



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**ANÁLISIS DEL MICROBIOMA INTESTINAL EN
PACIENTES CON SÍNDROME DE INTESTINO IRRITABLE**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA

DENISSE ADRIANA CARRILLO TORRES



CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX, 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor:** HERNANDEZ GOMEZ LUCIANO

VOCAL: **Profesor:** GILES GOMEZ MARTHA

SECRETARIO: **Profesor:** ORDUÑA ESTRADA PATRICIA

1er. SUPLENTE: **Profesor:** ORTEGA VAZQUEZ ALBERTO

2° SUPLENTE: **Profesor:** FLORES MORENO KAREN

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.

ASESOR DEL TEMA:

DRA. PATRICIA ORDUÑA ESTRADA

SUSTENTANTE:

DENISSE ADRIANA CARRILLO TORRES

ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN	1
LISTA DE ABREVIATURAS	2
INTRODUCCIÓN	4
1. Síndrome de Intestino Irritable	4
1.1 Fisiopatología del SII	5
1.1.1 Predisposición genética.....	5
1.1.2 Trastornos en la motilidad y sensibilidad visceral.....	5
1.1.3 Sistema inmunitario y trastornos de la barrera intestinal	5
1.1.4 Alimentación	6
1.1.5 Factores psicológicos	6
1.1.6 Sexo	7
1.1.7 Disbiosis	7
1.2 Clínica y diagnóstico	7
2. Microbiota intestinal y SII.....	10
2.1 Microbiota humana	10
2.2 Microbiota intestinal.....	12
2.3 Funciones de la microbiota intestinal	13
2.3.1 Metabolismo	13
2.3.2 Sistema Inmunológico	14
2.4 Disbiosis en el SII.....	15
3. Estudio del microbioma intestinal	18
3.1 Secuenciación del gen <i>16S ARNr</i>	20
JUSTIFICACIÓN	22
HIPÓTESIS	22
OBJETIVOS	23
OBJETIVO GENERAL	23
OBJETIVOS PARTICULARES.....	23
MATERIAL Y MÉTODOS	24
1. Población de estudio	24
2. Toma y almacenamiento de muestras	25

3. Extracción de ADN genómico	25
4. Secuenciación del gen 16S ARNr.....	26
5. Análisis de los datos de secuenciación.....	26
6. Generación de perfiles de abundancia	28
7. Análisis estadístico	28
RESULTADOS.....	29
1. Análisis de los datos de secuenciación	29
2. Perfiles K-mer.....	30
3. Curvas de Rarefacción	32
4. Análisis de coordenadas principales (PCoA).....	34
5. Composición de la microbiota intestinal en las muestras de estudio.....	37
DISCUSIÓN	44
CONCLUSIONES.....	54
PERSPECTIVAS.....	55
BIBLIOGRAFÍA	56
ANEXO I.....	57
Tabla 1. Resultados de la asignación taxonómica a nivel de Filo	57
Tabla 2. Resultados de la asignación taxonómica a nivel de Clase	57
Tabla 3. Resultados de la asignación taxonómica a nivel de Orden	57
Tabla 4. Resultados de la asignación taxonómica a nivel de Familia.....	57
Tabla 5. Resultados de la asignación taxonómica a nivel de Género	57

RESUMEN

El Síndrome de Intestino Irritable (SII) es el trastorno funcional gastrointestinal más frecuentemente diagnosticado en la práctica clínica, y es caracterizado por dolor abdominal asociado a cambios en la frecuencia y/o apariencia de las evacuaciones. Existen varios factores o mecanismos involucrados en la patogénesis del SII, entre ellos la disbiosis. En México, y en general para Latinoamérica no existen los suficientes estudios en los que se describa y caracterice la composición de la microbiota intestinal de pacientes con SII, mediante este estudio se pretende ampliar la información que se tiene para la población mexicana. Sobre esto, se espera que la composición microbiana se encuentre alterada en los principales grupos bacterianos, presentando un aumento en la abundancia de los filos *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria* y *Verrucomicrobia*; así como una disminución en el filo *Bacteroidetes*, en comparación con los sujetos control, teniendo como objetivo, identificar y analizar las comunidades microbianas presentes en la microbiota intestinal de pacientes con SII y sujetos control, a partir de datos metagenómicos obtenidos por secuenciación del gen *16S ARNr*. Para esto, se hizo uso del servidor MG-RAST, en el que se mostró que para el grupo de pacientes con SII presentó un menor número en el total de pares de bases, secuencias y longitud media de las secuencias, así como una menor cobertura K-mer y una menor abundancia en la riqueza de especies para pacientes con SII, a diferencia de los sujetos control. En los perfiles de abundancia bacteriana a nivel de Filo, Clase, Orden, Familia y Género se encontraron cambios entre los grupos de sujetos control y pacientes con SII. Revelando que hubo cambios significativos para una disminución de *Bacteroidetes* (filo) ($p=0.04$), *Bacteroidia* (clase) ($p=0.04$), *Bacteroidales* (orden) ($p=0.02$), y *Eubacteriaceae* (familia) ($p=0.04$), y un aumento para *Actinomycetales* (orden) ($p=0.02$).

LISTA DE ABREVIATURAS

5-HT	Serotonina
ACTH	Hormona adrenocorticotrópica
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNr	Ácido desoxirribonucleico ribosomal
AGCC	Ácidos grasos de cadena corta
ARN	Ácido ribonucleico
ARNr	Ácido ribonucleico ribosomal
BSH	Hidrolasa de Sales Biliares por sus siglas en inglés, Bile Salt Hydrolase
CRH	Hormona liberadora de hormona adrenocorticotrópica
EC	Enterocromafines
FODMAP	Fermentable, oligosacáridos, disacáridos, monosacáridos y polioles
GI	Gastrointestinal
HGM	Hospital General de México
HPA	Eje hipotalámico-pituitario-adrenal
kB	Kilobyte
KEGG	Enciclopedia de Genes y Genomas de Kioto por sus siglas en inglés, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
IL-x	Interleucina-x
MG-RAST	Anotación rápida metagenómica utilizando tecnología de subsistema, por sus siglas en inglés, Metagenomics Rapid Annotation using Subsystem Technology
NGS	Secuenciación de próxima generación, por sus siglas en inglés, Next-Generation Sequencing
nt	Nucleótido
OTU	Unidad Taxonómica Operativa, por sus siglas en inglés, Operational Taxonomic Unit
pb	Pares de bases

PCoA	Análisis de coordenadas principales, por sus siglas en inglés, Principal Coordinates Analysis
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa, por sus siglas en inglés, Polymerase Chain Reaction
SII	Síndrome de intestino irritable
SII-C	Síndrome de intestino irritable con constipación
SII-D	Síndrome de intestino irritable con diarrea
SII-E	Síndrome de intestino irritable con estreñimiento
SII-M	Síndrome de intestino irritable mixto
SII-NC	Síndrome de intestino irritable no clasificable
QC	Control de calidad por sus siglas en inglés, Quality Control
QIIME	Perspectivas cuantitativas de la ecología microbiana, por sus siglas en inglés, Quantitative Insights Into Microbial Ecology
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa, por sus siglas en inglés, Quantitative Polymerase Chain Reaction
SNP	Polimorfismo de Nucleótido Simple, por sus siglas en inglés, Single Nucleotide Polymorfism
TNF-α	Factor de Necrosis Tumoral alfa, por sus siglas en inglés, Tumor Necrosis Factor-alpha

INTRODUCCIÓN

El Síndrome de Intestino Irritable (SII) es el trastorno funcional gastrointestinal más frecuentemente diagnosticado en la práctica clínica.

La prevalencia mundial de este síndrome reportada para el año 2021 es del 10% al 20% (Zeledón et al., 2021). Mientras que, para México, la prevalencia reportada del SII, también para el año 2021 varía del 4.4 al 35%, esta amplia variación en los resultados epidemiológicos en nuestro país se explica por los criterios de Roma, los cuales son el estándar actual para diagnosticar el SII (Zeledón et al., 2021), Ver inciso 1.2. Algunos estudios han señalado que los criterios de Roma III parecen tener una baja sensibilidad para identificar casos de SII. Acorde con lo anterior, en el 2014, Amieva-Balmori y cols., reportaron una prevalencia del 4.4% utilizando los criterios de Roma III, lo que contrasta con prevalencias de hasta el 35% obtenidas en estudios que usaron los criterios de Roma II (Amieva-Balmori et al., 2014).

1. Síndrome de Intestino Irritable

El SII se define como un trastorno funcional crónico y recurrente que se caracteriza por dolor abdominal asociado a cambios en la frecuencia o en la apariencia de las evacuaciones (Carmona-Sánchez et al., 2016). Se presenta en todos los grupos de edad incluyendo niños y ancianos, con una mayor frecuencia a la edad de 30 a 50 años. Y aunque la enfermedad no se considera genética, existen estudios de agregación familiar que revelan doble riesgo en pacientes con familiares de primer grado con SII (García-Zermeño y Remes-Troche, 2018).

Este síndrome afecta a ambos sexos, no obstante, aproximadamente el 60-75% de los afectados son mujeres. Por otra parte, el nivel socio económico de los pacientes que sufren del SII es variable, sin embargo, existe una alta prevalencia en el nivel socioeconómico bajo (Guía de Práctica Clínica, 2015).

Esta enfermedad tiene un impacto negativo en la calidad de vida de las personas y productividad laboral, además de que es una carga socioeconómica importante para la sociedad.

1.1 Fisiopatología del SII

La fisiopatología del SII es compleja y se considera multifactorial. Existen diversos factores y mecanismos involucrados en la patogénesis del SII capaces de ejercer influencia en el eje bidireccional cerebro-intestino, así como en el intestino de manera local. Estos pueden ser:

1.1.1 Predisposición genética

Muchos pacientes con SII refieren tener familiares con el mismo diagnóstico. Las investigaciones se han centrado en tratar de identificar posibles marcadores genéticos. De hecho, se ha sugerido que un polimorfismo genético en el promotor de la región del gen *SLC6A4* que codifica el transportador de recaptación de serotonina (SERT) podría estar asociado con el SII (Zeledón et al., 2021).

1.1.2 Trastornos en la motilidad y sensibilidad visceral

En pacientes con SII se ha demostrado que hay un aumento de retención de gas acompañado de una disminución en la velocidad del tránsito intestinal desde el duodeno hasta el recto. Este aumento de los niveles de gas acompañado del tiempo de tránsito intestinal causa un aumento en la sensación de distensión abdominal y dolor visceral en estos pacientes (Zeledón et al., 2021).

1.1.3 Sistema inmunitario y trastornos de la barrera intestinal

En muestras de plasma de pacientes con SII se han observado niveles elevados de citocinas proinflamatorias como IL-6, IL-8, IL-1 β y TNF- α , y niveles bajos de IL-10, una citocina antiinflamatoria (Mishima e Ishihara, 2020). La inflamación provocada

por estos factores causa un aumento en la permeabilidad de la barrera intestinal con una consecuente pérdida de fluido intersticial hacia la luz intestinal, lo que puede explicar la aparición súbita de diarrea y estreñimiento al normalizarse sus niveles (Zeledón et al., 2021).

Las citocinas proinflamatorias, cuando alcanzan una concentración de 10nM, se unen a sus receptores específicos en el cerebro y por medio de vías fisiológicas diferentes como la neuroendocrina se inicia con la secreción de la CRH que estimula la actividad del eje hipotalámico-pituitario-adrenal (HPA), para dar lugar a un aumento en ACTH y cortisol. La alternancia de esta vía se asocia con trastornos psicológicos como la depresión y también con hipersensibilidad visceral en el SII (Mishima e Ishihara, 2020; Pavón et al., 2004).

1.1.4 Alimentación

Los alimentos también pueden ser desencadenantes de los síntomas del SII. Por ejemplo, la fermentación de carbohidratos de cadena corta puede llevar a una mayor producción de gas en el tracto intestinal, sensibilidad alimentaria no inmune y alteraciones en la motilidad intestinal (Carmona-Sánchez et al., 2016).

Adicionalmente, algunos pacientes con SII han reportado un beneficio sintomático al reducir las cantidades de oligosacáridos fermentables, disacáridos, monosacáridos y polioles (FODMAP) en su dieta. Estas moléculas tienen un efecto osmótico, lo que aumenta la carga de líquido en el tracto gastrointestinal y la distensión intestinal (Zeledón et al., 2021).

1.1.5 Factores psicológicos

El estrés, la ansiedad o la depresión se asocian con frecuencia al SII y a la exacerbación de síntomas. La interacción entre el sistema nervioso central y el sistema entérico es importante en la fisiopatología del SII y funciona de manera bidireccional. El sistema nervioso central puede alterar la fisiología intestinal, como la motilidad o la sensibilidad visceral. Del mismo modo, los cambios en el intestino

pueden dar retroalimentación al cerebro, lo que resulta en efectos sobre el bienestar psicológico y la salud del paciente (Zeledón et al., 2021).

1.1.6 Sexo

Actualmente se sabe que existe una mayor prevalencia del SII en pacientes del sexo femenino. Esta observación se ha asociado a las variaciones biológicas en las hormonas sexuales, los mecanismos serotoninérgicos, las vías del dolor, los problemas psicosociales y la comorbilidad uroginecológica que presentan las mujeres (Zeledón et al., 2021).

1.1.7 Disbiosis

En los últimos años, se ha evidenciado que el cambio en la biodiversidad, riqueza y composición de la microbiota intestinal (proceso llamado disbiosis) juega un papel clave en la patogénesis del SII. En pacientes con SII, la disbiosis gastrointestinal se ha asociado con un aumento de la percepción visceral del dolor y una mayor permeabilidad de la mucosa provocada por defectos en la barrera epitelial, lo que interfiere con la homeostasis inmune intestinal y posteriormente promueve la inflamación intestinal y aumenta la activación inmunitaria en el epitelio y la mucosa intestinal. También se ha asociado con cambios en la motilidad intestinal y alteraciones del sistema nervioso entérico (García-Zermeño y Remes-Troche, 2018).

1.2 Clínica y diagnóstico

Los síntomas clínicos son imprecisos para establecer el diagnóstico del SII, pero el dolor abdominal es a menudo su principal síntoma, así como la distensión abdominal que está asociada a un aumento en la cantidad de gas intestinal que puede llevar a un aumento del meteorismo. Sin embargo, existen una amplia variedad de síntomas documentados en estos pacientes incluyendo

manifestaciones gastrointestinales y extraintestinales. Los síntomas gastrointestinales son: dolor abdominal crónico, hábitos intestinales alterados (diarrea o constipación o alternancia de estos), reflujo gastroesofágico, disfagia, saciedad temprana, dispepsia intermitente, náuseas, dolor precordial de origen no cardíaco, flatulencia y eructos. Por otra parte, los síntomas extraintestinales son: depresión mayor, ansiedad, desorden somatomorfo, insomnio, disfunción sexual y dispareunia, dismenorrea, incremento en la frecuencia urinaria, urgencia urinaria, síntomas de asma y cefalea primaria (Guía de Práctica Clínica, 2015). Adicionalmente, la frecuencia y la forma de las deposiciones está directamente relacionada al subtipo de SII que se padezca.

Para su correcto diagnóstico, el inicio de los síntomas debe ocurrir al menos 6 meses antes y los síntomas deben estar presentes durante los últimos 3 meses (Mearin et al., 2017).

Los criterios de diagnóstico de Roma son derivados de un consenso de expertos y son útiles para el diagnóstico de trastornos gastrointestinales funcionales. Se han utilizado en el campo de la gastroenterología desde 1990 (Simren et al., 2017). A lo largo de los años ha sido necesario actualizar los criterios periódicamente, por lo que se tienen los criterios de Roma I, II, III y IV.

Entre los cambios relevantes en la actualización de los criterios de Roma III (2006) a Roma IV (2016) para el diagnóstico del SII, está la eliminación del síntoma “malestar abdominal” ya que es inespecífico, además de que el término “discomfort” (en inglés) tiene diferentes significados en diferentes idiomas y es un término ambiguo para los pacientes (Schmulson y Drossman, 2017). Otro cambio importante es el límite de la frecuencia de los síntomas: en los criterios de Roma IV se especifica que el dolor abdominal debe presentarse por lo menos 1 vez a la semana en promedio durante el mes anterior a la aplicación del cuestionario; mientras que, en los criterios de Roma III se describe que el dolor abdominal debe presentarse al menos 3 veces al mes (Simren et al., 2017).

Los criterios más recientes para la clasificación del SII son los de Roma IV; en base a estos, el SII puede ser clasificado dentro de cuatro subtipos basados en el

predominio del patrón de las evacuaciones: SII con diarrea (SII-D), SII con estreñimiento (SII-E) o constipación (SII-C), SII mixto (SII-M) y SII no clasificable (SII-NC), Ver Tabla 1, (García-Zermeño y Remes-Troche, 2018).

Tabla 1. Criterios de diagnóstico para los diferentes subtipos de SII de acuerdo con los criterios de Roma IV (Schmulson y Drossman, 2017).

Subtipo de SII	Criterios
SII-E	Más de una cuarta parte (25%) de las deposiciones con los tipos 1-2 de la escala de heces de Bristol y menos de una cuarta parte (25%) con los tipos 6-7.
SII-D	Más de una cuarta parte (25%) de las deposiciones con los tipos 6-7 de la escala de heces de Bristol y menos de una cuarta parte (25%) con los tipos 1-2.
SII-M	Más de una cuarta parte (25%) de las deposiciones con los tipos 1-2 de la escala de heces de Bristol y más de una cuarta parte (25%) con los tipos 6-7.
SII-NC	Los pacientes con SII-NC cumplen los criterios de diagnóstico para SII, pero sus hábitos intestinales no se pueden clasificar con precisión en ninguno de los subtipos anteriores.

Además de los criterios de Roma, se utiliza la escala de Bristol como herramienta en el diagnóstico del SII, esta escala caracteriza las heces en 7 diferentes tipos, ver Figura 1.

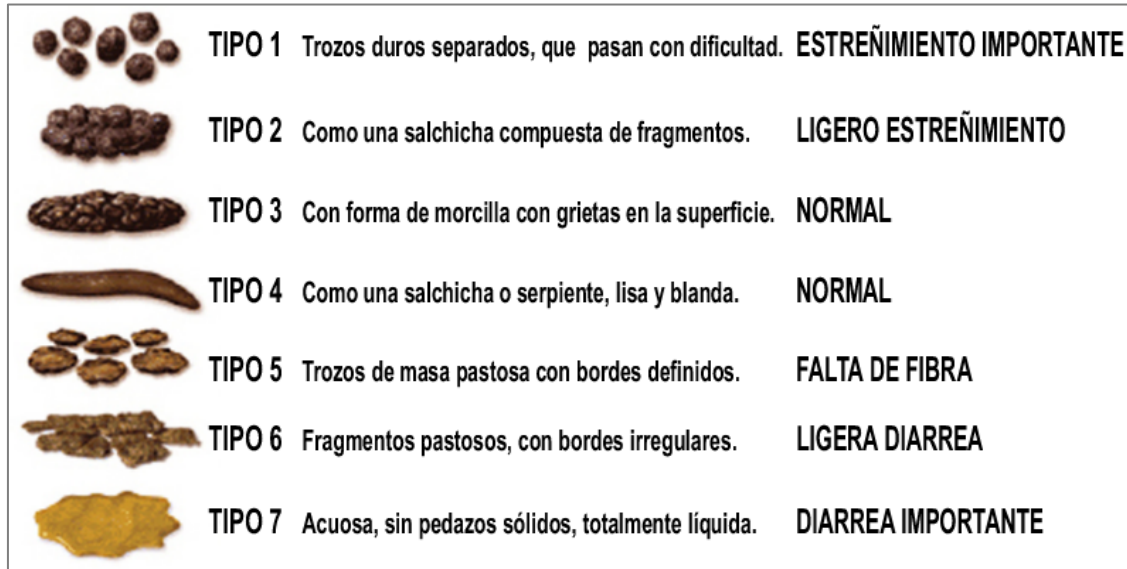


Figura 1. Escala de heces de Bristol (Editado de Ilce, 2014).

2. Microbiota intestinal y SII

2.1 Microbiota humana

La microbiota humana se define como el conjunto de microorganismos (bacterias, virus, arqueas y microorganismos eucariontes) que de forma simbiote conviven y se desarrollan en el cuerpo humano (García-García-de-Paredes et al., 2015; Young, 2017). Estos microorganismos codifican para más de 3 millones de genes, el estudio de estos genes y el ecosistema en el que se encuentran se denomina microbioma. Así, el término microbioma se refiere a la microbiota y a la función que cumple dentro de dicho entorno (Moreno del Castillo et al., 2018).

La diversidad microbiana varía según el sitio anatómico, la complejidad y las funciones agregadas de las comunidades microbianas y se correlaciona con el estado de salud, genotipo, dieta e higiene de un individuo (Cho y Blaser, 2012). Así,

distinguimos la microbiota cutánea, la microbiota vaginal, la microbiota respiratoria, la microbiota oral y la microbiota intestinal. En la Figura 2 se muestra la proporción relativa de secuencias determinadas a nivel de filo bacteriano en ocho sitios anatómicos.

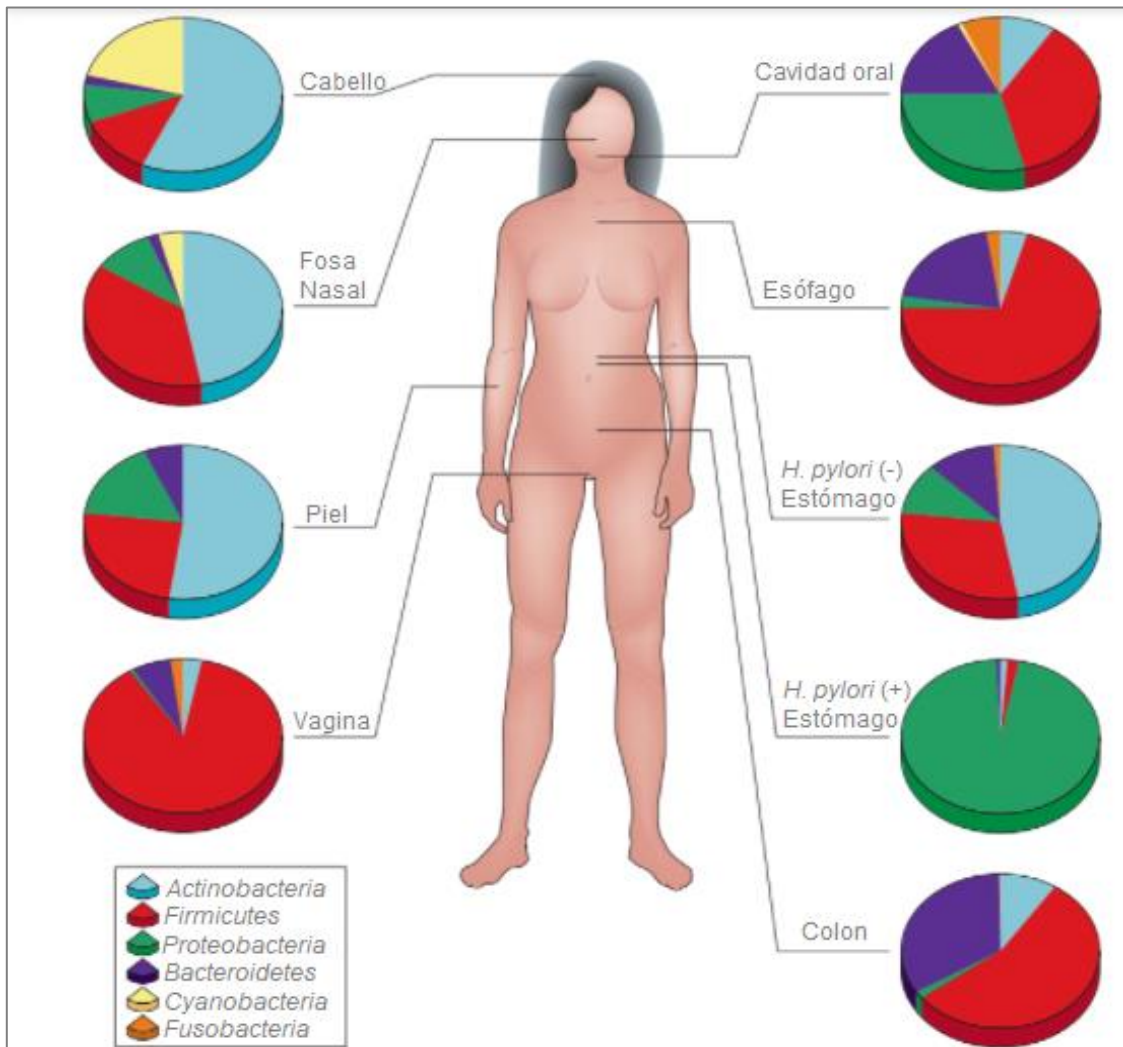


Figura 2. Proporción de filos bacterianos en diferentes sitios anatómicos, donde (+) significa presencia y (-) significa ausencia (Editado de Cho y Blaser, 2012).

2.2 Microbiota intestinal

La mayor diversidad de la microbiota humana reside en el intestino con alrededor de 10^{14} microorganismos y es denominada microbiota intestinal, siendo la más estudiada debido a la relación que presenta con diversas funciones fisiológicas (Peterson et al., 2009). En el tracto gastrointestinal, los filos bacterianos predominantes son *Firmicutes*, *Bacteroidetes* y *Proteobacteria* (ver Figura 2). No obstante, el microbioma intestinal se refiere no solo a los microorganismos que ahí residen, también incluye elementos del hospedero como el epitelio, componentes inmunes y productos tanto de los microorganismos como del hospedero, incluidos los metabolitos (Young, 2017).

En el intestino se han caracterizado cientos de cepas bacterianas y con esto más de 9 millones de genes que comprenden más de 3,000 millones de células bacterianas. Esto representa aproximadamente 0.5-2 kg del peso corporal total de cualquier individuo (Moreno del Castillo et al., 2018).

Actualmente se sabe que la densidad microbiana va aumentando a medida que avanzamos por el tracto gastrointestinal. Así, en el duodeno la densidad es de alrededor de 10^3 células/ml (principalmente *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Escherichia* y *Corynebacterium*), en el yeyuno es de alrededor de 10^5 células/ml y en el colon asciende hasta 10^{12} células/ml (predominando *Bacteroidetes* y *Firmicutes*). Siendo estos últimos los filos dominantes en la microbiota de un individuo sano, seguidos por *Actinobacteria* y *Verrucomicrobia*. Finalmente, el filo *Proteobacteria* supone una pequeña parte de las bacterias intestinales en personas sanas (García-García-de-Paredes et al., 2015).

La composición de esta comunidad microbiana es específica del huésped, evoluciona a lo largo de la vida del individuo y puede cambiar por estímulos tanto exógenos como endógenos, tales como factores genéticos, la edad, el embarazo, la dieta, el uso de antibióticos, el tipo de nacimiento y el estrés (Cerdá et al., 2016).

2.3 Funciones de la microbiota intestinal

La microbiota intestinal lleva a cabo múltiples actividades metabólicas que van desde el catabolismo y la bioconversión de moléculas complejas hasta la síntesis de una amplia gama de compuestos que pueden tener efectos tanto en la microbiota como en el hospedero. A continuación, se describen dos de sus principales funciones.

2.3.1 Metabolismo

Los microorganismos suponen un reservorio de funciones metabólicas adicionales, de otra forma inaccesibles al hospedero. La microbiota tiene la capacidad de fermentar oligosacáridos no digeribles y como resultado la síntesis de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) como n-butilato, acetato y propionato (Jandhyala et al., 2015).

Los AGCC son sustratos de los colonocitos, precursores del colesterol y sustratos de la gluconeogénesis en el hígado, lo cual optimiza el aprovechamiento de la energía de la dieta (Icaza-Chávez, 2013). Estos AGCC están involucrados en el eje intestino-cerebro, pues se unen a receptores específicos de células intestinales endocrinas (GRP43 y GRP41) que estimulan la liberación del péptido YY (PYY) y 5-hidroxitriptamina (5-HT) (Monda et al., 2017), el cual retarda el tránsito intestinal aumentando la absorción de nutrientes e incrementando los niveles de la hormona leptina (Icaza-Chávez, 2013).

La microbiota también participa en el metabolismo de carbohidratos mediante la degradación de polisacáridos como celulosa y pectina (Hemarajata et al., 2013). Varios miembros del filo *Bacteroidetes*, asimilan fácilmente hidratos de carbono de la dieta, ya que poseen vías metabólicas para estos (Hemarajata et al., 2013).

En general, los microorganismos, tienen acceso a abundantes fuentes de carbono fermentables que pueden usar como sustratos de hidratos de carbono complejos para sostener comunidades microbianas viables. Algunas especies de

bifidobacterias son fermentativas y forman principalmente ácido láctico y acético a través del catabolismo de los carbohidratos, en particular los oligosacáridos (Tabbers et al., 2011). Así mismo, contienen genes que codifican enzimas que degradan glicanos. El género *Bacteroides* contiene especies que son sacarolíticas, fermentan azúcares o proteínas, dependiendo de la especie, a acetato y succinato como los principales productos de fermentación. Y algunas otras bacterias como las bifidobacterias y lactobacilos son capaces de fermentar la lactosa, el disacárido presente en la leche, para la producción de ácido láctico (Ochoa, 2013).

También la microbiota participa en reacciones como la conversión de ácidos biliares en el intestino. Estos compuestos, sintetizados en el hígado y secretados como sales biliares conjugadas, pueden sufrir conversaciones mediadas por la microbiota dentro del intestino para liberar bilis no conjugada y generar ácidos biliares secundarios (Cerdá et al., 2016).

La microbiota intestinal también interviene en la producción y absorción de vitaminas esenciales como el ácido fólico y la vitamina K (Ochoa, 2013). Además, se ha demostrado que la microbiota intestinal contribuye a generar un metaboloma saludable en el suero al aumentar las concentraciones de ácido pirúvico, ácido cítrico, ácido fumárico y ácido málico, los cuales son indicadores de un alto metabolismo energético (Jandhyala et al., 2015).

2.3.2 Sistema Inmunológico

La microbiota intestinal ejerce un importante efecto sobre la respuesta inmune del humano. Una gran diversidad de estudios comparativos en la que utilizan animales criados de forma convencional y libres de gérmenes revelan que la presencia de microbiota es importante para el desarrollo y la regulación del sistema inmune innato y adaptativo (Min y Rhee, 2015). La “teoría de la higiene” supone que el exceso de limpieza y la disminución en la exposición a las bacterias a temprana edad impide el correcto desarrollo de los mecanismos inmunorreguladores, que previenen las

respuestas inapropiadas de las células T y las enfermedades inflamatorias posteriores (Icaza-Chávez, 2013).

La microbiota puede modificar las respuestas epiteliales y sistémicas, así como el desarrollo y la actividad del sistema inmunológico. La dieta y los efectos de esta en la microbiota intestinal y en la respuesta inmune se han postulado como posibles explicaciones para el incremento en la incidencia de enfermedades inflamatorias (Icaza-Chávez, 2013).

Además, el microbioma contribuye en la resistencia a la colonización, donde protege al hospedero preservando la integridad de la barrera de la mucosa intestinal al inhibir la adhesión y el crecimiento de microorganismos enteropatógenos. Por lo tanto, existe una simbiosis precisa e intrincada entre hospedero-microorganismo, y cualquier alteración de esta simbiosis puede tener efectos perjudiciales en ambos. Para el hospedero, la alteración de esta simbiosis puede conducir a una variedad de estados de enfermedad (Cerdá et al., 2016).

2.4 Disbiosis en el SII

Disbiosis es el término que se emplea para referirse a los cambios en la composición y/o funciones de la microbiota (Lynch y Pedersen, 2016). Y en el caso de la microbiota intestinal, la disbiosis juega un papel importante en el desarrollo de un estado inflamatorio crónico (Icaza-Chávez, 2013). Así mismo, se ha visto que la reducción de las poblaciones dominantes favorece el aumento de patógenos oportunistas (Zamudio-Tiburcio et al., 2017). La disbiosis puede tener lugar a través de varios mecanismos: el sobrecrecimiento o desaparición de especies específicas de bacterias, alteraciones en la riqueza relativa de bacterias y, por último, por mutación o transferencia de genes (Mari et al., 2020).

En el caso del SII, diversos estudios muestran que la microbiota intestinal de estos pacientes es distinta a la de sujetos sanos, aunque aún no se ha logrado identificar un perfil microbiológico específico (Moreno del Castillo et al., 2018; Young, 2017).

Si bien no existe una “firma” específica, recientemente se ha demostrado que los pacientes con SII con síntomas severos se caracterizan por tener una microbiota menos abundante y/o diversa en comparación con los sujetos control (Mishima e Ishihara, 2020).

En la tabla 2 se muestran algunos de los estudios donde se describe la microbiota en pacientes con SII. La variabilidad observada en estos estudios puede deberse a la heterogeneidad del SII y a los diferentes métodos empleados para la caracterización de la microbiota intestinal. Así como a la población y el tipo de muestra estudiada (M. Schmulson et al., 2014). Es de resaltar que dos de los estudios mostrados fueron realizados en población mexicana, siendo de los pocos estudios que se tienen sobre la diversidad microbiana representativa del SII en esta población, obteniendo resultados similares a los de los otros estudios.

Tabla 2. Estudios sobre la alteración de la microbiota intestinal en sujetos con SII.

Estudio	Sujetos	Muestra	Técnica	Hallazgos
Rajilić-Stojanović et al., 2015	62 sujetos SII 46 sujetos control	Muestras fecales	Microarreglo filogenético y qPCR	↑ <i>Ruminococcus</i> ↑ <i>Clostridium</i> ↑ <i>Dorea</i>
Durbán et al., 2012	16 sujetos SII 9 sujetos control	Biopsias de mucosa de colon y heces	Secuenciación por 16S ARNr	↑ <i>Bacteroides</i> ↓ <i>Eubacterium</i> ↓ <i>Fusobacterium</i> ↓ <i>Neisseria</i> ↓ <i>Streptococcus</i> ↓ <i>Veillonella</i> ↑ <i>Enterobacteriaceae</i>
Carroll et al., 2012	23 sujetos SII 23 sujetos control	Muestras fecales	Secuenciación por 16S ARNr	↑ <i>Enterobacteriaceae</i> ↓ <i>Faecalibacterium</i>
Jeffery et al., 2012	37 sujetos SII 15 sujetos control	Muestras fecales	Pirosecuenciación	↓ <i>Bacteroidetes</i> ↑ <i>Firmicutes</i> ↑ <i>Actinobacteria</i> ↑ <i>Bifidobacteriaceae</i> ↑ <i>Clostridium</i>
Shukla et al., 2015	47 sujetos SII 30 sujetos control	Muestras fecales	qPCR	↑ <i>Lactobacillus</i> ↑ <i>Bacteroides thetaiotamicron</i> ↑ <i>Veillonella</i> ↓ <i>Bifidobacterium</i>
Rangel et al., 2015	33 sujetos SII 16 sujetos control	Biopsias de mucosa y heces	Microarreglo filogenético	↓ <i>Bacteroidetes</i> ↑ <i>Actinobacteria</i> ↑ <i>Proteobacteria</i> ↑ <i>Bacilli</i> ↑ <i>Clostridium</i>
Chung et al., 2016	28 sujetos SII 19 sujetos control	Biopsias de mucosa de yeyuno y heces	Secuenciación de próxima generación	↑ <i>Firmicutes</i> ↑ <i>Proteobacteria</i> ↓ <i>Bacteroidetes</i> ↓ <i>Actinobacteria</i> ↓ <i>Fusobacteria</i> ↑ <i>Veillonaceae</i> ↑ <i>Prevotellaceae</i>
Tap et al., 2017	Cohorte 1: 110 sujetos SII, 39 sujetos control Cohorte 2: 29 sujetos SII, 17 sujetos control	Muestras fecales y biopsias de mucosa	Secuenciación por 16S ARNr	↑ <i>Clostridiales</i> ↓ <i>Prevotella</i> ↑ <i>Bacteroides</i>
*Schmulson et al., 2017	5 sujetos SII 5 sujetos control	Biopsias de mucosa de colon	Secuenciación de próxima generación	↓ <i>Bacteroidetes</i> ↑ <i>Firmicutes</i> ↑ <i>Proteobacteria</i> ↑ <i>Actinobacteria</i> ↓ <i>Actinomycetales</i> ↑ <i>Clostridium</i>
*Arredondo-Hernández et al., 2020	5 sujetos SII 5 sujetos control	Biopsias de mucosa de colon	Secuenciación shotgun	↓ <i>Bacteroidetes</i> ↑ <i>Proteobacteria</i> ↑ <i>Actinobacteria</i> ↑ <i>Faecalibacterium</i> ↑ <i>Enterococcus</i>
Barandouzi et al., 2021	80 sujetos SII 21 sujetos control	Muestras fecales	Secuenciación por 16S ARNr	↑ <i>Prevotella</i> ↑ <i>Verrucomicrobiaceae</i> ↑ <i>Bacilli</i> ↑ <i>Erysipelotrichi</i> ↑ <i>Lactobacillales</i>
Mei et al., 2021	30 sujetos SII 30 sujetos control	Muestras fecales	Secuenciación por 16S ARNr	↑ <i>Proteobacteria</i> ↓ <i>Firmicutes</i> ↓ <i>Fusobacteria</i> ↓ <i>Actinobacteria</i>

*Estudios realizados en México

La disbiosis en el SII se caracteriza, además de presentar una diversidad microbiana reducida, por un cambio en la producción de diversos metabolitos en la que participan un sinnúmero de bacterias, como lo es, una disminución en la producción de AGCC. En específico, existe una gran cantidad de evidencia de alteraciones en el metabolismo del butirato y/o bacterias productoras de butirato en pacientes con SII (Sultan et al., 2021).

Así mismo se ha visto que por el lado de ácidos biliares, una malabsorción está relacionado con la diarrea, donde el reciclaje defectuoso o la sobreproducción de ácidos biliares pueden aumentar su concentración en colon (James et al., 2020).

La alteración en la producción de metabolitos, o en concentraciones de neurotransmisores, enzimas y componentes endocrinos derivados de microorganismos intestinales se ha relacionado con el aumento de síntomas del SII (Mishima e Ishihara, 2020). De manera general, la producción excesiva o insuficiente de estos metabolitos, en comparación con las cantidades homeostáticas normales, podría indicar alteraciones en vías importantes para el intestino y la salud en general (James et al., 2020). Además, la disbiosis que se presenta en el SII tiene un impacto metabólico potencial en los colonocitos y esto puede ser la base de la progresión de la enfermedad (Sultan et al., 2021).

Estos hallazgos nos permiten corroborar que el SII está relacionado con el microbioma intestinal, ya que el ambiente creado a través de la interacción del hospedero-microorganismo se altera en esta condición.

3. Estudio del microbioma intestinal

El aislamiento, identificación y enumeración de la gran mayoría de microorganismos gastrointestinales utilizando técnicas convencionales basadas en cultivos es una tarea ardua. Anteriormente, utilizando técnicas basadas en cultivos, se podía aislar solo entre el 10% y el 25% de la microbiota intestinal y esto se debía a que la mayoría de los microorganismos del intestino son anaerobios. Posteriormente,

mejoras en las técnicas de cultivo permitieron identificar géneros dominantes como *Bacteroides*, *Clostridium* y *Bifidobacterium* (Jandhyala et al., 2015).

Otra forma de abordar el estudio del microbioma intestinal es a través de las técnicas denominadas “ómicas” o “meta-ómicas”. Por un lado, se puede analizar el contenido global de ADN extraído de una muestra (habitualmente heces) y compararlo con alguna de las bases de datos existentes (MetaHit o Human Microbiome Project), las cuales incluyen genes de ARN ribosómico de diferentes microorganismos (16S procariota y 18S eucariota). Esta primera aproximación es la genómica (García-García-de-Paredes et al., 2015). Además, también es posible analizar el ARN mensajero producido por la transcripción de estos genes (transcriptómica) y compararlo con bases de datos de ARN o de ADN complementario (tales como SILVA y RDP). Una tercera aproximación consiste en estudiar en las muestras los productos finales (pequeñas moléculas como proteínas, vitaminas, etc.) resultantes del metabolismo microbiano mediante espectroscopia de masas (metabolómica) (García-García-de-Paredes et al., 2015).

Actualmente existen numerosos estudios que describen el microbioma humano en diferentes estados biológicos utilizando la técnica de secuenciación del gen *16S ARNr*. Estos estudios han permitido identificar una amplia diversidad en la microbiota de los individuos; sin embargo, existen limitaciones en el enfoque de secuenciación del gen *16S ARNr* que han llevado en estudios más recientes a examinar la complejidad de las muestras mediante la secuenciación de bibliotecas genómicas elaboradas a partir de ADN extraído directamente de la muestra mixta. Este enfoque se denomina "metagenómica" (Peterson et al., 2009).

Los análisis metagenómicos están jugando un papel decisivo en la caracterización de las comunidades microbianas humanas, así como en la determinación de la relación entre el microbioma residente y los patógenos. La metagenómica no solo ayuda a identificar y caracterizar el microbioma intestinal humano, sino que también permite identificar genes y vías microbianas (Malla et al., 2019).

Con el surgimiento de las tecnologías de secuenciación masiva, conocidas como “Next Generation Sequencing” (NGS), se pueden secuenciar millones de moléculas

de ADN de manera simultánea, lo que facilita en gran medida el estudio de la diversidad microbiana (Cortés-López et al., 2021). El primer método de secuenciación de nueva generación fue lanzado en el 2005 por la empresa Roche, basado en la pirosecuenciación. En 2006 la empresa Illumina publicó un nuevo método de secuenciación de nueva generación basado en un tipo de amplificación conocida como PCR de puente. Ambos métodos son más eficientes que la secuenciación de Sanger, ya que la secuenciación se realiza simultáneamente en millones de fragmentos de ADN, aumentando el rendimiento (Vázquez, 2016).

Por otro lado, los métodos de secuenciación tipo “shotgun” se consideran superiores para la identificación y caracterización de comunidades microbianas, ya que permiten identificar un mayor nivel de diversidad en comparación con la secuenciación por amplicones (Malla et al., 2019). Este tipo de secuenciación tiene la particularidad de secuenciar todo el ADN presente en la muestra y se pueden clasificar los microorganismos taxonómicamente hasta el nivel de especie. Por otro lado, la secuenciación por amplicones tiene como limitante que la anotación se basa en la asociación putativa del gen *16S ARNr* con un taxón definido como una Unidad Taxonómica Operativa (OTU). En general, las OTU se analizan a nivel de filo o género y pueden ser menos precisas a nivel de especie (Ranjan et al., 2016).

3.1 Secuenciación del gen *16S ARNr*

El *16S ARNr* es un polirribonucleótido de aproximadamente 1 500 nt, codificado por el gen *rrs*, también denominado ADN ribosomal 16S (*ADNr 16S*). La subunidad 16S del ARN ribosomal es considerada como la diana universal para la identificación bacteriana por sus características y propiedades que permiten la caracterización taxonómica de las bacterias, logrando discernir hasta nivel de género y en algunos casos de especie (Suárez, 2017).

La región 16S del ARNr es muy conservada; sin embargo, posee 9 sitios hipervariables (V1-V9, ver Figura 3) que son suficientes para diferenciar miles de

especies bacterianas. Las regiones más comunes para la identificación de bacterias son la V3, V4, V6 y V8 (Jandhyala et al., 2015).

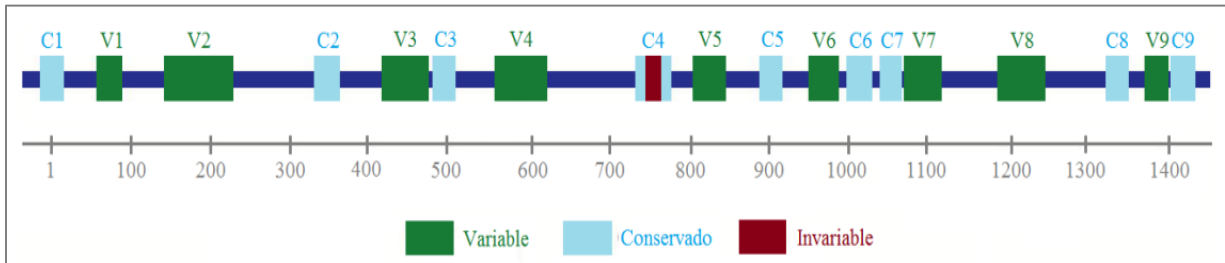


Figura 3. Imagen representativa del gen 16S ARNr, se indican las regiones variables (V1-V9), las conservadas (C1-C9) y la invariable, comunes en todas las bacterias (Izquierdo, 2015).

Existen ciertas características relevantes del 16S ARNr que permiten su uso como herramienta filogenética y taxonómica (Rodicio et al., 2004):

1. Se trata de una molécula muy antigua presente en todas las bacterias actuales, por tanto, constituye una diana universal para su identificación.
2. Su estructura y función han permanecido constantes durante un tiempo muy prolongado.
3. Los cambios ocurren lo suficientemente lento, como para aportar información acerca de todos los procariotes y, junto con las variaciones en los ARNr 18S, a lo largo de toda la escala evolutiva. Los ARNr SSU (del inglés, small subunit) contienen suficiente variabilidad para diferenciar no sólo los organismos más alejados, sino también los más próximos.
4. Dado que resulta relativamente fácil secuenciar, existen bases de datos amplias y en continuo crecimiento.

JUSTIFICACIÓN

En la actualidad existe un gran número de estudios en los que se analiza la diversidad del microbioma humano, así como su cambio y su relación con la etiología de diversas enfermedades. En específico, para la población mexicana, no se cuentan con los suficientes estudios para conocer y describir la composición del microbioma intestinal en pacientes con Síndrome de Intestino Irritable.

En este estudio se busca determinar la composición de la microbiota a diferentes niveles taxonómicos en pacientes con Síndrome de Intestino Irritable con la finalidad de ampliar el conocimiento actual.

HIPÓTESIS

El microbioma intestinal de pacientes con Síndrome de Intestino Irritable presentará una mayor abundancia de los filos *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria* y *Verrucomicrobia*, y una disminución del filo *Bacteroidetes*, en comparación con los sujetos control.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Identificar y analizar las comunidades microbianas presentes en la microbiota intestinal de pacientes con Síndrome de Intestino Irritable y sujetos control, a partir de datos metagenómicos obtenidos por secuenciación del gen *16S ARNr*.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar la composición de la microbiota intestinal en 3 sujetos control y 4 pacientes con Síndrome de Intestino Irritable.
- Analizar los cambios presentes en la microbiota intestinal de pacientes con Síndrome de Intestino Irritable.
- Establecer la disbiosis presente en pacientes con Síndrome de Intestino irritable.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Población de estudio

En este proyecto se analizaron los datos de secuenciación generados previamente en el Laboratorio de Microbioma de la Facultad de Medicina de la UNAM. Para este análisis fueron incluidos en el estudio 3 sujetos control y 4 pacientes con SII. Los sujetos control fueron sujetos clínicamente sanos, sin ninguna enfermedad aparente, que no presentaron síntomas o cualquier otro trastorno gastrointestinal.

El reclutamiento de los sujetos se realizó en el Servicio de Endoscopia del Hospital General de México “Eduardo Liceaga” (HGM). Todos los participantes firmaron un consentimiento informado y el protocolo fue aprobado por los comités de investigación y ética de la Facultad de Medicina (125/2014) y del Hospital General de México “Eduardo Liceaga” (DI/15/UME/03/33) (Santiago, 2017; Fitz, 2021).

A continuación, en la tabla 3 se muestran los criterios de inclusión y exclusión usados para los grupos de estudio.

Tabla 3. Criterios de inclusión y exclusión de la población de estudio (Santiago, 2017)

INCLUSIÓN	EXCLUSIÓN
1. Edad entre 18 y 65 años, de ambos géneros.	1. Que presenten trastornos de la coagulación que contraindiquen la toma de biopsias por colonoscopia.
2. Que llenen el Cuestionario de Roma III para determinar el diagnóstico de Trastornos Funcionales Gastrointestinales Digestivos, el Cuestionario de Spiller para SII-PI y el Cuestionario de Severidad del SII (IBS-SSS).	2. Que hayan tomado antibióticos, inhibidores de la bomba de protones, antiácidos, probióticos, prebióticos o antidiarreicos durante los 3 meses anteriores al estudio.
3. Que provean una muestra de materia fecal antes de llevar a cabo la preparación de limpieza del colon para la colonoscopia	3. Que presenten enfermedades en tratamiento con inmunosupresores.

2. Toma y almacenamiento de muestras

Para este estudio se tomaron cuatro biopsias de colon descendente. Las muestras se colocaron en criotubos conteniendo 500 µl de solución de RNAlater y se transportaron a temperatura ambiente del HGM al laboratorio de Microbioma de la Facultad de Medicina, en donde se almacenaron a -70°C hasta su procesamiento.

3. Extracción de ADN genómico

Debido a la naturaleza de las muestras, antes de comenzar con la extracción del ADN, fue necesario realizar un pretratamiento con el objetivo de lisar el tejido y facilitar la extracción. Para ello, las muestras fueron descongeladas a temperatura ambiente. Posteriormente, con una punta de plástico se retiró la solución de preservación y las muestras se dejaron secar al aire en una campana de extracción de flujo laminar (Clase I, Marca Nuairé) sobre papel parafilm estéril durante 10 minutos. Las biopsias se pesaron en un microtubo, limpio y estéril.

Para la extracción de ADN se utilizó el QIAamp DNA mini kit (Qiagen), siguiendo el protocolo a partir de tejidos. Brevemente, a cada microtubo con las muestras se les agregó 450 µl de Buffer ATL y 20 µl de proteinasa K, se mezcló suavemente por inversión del tubo por 30 segundos, después de esto, se incubó a 56 °C durante 1 h y 15 min. aproximadamente, o hasta que el tejido se lisara completamente. Transcurrido este tiempo, se adicionó 10 µl de RNAsa [10 mg/ml], se mezcló por inversión el tubo y se incubó a 37 °C por 30 min. Posteriormente, se agregó 200 µl de Buffer AL, se mezcló por inversión el tubo y se incubó a 70 °C por 10 min. Enseguida se adicionó 200 µl de etanol frío al 100 % y se mezcló perfectamente en un vórtex.

Se realizó una transferencia del lisado obtenido al tubo con la columna (QIAamp DNA Mini) y se centrifugó a 8,000 rpm durante 1 min. Se cambió el tubo de recolecta y se añadió 500 µl de Buffer AW1, y se centrifugó a 8,000 rpm durante 1 min. Posteriormente, se colocó la columna de centrifugación (QIAamp DNA Mini) en un

nuevo tubo de recolecta, y se agregó 500 µl de Buffer AW2, después se centrifugó a 14,000 rpm por 3 min. Nuevamente se cambió el tubo de recolecta y se centrifugó a 14,000 rpm durante 1 min., esto con el fin de remover el exceso del Buffer AW2 y demás contaminantes. Finalmente, se colocó la columna en un tubo eppendorf de 1.5 ml limpio y estéril, se adicionó 100 µl Buffer AE, y se incubó a temperatura ambiente durante 5 min y a continuación se centrifugó durante 1 min. a 8,000 rpm, obteniendo de esta manera el ADN genómico total.

4. Secuenciación del gen 16S ARNr

La secuenciación se realizó siguiendo el protocolo 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation (Illumina) en Macrogen (Seúl, Korea), usando el sistema MiSeq de Illumina. Se generaron lecturas tipo paired-end (“forward” y “reverse”) y la longitud de estas fue de 301 pb. La construcción de las bibliotecas se realizó con el Nextera XT Index Kit V2 (Illumina) y se amplificaron las regiones V3 y V4 del gen *16S ARNr*.

5. Análisis de los datos de secuenciación

Las secuencias se analizaron empleando el servidor de código abierto MG-RAST (Metagenomic Rapid Annotations using Subsystems Technology, Meyer et al., 2008). El análisis se realizó en línea, subiendo las secuencias al servidor: <https://www.mg-rast.org/>. Se creó un estudio privado en el cual se realizó la carga de los 7 metagenomas (3 sujetos control y 4 pacientes con SII).

En este servidor se llevaron a cabo todos los procesos para el análisis de las secuencias. Brevemente, se realizó el control de calidad de las lecturas de secuenciación, donde se eliminaron las regiones de baja calidad, así como las lecturas duplicadas. En seguida, con el programa de alineamiento Bowtie (Langmead et al., 2009) se eliminaron aquellas lecturas que presentan coincidencias cercanas a genomas de organismos eucariontes (mosca, ratón, vaca

y humano) (Meyer et al., 2008). A este conjunto de pasos se le consideró como: **limpieza de datos.**

Después, con el uso del programa FragGeneScan se realizó la búsqueda de genes (Rho et al., 2010), identificando secuencias de proteínas, para luego llevar a cabo una búsqueda inicial en BLAT (Kent, 2002) donde se realizó un alineamiento con la finalidad de identificar ARN ribosómico en la base de datos SILVA (Pruesse et al., 2007). Las lecturas asociadas a secuencias del ARNr se agruparon con una identidad del 97%. A este conjunto de pasos se le consideró como: **Extracción de funciones o características.**

Posteriormente, utilizando la implementación UCLUST en QIIME se crearon grupos de proteínas con un 90% de identidad para identificar las funciones putativas y anotaciones de genes. La secuencia más larga de cada grupo se sometió a un análisis de similitud, usando sBLAT (Kent, 2002). Estas búsquedas de similitud de secuencia se calcularon con la base de datos de proteínas derivada del M5nr, la cual, es una base de datos no redundante integrada por otras bases como: GenBank (Benson et al., 2013), SEED (Overbeek et al., 2005), KEGG (Kanehisa et al., 2002), entre otras (Meyer et al., 2008). A este conjunto de pasos se le consideró como: **Anotación de funciones o características.**

A partir del análisis realizado con MG-RAST se obtuvieron los perfiles de abundancia bacteriana a nivel de Filo, Clase, Orden, Familia y Género para los sujetos control y pacientes con SII.

Las muestras correspondientes a los 3 sujetos control se designaron como: **CTRL-1, CTRL-2, CTRL-3**; mientras que, las muestras de los 4 pacientes con SII se designaron como: **SII-1, SII-2, SII-3, SII-4.**

6. Generación de perfiles de abundancia

Para cada nivel taxonómico, los perfiles de abundancia se calcularon utilizando el porcentaje de secuencias asignadas a cada taxón. Se consideraron los grupos bacterianos que eran más abundantes y además se encontraban presentes en todas las muestras.

7. Análisis estadístico

Se realizó una prueba t de dos grupos (control y pacientes con SII) para cada nivel taxonómico, donde $p < 0.05$ se consideró con una diferencia significativa.

RESULTADOS

1. Análisis de los datos de secuenciación

En las tabla 4 y 5 se muestran los datos generales obtenidos de la secuenciación de cada una de las muestras antes y después del control de calidad.

Tabla 4. Estadísticas de los datos de secuenciación por muestra.

Muestra	Total de pares de bases (pb)	Total de secuencias	Longitud media (pb)
CTRL-1	53,662,890	119,226	450 ± 11
CTRL-2	54,311,705	119,767	453 ± 10
CTRL-3	38,166,288	84,511	425 ± 10
SII-1	38,734,213	85,989	450± 19
SII-2	44,614,995	98,995	451 ± 20
SII-3	47,838,769	104,957	456 ± 16
SII-4	42,810,445	95,159	450 ± 23

Tabla 5. Estadísticas de los datos de secuenciación después realizar el proceso de control de calidad en cada muestra

Muestra	Total de pares de bases (pb)	Total de secuencias	Longitud media (pb)
CTRL-1	1,454,187	3,219	452 ± 11
CTRL-2	1,497,008	3,304	453 ± 11
CTRL-3	1,668,633	3,701	451 ± 11
SII-1	1,506,069	3,323	453 ± 12
SII-2	1,050,531	2,318	453 ± 12
SII-3	1,303,008	2,858	456 ± 11
SII-4	1,191,863	2,633	453 ± 14

En la tabla 4 se pueden observar los datos crudos, estos valores no son representativos del número de secuencias ya que fueron obtenidos antes del proceso QC; mientras que, en la tabla 5 se muestran los valores que fueron obtenidos post QC, es decir, después de un filtrado de control de calidad, en donde se eliminan las lecturas duplicadas artificiales, se realiza el recorte de lecturas

basado en calidad, el recorte de lecturas basado en longitud y la detección de ADN de organismos modelo o humanos.

El número total de pares de bases y secuencias, disminuyeron después del QC, como se esperaba, los datos post QC son representativos y nos indica que la muestra en la que se obtuvo una mayor cantidad de pares de bases corresponde a la muestra CTRL-3; mientras que, la menor cantidad se obtuvo en la muestra SII-2. La longitud media después del filtrado de calidad para cada muestra fue de 451 a 456 pb y se puede calcular al dividir el número total de bases entre el total de secuencias de cada muestra.

Ahora bien, para determinar la calidad de una lectura se utilizó la puntuación phred, Q o score. Este es un valor entero que representa la probabilidad estimada de un error, es decir, que la base es incorrecta y p es la probabilidad de que la base en la secuencia sea incorrecta. La puntuación utilizada en MG-RAST fue la propuesta por el programa, donde 15 fue la puntuación phred más baja que se consideró como una base de alta calidad. Esto indica que un puntaje de calidad phred 15 tiene un p de 0.3162, es decir, la probabilidad de tener un error entre 31.62 bases.

2. Perfiles K-mer

Los datos de secuenciación fueron analizados en el servidor MG-RAST, este servidor generó los perfiles de K-mer para cada muestra, permitiendo observar la cobertura K-mer, es decir, el equivalente al número de observaciones de cada K-mer frente al tamaño de la secuencia. En la Figura 4 se encuentran los perfiles obtenidos para cada muestra de sujetos control y pacientes con SII.

En general, en las muestras control se observó una mayor cobertura, a diferencia de las muestras de SII. En el caso de la muestra CTRL-3, esta presentó una menor cobertura. Mientras que la muestra SII-3 presentó la mayor cobertura de entre las cuatro muestras de pacientes con SII.

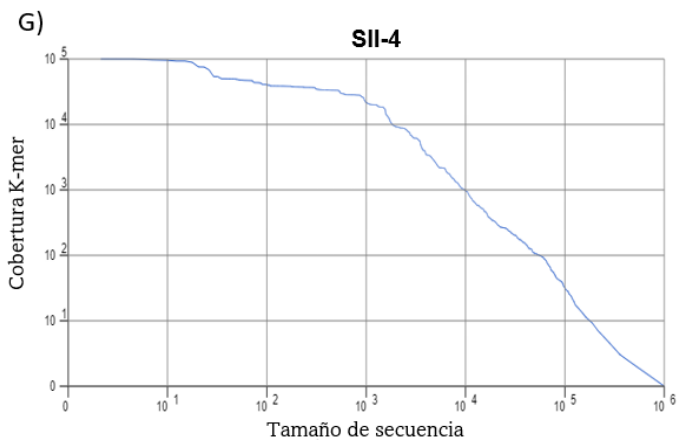
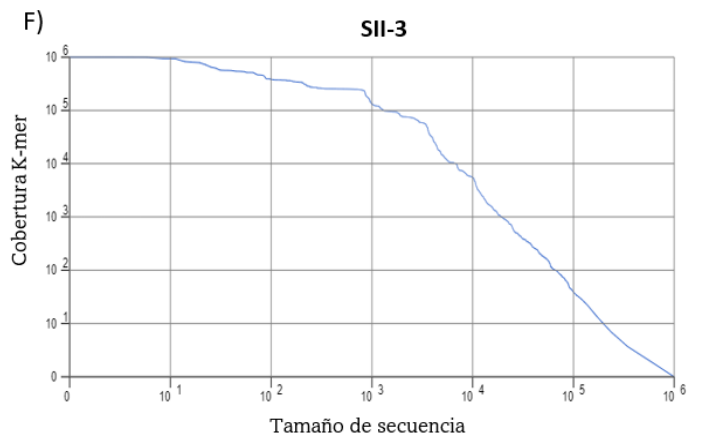
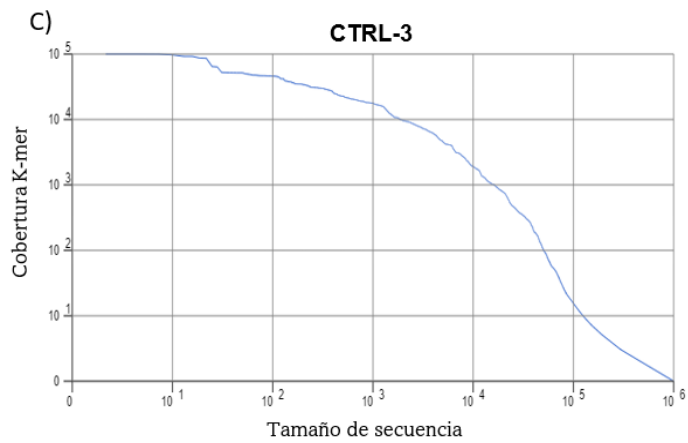
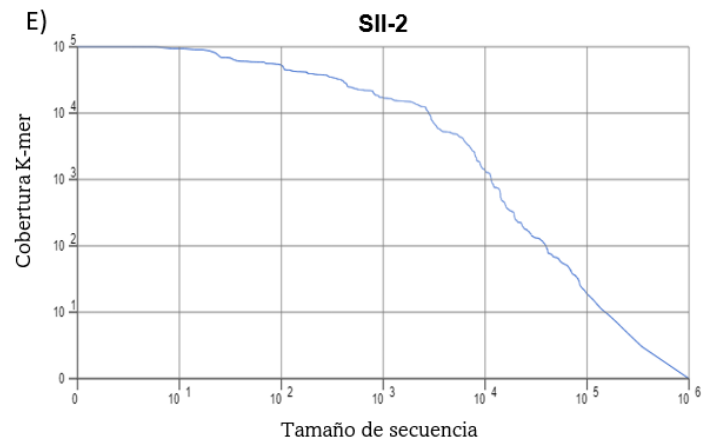
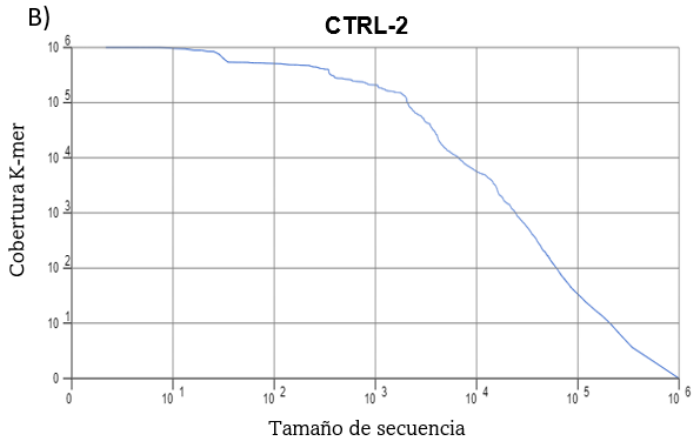
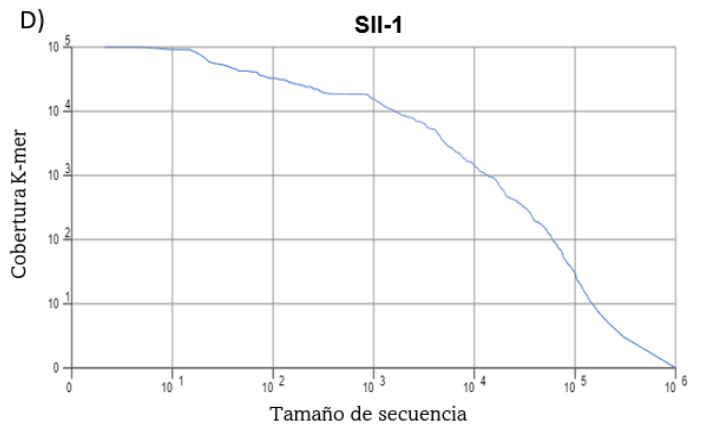
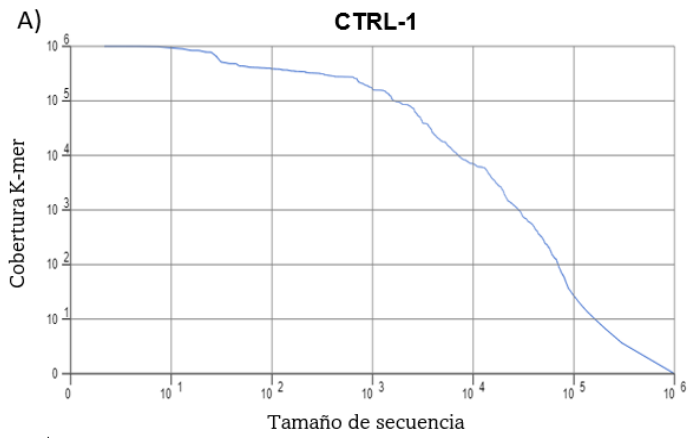


Figura 4. Perfiles K-mer de las muestras incluidas en el estudio. A, B y C corresponden a los perfiles de las muestras de sujetos control. D, E, F y G corresponden a los perfiles de las muestras de pacientes con SII.

3. Curvas de Rarefacción

La curva de rarefacción es una gráfica que muestra el número total de anotaciones de especies distintas en función del número de secuencias muestreadas por muestra (Meyer, 2019). En la Figura 5 se muestran las curvas de rarefacción obtenidas para los sujetos control y los pacientes con SII.

En general, en las curvas de las muestras control se observó un mayor número de recuento de especies respecto al número de secuencias, a diferencia de las muestras de los pacientes con SII. En el caso del grupo de los sujetos control, la muestra CTRL-1 (Figura 5A) mostró un menor recuento de especies; mientras que, la muestra CTRL-3 (Figura 5C) mostró un mayor recuento de especies con una menor cantidad de lecturas. Por otro lado, en el grupo de pacientes con SII, la muestra con menor recuento de especies fue la SII-2 (Figura 5E) y la de mayor recuento de especies fue la SII-1 (Figura 5D)

En la Figura 6 se muestran las curvas de rarefacción de las 7 muestras de manera conjunta, en donde se puede apreciar de una mejor forma que la riqueza microbiana es menor en los pacientes con SII en comparación con los sujetos control.

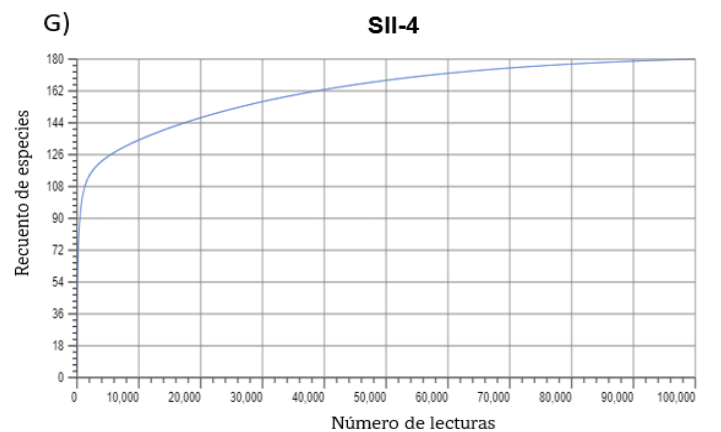
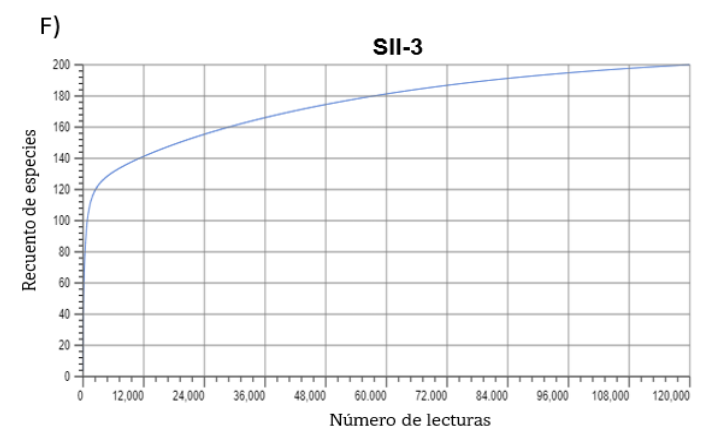
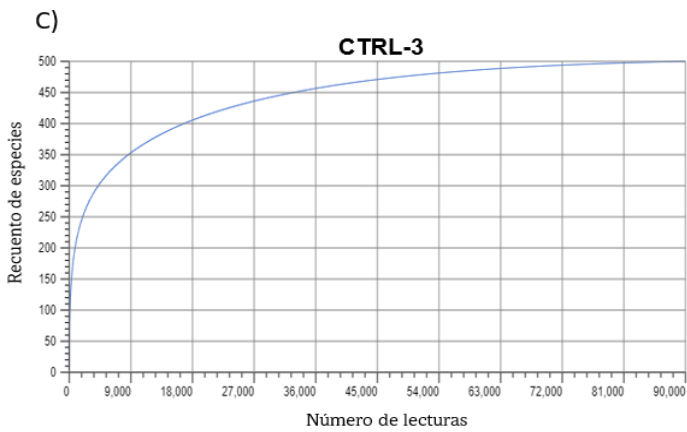
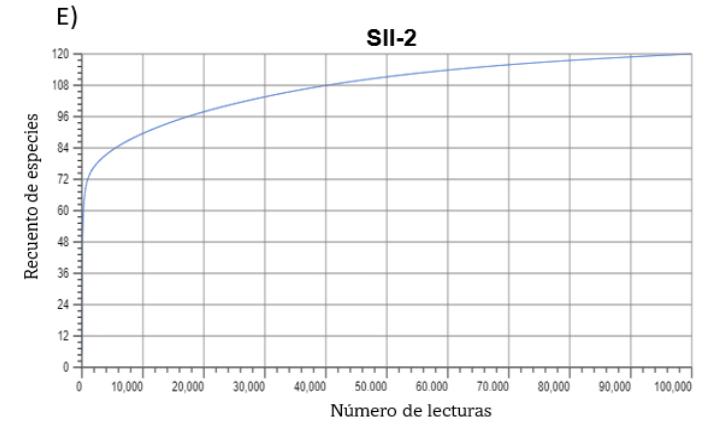
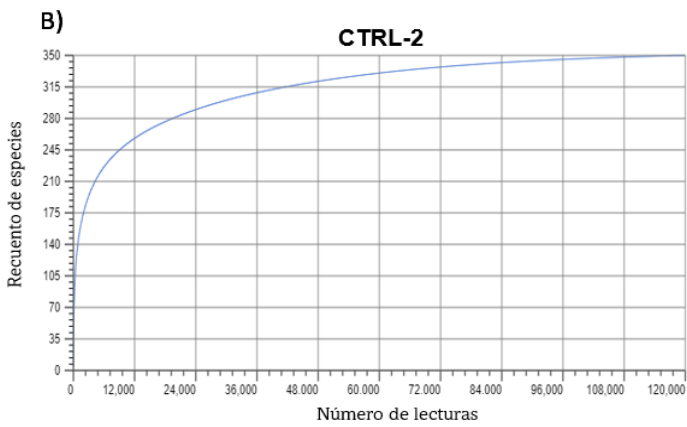
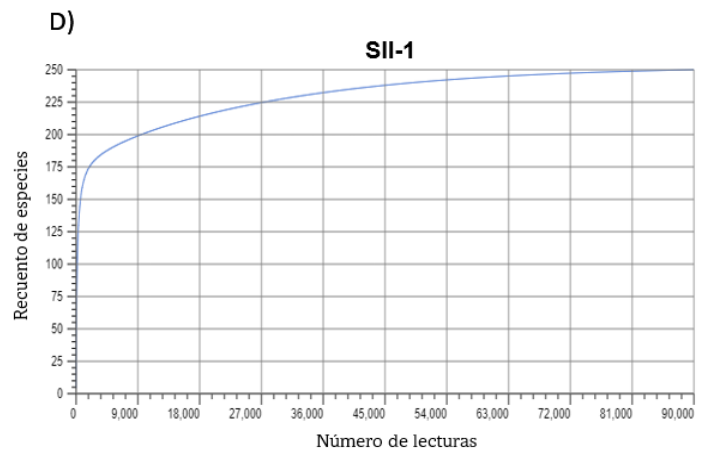
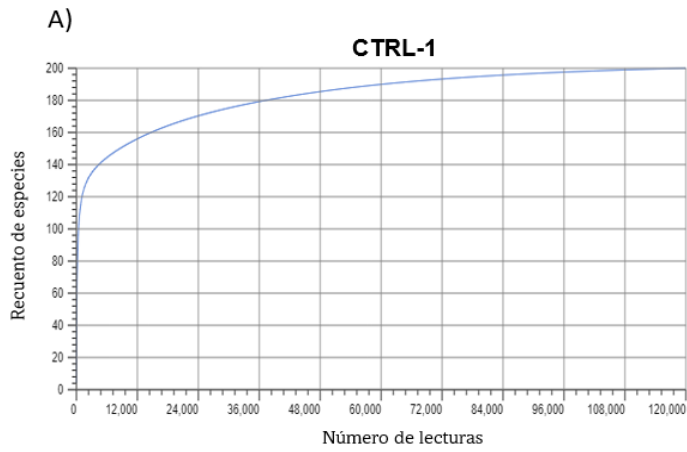


Figura 5. Curvas de rarefacción de las muestras incluidas en el estudio. A, B y C corresponden a las curvas de las muestras de sujetos control. D, E, F y G corresponden a las curvas de las muestras de paciente con SII

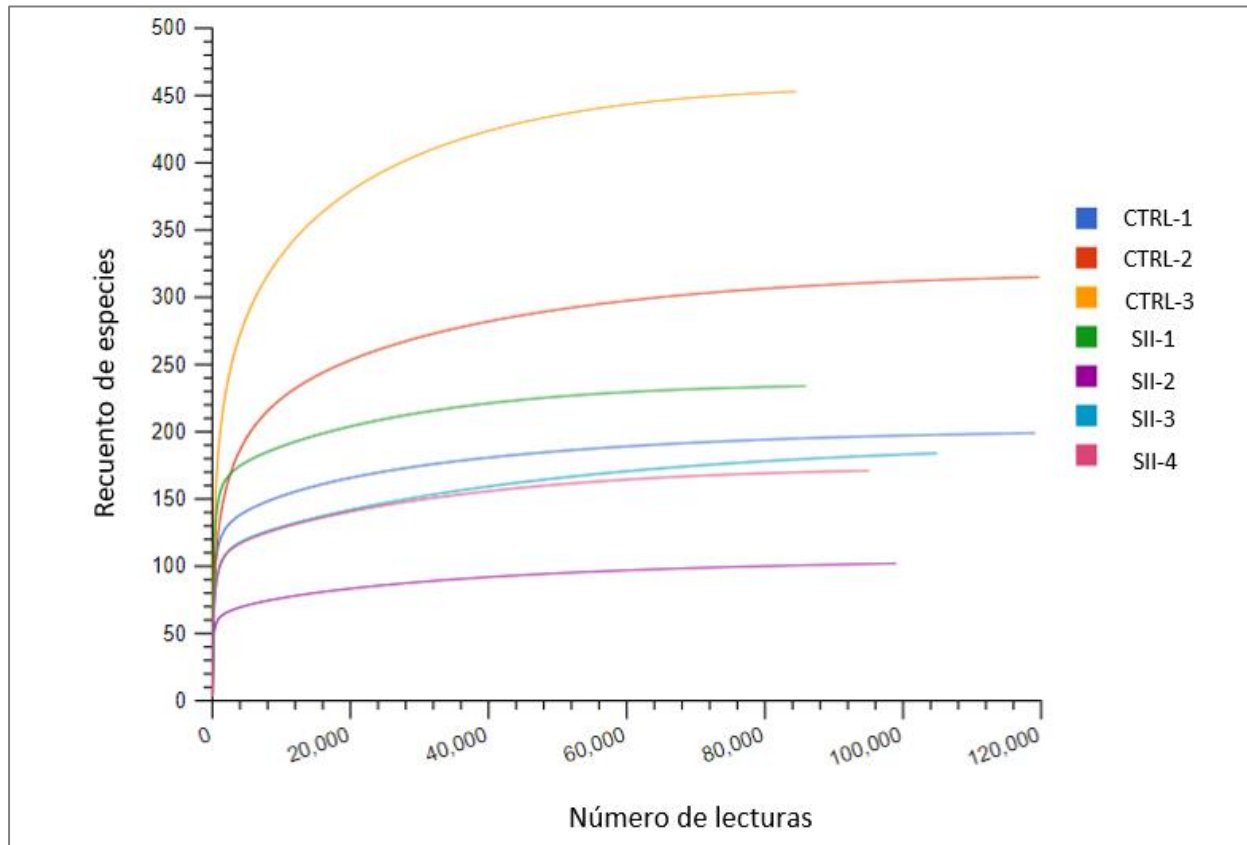


Figura 6. Representación conjunta de la curvas de rarefacción de las muestras de sujetos control y pacientes con SII.

4. Análisis de coordenadas principales (PCoA)

De manera general, el PCoA se utiliza para describir la distancia entre las muestras; cuanto más cercana es la distancia de las muestras más similares son, es decir, los puntos más cercanos representan comunidades microbianas similares (Meyer, 2019).

Para este análisis, se obtuvo un PCoA por separado para cada nivel taxonómico, los cuales están basados en distancias euclidianas. En este caso, se eligieron 3 niveles taxonómicos para su presentación y análisis: Filo, Orden y Género (Figuras 7, 8 y 9).

En cada PCoA es posible observar la similaridad o disimilaridad de comunidades bacterianas entre los dos grupos de muestras incluidos en el estudio: muestras de sujetos control y muestras de pacientes con SII. En la Figura 7 se presenta el PCoA a nivel de Filo, donde es posible observar que los puntos correspondientes al grupo control se encuentran alineados, por su parte, los puntos de las muestras de SII se encuentran también alineados, resaltando que el punto correspondiente a SII-2 se aleja del resto de puntos para SII. Las distancias entre cada muestra de cada grupo son cercanas, mientras que si se compara con las del otro grupo son distancias más lejanas.

Así mismo en la Figura 8, que muestra el PCoA a nivel de Orden se observa que las distancias entre las muestras de cada grupo son aún más cercanas. Ambos grupos, sujetos control y pacientes con SII se pueden distinguir con facilidad, destacando nuevamente el punto SII-2, el cual se encuentra alejado de ambos grupos, corroborando así la diferencia que cuenta esta muestra respecto al grupo de SII.

En la Figura 9, que corresponde al PCoA a nivel de género, las distancias entre las muestras son cercanas, resaltando de nuevo la muestra SII-2, la cual se encontró inmersa dentro del grupo control, ya que se ubicó dentro de esa linealidad de las muestras control. Mientras que, la muestra CTRL-3 destacó de entre ese grupo por encontrarse a una distancia más alejada, es decir con una menor similitud, respecto a las otras muestras control.

En este análisis se encontró que la muestra SII-2 presenta una disimilitud con las muestras de los pacientes con SII, pues se encontró siempre a una distancia más grande. A partir de este hallazgo, se decidió descartar la muestra SII-2 del análisis estadístico de las comunidades microbianas.

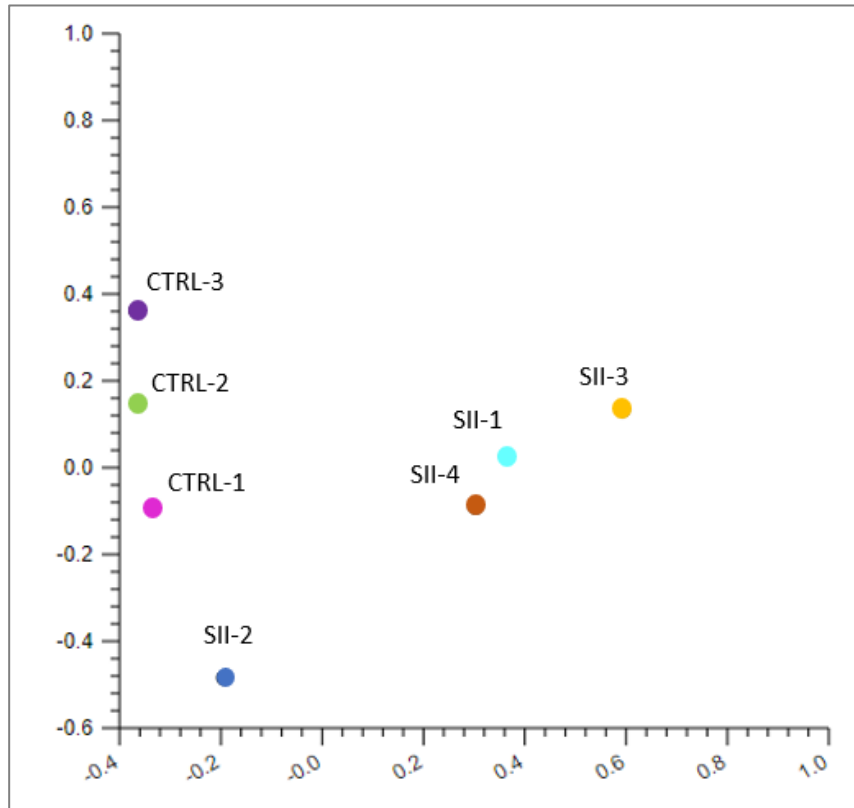


Figura 7. PCoA a nivel de filo en sujetos control (CTRL) y pacientes con SII (SII).

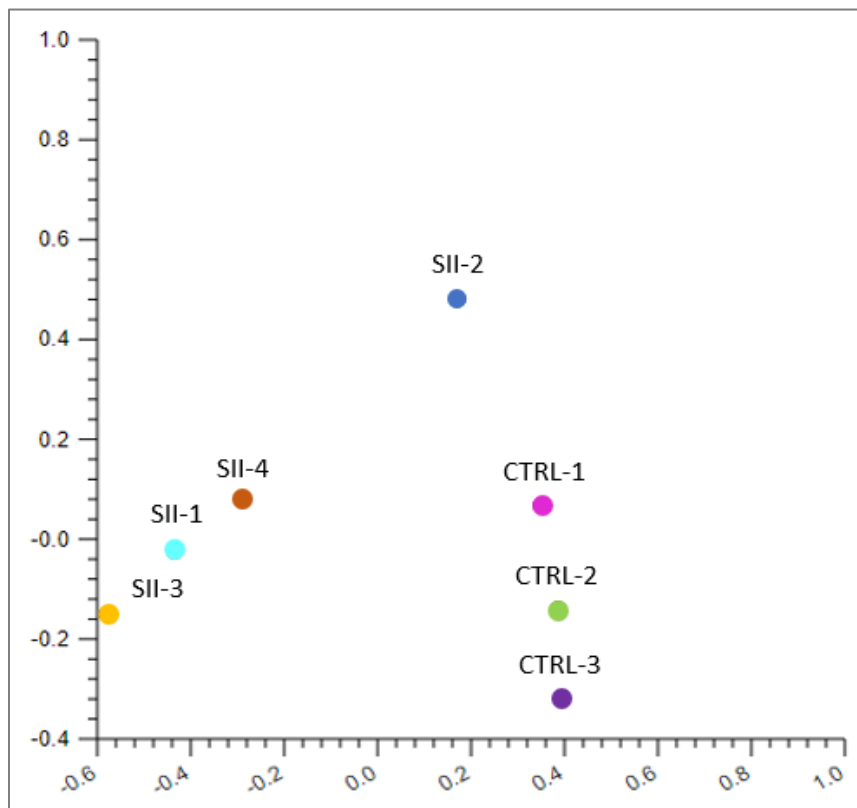


Figura 8. PCoA a nivel de Orden de los sujetos control (CTRL) y pacientes con SII (SII).

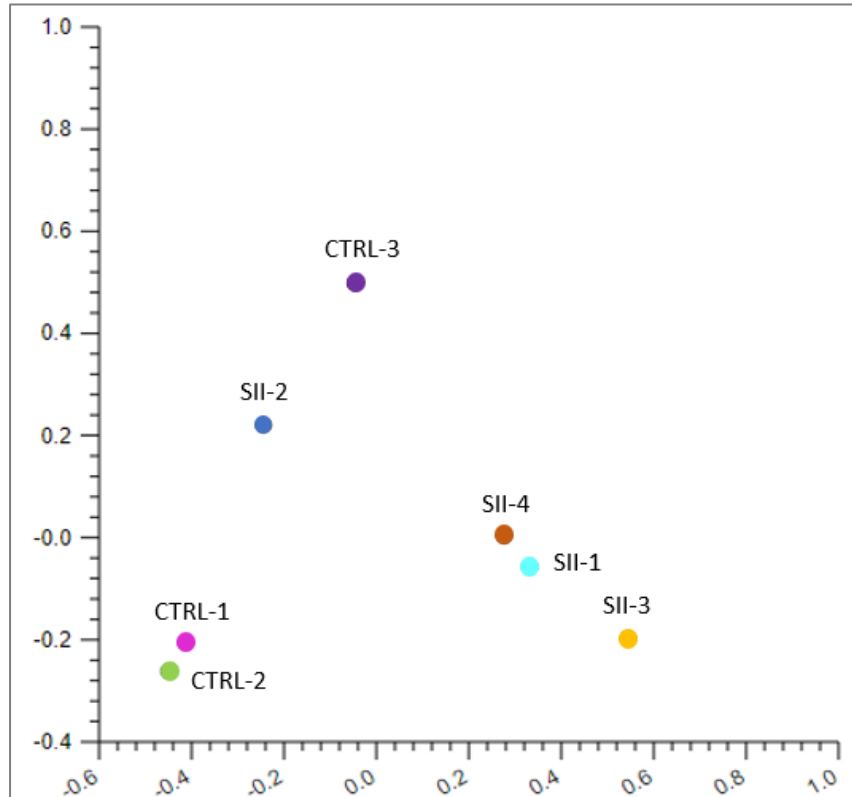


Figura 9. PCoA a nivel de género en sujetos control (CTRL) y pacientes con SII (SII).

5. Composición de la microbiota intestinal en las muestras de estudio

Los perfiles de abundancia se determinaron con los grupos bacterianos más abundantes y que además estuvieron presentes en la mayoría de las muestras para sujetos control y pacientes con SII.

En la Figura 10 se muestran los 5 filos más abundantes en cada una de las muestras de estudio. En general, se observa un aumento del filo *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria* y *Verrucomicrobia* en los pacientes con SII y una disminución en el filo *Bacteroidetes*, dicha disminución fue significativa ($p=0.04$), ver Figura 15 A.

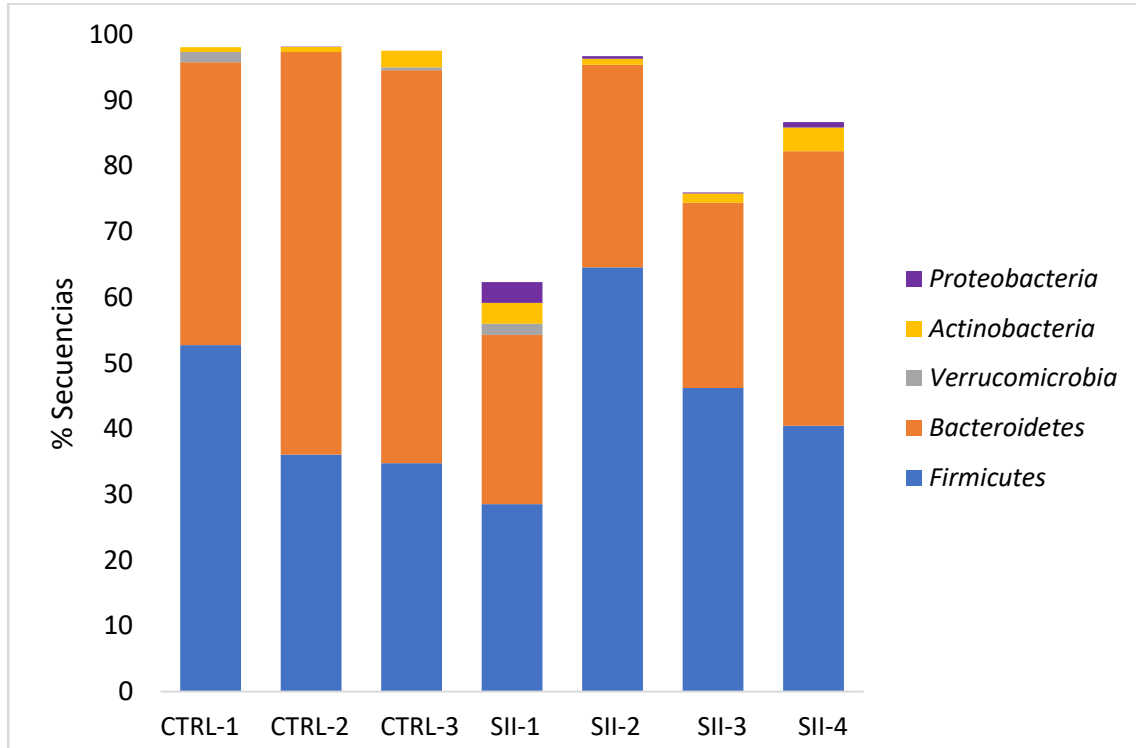


Figura 10. Perfil de abundancia a nivel de filo en sujetos control (CTRL) y pacientes con SII (SII).

Dentro de los grupos con menor abundancia, no representados en la Figura 10, también se observaron filos presentes o aumentados en los pacientes con SII. Tal es el caso de *Fusobacteria* y *Streptophyta*, los cuales se encontraron con mayor abundancia en sujetos con SII (Ver Anexo, Tabla 1).

En la Figura 11 se muestran los perfiles de los 5 grupos más abundantes a nivel de clase. En esta figura se observa que el único grupo bacteriano con disminución en los pacientes con SII fue el de *Bacteroidia* y que además su diferencia es significativa ($p=0.04$), ver Figura 15 B. Mientras que, los grupos restantes presentaron un aumento en estos pacientes.

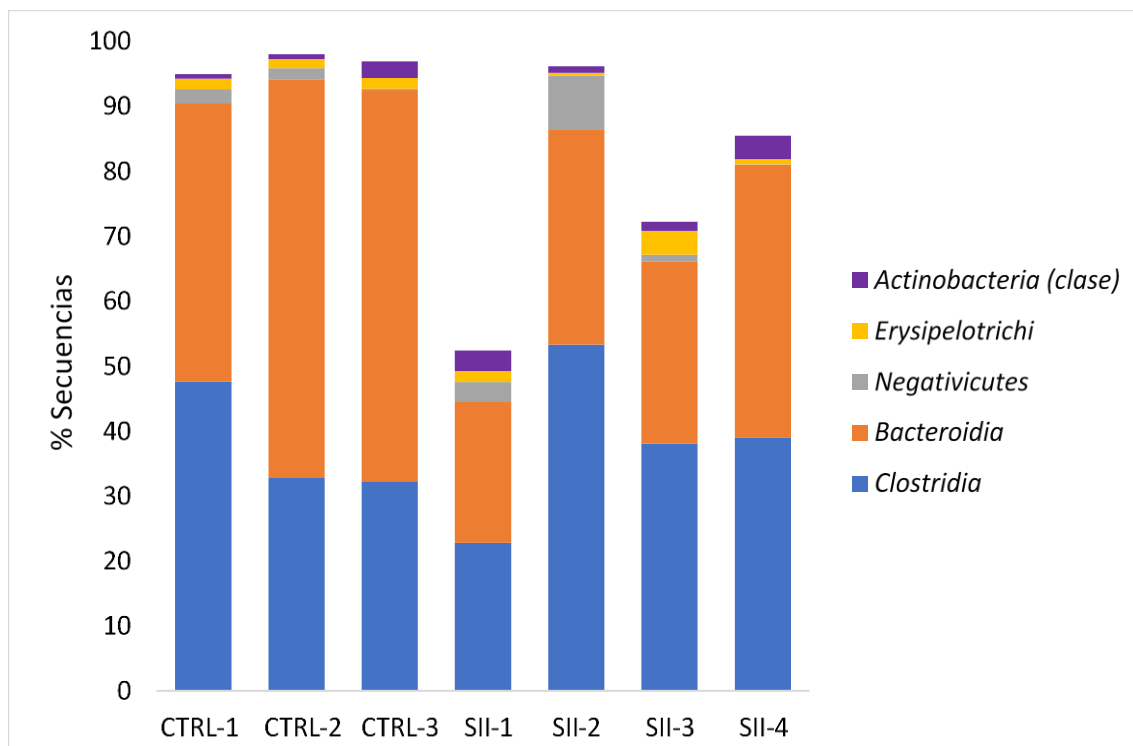


Figura 11. Perfil de abundancia a nivel de clase en sujetos control (CTRL) y pacientes con SII (SII).

Algunos grupos del filo *Proteobacteria* también presentaron un aumento en pacientes con SII, como: *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria* y *Gammaproteobacteria*. Así como *Bacilli* dentro del filo *Firmicutes* (Ver Anexo, Tabla 2).

En la Figura 12 se muestran los perfiles de los 10 grupos más abundantes a nivel de orden. Para los pacientes con SII, se puede observar que el grupo *Bacteroidales* presentó una disminución, la cual fue significativa ($p=0.02$), ver Figura 15 C. Además, se presentó una disminución en *Bifidobacteriales* y *Coriobacteriales*; los grupos restantes presentaron un aumento en pacientes con SII respecto a los controles. En los *Actinomycetales* se observó un aumento significativo ($p=0.02$), ver Figura 15 C.

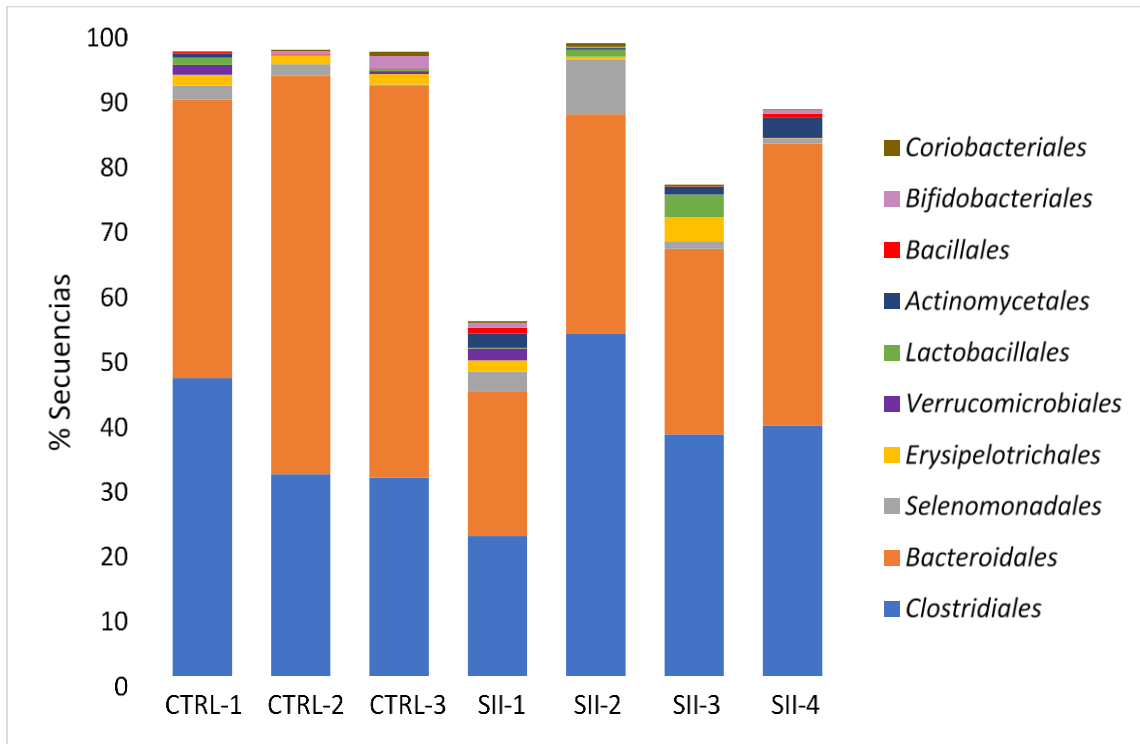


Figura 12. Perfil de abundancia a nivel de orden en sujetos control (CTRL) y pacientes con SII (SII).

A nivel de orden, también se observó que los *Sphingobacteriales* sólo están presentes en pacientes con SII; mientras que, los *Enterobacteriales* y *Pseudomonadales* presentaron un aumento en pacientes con SII (Ver Anexo, Tabla 3).

En la Figura 13, se muestran los perfiles de los 10 grupos más abundantes a nivel de familia. Entre los grupos que presentaron un incremento en su abundancia en pacientes con SII están *Clostridiaceae*, *Ruminococcaceae*, *Veillonellaceae*, *Bifidobacteriaceae* y *Erysipelotrichaceae*. Los grupos restantes mostraron una disminución en pacientes con SII, donde el grupo *Eubacteriaceae* presentó una diferencia significativa ($p=0.04$), ver Figura 15 D.

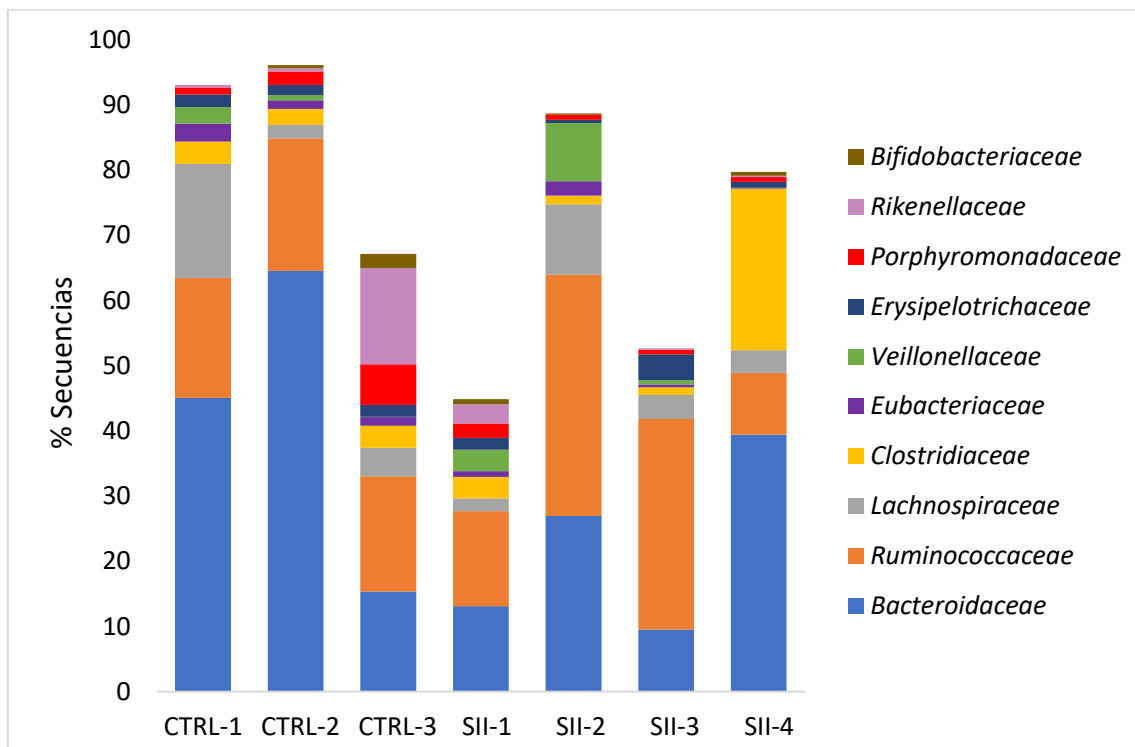


Figura 13. Perfil de abundancia a nivel de familia en sujetos control (CTRL) y pacientes con SII (SII).

Además, las familias *Bacillaceae*, *Lactobacillaceae*, *Staphylococcaceae*, *Enterococcaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonadaceae* y *Fusobacteriaceae* también presentaron un incremento en pacientes con SII. Por otra parte, en los pacientes con SII se encontraron presentes las familias *Clostridiales* Familia XI, *Incertae Sedis* y *Sphingobacteriaceae* (Ver Anexo, Tabla 4).

En la Figura 14 se muestran los perfiles de los 11 grupos más abundantes a nivel de género en donde se observa un aumento de *Clostridium*, *Ruminococcus* y *Faecalibacterium* en los pacientes con SII. Los grupos restantes presentaron una disminución en estos pacientes.

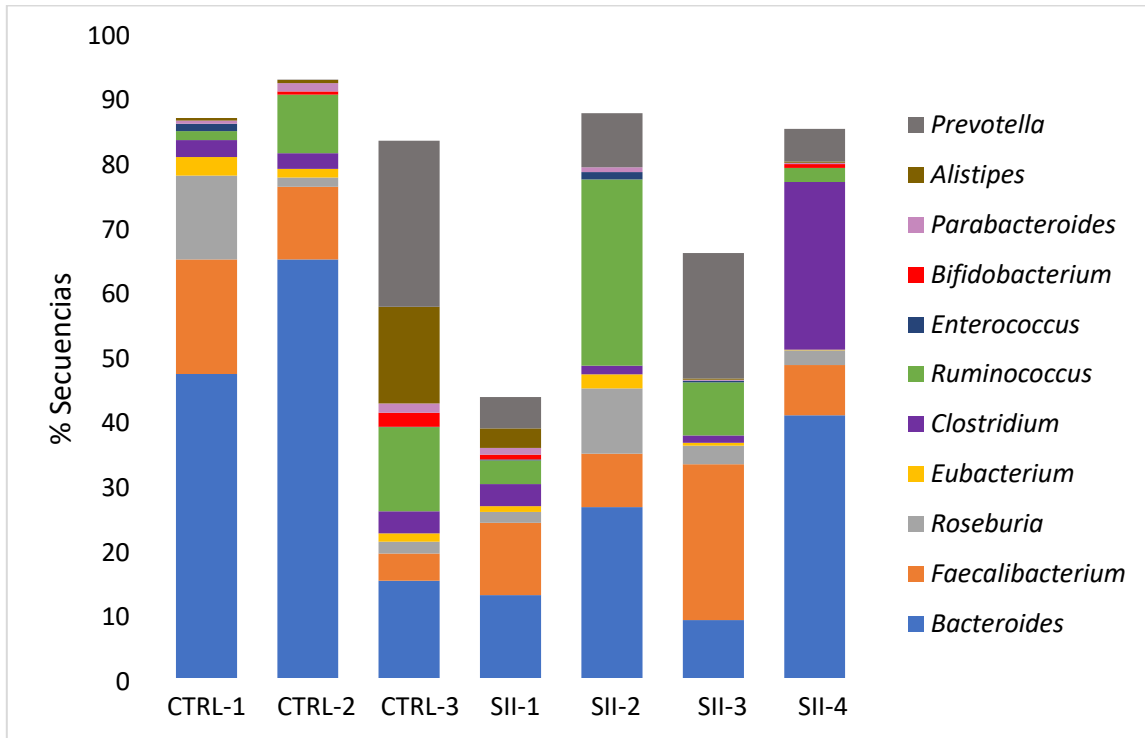


Figura 14. Perfil de abundancia a nivel de género en sujetos control (CTRL) y pacientes con SII (SII).

Al igual que a nivel de familia, los géneros *Lactobacillus*, *Enterococcus* y *Pseudomonas* presentaron un aumento en pacientes con SII, así como *Dorea*, *Veillonella*, *Corynebacterium*, *Dietzia* y *Propionibacterium* (Ver Anexo, Tabla 5).

Para este nivel taxonómico no se encontró una diferencia significativa entre los grupos bacterianos de pacientes con SII y sujetos control, aun así, se puede observar el cambio en la diversidad de la microbiota intestinal en el síndrome de intestino irritable.

Finalmente, en la Figura 15 se muestran los perfiles de abundancia en los que se encontró una diferencia significativa en los porcentajes de secuencias entre sujetos control y pacientes con SII. En las gráficas se muestra el valor de p, cuando este valor es igual o menor que 0.05 indica que entre los dos grupos hay diferencia estadísticamente significativa; mientras que, un valor de p mayor que 0.05 indica que no existen diferencias entre los valores de ambos grupos.

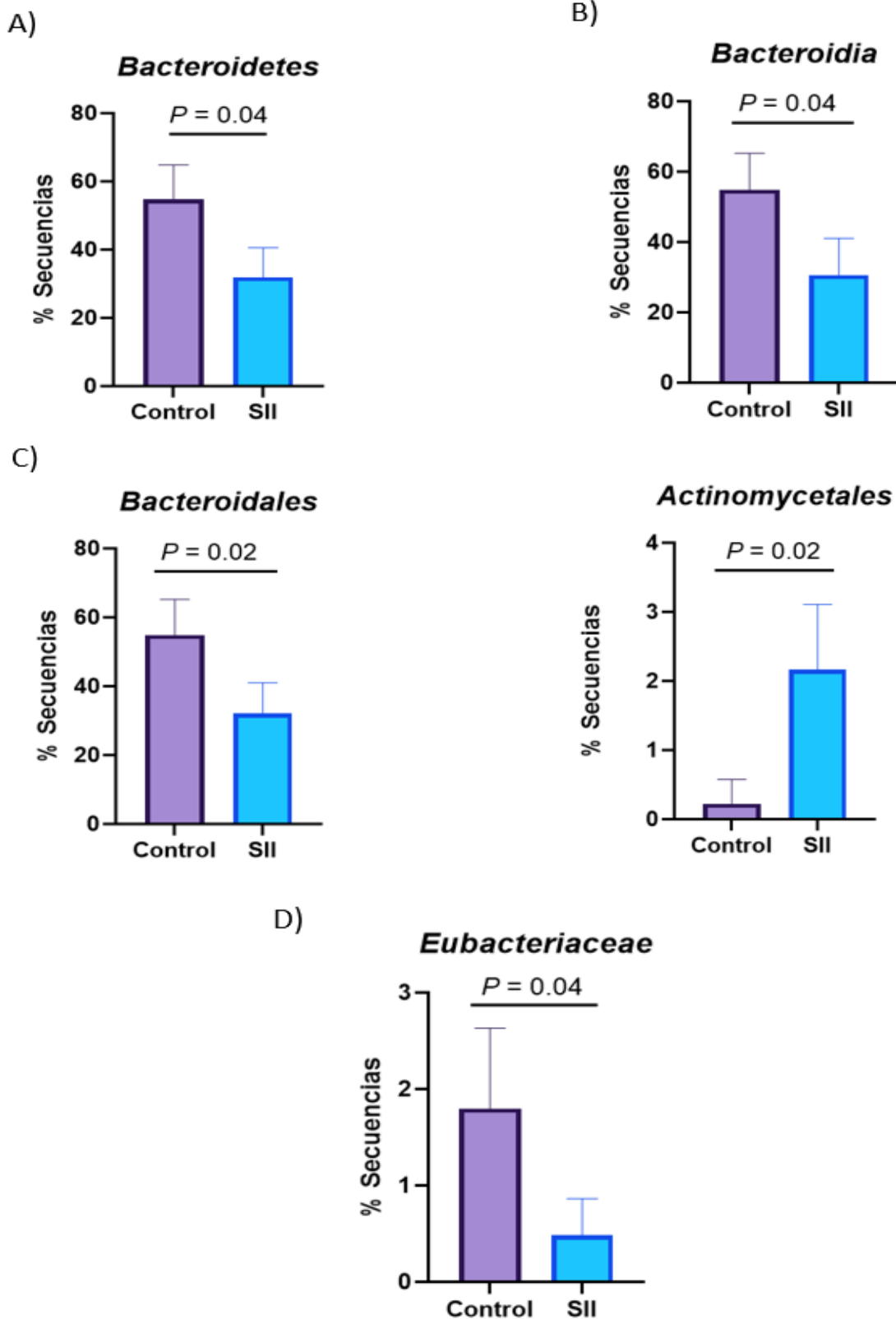


Figura 15. Perfiles de abundancia con significancia. Donde A) corresponde a Filo *Bacteroidetes*, B) a Clase *Bacteroidia*, C) a Orden de *Bacteroidales* y *Actinomycetales* y D) a Familia *Eubacteriaceae*. Los datos se muestran como la media con $p < 0.05$.

DISCUSIÓN

El presente estudio es uno de los pocos que se tienen en México y en Latinoamérica en donde se describe y analiza la composición bacteriana del microbioma intestinal a diferentes niveles taxonómicos, desde filo hasta género, en pacientes con SII.

En general, en la mayoría de los estudios que abordan la composición del microbioma intestinal las muestras que más se emplean son de materia fecal; en contraste, el presente estudio se realizó con biopsias de colon descendente, puesto que se ha estudiado que la composición de la microbiota difiere significativamente en los distintos nichos (Zoetendal et al., 2002). La comunidad bacteriana predominante asociada a la mucosa es específica del huésped y se distribuye uniformemente a lo largo del colon, pero de manera significativamente diferente a la de la comunidad fecal ($p < 0.01$) (Zoetendal et al., 2002). Una ventaja del uso de biopsias es que son representativas de la microbiota de la mucosa presente en el sitio de la enfermedad (Carco et al., 2020), por lo que son una opción más directa de estudiar patologías o tratamientos intestinales relacionados con la microbiota. Además, las biopsias pueden extraerse en condiciones controladas y conservarse inmediatamente mediante congelación (Durbán et al., 2011). Es importante mencionar que la toma de biopsias es un procedimiento invasivo, por lo que en la mayoría de los casos se opta por la recolección de materia fecal.

La secuenciación por amplicones del gen *16S ARNr* es uno de los métodos más usados para el análisis de la microbiota intestinal humana. Este gen consta de regiones tanto conservadas como variables, donde la región conservada hace posible la amplificación universal; mientras que, la secuenciación de las regiones variables permite la discriminación entre diferentes microorganismos, como bacterias. Además, la secuenciación del gen *16S ARNr* tiene como ventaja su alta velocidad, rentabilidad y precisión. Sin embargo, también cuenta con algunas limitantes, la caracterización de las comunidades microbianas que utilizan el gen *16S ARNr* se ha visto obstaculizada por las diferencias inherentes generadas en los perfiles de la comunidad al secuenciar diferentes regiones hipervariables, longitudes

de lectura cortas y dificultades de clasificación taxonómica debido a la resolución limitada para especies estrechamente relacionadas, ya que existen algunos miembros genéticamente muy relacionados que carecen de un origen monofilético claro (O'Callaghan et al., 2021).

En el presente estudio se usaron para la secuenciación las regiones V3-V4 del gen *16S ARNr*. La región V4 presenta secuencias muy conservadas comparada con otras regiones; aun así, ha aumentado en popularidad a medida que los estudios sobre estimaciones de diversidad alfa y beta (es decir, medidas de diversidad dentro y entre muestras, respectivamente) y asignaciones taxonómicas han indicado que este sitio genera las descripciones más precisas. Además, su longitud relativamente corta ha permitido la superposición completa de la lectura de secuenciación directa e inversa. Por otro lado, la región V3 presenta una mayor variación en su secuencia, por lo que es una región con mayor hipervariabilidad en este gen (Drengenes et al., 2021). En el estudio de Chakravorty y cols., donde amplificaron las regiones del gen *16S ARNr* en comunidades bacterianas, la región V3 se utilizó para discriminar entre 9 géneros y 110 especies de bacterias. Esta región tiene una longitud corta de 64 pb, y reveló que entre las posiciones 456-479 se encuentra la mayor variación de cambios en la secuencia, conocidos como SNP (Chakravorty et al., 2007).

Tomando en cuenta estos antecedentes se secuenciaron, por el método de amplicones del gen *16S ARNr*, 4 muestras de pacientes con SII y 3 muestras control de sujetos clínicamente sanos. En los 7 metagenomas analizados se observó una longitud media de lecturas de 451-456 pb. De acuerdo con la Tabla 4, la longitud de las lecturas y el número de secuencias es mayor en las muestras control en comparación con las muestras con SII.

Una forma de abordar el correcto alineamiento en un metagenoma es gracias al uso de k-meros, los cuales son subsecuencias en cadenas de longitud fija k, los k-meros se componen de nucleótidos (A, T, G y C). Es, por tanto, un método que permite describir conjuntos de datos de secuencias que pueden respaldar inferencias sobre el tamaño y la cobertura del genoma (Meyer, 2019).

Los perfiles k-mer que se obtuvieron para las muestras estudiadas nos proporcionan información acerca de la cobertura que se tuvo en cada una de las muestras. Esto significa que, la cobertura k-mer es equivalente al número de observaciones de cada k-mer, pues se cuentan las apariciones de cada k-mer en el conjunto de secuencias (Meyer, 2019). Para el caso de los sujetos control se obtuvo una mayor cobertura, lo que se explica puesto que también presentaron un mayor número de secuencias; por el contrario, las muestras de los pacientes con SII mostraron una menor cobertura, al presentar un menor número de secuencias.

En general, se observó que los metagenomas de los sujetos control tienen un mayor número de secuencias y por tanto mayor cobertura, pero esto no es un indicador de si existe también una mayor diversidad microbiana. Por lo que, un método para comparar el número de especies cuando las muestras difieren en tamaño es la rarefacción. El número de especies es, quizás, el atributo más frecuentemente utilizado para describir de forma taxonómica un metagenoma, ya que es una expresión mediante la cual se obtiene una idea rápida y sencilla de su diversidad (Jiménez-Valverde et al., 2003).

En las curvas de rarefacción, la pendiente de la parte derecha está relacionada con la fracción de especies muestreadas que son raras. En tanto que, a la izquierda, una pendiente pronunciada indica que queda por descubrir una gran fracción de la diversidad de especies (Meyer, 2019). Las curvas, en general, aumentan rápidamente al principio y luego se estabilizan hacia una asíntota a medida que se encuentran menos especies nuevas respecto al número de lecturas que se realiza. A una mayor profundidad de estudio, produciría sólo unas pocas especies adicionales (Meyer, 2019).

Las curvas de rarefacción que corresponden a las muestras control (Figura 5 A-C) muestran un mayor recuento de especies, lo que demuestra que existe una mayor riqueza de grupos bacterianos en sujetos control. En la Figura 7, en donde se muestran en conjunto las curvas de rarefacción de todas las muestras, es posible observar que la riqueza microbiana es mayor en los sujetos control; en contraste con los pacientes con SII en donde la diversidad es menor. De hecho, en estudios

previos se ha descrito que la diversidad microbiana de los pacientes con SII difiere a la de los sujetos control (Chong et al., 2019). Específicamente, las bacterias benéficas disminuyen y las bacterias patógenas aumentan. La mayor riqueza y diversidad de la microbiota se considera un indicador de buena salud; mientras que, la disminución de la diversidad y el desequilibrio de la microbiota pueden estar estrechamente relacionados con una amplia gama de enfermedades, especialmente las intestinales (Cui et al., 2021).

MG-RAST utiliza el análisis de PCoA para reducir la dimensionalidad de las comparaciones de múltiples muestras que consideran anotaciones funcionales o taxonómicas. La reducción de dimensionalidad es un proceso que permite que la variación compleja que se encuentra en grandes conjuntos de datos, por ejemplo, los valores de abundancia de roles funcionales o especies anotadas en muestras metagenómicas, se pueda reducir a un número menor de variables que se pueden visualizar como diagramas de dispersión simples bidimensionales o tridimensionales (Meyer, 2019). Los gráficos permiten la interpretación de los datos multidimensionales en una presentación más amigable. Las muestras que exhiben perfiles de abundancia similares (taxonómicos o funcionales) se agrupan, en tanto que, las que difieren se encuentran más separadas.

En el análisis de PCoA de los metagenomas estudiados a diferentes niveles taxonómicos (Figuras 8, 9 y 10) se observa que el grupo de las muestras control se separa del grupo de las muestras de pacientes con SII, por lo que se cumple la similaridad entre muestras. A excepción de la muestra SII-2, la cual se encuentra a un punto medio entre ambos grupos, a una mayor distancia de las otras muestras de SII, y es por esta razón que se excluyó de análisis posteriores. Es importante resaltar que la muestra SII-2 también es la que cuenta con la menor cantidad de lecturas en pb y menor recuento de especies dentro del grupo de SII. El comportamiento de esta muestra, que, si bien parece estar más cercano a las muestras de sujetos control, puede explicarse debido a la variación interindividual, el tipo de SII que padece, además de que puede influir el grado o estadio de la enfermedad en el sujeto al momento de obtenerse la muestra.

El análisis a nivel taxonómico de la composición de la microbiota intestinal en los metagenomas estudiados reveló que los filos con mayor abundancia corresponden a *Firmicutes* y *Bacteroidetes*, pero para el grupo de los controles, *Bacteroidetes* presentó mayor abundancia en comparación con los pacientes con SII. Estos hallazgos concuerdan con lo descrito previamente en la literatura, donde *Bacteroidetes* y *Firmicutes* constituyen los dos filos que dominan en el intestino humano y comprenden más del 90% de todo el microbioma humano (Rangel et al., 2015).

A nivel de filo, se observó un aumento en la abundancia de *Firmicutes* en pacientes con SII. Este cambio se ha descrito previamente en diversos estudios (Rajilić-Stojanović et al., 2011; Jeffery et al., 2012; Chung et al., 2016). Este aumento fue relativamente consistente a través de los diferentes niveles taxonómicos. Como clase predominante dentro del filo *Firmicutes*, *Clostridia* estuvo presente en niveles elevados en pacientes con SII, y a nivel de orden, se observó también una mayor abundancia de *Clostridiales*. A pesar de estos cambios observados no se encontró un aumento significativo de *Clostridium*, como se esperaba, ya que en diversos estudios se ha descrito este cambio (Jeffery et al., 2012; Rangel et al., 2015; Schmulson et al., 2017).

Recordemos que la microbiota intestinal juega un papel clave en el metabolismo de carbohidratos para la producción de AGCC, que son los principales productos de la fermentación bacteriana del colon, desempeñando una parte esencial en la preservación de las funciones de barrera intestinal, así como con propiedades inmunomoduladoras y antiinflamatorias. Los AGCC son esenciales para alimentar las células epiteliales intestinales y fortalecer la función de barrera intestinal (García-Zermeño y Remes-Troche, 2018). Además, un metabolismo alterado de los AGCC se ha asociado con la fisiopatología del SII (Duan et al., 2019). En *Clostridia*, grupo con incremento en los pacientes con SII, se pueden encontrar especies que degradan varios compuestos orgánicos y producen AGCC.

En el análisis, también se encontraron diferencias en la abundancia de bacterias productoras de otros AGCC como butirato y propionato. Los principales grupos bacterianos productores de butirato son *Roseburia* y *Eubacterium*, los cuales en este estudio se encontraron disminuidos en pacientes con SII, y en especial la familia *Eubacteriaceae*, su disminución fue significativa (Figura 16-D). Es interesante mencionar que, en el estudio de Jia y cols. se detectaron niveles significativamente más bajos de *Roseburia* y *E. rectale* en pacientes con SII-C en comparación con los control, así como una disminución en la concentración de butirato en pacientes con SII-C (Jia et al., 2019).

Otro grupo bacteriano productor de butirato es *Faecalibacterium*, el cual se encontró aumentado en pacientes con SII (Figura 15). El butirato es el AGCC preferido por los colonocitos para mantener la función de barrera intestinal normal. El butirato y el acetato son necesarios para el funcionamiento normal de las interacciones hospedero-microbiota, pues tienen efectos benéficos en relación con el estrés oxidativo y la inflamación, la energía para el epitelio colónico, la modulación de la proliferación celular y la protección contra las infecciones gastrointestinales (Bedford y Gong, 2018).

El butirato, también desempeña un papel antiinflamatorio induciendo células inmunitarias reguladoras, con una reducción de la expresión de citocinas proinflamatorias como INF- γ , TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 y un aumento de IL-10 y TGF- β (Bedford y Gong, 2018). Otro miembro importante del filo *Firmicutes* es *Lactobacillus*, el cual presentó un aumento en pacientes con SII (Anexo, Tabla 5). Diversos estudios han demostrado que *Lactobacillus* aumenta en la microbiota de pacientes con SII (Shukla et al., 2015; Barandouzi et al., 2021). Diferentes especies y cepas de *Lactobacillus* pueden tener actividades tanto proinflamatorias como antiinflamatorias (Neville et al., 2012), es prudente considerar solo a los *Lactobacilli* flagelados móviles como proinflamatorios obligatorios (Jeffery et al., 2012).

Por otra parte, *Lactobacillus* es considerado el principal productor de ácido láctico. La disminución de este ácido se asocia a un deterioro de la barrera de defensa intestinal (Elshaghabee et al., 2017), que coincide con cambios en la integridad de

la mucosa y la función de la unión estrecha (König et al., 2013). De hecho, se considera que un incremento en la permeabilidad de la membrana puede ser un factor etiológico potencial en pacientes con SII.

Interesantemente, un estudio realizado por Tana y cols. mostró un aumento de *Lactobacillus* y *Veillonella* en los pacientes con SII, grupo que también se encontró aumentado en este estudio (Anexo, Tabla 5), así como mayores niveles de acetato, propionato y ácidos orgánicos totales (Tana et al., 2010). De acuerdo a esto, el aumento en *Lactobacillus* y *Veillonella* que se presentó, puede dar lugar a una producción de niveles más altos de ácido acético y ácido propiónico a partir de nutrientes de la luz intestinal en pacientes con SII.

El filo *Firmicutes* también tiene una participación importante en el eje microbiota-intestino-cerebro, el cual es el eje regulador de la interacción bidireccional del SNC con el sistema nervioso entérico (ENS), el sistema neuroendocrino e inmunológico.

La 5-HT parece ser una de las moléculas clave en la patología del SII a través del aumento de la permeabilidad epitelial, la hipersensibilidad visceral, la activación de las células inmunes y los cambios en la motilidad, todos los cuales inducen de manera conjunta los síntomas del SII (Mishima e Ishihara, 2020). Se ha encontrado que, en específico, los receptores 5-HT₃ se asocian a excitación del tracto GI y por lo tanto a un aumento de la motilidad intestinal, secreción y sensibilidad (García-Zermeño y Remes-Troche, 2018). Existen diversas bacterias productoras de 5-HT como *Streptococcus* y *Enterococcus*. Específicamente, en este estudio se observó un incremento de *Enterococcus* en pacientes con SII (Figura 15).

De acuerdo con el estudio de Luo y cols. se ha descrito que los niveles de 5-HT aumentan en la sangre de pacientes con SII en comparación con los sujetos control (Luo et al., 2021). Se sabe, además, que un exceso de 5-HT puede desencadenar aferentes neuronales primarios, lo que da lugar a hiperalgesia visceral (Barbara et al., 2011), contribuyendo de esta forma a la sintomatología del SII.

El género *Ruminococcus* también se encontró con niveles aumentados en los pacientes con SII (Figura 15). Este grupo bacteriano participa en la degradación de

mucina, resultando relevante que las bacterias que degradan mucina tienen un papel importante en la modulación de la respuesta inflamatoria intestinal en la superficie de la mucosa (Tailford et al., 2015).

En este estudio se encontró una disminución significativa de *Bacteroidetes* (filo), *Bacteroidia* (clase) y *Bacteroidales* (orden) en pacientes con SII (Figuras 16 B y C). Los *Bacteroidetes* son bacterias que participan de manera importante en el metabolismo de glicanos y como producto final están los AGCC. La producción de diferentes tipos de glicanos por *Bacteroides* también ayuda al mutualismo, ya que su producción es esencial para la supervivencia bacteriana y proporciona propiedades inmunomoduladoras benéficas para el huésped (Benítez-Páez et al., 2017). Así pues, *Bacteroides* comprende un grupo de bacterias altamente competitivas para sobrevivir en el tracto GI, lo que se ve reflejado en su abundancia en sujetos control, pero no en los pacientes con SII, principalmente debido al aumento de otros grupos bacterianos y de patógenos.

En el filo *Actinobacteria*, existen también grupos involucrados en el metabolismo de AGCC como, *Bifidobacteriales* (orden), *Bifidobacteriaceae* (familia) y *Bifidobacterium* (género), los cuales se encontraron disminuidos en pacientes con SII en comparación de los sujetos control (Figuras 13-15). De acuerdo con diversos estudios (Zhuang et al., 2018; Mari et al., 2020), esta reducción conduce a alteraciones en la producción de AGCC, así como de la actividad inmunológica y también bactericida, lo que conduce a una alteración sobre la función y estabilidad de la microbiota. Además, se sabe que una especie de este grupo bacteriano, *Bifidobacterium adolescentis*, produce ácido acético y lactato (Collado y Sanz, 2006). Esta es una fuente potencial del aumento de AGCC en pacientes con SII, aunque en nuestro estudio está limitado hasta nivel de género, sería interesante realizar un estudio a nivel de especies para conocer la riqueza que se tiene de esta especie ya que predomina sobre otras especies de *Bifidobacterium*.

Bifidobacterium también está involucrado en el metabolismo de ácidos biliares. Este grupo tiene un papel importante en la transformación de los ácidos biliares en el

intestino (James et al., 2021). Es, además, una actividad metabólica que exhiben casi todas las bifidobacterias, ya que se ha descrito que, entre los microorganismos considerados probióticos, las bifidobacterias muestran una actividad de BSH particularmente alta (Jarocki et al., 2014).

A nivel de orden, se encontró un aumento significativo en pacientes con SII de *Actinomycetales* (Figura 16C). Diversas especies de *Actinomycetales* producen formiato, acetato, succinato, lactato y varios antibióticos; su potencial metabólico podría ser descomponer y reciclar compuestos orgánicos en el sistema gastrointestinal humano (Li et al., 2018). Estudios recientes describen que las especies de *Actinomycetales* no están relacionadas con la patogenia del SII; sin embargo, las bacterias acompañantes podrían elaborar las toxinas y enzimas, así como inhibir las defensas del huésped para facilitar las infecciones (Li et al., 2018).

A nivel de género, en este estudio, *Corynebacterium* presentó un aumento en los pacientes con SII respecto a los sujetos control. Las bacterias de este género tienen la capacidad metabólica para sintetizar 5-HT (Binda et al., 2018). Por otro lado, *Corynebacterium* también es productora de glutamato. El glutamato parece estar implicado en el mecanismo de las respuestas inflamatorias intestinales y cerebrales (Mishima e Ishihara, 2020).

Finalmente, se encontró una disminución en pacientes con SII del filo *Verrucomicrobia* (Figura 11). Dentro de este filo hay algunas bacterias que son degradadoras de mucina, como *Akkermansia*, género que igualmente se encontró disminuido en pacientes con SII (Anexo, Tabla 5). Una especie en específico, *Akkermansia muciniphila*, ha mostrado una reducción en pacientes con SII en algunos estudios (Bajer et al., 2017 y Png et al., 2010). *Akkermansia* puede tener también efectos benéficos en el hospedero, en un estudio reciente se describió a *A. muciniphila* como un probiótico potencial que puede hacer uso de la mucina gastrointestinal para mantener el equilibrio microbiano del intestino al convertir la mucina en subproductos benéficos (Zhang et al., 2019). Por el contrario, la ausencia de esta bacteria podría afectar el uso de mucinas como fuente de carbono por otras bacterias que son miembros importantes de la comunidad microbiana en individuos

sanos (Bajer et al., 2017). Ya que se sabe que la mucina es usada como fuente de energía por algunas bacterias, específicamente del 1 hasta el 3% de las bacterias totales en el intestino (Derrien et al., 2008).

CONCLUSIONES

En el presente estudio se logró determinar la composición de la microbiota intestinal en pacientes con Síndrome de Intestino Irritable en México. Las diferencias entre la composición de la microbiota intestinal de pacientes con SII y sujetos control se presentaron a los niveles de la clasificación taxonómica de filo a género, con una disminución significativa de *Bacteroidetes* (filo), *Bacteroidia* (clase), *Bacteroidales* (orden) y *Eubacteriaceae* (familia). En contraste, el único grupo en presentar un aumento significativo fue *Actinomycetales* (orden).

Los cambios observados en la microbiota intestinal de los pacientes con Síndrome de Intestino Irritable pueden estar relacionadas con la fisiopatología de esta enfermedad. Se sabe que estas bacterias son productoras de diferentes moléculas como AGCC, ácidos biliares y serotonina, las cuales están involucradas en el metabolismo y señalización de procesos que se han descrito como claves en la fisiología del SII.

PERSPECTIVAS

Para seguir estudiando y profundizar acerca de la composición del microbioma intestinal en pacientes con SII, se sugiere que el número de muestras de pacientes y sujetos control sea mayor al de este estudio. Así como hacer un análisis por separado de acuerdo con los diferentes subtipos del SII, y de esta manera clarificar si se tiene un perfil de microbioma intestinal para cada subtipo.

Siguiendo el análisis de grupos bacterianos y sus metabolitos relacionados, se sugiere analizar y cuantificar cada metabolito para conocer los cambios ocurridos en estos y; de esta forma, comprender los mecanismos moleculares involucrados en la etiología del SII mediados por la microbiota intestinal.

BIBLIOGRAFÍA

1. Agnello, M., Carroll, L. N., Imam, N., Pino, R., Palmer, C., Varas, I., Greene, C., Hitschfeld, M., Gupta, S., Almonacid, D. E., y Hoaglin, M. C. (2020). Gut microbiome composition and risk factors in a large cross-sectional IBS cohort. *BMJ Open Gastroenterology*, 7(1). <https://doi.org/10.1136/bmjgast-2019-000345>
2. Amieva-Balmori, M., Meixueiro-Daza, A., Cantón, P. (2014). Síndrome de intestino irritable en México. Estudio nacional utilizando cuestionario modular Roma III. In *Revista de Gastroenterología de México*. (Vol. 79, Issue 2, pp. 22-33)
3. Arredonodo-Hernández, R., Schmulson, M., Orduña, P., López-Leal, G., Zarate, A., Alanis-Funez, G., Alcaraz, D., Santiago-Cruz, R., Cevallos, M., Villa, A., Ponce-de-León, S., y López-Vidal, Y. (2020). Mucosal Microbiome Profiles Polygenic Irritable Bowel Syndrome in Mestizo Individuals. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 10(72). <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00072>
4. Atkinson, W., Lockhart, S., Whorwell, P. J., Keevil, B., y Houghton, L. A. (2006). Altered 5-hydroxytryptamine signaling in patients with constipation- and diarrhea-predominant irritable bowel syndrome. *Gastroenterology*, 130(1), 34–43. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2005.09.031>
5. Bajer, L., Kverka, M., Kostovcik, M., Macinga, P., Dvorak, J., Stehlikova, Z., Brezina, J., Wohl, P., Spicak, J., y Drastich, P. (2017). Distinct gut microbiota profiles in patients with primary sclerosing cholangitis and ulcerative colitis. *World Journal of Gastroenterology*, 23(25), 4548–4558. <https://doi.org/10.3748/wjg.v23.i25.4548>
6. Barandouzi, Z. A., Lee, J., Maas, K., Starkweather, A. R., y Cong, X. S. (2021). Altered gut microbiota in irritable bowel syndrome and its association with food components. *Journal of Personalized Medicine*, 11(1), 1–19. <https://doi.org/10.3390/jpm11010035>
7. Barbara, G., Cremon, C., de Giorgio, R., Dohel, G., Zecchi, L., Bellacosa, L., Carini, G., Stanghellini, V., y Corinaldesi, R. (2011). Mechanisms underlying visceral hypersensitivity in irritable bowel syndrome. In *Current Gastroenterology Reports* (Vol. 13, Issue 4, pp. 308–315). <https://doi.org/10.1007/s11894-011-0195-7>
8. Bearcroft, C. P., Perrett, D., Farthing, J. G., Bartholomew's, S., y London, R. (1998). Postprandial plasma 5-hydroxytryptamine in diarrhoea predominant irritable bowel syndrome: a pilot study. <http://gut.bmj.com/>

9. Bedford, A., y Gong, J. (2018). Implications of butyrate and its derivatives for gut health and animal production. In *Animal Nutrition* (Vol. 4, Issue 2, pp. 151–159). KeAi Communications Co. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2017.08.010>
10. Benítez-Páez, A., Gómez del Pulgar, E. M., y Sanz, Y. (2017). The glycolytic versatility of *Bacteroides uniformis* CECT 7771 and Its genome response to oligo and polysaccharides. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7(AUG). <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00383>
11. Benson, D. A., Cavanaugh, M., Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D. J., Ostell, J., y Sayers, E. W. (2013). GenBank. *Nucleic Acids Research*, 41(D1). <https://doi.org/10.1093/nar/gks1195>
12. Binda, C., Lopetuso, L. R., Rizzatti, G., Gibiino, G., Cennamo, V., y Gasbarrini, A. (2018). Actinobacteria: A relevant minority for the maintenance of gut homeostasis. In *Digestive and Liver Disease* (Vol. 50, Issue 5, pp. 421–428). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.dld.2018.02.012>
13. Carmona-Sánchez, R., Icaza-Chávez, M. E., Bielsa-Fernández, M. v., Gómez-Escudero, O., Bosques-Padilla, F., Coss-Adame, E., Esquivel-Ayanegui, F., Flores-Rendón, R., González-Martínez, M. A., Huerta-Iga, F., López-Colombo, A., Méndez-Gutiérrez, T. H., Noble-Lugo, A., Nogueira-de Rojas, J. R., Raña-Garibay, R. H., Remes-Troche, J. M., Roesch-Dietlen, F., Schmulson, M. J., Soto-Pérez, J. C., ... Zavala-Solares, M. R. (2016). Consenso mexicano sobre el síndrome de intestino irritable. In *Revista de Gastroenterología de México* (Vol. 81, Issue 3, pp. 149–167). Asociación Mexicana de Gastroenterología. <https://doi.org/10.1016/j.rgmx.2016.01.004>
14. Carroll, I. M., Ringel-Kulka, T., Siddle, J. P., y Ringel, Y. (2012). Alterations in composition and diversity of the intestinal microbiota in patients with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterology and Motility*, 24(6). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2982.2012.01891.x>
15. Carco, C., Young, W., Gearry, R. B., Talley, N. J., McNabb, W. C., y Roy, N. C. (2020). Increasing Evidence That Irritable Bowel Syndrome and Functional Gastrointestinal Disorders Have a Microbial Pathogenesis. In *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* (Vol. 10). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00468>
16. Cerdá, B., Pérez, M., Pérez-Santiago, J. D., Tornero-Aguilera, J. F., González-Soltero, R., y Larrosa, M. (2016). Gut microbiota modification: Another piece in the puzzle of the benefits of physical exercise in health? In *Frontiers in Physiology* (Vol. 7, Issue FEB). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00051>

17. Chakravorty, S., Helb, D., Burday, M., Connell, N., y Alland, D. (2007). A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 69(2), 330–339. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2007.02.005>
18. Cho, I., y Blaser, M. J. (2012). The human microbiome: At the interface of health and disease. In *Nature Reviews Genetics* (Vol. 13, Issue 4, pp. 260–270). <https://doi.org/10.1038/nrg3182>
19. Chong, P. P., Chin, V. K., Looi, C. Y., Wong, W. F., Madhavan, P., y Yong, V. C. (2019). The microbiome and irritable bowel syndrome - A review on the pathophysiology, current research and future therapy. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 10, Issue JUN). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01136>
20. Chung, C. S., Chang, P. F., Liao, C. H., Lee, T. H., Chen, Y., Lee, Y. C., Wu, M. S., Wang, H. P., y Ni, Y. H. (2016). Differences of microbiota in small bowel and faeces between irritable bowel syndrome patients and healthy subjects. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 51(4), 410–419. <https://doi.org/10.3109/00365521.2015.1116107>
21. Collado, M. C., y Sanz, Y. (2006). Method for direct selection of potentially probiotic Bifidobacterium strains from human feces based on their acid-adaptation ability. *Journal of Microbiological Methods*, 66(3), 560–563. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2006.01.007>
22. Cortés-López, N. G., Ordóñez-Baquera, P. L., y Domínguez-Viveros, J. (2021). Molecular tools used for metagenomic analysis. Review. In *Revista Mexicana De Ciencias Pecuarias* (Vol. 11, Issue 4, pp. 1150–1173). INIFAP-CENID Parasitología Veterinaria. <https://doi.org/10.22319/RMCP.V11I4.5202>
23. Cremon, C., Carini, G., Wang, B., Vasina, V., Cogliandro, R. F., de Giorgio, R., Stanghellini, V., Grundy, D., Tonini, M., de Ponti, F., Corinaldesi, R., y Barbara, G. (2011). Intestinal serotonin release, sensory neuron activation, and abdominal pain in irritable bowel syndrome. *American Journal of Gastroenterology*, 106(7), 1290–1298. <https://doi.org/10.1038/ajg.2011.86>
24. Cui, X., Wang, H., Ye, Z., Li, Y., Qiu, X., y Zhang, H. (2021). Fecal microbiota profiling in irritable bowel syndrome and inflammatory bowel disease patients with irritable bowel syndrome-type symptoms. *BMC Gastroenterology*, 21(1). <https://doi.org/10.1186/s12876-021-02015-w>
25. Derrien, M., Collado, M. C., Ben-Amor, K., Salminen, S., y de Vos, W. M. (2008). The mucin degrader *Akkermansia muciniphila* is an abundant resident of the human intestinal

- tract. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(5), 1646–1648. <https://doi.org/10.1128/AEM.01226-07>
26. Diagnóstico y Tratamiento del Intestino Irritable en el adulto. Guía de Referencia Rápida: Guía de Práctica Clínica. México, CENETEC, 2015
27. Drengenes, C., Eagan, T. M. L., Haaland, I., Wiker, H. G., y Nielsen, R. (2021). Exploring protocol bias in airway microbiome studies: one versus two PCR steps and 16S rRNA gene region V3 V4 versus V4. *BMC Genomics*, 22(1). <https://doi.org/10.1186/s12864-020-07252-z>
28. Duan, R., Zhu, S., Wang, B., y Duan, L. (2019). Alterations of gut microbiota in patients with irritable bowel syndrome based on 16s rRNA-targeted sequencing: A systematic review. In *Clinical and Translational Gastroenterology* (Vol. 10, Issue 2). Lippincott Williams and Wilkins. <https://doi.org/10.14309/ctg.0000000000000012>
29. Durbán, A., Abellán, J. J., Jiménez-Hernández, N., Ponce, M., Ponce, J., Sala, T., D'Auria, G., Latorre, A., y Moya, A. (2011). Assessing Gut Microbial Diversity from Feces and Rectal Mucosa. *Microbial Ecology*, 61(1), 123–133. <https://doi.org/10.1007/s00248-010-9738-y>
30. Durbán, A., Abellán, J. J., Jiménez-Hernández, N., Salgado, P., Ponce, M., Ponce, J., Garrigues, V., Latorre, A., y Moya, A. (2012). Structural alterations of faecal and mucosa-associated bacterial communities in irritable bowel syndrome. *Environmental Microbiology Reports*, 4(2), 242–247. <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2012.00327.x>
31. Elshaghabee, F. M. F., Rokana, N., Gulhane, R. D., Sharma, C., y Panwar, H. (2017). Bacillus as potential probiotics: Status, concerns, and future perspectives. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 8, Issue AUG). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01490>
32. Fitz, B. (2021). *Tesis: Importancia del phylum Actinobacteria en sujetos con Síndrome de Intestino Irritable*. Universidad Nacional Autónoma de México. (Manuscrito no publicado).
33. García-García-de-Paredes, A., Rodríguez-de-Santiago, E., Aguilera-Castro, L., Ferrer-Aracil, C., y López-Sanromán, A. (2015). Fecal microbiota transplantation. *Gastroenterología y Hepatología*, 38(3), 123–134. <https://doi.org/10.1016/j.gastrohep.2014.07.010>
34. García-Zermeño, KM., y Remes-Troche, JM. (2018). Síndrome de Intestino Irritable. In *Revista de la Asociación guatemalteca de Gastroenterología*. (Vol 4, pp. 9-26)

35. Guzior, D. v., y Quinn, R. A. (2021). Review: microbial transformations of human bile acids. In *Microbiome* (Vol. 9, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s40168-021-01101-1>
36. Hemarajata, P., Versalovic, J., y Dra Lau, L. (2013). Traducciones seleccionadas del *Clinical Chemistry* La microbiota intestinal humana y el metabolismo corporal: Implicaciones con la obesidad y la diabetes. *Acta Bioquím Clín Latinoam*, 47(2), 617–645.
37. Houghton, L. A., Atkinson, W., Whitaker, R. P., y Whorwell, J. (2003). *Increased platelet depleted plasma 5-hydroxytryptamine concentration following meal ingestion in symptomatic female subjects with diarrhoea predominant irritable bowel syndrome*. www.gutjnl.com
38. Icaza-Chávez, M. E. (2013). Gut microbiota in health and disease. In *Revista de Gastroenterología de México* (Vol. 78, Issue 4, pp. 240–248). Asociación Mexicana de Gastroenterología. <https://doi.org/10.1016/j.rgmx.2013.04.004>
39. Izquierdo, P. (2015). Comparación de estrategias metagenómicas en muestras ambientales de biofilms. Universidad Politécnica de Valencia (UPV).
40. James, S. C., Fraser, K., Young, W., Heenan, P. E., Gearry, R. B., Keenan, J. I., Talley, N. J., Joyce, S. A., McNabb, W. C., y Roy, N. C. (2021). Concentrations of fecal bile acids in participants with functional gut disorders and healthy controls. *Metabolites*, 11(9). <https://doi.org/10.3390/metabo11090612>
41. James, S. C., Fraser, K., Young, W., McNabb, W. C., y Roy, N. C. (2020). Gut microbial metabolites and biochemical pathways involved in irritable bowel syndrome: Effects of diet and nutrition on the microbiome. In *Journal of Nutrition* (Vol. 150, Issue 5, pp. 1012–1021). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/jn/nxz302>
42. Jandhyala, S. M., Talukdar, R., Subramanyam, C., Vuyyuru, H., Sasikala, M., y Reddy, D. N. (2015). Role of the normal gut microbiota. *World Journal of Gastroenterology*, 21(29), 8836–8847. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i29.8787>
43. Jarocki, P., Podlešny, M., Glibowski, P., y Targoński, Z. (2014). A new insight into the physiological role of bile salt hydrolase among intestinal bacteria from the genus bifidobacterium. *PLoS ONE*, 9(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114379>
44. Jeffery, I. B., O'Toole, P. W., Öhman, L., Claesson, M. J., Deane, J., Quigley, E. M. M., y Simrén, M. (2012). An irritable bowel syndrome subtype defined by species-specific alterations in faecal microbiota. *Gut*, 61(7), 997–1006. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2011-301501>

45. Jia, Q., Zhang, L., Zhang, J., Pei, F., Zhu, S., Sun, Q., y Duan, L. (2019). Fecal Microbiota of Diarrhea-Predominant Irritable Bowel Syndrome Patients Causes Hepatic Inflammation of Germ-Free Rats and Berberine Reverses It Partially. *BioMed Research International*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/4530203>
46. Jiménez-Valverde A., y Hortal, J. (2003). Las curvas de acumulación de especies y la necesidad de evaluar la calidad de los inventarios biológicos. *Revista Ibérica de Aracnología*. Vol. 8 pp. 151-161.
47. Kanehisa, M., Goto, S., Kawashima, S., y Nakaya, A. (2002). The KEGG databases at GenomeNet. In *Nucleic Acids Research* (Vol. 30, Issue 1). <http://www.genome.ad.jp/kegg/>
48. Kent, W. J. (2002). BLAT—The BLAST -Like Alignment Tool. *Genome Research*, 12(4), 656–664. <https://doi.org/10.1101/gr.229202>
49. Klooker, T. K., Braak, B., Koopman, K. E., Welting, O., Wouters, M. M., van der Heide, S., Schemann, M., Bischoff, S. C., van den Wijngaard, R. M., y Boeckxstaens, G. E. (2010). The mast cell stabiliser ketotifen decreases visceral hypersensitivity and improves intestinal symptoms in patients with irritable bowel syndrome. *Gut*, 59(9), 1213–1221. <https://doi.org/10.1136/gut.2010.213108>
50. König, J., Rangel, I., y Brummer, R. J. (2013). The Role of Lactic Acid Bacteria in the Pathophysiology and Treatment of Irritable Bowel Syndrome (IBS). *Food and Nutrition Sciences*, 04(11), 27–39. <https://doi.org/10.4236/fns.2013.411a005>
51. Langmead, B., Trapnell, C., Pop, M., y Salzberg, S. L. (2009). Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biology*, 10(3). <https://doi.org/10.1186/gb-2009-10-3-r25>
52. Li, J., Li, Y., Zhou, Y., Wang, C., Wu, B., y Wan, J. (2018). Actinomyces and Alimentary Tract Diseases: A Review of Its Biological Functions and Pathology. In *BioMed Research International* (Vol. 2018). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2018/3820215>
53. Lynch, S. v., y Pedersen, O. (2016). The Human Intestinal Microbiome in Health and Disease. *New England Journal of Medicine*, 375(24), 2369–2379. <https://doi.org/10.1056/nejmra1600266>
54. Luo, M., Zhuang, X., Tian, Z., y Xiong, L. (2021). Alterations in short-chain fatty acids and serotonin in irritable bowel syndrome: a systematic review and meta-analysis. *BMC Gastroenterology*, 21(1). <https://doi.org/10.1186/s12876-020-01577-5>
55. Maccaferri, S., Candela, M., Turrone, S., Severgnini, M. C. M., Consolandi, C., Cavina, P., y Brigidi, P. (2012). Ibs-associated phylogenetic unbalances of the intestinal

- microbiota are not reverted by probiotic supplementation. *Gut Microbes*, 3(5), 406–413. <https://doi.org/10.4161/gmic.21009>
56. Malla, M. A., Dubey, A., Kumar, A., Yadav, S., Hashem, A., y Allah, E. F. A. (2019). Exploring the human microbiome: The potential future role of next generation sequencing in disease diagnosis and treatment. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 10, Issue JAN). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02868>
 57. Mari, A., Baker, F. A., Mahamid, M., Sbeit, W., y Khoury, T. (2020). The evolving role of gut microbiota in the management of irritable bowel syndrome: An overview of the current knowledge. In *Journal of Clinical Medicine* (Vol. 9, Issue 3). MDPI. <https://doi.org/10.3390/jcm9030685>
 58. Mearin, F., Ciriza, C., Mínguez, M., Rey, E., Mascort, J. J., Peña, E., Cañones, P., y Júdez, J. (2017). Guía de práctica clínica. Síndrome del intestino irritable con estreñimiento y estreñimiento funcional en adultos: concepto, diagnóstico y continuidad asistencial (Parte 1). *Medicina General y de Familia*, 6(1), 23–35. <https://doi.org/10.24038/mgyf.2017.005>
 59. Mei, L., Zhou, J., Su, Y., Mao, K., Wu, J., Zhu, C., He, L., y Cui, Y. (2021). Gut microbiota composition and functional prediction in diarrhea-predominant irritable bowel syndrome. *BMC Gastroenterology*, 21(1). <https://doi.org/10.1186/s12876-021-01693-w>
 60. Meyer F. (2019). MG-RAST User Manual. <https://mg-rast.org>.
 61. Meyer, F., Paarmann, D., D'Souza, M., Olson, R., Glass, E. M., Kubal, M., Paczian, T., Rodriguez, A., Stevens, R., Wilke, A., Wilkening, J., y Edwards, R. A. (2008). The metagenomics RAST server - A public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes. *BMC Bioinformatics*, 9. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-386>
 62. Min, Y. W., y Rhee, P. L. (2015). The Role of Microbiota on the Gut Immunology. In *Clinical Therapeutics* (Vol. 37, Issue 5, pp. 968–975). Excerpta Medica Inc. <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2015.03.009>
 63. Mishima, Y., e Ishihara, S. (2020). Molecular mechanisms of microbiota-mediated pathology in irritable bowel syndrome. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 21, Issue 22, pp. 1–25). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms21228664>
 64. Monda, V., Villano, I., Messina, A., Valenzano, A., Esposito, T., Moscatelli, F., Viggiano, A., Cibelli, G., Chieffi, S., Monda, M., y Messina, G. (2017). Exercise modifies the gut microbiota with positive health effects. In *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* (Vol. 2017). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2017/3831972>

65. Moreno del Castillo, M., Valladares-García, J., y Halabe-Cherem, J. (2018). *Microbioma humano* (Vol. 61, Issue 6, pp. 7-19). <http://dx.doi.org/10.22201.fm.24484865e.2018.61.6.02>
66. Neville, B. A., Forde, B. M., Claesson, M. J., Darby, T., Coghlan, A., Nally, K., Ross, R. P., y O'Toole, P. W. (2012). Characterization of pro-inflammatory flagellin proteins produced by *Lactobacillus ruminis* and related motile *lactobacilli*. *PLoS ONE*, 7(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040592>
67. O'Callaghan, J. L., Willner, D., Buttini, M., Huygens, F., y Pelzer, E. S. (2021). Limitations of 16S rRNA Gene Sequencing to Characterize *Lactobacillus* Species in the Upper Genital Tract. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.641921>
68. Ochoa, C. (2013). Revisión temática la biota intestinal, el metabolismo energético, y la diabetes mellitus. *RCAN Rev Cubana Aliment Nutr*, 1(1), 2221
69. O'Flaherty, S., Briner Crawley, A., Theriot, C. M., y Barrangou, R. (2018). The *Lactobacillus* Bile Salt Hydrolase Repertoire Reveals Niche-Specific Adaptation. *MSphere*, 3(3). <https://doi.org/10.1128/msphere.00140-18>
70. Overbeek, R., Begley, T., Butler, R. M., Choudhuri, J. v., Chuang, H. Y., Cohoon, M., de Crécy-Lagard, V., Diaz, N., Disz, T., Edwards, R., Fonstein, M., Frank, E. D., Gerdes, S., Glass, E. M., Goesmann, A., Hanson, A., Iwata-Reuyl, D., Jensen, R., Jamshidi, N., ... Vonstein, V. (2005). The subsystems approach to genome annotation and its use in the project to annotate 1000 genomes. *Nucleic Acids Research*, 33(17), 5691–5702. <https://doi.org/10.1093/nar/gki866>
71. Pavón, L., Hernández, M. Loria, F. y Sandoval, G.(2004). Interacciones Neuroendocrinoinmunológicas. *Salud Mental*. Vol. 27, Issue 3, pp.19-25)
72. Peterson, J., Garges, S., Giovanni, M., McInnes, P., Wang, L., Schloss, J. A., Bonazzi, V., McEwen, J. E., Wetterstrand, K. A., Deal, C., Baker, C. C., di Francesco, V., Howcroft, T. K., Karp, R. W., Lunsford, R. D., Wellington, C. R., Belachew, T., Wright, M., Giblin, C., ... Guyer, M. (2009). The NIH Human Microbiome Project. *Genome Research*, 19(12), 2317–2323. <https://doi.org/10.1101/gr.096651.109>
73. Png, C. W., Lindén, S. K., Gilshenan, K. S., Zoetendal, E. G., McSweeney, C. S., Sly, L. I., McGuckin, M. A., y Florin, T. H. J. (2010). Mucolytic bacteria with increased prevalence in IBD mucosa augment in vitro utilization of mucin by other bacteria. *American Journal of Gastroenterology*, 105(11), 2420–2428. <https://doi.org/10.1038/ajg.2010.281>

74. Pruesse, E., Quast, C., Knittel, K., Fuchs, B. M., Ludwig, W., Peplies, J., y Glöckner, F. O. (2007). SILVA: A comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nucleic Acids Research*, 35(21), 7188–7196. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm864>
75. Rajilić-Stojanović, M., Biagi, E., Heilig, H. G. H. J., Kajander, K., Kekkonen, R. A., Tims, S., y de Vos, W. M. (2011). Global and deep molecular analysis of microbiota signatures in fecal samples from patients with irritable bowel syndrome. *Gastroenterology*, 141(5), 1792–1801. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.07.043>
76. Rajilić-Stojanović, M., Jonkers, D. M., Salonen, A., Hanevik, K., Raes, J., Jalanka, J., de Vos, W. M., Manichanh, C., Golic, N., Enck, P., Philippou, E., Iraqi, F. A., Clarke, G., Spiller, R. C., y Penders, J. (2015). Intestinal microbiota and diet in IBS: Causes, consequences, or epiphenomena? In *American Journal of Gastroenterology* (Vol. 110, Issue 2, pp. 278–287). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/ajg.2014.427>
77. Rangel, I., Sundin, J., Fuentes, S., Repsilber, D., de Vos, W. M., y Brummer, R. J. (2015). The relationship between faecal-associated and mucosal-associated microbiota in irritable bowel syndrome patients and healthy subjects. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 42(10), 1211–1221. <https://doi.org/10.1111/apt.13399>
78. Ranjan, R., Rani, A., Metwally, A., McGee, H. S., y Perkins, D. L. (2016). Analysis of the microbiome: Advantages of whole genome shotgun versus 16S amplicon sequencing. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 469(4), 967–977. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.12.083>
79. Rho, M., Tang, H., y Ye, Y. (2010). FragGeneScan: Predicting genes in short and error-prone reads. *Nucleic Acids Research*, 38(20). <https://doi.org/10.1093/nar/gkq747>
80. Rodicio, M., y Mendoza, M. (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación del 16S ARNr: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. In *Enferm Infec Microbiol Clin.* (Vol 22, Issue 4, pp. 238-45). [https://doi.org/10.1016/s0213-005x\(04\)73073-6](https://doi.org/10.1016/s0213-005x(04)73073-6)
81. Rodiño-Janeiro, B., Vicario, M., Alonso-Cotoner, C., Pascua-García, R., y Santos, J. (2018). A Review of Microbiota and Irritable Bowel Syndrome: Future in Therapies. *Adv Ther.* (Vol 35, pp. 289–310). <https://doi.org/10.1007/s12325-018-0673-5>
82. Santiago, R. (2017). *Tesis: análisis de la diversidad microbiana en muestras de biopsias de intestino mediante secuenciación masiva*. Universidad Nacional Autónoma de México

83. Schmulson, M., Bielsa, M. v., Carmona-Sánchez, R., Hernández, A., López-Colombo, A., López Vidal, Y., Peláez-Luna, M., Remes-Troche, J. M., Tamayo, J. L., y Valdovinos, M. A. (2014). Microbiota, gastrointestinal infections, low-grade inflammation, and antibiotic therapy in irritable bowel syndrome: An evidence-based review. In *Revista de Gastroenterología de México* (Vol. 79, Issue 2, pp. 96–134). Asociación Mexicana de Gastroenterología. <https://doi.org/10.1016/j.rgmx.2014.01.004>
84. Schmulson, M. J., y Drossman, D. A. (2017). What is new in Rome IV. In *Journal of Neurogastroenterology and Motility* (Vol. 23, Issue 2, pp. 151–163). Journal of Neurogastroenterology and Motility <https://doi.org/10.5056/jnm16214>
85. Schmulson, M., Ponce de León, S., Zarate, A., Orduña, P., Santiago-Cruz, R., Arredondo-Hernández, R., y López-Vidal, Y. (2017). A Study of Microbial Diversity in Colonic Biopsies of Patients with Irritable Bowel Syndrome in Mexico Using High-Throughput Sequencing. In *The American Journal of Gastroenterology*. (Vol. 112, Issue 1)
86. Shukla, R., Ghoshal, U., Dhole, T. N., y Ghoshal, U. C. (2015). Fecal Microbiota in Patients with Irritable Bowel Syndrome Compared with Healthy Controls Using Real-Time Polymerase Chain Reaction: An Evidence of Dysbiosis. *Digestive Diseases and Sciences*, 60(10), 2953–2962. <https://doi.org/10.1007/s10620-015-3607-y>
87. Simren, M., Palsson, O. S., y Whitehead, W. E. (2017). Update on Rome IV Criteria for Colorectal Disorders: Implications for Clinical Practice. In *Current Gastroenterology Reports* (Vol. 19, Issue 4). Current Medicine Group LLC 1. <https://doi.org/10.1007/s11894-017-0554-0>
88. Suárez-Moya, A. (2017). Microbiome and next generation sequencing Microbioma y secuenciación masiva. In *Secuenciación masiva Rev Esp Quimioter* (Vol. 30, Issue 5, pp. 305-311).
89. Sultan, S., El-Mowafy, M., Elgaml, A., Ahmed, T. A. E., Hassan, H., y Mottawea, W. (2021). Metabolic Influences of Gut Microbiota Dysbiosis on Inflammatory Bowel Disease. In *Frontiers in Physiology* (Vol. 12). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.715506>
90. Tabbers, M. M., de Milliano, I., Roseboom, M. G., y Benninga, M. A. (2011). Is *Bifidobacterium breve* effective in the treatment of childhood constipation? Results from a pilot study. *Nutrition Journal*, 10(1). <https://doi.org/10.1186/1475-2891-10-19>

91. Tailford, L. E., Crost, E. H., Kavanaugh, D., y Juge, N. (2015). Mucin glycan foraging in the human gut microbiome. *Frontiers in Genetics*, 5(FEB). <https://doi.org/10.3389/fgene.2015.00081>
92. Tana, C., Umesaki, Y., Imaoka, A., Handa, T., Kanazawa, M., y Fukudo, S. (2010). Altered profiles of intestinal microbiota and organic acids may be the origin of symptoms in irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterology and Motility*, 22(5). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2982.2009.01427.x>
93. Tanaka, H., Hashiba, H., Kok, J., y Mierau, I. (2000). Bile Salt Hydrolase of *Bifidobacterium longum*-Biochemical and Genetic Characterization. In *Applied and Environmental Microbiology* (Vol. 66, Issue 6). <https://journals.asm.org/journal/aem>
94. Tap, J., Derrien, M., Törnblom, H., Brazeilles, R., Cools-Portier, S., Doré, J., Störsrud, S., le Nevé, B., Öhman, L., y Simrén, M. (2017). Identification of an Intestinal Microbiota Signature Associated with Severity of Irritable Bowel Syndrome. *Gastroenterology*, 152(1), 111-123.e8. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.09.049>
95. Vázquez, A. (2016). *Trabajo de fin de grado: Técnicas de secuenciación de nueva generación para el estudio del microbioma humano*. Universidad Complutense.
96. Venegas, D. P., de La Fuente, M. K., Landskron, G., González, M. J., Quera, R., Dijkstra, G., Harmsen, H. J. M., Faber, K. N., y Hermoso, M. A. (2019). Short chain fatty acids (SCFAs) mediated gut epithelial and immune regulation and its relevance for inflammatory bowel diseases. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 10, Issue MAR). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00277>
97. Young, V. B. (2017). The role of the microbiome in human health and disease: An introduction for clinicians. In *BMJ (Online)* (Vol. 356). BMJ Publishing Group. <https://doi.org/10.1136/bmj.j831>
98. Zamudio-Tiburcio, Á., Bermúdez-Ruiz, H., Lezama-Guzmán, H. R., Guevara-Ortigoza, M. del P., Islas-Solares, E., y Sosa-López, F. A. (2017). Breaking paradigms. Intestinal microbiota transplantation: Preliminar report. *Cirugia y Cirujanos (English Edition)*, 85, 6–12. <https://doi.org/10.1016/j.circir.2016.11.017>
99. Zeledón, N., Serrano, J., y Fernández, S. (2021). Síndrome de Intestino Irritable. *Rev. Médica Sinergia*. (Vol.6, Issue 2, e645). <https://doi.org/10.31434/rms.v6i2.645>
100. Zhang, T., Li, Q., Cheng, L., Buch, H., y Zhang, F. (2019). *Akkermansia muciniphila* is a promising probiotic. In *Microbial Biotechnology* (Vol. 12, Issue 6, pp. 1109–1125). John Wiley and Sons Ltd. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13410>

101. Zhao, L., Yang, W., Chen, Y., Huang, F., Lu, L., Lin, C., Huang, T., Ning, Z., Zhai, L., Zhong, L. L. D., Lam, W., Yang, Z., Zhang, X., Cheng, C., Han, L., Qiu, Q., Shang, X., Huang, R., Xiao, H., ... Bian, Z. (2020). A Clostridia-rich microbiota enhances bile acid excretion in diarrhea-predominant irritable bowel syndrome. *Journal of Clinical Investigation*, *130*(1), 438–450. <https://doi.org/10.1172/JCI130976>
102. Zhou, Q. Q., Zhang, B., y Nicholas Verne, G. (2009). Intestinal membrane permeability and hypersensitivity in the irritable bowel syndrome. *Pain*, *146*(1–2), 41–46. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2009.06.017>
103. Zhuang, X., Tian, Z., Li, L., Zeng, Z., Chen, M., y Xiong, L. (2018). Fecal microbiota alterations associated with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome. *Frontiers in Microbiology*, *9*(JUL). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01600>
104. Zoetendal, E. G., von Wright, A., Vilpponen-Salmela, T., Ben-Amor, K., Akkermans, A. D. L., y de Vos, W. M. (2002). Mucosa-associated bacteria in the human gastrointestinal tract are uniformly distributed along the colon and differ from the community recovered from feces. *Applied and Environmental Microbiology*, *68*(7), 3401–3407. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.7.3401-3407.2002>

ANEXO I

Tabla 1. Resultados de la asignación taxonómica a nivel de Filo

Nivel taxonómico	Número de Secuencias (%)						
Filo	CTRL-1	CTRL-2	CTRL-3	SII-1	SII-2	SII-3	SII-4
<i>Firmicutes</i>	55652 (52.77%)	40162 (36.09%)	23494 (34.78%)	16938 (28.54%)	45855 (64.57%)	30572 (46.20%)	33713 (40.45%)
<i>Bacteroidetes</i>	45413 (43.06%)	68180 (61.27%)	40399 (59.80%)	15284 (25.75%)	21919 (30.86%)	18668 (28.21%)	34854 (41.82%)
<i>Proteobacteria</i>	---	29 (0.03%)	---	1879 (3.17%)	281 (0.40%)	99 (0.15%)	671 (0.81%)
<i>Actinobacteria</i>	765 (0.73%)	845 (0.76%)	1731 (2.56%)	1863 (3.14%)	658 (0.93%)	927 (1.40%)	3011 (3.61%)
<i>Verrucomicrobia</i>	1613 (1.53%)	---	301 (0.45%)	1026 (1.73%)	---	---	---
<i>Fusobacteria</i>	---	9 (0.01%)	---	16049 (27.04%)	---	1319 (1.99%)	---
<i>Deinococcus-Thermus</i>	1010 (0.10%)	---	---	380 (0.64%)	---	---	---
<i>Arthropoda</i>	105 (0.10%)	187 (0.17%)	634 (0.94%)	308 (0.52%)	---	162 (0.24%)	---
<i>Streptophyta</i>	404 (0.38%)	51 (0.05%)	8 (0.01%)	927 (1.56%)	1981 (2.79%)	1619 (2.45%)	2274 (2.73%)
<i>Cyanobacteria</i>	---	---	---	803 (1.35%)	---	---	---
<i>Basidiomycota</i>	---	---	---	278 (0.47%)	---	---	---
<i>Acidobacteria</i>	---	---	---	---	---	---	250 (0.30%)
<i>Synergistetes</i>	---	---	23 (0.03)	---	---	---	---
<i>Euryarchaeota</i>	---	---	171 (0.25%)	---	---	---	---
NC (derivado de Bacteria)	1409 (1.34%)	1806 (1.62%)	792 (1.17%)	3540 (5.96%)	327 (0.46%)	12806 (19.35%)	8564 (10.28%)
NC (derivado de secuencias no clasificadas)	---	---	---	77 (0.13%)	---	---	---

NC: No clasificado

Tabla 2. Resultados de la asignación taxonómica a nivel de Clase

Nivel taxonómico	Número de Secuencias (%)						
	CTRL-1	CTRL-2	CTRL-3	SII-1	SII-2	SII-3	SII-4
Bacilli	1452 (1.38%)	105 (0.09%)	301 (0.45%)	590 (1.00%)	701 (1.06%)	2294 (3.47%)	505 (0.61%)
Clostridia	50160 (47.59%)	36402 (32.77%)	21622 (32.27%)	13423 (22.77%)	35229 (53.30%)	25135 (38.07%)	32349 (38.94%)
Erysipelotrichi	1714 (1.63%)	1556 (1.40%)	1090 (1.63%)	1008 (1.71%)	310 (0.47%)	2404 (3.64%)	652 (0.79%)
Negativicutes	2273 (2.16%)	1905 (1.72%)	136 (0.20%)	1803 (3.06%)	5428 (8.21%)	734 (1.11%)	30 (0.04%)
Bacteroidia	45195 (42.88%)	68179 (61.38%)	40368 (60.24%)	12789 (21.69%)	21919 (33.16%)	18474 (27.98%)	34854 (42.08%)
Cytophagia	217 (0.21%)	---	---	---	---	---	---
Flavobacteria	---	---	---	2051 (3.48%)	---	---	---
Sphingobacteria	---	---	---	438 (0.74%)	---	194 (0.29%)	---
Actinobacteria (clase)	765 (0.73%)	845 (0.76%)	1731 (2.58%)	1863 (3.16%)	658 (1.00%)	927 (1.40%)	3011 (3.64%)
Alphaproteobacteria	---	---	---	1341 (2.27%)	43 (0.07%)	---	491 (0.59%)
Betaproteobacteria	---	---	---	---	---	71 (0.11%)	32 (0.04%)
Gammaproteobacteria	---	28 (0.03%)	---	537 (0.91%)	238 (0.36%)	28 (0.04%)	148 (0.18%)
Verrucomicrobiae	1613 (1.53%)	---	301 (0.45%)	1026 (1.74%)	---	---	---
Deinococci	101 (0.10%)	---	---	380 (0.64%)	---	---	---
Solibacteres	---	---	---	---	---	---	250 (0.30%)
Fusobacteria (clase)	---	9 (0.01%)	---	16049 (27.22%)	---	1319 (2.00)	---
Insecta	105 (0.10%)	187 (0.17%)	634 (0.95%)	308 (0.52%)	---	162 (0.25%)	---
NC (derivado de Streptophyta)	404 (0.38%)	50 (0.05%)	8 (0.01%)	418 (0.71%)	1244 (1.88%)	1475 (2.23%)	2035 (2.45%)
NC (derivado de Cyanobacteria)	---	---	---	803 (1.36%)	---	---	---
NC (derivado de Bacteria)	1409 (1.34%)	1806 (1.63%)	792 (1.18%)	3540 (6.00%)	327 (0.49%)	12806 (19.40%)	8564 (10.34%)
NC (derivado de secuencias no clasificadas)	---	---	---	77 (0.13%)	---	---	---

NC: No clasificado

Tabla 3. Resultados de la asignación taxonómica a nivel de Orden

Nivel taxonómico	Número de Secuencias (%)						
	Orden	CTRL-1	CTRL-2	CTRL-3	SII-1	SII-2	SII-3
<i>Bacillales</i>	244 (0.23%)	102 (0.09%)	40 (0.06%)	510 (0.88%)	---	32 (0.05%)	501 (0.62%)
<i>Lactobacillales</i>	1208 (1.15%)	---	252 (0.38%)	79 (0.14%)	701 (1.08%)	2261 (3.50%)	---
<i>Clostridiales</i>	50160 (47.59%)	36395 (32.77%)	21615 (32.26%)	13423 (23.27%)	35229 (54.36%)	25135 (38.90%)	32249 (40.22%)
<i>Erysipelotrichales</i>	1714 (1.63%)	1556 (1.40%)	1090 (1.63%)	1008 (1.75%)	310 (0.48%)	2404 (3.72%)	652 (0.81%)
<i>Selenomonadales</i>	2273 (2.16%)	1905 (1.72%)	136 (0.20%)	1803 (3.13%)	5428 (8.38%)	734 (1.14%)	30 (0.04%)
<i>Bacteroidales</i>	45195 (42.88%)	68179 (61.39%)	40368 (60.26%)	12789 (22.17%)	21919 (33.82%)	18474 (28.59%)	34854 (43.47%)
<i>Cytophagales</i>	217 (0.21%)	---	---	---	---	---	---
<i>Flavobacteriales</i>	---	---	---	2050 (3.55%)	---	---	---
<i>Sphingobacteriales</i>	---	---	---	438 (0.76%)	---	194 (0.30%)	---
<i>Actinomycetales</i>	663 (0.63%)	---	4 (0.01%)	1279 (2.22%)	158 (0.24%)	771 (1.19%)	2467 (3.08%)
<i>Coriobacteriales</i>	105 (0.10%)	301 (0.27%)	445 (0.66%)	166 (0.29%)	364 (0.56%)	156 (0.24%)	103 (0.13%)
<i>Rhizobiales</i>	---	---	---	141 (0.24%)	---	---	247 (0.31%)
<i>Rhodobacterales</i>	---	---	---	4 (0.01%)	---	---	---
<i>Sphingomonadales</i>	---	---	---	1197 (2.08%)	---	---	---
<i>Enterobacteriales</i>	---	20 (0.02%)	---	393 (0.68%)	238 (0.37%)	22 (0.03%)	17 (0.02%)
<i>Legionellales</i>	---	---	---	67 (0.12%)	---	---	---
<i>Oceanospirillales</i>	---	---	---	18 (0.03%)	---	---	---
<i>Pseudomonadales</i>	---	9 (0.01%)	---	3 (0.01%)	---	---	11 (0.01%)
<i>Neisseriales</i>	---	---	---	---	---	69 (0.10%)	30 (0.04%)
<i>Bifidobacteriales</i>	---	513 (0.46%)	1281 (1.91%)	418 (0.72%)	136 (0.21%)	---	441 (0.55%)
<i>Verrucomicrobiales</i>	1613 (1.53%)	---	301 (0.45%)	1026 (1.78%)	---	---	---
<i>Fusobacteriales</i>	---	8 (0.01%)	---	16049 (27.83%)	---	1319 (2.04%)	---
<i>Deinococcales</i>	101 (0.10%)	---	---	380 (0.66%)	---	---	---
<i>Synergistales</i>	---	---	23 (0.03%)	---	---	---	---
<i>Isoptera</i>	102 (0.10%)	187 (0.17%)	634 (0.95%)	308 (0.53%)	---	162 (0.25%)	---
<i>Brassicales</i>	404 (0.38%)	41 (0.04%)	8 (0.01%)	---	---	71 (0.11%)	---
NC (derivado de secuencias no clasificadas)	---	---	---	77 (0.13%)	---	---	---
NC (derivado de Bacteria)	1409 (1.34%)	1806 (1.63%)	792 (1.18%)	3540 (6.14%)	327 (0.50%)	12806 (19.82%)	8564 (10.68%)

NC: No clasificado

Tabla 4. Resultados de la asignación taxonómica a nivel de Familia

Nivel taxonómico	Número de Secuencias (%)						
	Familia	CTRL-1	CTRL-2	CTRL-3	SII-1	SII-2	SII-3
<i>Bacillaceae</i>	---	---	8 (0.01%)	---	---	10 (0.02%)	264 (0.34%)
<i>Lactobacillaceae</i>	---	---	104 (0.18%)	---	---	551 (0.91%)	---
<i>Clostridiaceae</i>	3087 (3.46%)	2422 (2.44%)	2013 (3.40%)	1836 (3.31%)	813 (1.34%)	697 (1.15%)	19115 (24.79%)
<i>Clostridiales Familia XI. Incertae Sedis</i>	---	---	---	---	---	406 (0.67%)	52 (0.07%)
<i>Eubacteriaceae</i>	2462 (2.76%)	1316 (1.33%)	766 (1.30%)	489 (0.88%)	1339 (2.20%)	272 (0.45%)	90 (0.12%)
<i>Lachnospiraceae</i>	15559 (17.44%)	2058 (2.07%)	2569 (4.35%)	1085 (1.96%)	6541 (10.77%)	2226 (3.68%)	2682 (3.48%)
<i>Ruminococcaceae</i>	16456 (18.45%)	20189 (20.34%)	10470 (17.71%)	8060 (14.59%)	22480 (37.02%)	19558 (32.34%)	7328 (9.50%)
<i>Erysipelotrichaceae</i>	1714 (1.92%)	1556 (1.57%)	1090 (1.84%)	1008 (1.82%)	310 (0.51%)	2404 (3.97%)	652 (0.85%)
<i>Acidaminococcaceae</i>	---	1120 (1.13%)	110 (0.19%)	---	---	338 (0.56%)	---
<i>Veillonellaceae</i>	2266 (2.54%)	785 (0.79%)	25 (0.04%)	1803 (3.26%)	5427 (8.94%)	396 (0.65%)	30 (0.04%)
<i>Staphylococcaceae</i>	---	9 (0.01%)	33 (0.06%)	133 (0.24%)	---	22 (0.04%)	80 (0.10%)
<i>Aerococcaceae</i>	---	---	---	12 (0.02%)	---	---	---
<i>Leuconostocaceae</i>	---	---	107 (0.18%)	---	---	---	---
<i>Sphingobacteriaceae</i>	---	---	---	438 (0.79%)	---	154 (0.25%)	---
NC (derivado de <i>Bacillales</i>)	242 (0.27%)	---	---	378 (0.68%)	---	---	157 (0.20%)
NC (derivado de <i>Clostridiales</i>)	354 (0.40%)	53 (0.05%)	27 (0.05%)	---	---	---	---
<i>Carnobacteriaceae</i>	267 (0.30%)	---	---	---	---	---	---
<i>Enterococcaceae</i>	940 (1.05%)	---	16 (0.03%)	59 (0.11%)	676 (1.11%)	156 (0.26%)	---
<i>Streptococcaceae</i>	---	---	10 (0.02%)	---	---	---	---
<i>Peptococcaceae</i>	---	13 (0.01%)	8 (0.01%)	---	---	---	---
<i>Victivallaceae</i>	---	5 (0.01%)	---	---	---	---	---
NC (derivado de <i>Sphingobacteriales</i>)	---	---	---	---	---	40 (0.07%)	---
<i>Bacteroidaceae</i>	40210 (45.07%)	64076 (64.56%)	9083 (15.36%)	7242 (13.11%)	16382 (26.98%)	5753 (9.51%)	30398 (39.43%)
<i>Porphyromonadaceae</i>	945 (1.06%)	2047 (2.06%)	3690 (6.24%)	1211 (2.19%)	459 (0.76%)	427 (0.71%)	594 (0.77%)
<i>Prevotellaceae</i>	---	203 (0.20%)	16769 (28.36%)	2611 (4.73%)	5077 (8.36%)	11708 (19.36%)	3710 (4.81%)
<i>Rikenellaceae</i>	339 (0.38%)	478 (0.48%)	8734 (14.77%)	1645 (2.98%)	---	129 (0.21%)	148 (0.19%)
<i>Cytophagaceae</i>	217 (0.24%)	---	---	---	---	---	---
<i>Flavobacteriaceae</i>	---	---	---	2050 (3.71%)	---	---	---
<i>Vibrionaceae</i>	---	---	---	---	---	---	118 (0.15%)
<i>Rhizobiaceae</i>	---	---	---	141 (0.26%)	---	---	---

<i>Rhodobacteraceae</i>	---	---	---	5 (0.01%)	---	---	---
<i>Sphingomonadaceae</i>	---	---	---	1197 (2.17%)	---	---	---
<i>Enterobacteriaceae</i>	---	20 (0.02%)	---	393 (0.71%)	238 (0.39%)	22 (0.04%)	17 (0.02%)
<i>Legionellaceae</i>	---	---	---	67 (0.12%)	---	---	---
<i>Halomonadaceae</i>	---	---	---	18 (0.03%)	---	---	---
<i>Pseudomonadaceae</i>	---	8 (0.01%)	---	5 (0.01%)	---	---	14 (0.01%)
<i>Neisseriaceae</i>	---	---	---	---	---	69 (0.11%)	30 (0.04%)
NC (derivado de <i>Alphaproteobacteria</i>)	---	---	---	---	---	---	250 (0.32%)
<i>Dermabacteraceae</i>	---	---	---	40 (0.07%)	---	---	---
<i>Gordoniaceae</i>	---	---	---	120 (0.22%)	---	---	---
<i>Micrococcaceae</i>	---	10 (0.01%)	---	44 (0.08%)	---	316 (0.52%)	257 (0.33%)
<i>Nocardioidaceae</i>	---	---	---	131 (0.24%)	---	---	---
<i>Bifidobacteriaceae</i>	---	513 (0.52%)	1281 (2.17%)	418 (0.76%)	136 (0.22%)	---	441 (0.57%)
<i>Corynebacteriaceae</i>	54 (0.06%)	---	445 (0.75%)	236 (0.43%)	---	---	---
<i>Dietziaceae</i>	134 (0.15%)	---	---	166 (0.30%)	149 (0.25%)	---	157 (0.20%)
<i>Microbacteriaceae</i>	136 (0.15%)	---	---	29 (0.05%)	---	16 (0.03%)	---
<i>Propionibacteriaceae</i>	91 (0.10%)	12 (0.01%)	---	141 (0.26%)	14 (0.01%)	296 (0.49%)	193 (0.25%)
<i>Coriobacteriaceae</i>	102 (0.11%)	301 (0.30%)	---	164 (0.30%)	364 (0.60%)	156 (0.26%)	103 (0.13%)
<i>Actinomycetaceae</i>	---	9 (0.01%)	---	---	---	---	690 (0.89%)
<i>Corynebacteriaceae</i>	---	---	---	---	---	---	250 (0.32%)
<i>Streptomycetaceae</i>	---	---	---	---	---	---	283 (0.37%)
<i>Thermomonosporaceae</i>	---	---	---	---	---	---	192 (0.25%)
<i>Verrucomicrobiaceae</i>	1613 (1.81%)	---	301 (0.51%)	1026 (1.86%)	---	---	---
<i>Fusobacteriaceae</i>	---	9 (0.01%)	---	16049 (29.04%)	---	1319 (2.18%)	---
<i>Solibacteraceae</i>	---	---	---	---	---	---	248 (0.32%)
<i>Deinococcaceae</i>	101 (0.11%)	---	---	380 (0.69%)	---	---	---
<i>Synergistaceae</i>	---	---	23 (0.04%)	---	---	---	---
NC (derivado de Bacteria)	1409 (1.58%)	1806 (1.82%)	792 (1.34%)	3540 (6.41%)	327 (0.54%)	12806 (21.17%)	8564 (11.11%)
NC (derivado de secuencias no clasificadas)	---	---	---	77 (0.14%)	---	---	---

NC: No clasificado

Tabla 5. Resultados de la asignación taxonómica a nivel de Género

Nivel taxonómico	% secuencias							
	Género	CTRL-1	CTRL-2	CTRL-3	SII-1	SII-2	SII-3	SII-4
<i>Bacillus</i>	---	---	---	---	---	---	10 (0.02%)	264 (0.36%)
NC (derivado de <i>Clostridiales</i> Familia XI. <i>Incertae Sedis</i>)	---	---	---	---	---	---	406 (0.67%)	52 (0.07%)
<i>Dialister</i>	---	540 (0.55%)	12 (0.01%)	---	---	---	69 (0.11%)	---
<i>Lactobacillus</i>	---	---	101 (0.17%)	---	---	---	550 (0.91%)	---
NC (derivado de <i>Ruminococcaceae</i>)	---	233 (0.24%)	121 (0.21%)	---	---	---	39 (0.06%)	---
<i>Gemella</i>	242 (0.29%)	---	---	---	---	---	---	157 (0.21%)
<i>Enterococcus</i>	940 (1.11%)	---	15 (0.03%)	59 (0.11%)	676 (1.12%)	156 (0.26%)	---	---
<i>Butyricicoccus</i>	894 (1.06%)	45 (0.05%)	14 (0.02%)	---	---	---	---	---
<i>Clostridium</i>	2193 (2.60%)	2377 (2.42%)	1986 (3.41%)	1830 (3.39%)	813 (1.34%)	697 (1.16%)	19114 (25.95%)	---
<i>Eubacterium</i>	2462 (2.92%)	1316 (1.34%)	766 (1.32%)	489 (0.91%)	1339 (2.21%)	272 (0.45%)	90 (0.12%)	---
<i>Coprococcus</i>	154 (0.18%)	---	---	---	---	---	---	---
<i>Dorea</i>	74 (0.09%)	456 (0.47%)	145 (0.25%)	---	255 (0.42%)	517 (0.86%)	895 (1.21%)	---
<i>Robinsoniella</i>	---	52 (0.05%)	88 (0.15%)	---	161 (0.27%)	---	---	---
<i>Roseburia</i>	10947 (12.97%)	1403 (1.43%)	1052 (1.81%)	898 (1.66%)	6123 (10.10%)	1706 (2.83%)	1668 (2.26%)	---
<i>Shuttleworthia</i>	224 (0.27%)	---	---	---	---	---	---	---
<i>Faecalibacterium</i>	14986 (17.75%)	11038 (11.26%)	2480 (4.26%)	6056 (11.21%)	5001 (8.25%)	14549 (24.14%)	5722 (7.77%)	---
<i>Ruminococcus</i>	1196 (1.42%)	8883 (9.06%)	7583 (13.02%)	2003 (3.71%)	17478 (28.84%)	4967 (8.24%)	1605 (2.18%)	---
<i>Blautia</i>	354 (0.42%)	52 (0.05)	27 (0.05%)	---	---	---	---	---
<i>Holdemania</i>	162 (0.19%)	8 (0.01%)	13 (0.01%)	---	---	59 (0.10%)	---	---
NC (derivado de <i>Erysipelotrichaceae</i>)	1471 (1.74%)	1547 (1.58%)	972 (1.67%)	166 (0.31%)	192 (0.32%)	2345 (3.89%)	398 (0.54%)	---
<i>Phascolarctobacterium</i>	---	---	105 (0.18%)	---	---	338 (0.56%)	---	---
<i>Sporomusa</i>	1815 (2.15%)	42 (0.04%)	---	849 (1.57%)	350 (0.58%)	---	29 (0.04%)	---
<i>Veillonella</i>	451 (0.53%)	187 (0.19%)	5 (0.01%)	567 (1.05%)	4756 (7.85%)	129 (0.21%)	---	---
<i>Staphylococcus</i>	---	9 (0.01%)	33 (0.06%)	131 (0.24%)	---	22 (0.04%)	80 (0.11%)	---
<i>Exiguobacterium</i>	---	---	---	380 (0.70%)	---	---	---	---
<i>Aerococcus</i>	---	---	---	12 (0.02%)	---	---	---	---
<i>Leuconostoc</i>	---	---	8 (0.01%)	---	---	---	---	---
<i>Megasphaera</i>	---	7 (0.01%)	6 (0.01%)	387 (0.72%)	321 (0.53%)	---	---	---
<i>Leptotrichia</i>	---	9 (0.01%)	---	159 (0.29%)	---	---	---	---
<i>Streptococcus</i>	---	---	9 (0.02%)	---	---	---	---	---
<i>Catenibacterium</i>	---	---	106 (0.18%)	---	---	---	249 (0.34%)	---
<i>Geobacillus</i>	---	---	5 (0.01%)	---	---	---	---	---
<i>Weissella</i>	---	---	101 (0.17%)	---	---	---	---	---

<i>Cellulosilyticum</i>	---	---	5 (0.01%)	---	---	---	---
NC (derivado de <i>Lachnospiraceae</i>)	---	26 (0.03%)	12 (0.01%)	---	---	---	---
<i>Desulfotobacterium</i>	---	7 (0.01%)	---	---	---	---	---
<i>Desulfotomaculum</i>	---	6 (0.01%)	6 (0.01%)	---	---	---	---
<i>Anaerotruncus</i>	---	5 (0.01%)	11 (0.02%)	---	---	---	---
<i>Ethanoligenens</i>	---	---	22 (0.04%)	---	---	---	---
<i>Subdoligranulum</i>	---	21 (0.02%)	71 (0.12%)	---	---	---	---
<i>Pectinatus</i>	---	11 (0.01%)	---	---	---	---	---
<i>Butyrivibrio</i>	---	---	609 (1.05%)	---	---	---	119 (0.16%)
<i>Coprococcus</i>	---	10 (0.01%)	33 (0.06%)	---	---	---	---
<i>Paenibacillus</i>	---	89 (0.09%)	---	---	---	---	---
<i>Barnesiella</i>	---	221 (0.23%)	175 (0.30%)	95 (0.18%)	---	98 (0.16%)	26 (0.04%)
<i>Bacteroides</i>	40210 (47.62%)	64076 (65.37%)	9083 (15.60%)	7242 (13.41%)	16382 (27.03%)	5753 (9.54%)	30398 (41.26%)
<i>Butyricimonas</i>	143 (0.17%)	37 (0.04%)	2345 (4.03%)	133 (0.25%)	---	87 (0.14%)	---
<i>Parabacteroides</i>	413 (0.49%)	1249 (1.27%)	824 (1.42%)	553 (1.02%)	459 (0.76%)	62 (0.10%)	157 (0.21%)
<i>Paraprevotella</i>	---	138 (0.14%)	1785 (3.07%)	---	---	---	---
<i>Prevotella</i>	---	65 (0.07%)	14958 (25.69%)	2611 (4.83%)	5077 (8.38%)	11708 (19.42%)	3710 (5.04%)
<i>Alistipes</i>	339 (0.40%)	478 (0.49%)	8733 (15.00%)	1645 (3.05%)	---	129 (0.21%)	148 (0.20%)
<i>Hymenobacter</i>	217 (0.26%)	---	---	---	---	---	---
<i>Porphyromonas</i>	---	7 (0.01%)	8 (0.01%)	174 (0.32%)	---	---	248 (0.34%)
<i>Flavobacterium</i>	---	---	---	1981 (3.67%)	---	---	---
<i>Pedobacter</i>	---	---	---	44 (0.08%)	---	---	---
<i>Sphingobacterium</i>	---	---	---	395 (0.73%)	---	---	---
<i>Sphingobacterium</i>	---	---	---	---	---	154 (0.26%)	---
<i>Chitinophaga</i>	---	---	---	---	---	40 (0.07%)	---
<i>Tannerella</i>	---	---	5 (0.01%)	---	---	---	---
<i>Odoribacter</i>	389 (0.46%)	471 (0.48%)	321 (0.55%)	256 (0.47%)	---	180 (0.30%)	165 (0.22%)
<i>Riemerella</i>	---	---	---	65 (0.12%)	---	---	---
<i>Agrobacterium</i>	---	---	---	140 (0.26%)	---	---	---
<i>Sphingomonas</i>	---	---	---	1197 (2.22%)	---	---	---
<i>Escherichia</i>	---	---	---	---	---	9 (0.01%)	---
<i>Raoultella</i>	---	---	---	387 (0.72%)	---	---	---
<i>Legionella</i>	---	---	---	67 (0.12%)	233 (0.38%)	---	---
<i>Halomonas</i>	---	---	---	18 (0.03%)	---	---	---
<i>Pseudomonas</i>	---	8 (0.01%)	---	5 (0.01%)	---	---	14 (0.01%)
<i>Chromobacterium</i>	---	---	---	---	---	---	29 (0.04%)
<i>Rahnella</i>	---	---	---	---	---	---	17 (0.02%)
<i>Vibrio</i>	---	---	---	---	---	---	119 (0.16%)
<i>Neisseria</i>	---	---	---	---	---	69 (0.11%)	---

NC (derivado de Alphaproteobacteria)	---	---	---	---	---	---	244 (0.33%)
<i>Corynebacterium</i>	54 (0.06%)	---	---	236 (0.44%)	---	---	248 (0.34%)
<i>Dietzia</i>	134 (0.16%)	---	---	164 (0.30%)	149 (0.25%)	---	157 (0.21%)
<i>Microbacterium</i>	62 (0.07%)	---	---	29 (0.05%)	---	16 (0.03%)	---
<i>Rathayibacter</i>	74 (0.09%)	---	---	---	---	---	---
<i>Propionibacterium</i>	91 (0.11%)	12 (0.01%)	---	77 (0.14%)	14 (0.01%)	296 (0.49%)	193 (0.26%)
<i>Collinsella</i>	105 (0.12%)	272 (0.28%)	403 (0.69%)	---	238 (0.39%)	129 (0.21%)	---
<i>Brachybacterium</i>	---	---	---	40 (0.07%)	---	---	---
<i>Gordonia</i>	---	---	---	120 (0.22%)	---	---	---
<i>Kocuria</i>	---	---	---	41 (0.08%)	---	---	---
<i>Streptomyces</i>	---	---	---	---	---	---	283 (0.38%)
<i>Bifidobacterium</i>	---	513 (0.52%)	1281 (2.20%)	418 (0.77%)	---	---	441 (0.60%)
<i>Eggerthella</i>	---	17 (0.02%)	14 (0.02%)	166 (0.31%)	136 (0.22%)	---	---
<i>Slackia</i>	---	---	---	---	126 (0.21%)	---	---
<i>Arthrobacter</i>	---	---	---	---	---	75 (0.12%)	---
<i>Kocuria</i>	---	---	---	---	---	189 (0.31%)	---
<i>Micrococcus</i>	---	---	---	---	---	52 (0.09%)	---
<i>Enterorhabdus</i>	---	---	9 (0.02%)	---	---	31 (0.05%)	---
<i>Actinomyces</i>	---	---	5 (0.01%)	---	---	---	690 (0.94%)
<i>Arthrobacter</i>	---	9 (0.01%)	---	---	---	---	256 (0.35%)
<i>Actinomadura</i>	---	---	---	---	---	---	192 (0.26%)
<i>Eggerthella</i>	---	10 (0.01%)	---	---	---	---	103 (0.14%)
<i>Akkermansia</i>	1613 (1.91%)	---	301 (0.52%)	996 (1.84%)	---	---	---
<i>Victivallis</i>	---	5 (0.01%)	---	---	---	---	---
NC (derivado de Verrucomicrobiaceae)	---	---	---	30 (0.06%)	---	---	---
<i>Fusobacterium</i>	---	---	---	15890 (29.42%)	---	1319 (2.19%)	---
<i>Candidatus Solibacter</i>	---	---	---	---	---	---	250 (0.34%)
<i>Deinococcus</i>	105 (0.12%)	---	---	378 (0.70%)	---	---	---
<i>Pyramidobacter</i>	---	---	22 (0.04%)	---	---	---	---
NC (derivado de Bacteria)	1409 (1.67%)	1806 (1.84%)	792 (1.36%)	3540 (6.55%)	327 (0.54%)	12806 (21.25%)	8564 (11.63%)
NC (derivado de secuencias no clasificadas)	---	---	---	77 (0.14%)	---	---	---

NC: No clasificado