



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD MICROBIANA EN MUESTRAS DE
BIOPSIAS DE INTESTINO MEDIANTE SECUENCIACIÓN MASIVA**

**TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestra en Ciencias**

**PRESENTA:
RUBÍ SANTIAGO CRUZ**

**Tutor principal:
Dra. Yolanda López Vidal
Facultad de Medicina, UNAM**

**Miembros del Comité Tutor:
Dr. Samuel Ponce de León Rosales
Facultad de Medicina, UNAM
Dr. Miguel Ángel Cevallos Gaos
Centro de Ciencias Genómicas, UNAM**

Ciudad de México, Octubre, 2017



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.

Agradecimiento

Agradezco al Dr. Samuel Ponce de León Rosales por el apoyo brindado para la realización de esta tesis.

El proyecto fue financiado por DGAPA-PAPIIT IV200315, Fundación Miguel Alemán Valdez (Dra. YLV), Fundación Miguel Alemán Valdez (Dr. SaPLR), Presupuesto Operativo 2016 y 2017 (Dra. YLV).

Durante la realización de la tesis gocé de una beca otorgada por el CONACyT y por el Proyecto DGAPA-PAPIIT IV200315

El presente trabajo de tesis fue realizado en el Laboratorio de Inmunología Molecular Microbiana, 4-PA, de la División de Investigación de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la tutoría de la Dr. Yolanda López Vidal y el asesoramiento de la Dra. Patricia Orduña Estrada y el Dr. René Arredondo Hernández.

Así mismo hago mención que el presente contó con el apoyo financiero del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

“Somos un “paisaje genético”, una colección del genoma de cientos de especies diferentes trabajando todas juntas, de forma que misteriosamente nuestra mente se libera, nos lleva a la oficina y nos hace imaginar sobre lo que vamos a almorzar”

Jeffrey Gordon

“La vida es una asociación simbiótica y cooperativa que permite triunfar a los que se asocian”

Lynn Margulis

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo de tesis es un esfuerzo conjunto en el que participaron directa e indirectamente muchas personas a las que les estoy profundamente agradecida. Deseo comenzar reconociendo a mi querida casa de estudios, la Universidad Nacional Autónoma de México por haberme acogido y brindado la oportunidad de estar entre sus aulas desde el Colegio de Ciencias y Humanidades hasta este momento en el Posgrado de Ciencias Bioquímicas, por haberme dado a los mejores profesores, quienes me guiaron en el camino del conocimiento y me formaron como profesionista.

A mis adorados padres, quienes con su valioso apoyo, amor, comprensión, disposición y entera confianza, me han impulsado a continuar esforzándome por cumplir mis metas y objetivos, a ustedes gracias, les entrego el producto de mi esfuerzo; porque a través de su ahínco me han legado una herencia invaluable, mi educación y formación.

A mi amada hermana, por tu cariño y apoyo sincero, por acompañarme en esas largas noches de desvelo cultivándonos para continuar con nuestros proyectos, dándome ánimos, haciendo de una noche larga una noche placentera y alentándome a seguir mi camino, gracias por tu amor incondicional.

Muy especialmente a mis abuelos, maternos y paternos, que ahora ya no están más conmigo, pero que no haya duda que sus sabios consejos, sus enseñanzas y sus valores, se quedaron en mí.

Mi más sincero agradecimiento a mi tutora, la Dra. Yolanda López Vidal, por haberme brindado la oportunidad de realizar este proyecto con ella en su grupo de trabajo, por haber tenido la paciencia necesaria para guiarme, por transmitirme sus conocimientos y darme su confianza.

Agradecida también con mis sinodales por la orientación, observaciones y críticas constructivas que me dieron para hacer de esta tesis un trabajo más completo.

Gracias también a mis queridos amigos y compañeros del laboratorio por brindarme su apoyo y permitirme entrar en sus vidas durante este tiempo de convivir dentro y fuera del mismo.

No cabe duda que adquirí muchos aprendizajes, tanto de conocimiento como personales. Concluyo esta etapa con una perspectiva diferente de la Biología a la que tenía cuando comencé el Posgrado, convenciéndome cada vez más de que un país sin desarrollo tecnológico y científico, es un país sin visión ni misión.

ÍNDICE

GLOSARIO	7
LISTA DE ABREVIATURAS	8
LISTA DE FIGURAS Y TABLAS	9
RESUMEN	10
INTRODUCCIÓN	
1. Microbioma/Microbiota Humano.....	11
1.1 Funciones del Microbioma/Microbiota Humano.....	14
1.2 Diversidad bacteriana de la porción distal del intestino.....	15
1.3 Composición y cambios de la microbiota intestinal a lo largo de la vida.....	19
2. Efectos de la microbiota intestinal en la salud y enfermedad.....	22
2.1 Disbiosis.....	25
2.2 Síndrome de Intestino Irritable.....	26
3. Técnicas para el estudio de la microbiota por medio de secuenciación masiva tipo shotgun y amplicón ARNr 16S.....	30
JUSTIFICACIÓN	33
HIPÓTESIS	34
OBJETIVO GENERAL	35
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
MATERIAL Y PROCEDIMIENTOS	36
A) Diseño del estudio.....	36
B) Población de estudio.....	36
C) Toma y almacenamiento de las biopsias.....	37
D) Extracción del DNA genómico total.....	37
E) Cuantificación del DNA genómico total.....	38
F) Determinación de la integridad del DNA genómico total.....	38
G) Secuenciación masiva.....	38
H) Análisis de las secuencias.....	39
1. Calidad de las secuencias obtenidas.....	39
2. Fusión de lecturas.....	39
3. Alineamiento de las secuencias contra el Genoma Humano.....	40
4. Anotación taxonómica con MG-RAST.....	40

5. Análisis estadístico.....	41
RESULTADOS	42
A) Características demográficas y clínicas de la población de estudio.....	42
B) Cuantificación e integridad del DNA genómico total.....	42
C) Calidad de las secuencias obtenidas.....	44
D) Análisis de las secuencias.....	45
1. Calidad de las secuencias crudas y fusionadas.....	45
2. Alineamiento de las secuencias.....	48
3. Análisis de la diversidad bacteriana con MG-RAST y Análisis estadístico.....	48
DISCUSIÓN	59
CONCLUSIONES	64
BIBLIOGRAFÍA	65
ANEXO I	73
Extracción de DNA genómico total.....	73
ANEXO II	74
Comandos utilizados para el análisis de las secuencias.....	74
ANEXO III	76
Cuestionarios aplicados a los sujetos participantes de este estudio.....	76

GLOSARIO

- Categoría taxonómica: Se refiere a los grupos (taxones) en los que se clasifican los seres vivos, ordenados en una jerarquía.
- Clado: Grupo de microorganismos monofilético (usualmente especies) que están más cercanamente relacionados a cualquier otro grupo, compartiendo el antepasado común más reciente.
- Clase: Categoría taxonómica situada entre el filo y el orden.
- Diversidad: Variedad de microorganismos, expresado en el número de especies y abundancia relativa de las mismas en una comunidad.
- Especie: Categoría taxonómica situada después del género
- Familia: Categoría taxonómica situada entre el orden y el género
- Filo: Categoría taxonómica situada entre el reino y la clase.
- Filotipo: Similitud observada, utilizada para clasificar a un grupo microorganismos por su relación filogenética.
- Género: Categoría taxonómica situada entre la familia y la especie.
- Grupos taxonómicos: Grupo de organismos o microorganismos que se encuentran relacionados evolutivamente y debido a que comparten ciertas características se agrupa en un nivel taxonómico: Dominio, Reino, Filo, Clase, Orden, Familia, Género y Especie.
- Microbioma: Totalidad de genes y genomas presentes en cada uno de los miembros que conforman la microbiota.
- Microbiota: Comunidad microbiana comúnmente referida de acuerdo al hábitat que ésta ocupa.
- Metagenoma: Conjunto de genes y genomas presentes en una muestra ambiental o sitio determinado.
- Orden: Categoría taxonómica situada entre la clase y la familia.
- Riqueza: Número de especies bacterianas en un área determinada.
- Taxón: Grupo de microorganismos emparentados que han sido agrupados en una clasificación dada.
- Unidad taxonómica operacional (OTU): Grupo de microorganismos definidos por el nivel de similitud de secuencias (porcentaje de identidad) entre la subunidad pequeña del gen ARNr 16S.

LISTA DE ABREVIATURAS

- ADN: Ácido desoxirribonucleico
- ADNg: Ácido desoxirribonucleico genómico
- AGCC: Ácidos grasos de cadena corta
- ARNr 16S: Ácido ribonucleico ribosomal 16S, componente de la subunidad 30S de los ribosomas del ácido ribonucleico
- CH₄: Metano
- CO₂: Dióxido de carbono
- CU: Colitis ulcerativa
- EC: Enfermedad de Crohn
- EII: Enfermedad Inflamatoria Intestinal
- G+C: Guanina y Citosina
- HMO: Oligosacáridos de la leche humana
- HMP: Proyecto del Microbioma Humano
- MetaHIT: Metagenómica del Tracto Intestinal Humano
- MG-RAST: Servicio Metagenómico para el Análisis de la Estructura y Función de la Comunidad Microbiana
- H₂: Hidrógeno
- IBPs: Inhibidores de la bomba de protones
- pH: Potencial hidrógeno
- SII: Síndrome de Intestino Irritable
- SII-D: SII con predominio de diarrea
- SII-E: SII con predominio de estreñimiento
- SII-M: SII con un patrón de defecación mixto
- OTUs: Unidades Taxonómicas Operacionales
- TFGI: Trastornos Funcionales Gastrointestinales

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Mapa de la diversidad del microbioma humano.

Figura 2. Distribución bacteriana en diferentes sitios del cuerpo.

Figura 3. Representación gráfica de la diversidad bacteriana en el tracto gastrointestinal humano.

Tabla 1. Composición de la microbiota intestinal humana a través de la vida.

Tabla 2. Efectos de la dieta sobre la microbiota y la salud del huésped.

Tabla 3. Contribución metabólica de microorganismos intestinales.

Tabla 4. Condiciones asociadas con las alteraciones en la composición del microbioma humano.

Figura 4. Proporción relativa de los filos bacterianos más comunes en sujetos sanos y sujetos con SII.

Tabla 5. Alteraciones de la microbiota en pacientes con SII versus sujetos sanos.

Figura 5. Enfoques de secuenciación masiva para el estudio de la microbiota.

Tabla 6. Criterios de inclusión y exclusión de la población de estudio.

Tabla 7. Características demográficas y clínicas de la población.

Tabla 8. Cuantificación del ADN genómico obtenido a partir de biopsias.

Figura 6. Visualización del ADN genómico total de las muestras procesadas.

Tabla 9. Estadísticas de los datos de secuenciación.

Tabla 10. Estadística básica generada por el programa FastQC para cada muestra.

Figura 7. Histograma del puntaje de calidad por base de secuencia de la muestra SII-1E.

Tabla 11. Número de secuencias alineadas y no alineadas contra el Genoma Humano.

Tabla 12. Porcentaje de lecturas que no alinearon contra el genoma humano asignadas con el Servidor MG-RAST.

Figura 8. Frecuencia relativa a nivel de los filos en los metagenomas analizados.

Tabla 13. Frecuencia relativa a nivel de filo en los metagenomas de los pacientes con SII y los sujetos sanos.

Tabla 14. Frecuencia relativa a nivel de clase en los metagenomas de los pacientes con SII y los sujetos sanos.

Figura 9. Frecuencia relativa a de las clases en los metagenomas analizados.

Tabla 15. Frecuencia relativa a nivel de orden en los metagenomas de los pacientes con SII y los sujetos sanos.

Figura 10. Frecuencia relativa de los órdenes en los metagenomas analizados.

Figura 11. Frecuencia relativa de las familias presentes en los metagenomas analizados.

Tabla 16. Frecuencia relativa a nivel de familia en los metagenomas de los pacientes con SII y los sujetos sanos.

Figura 12. Frecuencia relativa de los géneros presentes en los metagenomas analizados.

Tabla 17. Frecuencia relativa a nivel de género en los metagenomas de los pacientes con SII y los sujetos sanos.

Tabla 18. Frecuencia relativa a nivel de especie en los metagenomas de los pacientes con SII y los sujetos sanos.

Figura 13. Gráfica de frecuencia relativa de las especies presentes en los metagenomas analizados.

RESUMEN

Introducción: El Síndrome de Intestino Irritable (SII) es el Transtrono funcional gastrointestinal más frecuente a nivel mundial. En América Latina, su prevalencia ha sido reportada entre el 16 al 17.5%, aunque ha sido poco estudiado. **Objetivos:** Describir y conocer la composición taxonómica de la microbiota intestinal en pacientes con SII y sujetos sanos. **Método:** Se reclutaron 5 pacientes con SII mediante la aplicación del cuestionario de Roma III y 5 sujetos clínicamente sanos; ninguno de sujetos estudiados utilizó antibióticos o inhibidores de la bomba de protones en los 3 meses previos al estudio. Todos los sujetos fueron sometidos a colonoscopia para la obtención de biopsias de colon descendente de las cuales, se obtuvo el ADN que fue secuenciado empleando la plataforma Illumina HiSeq 4000. El metagenoma intestinal de cada sujeto fue anotado taxonómicamente con el servidor MG-RAST, previa eliminación de las lecturas alineadas contra el genoma humano. Posteriormente se obtuvieron las abundancias para cada metagenoma, los cuales fueron transformadas a frecuencias relativas, a las que se les aplicó la prueba estadística de U de Mann-Whitney para determinar las diferencias significativamente estadísticas entre ambas poblaciones de estudio. **Resultados:** En relación con los patrones de evacuación, en el grupo de los pacientes con SII, se encontraron: tres pacientes con diarrea, uno con estreñimiento y uno con patrón mixto. En esta población de estudio, las diferencias significativamente estadísticas a nivel de filo se presentaron en las *Actinobacterias* y *Proteobacterias*. A nivel de clase los taxones más abundantes fueron *Alphaproteobacteria* y *Erysipelotrichia*, con una disminución en *Bacteroidia* y *Deltaproteobacteria*. A nivel de orden se encontró un aumento en los *Actinomycetales* y *Erysipelotrichales*, y se observó una disminución en *Desulfovibriales*. A nivel de familia se presenta una disminución de *Bacteroidaceae* y *Desulfovibrionaceae*, con un aumento en la familia *Erysipelotrichaceae*. A nivel de género se encontró a *Propionibacterium* y *Staphylococcus* con un aumento, mientras que *Gemella* y *Faecalibacterium* presentaron una disminución. Finalmente, se encontró una disminución a nivel de especie: *Clostridiales bacterium I_7_47FAA*, *Dorea formicigenerans*, *Faecalibacterium prausnitzii* y *Ruminococcus torques*, con un aumento en *Propionibacterium acnés* y una ausencia de *Enterococcus faecium*, *Clostridiales bacterium* y *Dorea longicatena*. En cuanto al grupo de los sujetos sanos, a nivel de filo se observó una mayor frecuencia de *Bacteroidetes* y *Firmicutes*. *Bacteroidia* y *Deltaproteobacteria* fueron las clases más frecuentes. A nivel de orden los *Bacteroidales* y *Desulfovibriales* presentaron una mayor frecuencia. Las familias *Bacteroidaceae*, *Desulfovibrionaceae* y *Ruminococcaceae* fueron las más abundantes. A nivel de género, predominaron *Dorea* y *Gemella*. Mientras que nivel de especie se encontraron con mayor frecuencia a *Dorea formicigenerans*, *Dorea longicatena*, *Eggerthella lenta*, *Enterococcus faecium* y *Faecalibacterium prausnitzii*. **Conclusiones:** El análisis metagenómico muestra una clara división en la frecuencia relativa a lo largo de toda la escala filogenética entre pacientes con SII y sujetos sanos, sugiriendo cambios intestinales que afectan funciones esenciales. La distribución de especies apunta hacia qué miembros de la microbiota son insensibles a las condiciones, permaneciendo sin cambios y mostrando su importancia biológica como miembros de la microbiota, en pacientes con SII o sujetos sanos, y asociaciones específicas dando una probable explicación a los síntomas.

INTRODUCCIÓN

1. Microbiota/Microbioma Humano

En el transcurso de nuestra vida, los seres humanos somos colonizados por una gran diversidad de bacterias, arqueas, hongos y virus, que viven asociados en distintas partes del cuerpo y que comprenden una comunidad simbiote de microorganismos, denominada microbiota humana. Este término fue acuñado en 2001 por Joshua Lederberg, quien lo define como los taxones microbianos asociados con los seres humanos y, al “microbioma” como el catálogo de estos microorganismos y sus genes, pero que a menudo son utilizados indistintamente (Luke K Ursell, *et al.*, 2012).

La diversidad de los microorganismos dentro de un hábitat del cuerpo (Figura 1) es definida por la variedad de estos microorganismos y su abundancia de acuerdo a cómo se encuentran distribuidos en el cuerpo. En la actualidad un desequilibrio en esta diversidad ha sido vinculada a diversas enfermedades humanas (Turnbaugh, *et al.*, 2009), por ejemplo: la baja diversidad de microorganismos en el intestino está relacionada con la obesidad y enfermedades inflamatorias; en tanto que una alta diversidad en la vagina se ha vinculado a vaginitis bacteriana (Fredricks, *et al.*, 2005).

Entre los diferentes grupos taxonómicos que conforman la microbiota, las bacterias son las que engloban el mayor número de genes y la mayor diversidad metabólica. A pesar de que han sido las más estudiadas, algunos taxones son difíciles o imposibles de cultivar bajo condiciones de laboratorio, es por ello que en los últimos años han surgido técnicas basadas en el estudio del ADN, principalmente, a través de secuenciación del gen ARNr 16S, que favorecen su análisis dentro de una comunidad determinada (Lazarevic, *et al.*, 2009).

El primer estudio metagenómico a escala poblacional del microbioma humano fue realizado por el consorcio Metagenómico del Tracto Intestinal Humano (MetaHIT) y estuvo basado en la secuenciación del gen ARNr 16S a partir de muestras de heces de 124 individuos sanos, Españoles y Daneses. Los resultados de este estudio mostraron que el intestino humano contiene 1,150 especies de bacterias comunes con un colectivo de 3,3 millones de genes, lo que representa un genoma aproximado de 150 veces más grande comparado con el genoma humano (Qin J., *et al.*, 2010)

Paralelamente, el Proyecto del Microbioma Humano (HMP) tiene como objetivo caracterizar el microbioma de manera más amplia, mediante el estudio de muestras de varios sitios del cuerpo y proporcionar un recurso de datos estandarizados y nuevos

enfoques tecnológicos que permitan que este tipo de estudios sean practicados extensamente en la comunidad científica.

La diversidad total del microbioma humano asignado por el HMP estimó entre 3,500 y 35,000 Unidades Taxonómicas Operacionales (OTUs), abarcando aproximadamente 600 géneros. Estos datos fueron derivados de la secuenciación de más de 5,000 muestras, de aproximadamente 250 voluntarios sanos, de 15 a 18 sitios anatómicos diferentes por sujeto, entre los que se incluyen: cavidad oral, piel, cavidad nasal, vagina y tracto gastrointestinal (Peterson, *et al.*, 2009).

Mapa de la diversidad en el microbioma humano

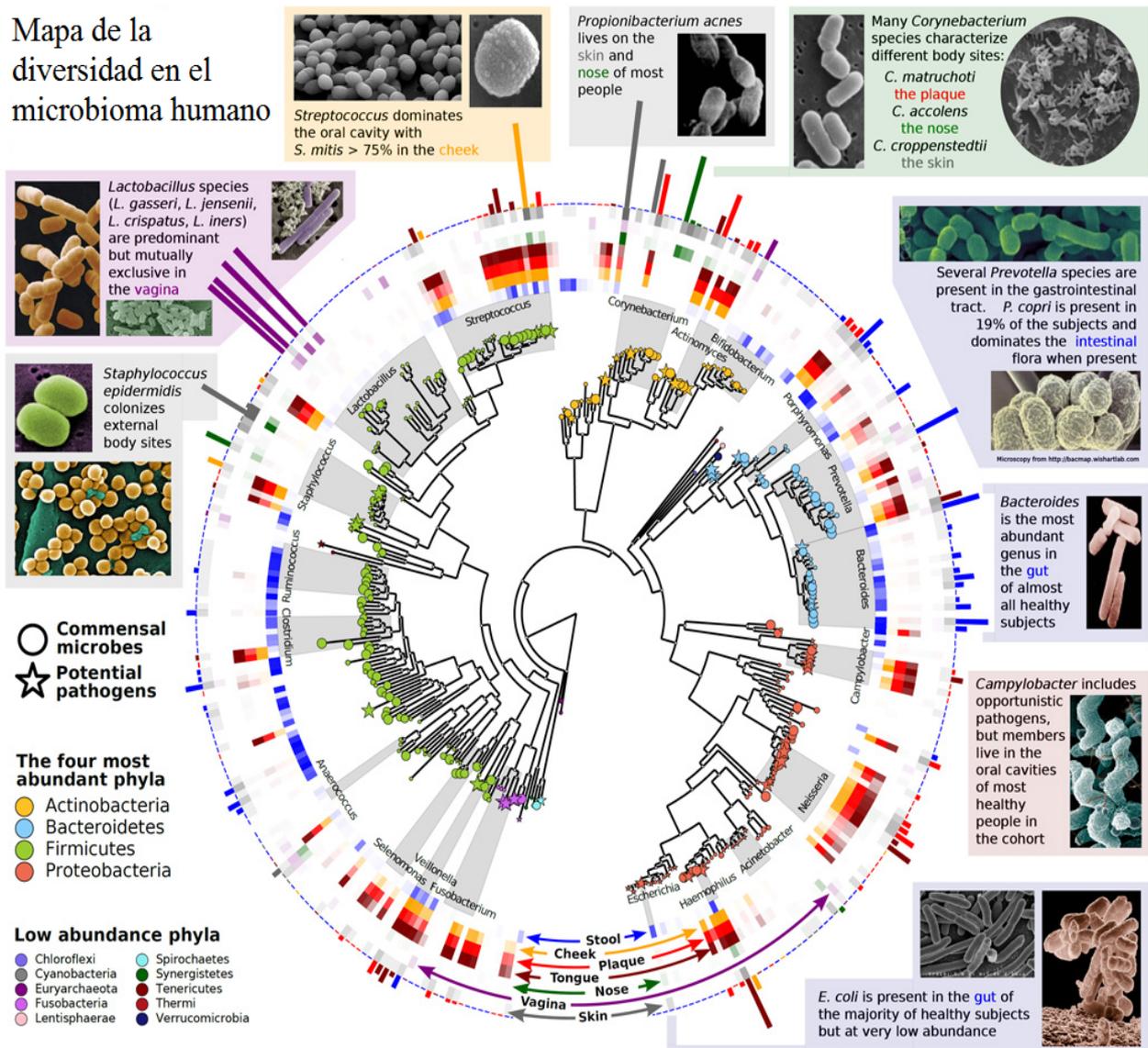


Figura 1. Mapa de la diversidad del microbioma humano. El microbioma humano está dominado por cuatro filos bacterianos: *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes* y *Proteobacteria*. En el centro se encuentra un árbol filogenético de los organismos más abundantes en el microbioma humano. Los microorganismos comensales se indican con círculos, y los patógenos potenciales se indican mediante estrellas. Tomado de: Xóchitl C. Morgan N. S., 2013.

De entre los sitios muestreados del cuerpo, el tracto gastrointestinal presentó el microbioma más diverso (Figura 2), que se estima contiene varios miles de OTUs correspondientes a aproximadamente 150 géneros, en donde los filos que dominaron fueron *Bacteroidetes* y *Firmicutes*. La diversidad del microbioma oral, que resultó ser la segunda más diversa, fue compartida entre los individuos; sin embargo, hubo variaciones notables en los diferentes clados incluso entre superficies orales muy similares (por ejemplo: mucosa, saliva, y placa dentobacteriana); los géneros más abundantes incluyeron: *Streptococcus*, *Haemophilus*, *Veillonella*, *Actinomyces*, y *Fusobacterium* (Peterson, *et al.*, 2009). La diversidad de la piel, muestreada en los codos interiores y detrás de la oreja, presentó una alta abundancia de *Staphylococcus epidermidis*. En contraste, la comunidad del cuerpo humano con menor diversidad fue la vagina, donde la mayoría de las mujeres presentaron microbiomas dominados por una de las cuatro especies individuales del género *Lactobacillus*; volviéndose aún menos diverso durante el embarazo (Ratner, 2012).

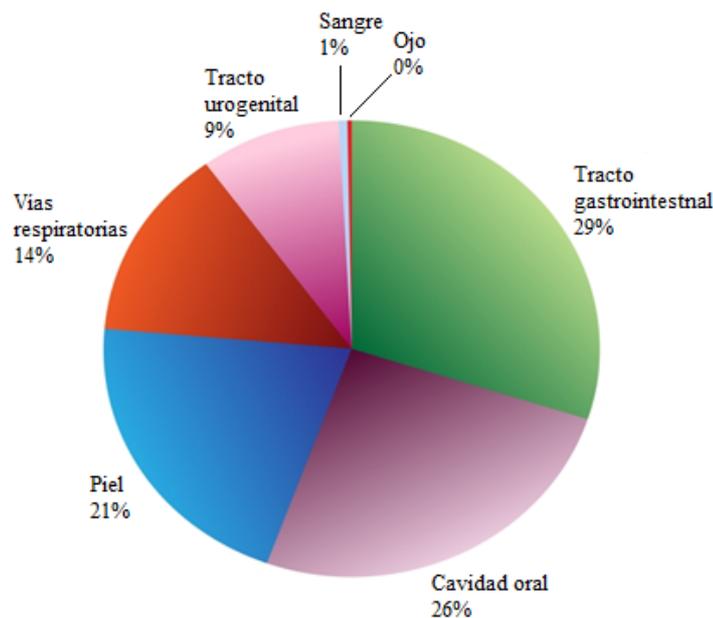


Figura 2. Distribución bacteriana en diferentes sitios del cuerpo. Esta gráfica muestra los porcentajes estimados en los que se distribuyen las bacterias que se han secuenciado por el HMP: Tracto gastrointestinal (29%), cavidad oral (26%), piel (21%), tracto respiratorio (14%), tracto urogenital (9%), sangre (1%) y ojos (0%) (Lederberg, 2001).

Estos estudios demuestran que el metagenoma humano, es decir, el conjunto de genes y genomas presentes en una muestra ambiental o sitio determinado, está compuesto, tanto por los genes de *Homo sapiens* como por los genes de los millones de microorganismos que colonizan el cuerpo humano; y que el microbioma intestinal codifica una amplia

variedad de vías metabólicas que permanecen en gran medida inexploradas (Peter J Turnbaugh y Jeffrey I. Grodon, *et al.*, 2009), por lo que es necesario tener una comprensión funcional más amplia del microbioma humano y profundizar e innovar en los diseños experimentales que permitan ahondar en su conocimiento.

1.1 Funciones de la Microbiota/Microbioma Humano

Hasta hace relativamente poco, el papel del microbioma era desconocido, y la carga microbiana de un organismo se consideraba de poco impacto en el funcionamiento del mismo. Las investigaciones acerca de la microbiota, demuestran que las comunidades de microorganismos en los individuos son únicas, al igual que las comunidades microbianas de sitios específicos dentro de un individuo. Ahora se entiende que el microbioma de un individuo puede influir en muchos procesos fisiológicos en el hospedero. Los descubrimientos sobre el papel del microbioma en condiciones de enfermedad, como la obesidad, la diabetes mellitus, síndrome de intestino irritable, incluyendo las enfermedades cardiovasculares, han llevado a la posibilidad de desarrollar herramientas diagnósticas y terapéuticas basadas en el uso del microbioma (Adlerbeth, I., *et al.*, 2009).

La microbiota se desarrolla con nosotros y su composición se altera en respuesta a las condiciones cambiantes del medio ambiente (Ley, R.E., *et al.*, 2008). Los microorganismos que viven en los diferentes nichos del cuerpo humano se encuentran asociados a él por interacciones simbióticas, participando en funciones importantes para la homeostasis del individuo. De manera general estas funciones se pueden dividir en:

- Regulación de procesos metabólicos, como el suministro de nutrientes esenciales (sustancias necesarias para la vida, que no somos capaces de sintetizar a partir de otros nutrientes, como las vitaminas).
- Modulación y regulación del sistema inmune, principalmente de mucosas, frente a organismos que puedan ser patógenos (Randall, T.D., *et al.*, 2014)
- Antagonistas microbianos, las bacterias comensales pueden controlar la presencia de patógenos impidiendo el asentamiento de microorganismos foráneos a través de la competencia por fuentes de energía y la producción de moléculas antimicrobianas (Kamada, N., *et al.*, 2012).

1.2 Diversidad bacteriana de la porción distal del intestino

Como se mencionó previamente, la mayor diversidad bacteriana del cuerpo humano se encuentra presente en el intestino y dentro del mismo, la región que contiene la mayor cantidad de microorganismos es el colon, con una densidad de 10^{11} células/g. La microbiota del colon se encuentra conformada por aproximadamente más de 1000 especies, compuesta principalmente de bacterias anaerobias, que superan en número a las bacterias anaerobias facultativas y bacterias aerobias, por aproximadamente de 2 a 3 órdenes de magnitud, y dominado por 6 filos bien descritos: *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Fusobacteria* y *Verrucomicrobia* (Figura 3) (Clemente, 2012).

Específicamente, en el colon descendente el 90% pertenecen a los miembros del filo *Firmicutes*, cuyos géneros más representativos son *Eubacterium*, *Clostridium* y *Lactobacillus*; y al filo *Bacteroidetes*, mejor representado por el género *Bacteroides*; y en una menor proporción los filos *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Fusobacteria* y *Verrucomicrobia* (Qin J., et al., 2010). Sin embargo, se ha visto que existe un rango de variabilidad en los taxones presentes en el intestino y la diversidad interindividual en la composición bacteriana, principalmente influenciado por la dieta. Esto ha sugerido que la microbiota de muchos individuos pueda ser caracterizada en una de tres variantes o “enterotipos” basadas en el género dominante: *Bacteroides*, *Prevotella* o *Ruminococcus* (Arumugam, et al., 2011).

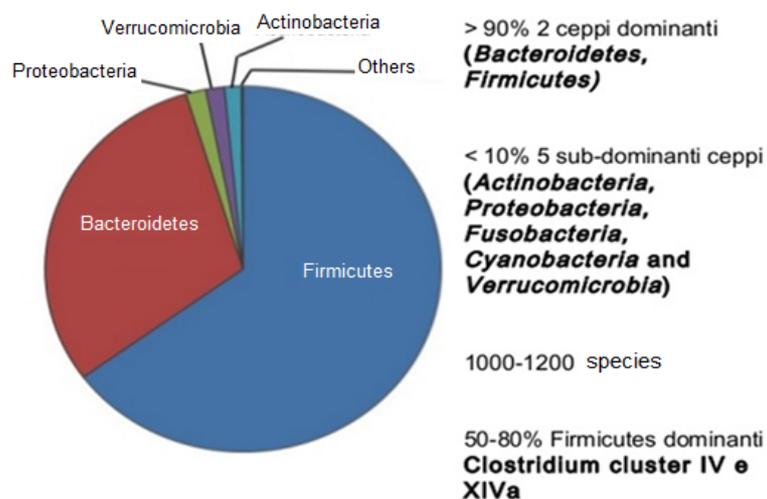


Figura 3. Representación gráfica de la diversidad bacteriana en el tracto gastrointestinal humano (Verdu EF., 2006).

Firmicutes

El filo *Firmicutes* se encuentra formado por bacterias gram positivas y ácido lácticas. Se divide típicamente en el orden *Clostridiales*, *Lactobacillales* y *Bacillales*. Algunas de las especies de los géneros *Bacillus* y *Clostridium*, son habitantes del tracto gastrointestinal, aerobias o aerobias facultativas, y *Clostridium* que contiene especies que son anaerobias obligatorias y fermentativas; en el intestino se encuentran asociados a la mucosa.

La mayoría de las especies que pertenecen al género *Clostridium* son sacarolíticos y fermentadores de azúcares, siendo el producto final de su fermentación el ácido butírico, sin embargo, algunos también producen acetona y butanol.

La especie más estudiada dentro de este filo es *Fecalibacterium praunitzzi*, bacteria comensal obligatoria anaerobia, perteneciente al orden *Clostridiales IV*, que representa del 1,4% hasta el 5,9% de la microbiota fecal total de adultos sanos. Estas bacterias sintetizan ácidos grasos de cadena corta, principalmente el butirato, a través de la fermentación de la fibra no dietética, lo cual contribuye al mantenimiento de la salud intestinal, por sus beneficios indirectos de proporcionar energía a los colonocitos por medio de la producción de butirato y por lo tanto reforzar el epitelio (Lopetuso, Loris R., et al., 2013).

Bacteroidetes

El filo *Bacteroidetes* contiene más de 700 especies descritas, distribuidas en cuatro órdenes: *Bacteroidales*, *Cytophagales*, *Flavobacteriales* y *Sphingobacteriales*. Los *Bacteroidetes* son bacterias no esporuladas gram negativas; incluye especies típicamente sacarolíticos y pueden ser aeróbicas o fermentativas, incluyendo aerobias obligadas, aerobias facultativas y anaerobias obligadas. Algunas especies son inmóviles y algunos son móviles. El género *Bacteroides* ha sido particularmente estudiado ya que estos organismos son un componente importante de la comunidad microbiana en el intestino humano.

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. Los *Bacteroides* son normalmente comensales, con un gran número de especies que dominan el intestino grueso del humano. Sin embargo, especies de *Bacteroides* ocasionalmente pueden ser patógenas y de ellas, las bacterias anaerobias son las que se asocian con infecciones humanas, tales como bacteriemia.

Bacteroides thetaiotaomicron es una de las especies más prominentes del género *Bacteroides*, alojada en el lumen del intestino grueso. Se especializa en la degradación de polisacáridos complejos. La mayoría de su genoma se dedica a sintetizar enzimas que degradan polisacáridos. La diversidad y el número de genes para el metabolismo de los carbohidratos que se encuentran en su genoma supera por mucho a las que se encuentran en otras especies bacterianas. También produce muchas enzimas que no son codificados por el genoma humano y por lo tanto aumenta enormemente la diversidad de polímeros de plantas que pueden ser degradados en el tracto digestivo humano (Zocco, M.A., *et al.*, 2007).

Proteobacteria

Son un grupo de bacterias gram negativas que muestran una gran diversidad metabólica, con especies anaerobias y aerobias facultativas, morfológicamente también exhiben una amplia gama de formas celulares. En base a las secuencias del gen ARNr 16S, este filo puede ser clasificado filogenéticamente en seis clases: *Alfa*, *Beta*, *Gamma*, *Delta*, *Epsilon* y *Zetaproteobacteria*.

De estas clases, las *Gammaproteobacterias* incluyen al orden *Enterobacteriales*, que comprenden un grupo relativamente homogéneo, formado por bacterias facultativas aerobias, gram negativas, fermentadoras de glucosa y reductoras de nitrato. De ellos, los género más representativo en la microbiota intestinal son: *Proteus*, *Escherichia*, *Klebsiella* y *Enterobacteria*; específicamente la especie *Escherichia coli* que es habitante universal del tracto intestinal. Estos microorganismos, producen principalmente vitamina K, consumen oxígeno (facultativas aerobias) y contribuyen a la anoxia del intestino. No obstante, algunas especies son patógenas y han sido relacionadas con enfermedades diarreicas en infantes y con infecciones urinarias en mujeres. Por su parte, el género *Proteus* contiene células altamente móviles que producen la enzima ureasa, capaces de degradar urea.

Las especies de la clase *Epsilonproteobacteria* son especialmente abundantes en interfaces oxigénicas y anóxicas, en ambientes ricos en azufre. Y engloba dos géneros representativos de la microbiota del tracto gastrointestinal, *Campylobacter* y *Helicobacter*, éstas últimas incluyen bacterias gram negativas, la mayoría de las especies son patógenas para el ser humano y habitan el estómago. Las especies de *Campylobacter* causan gastroenteritis aguda que típicamente resulta en una diarrea con sangre; su patogenicidad se debe a varios factores, incluyendo una enterotoxina que está

relacionada con la toxina del cólera. *Helicobacter pylori*, también es considerado un patógeno que causa tanto gastritis crónica como aguda y conduce a la formación de úlceras pépticas (Madigan, Michael T., *et al.*, 2014).

Actinobacteria

Se compone principalmente de organismos gram positivos con un alto contenido de G+C, los diferentes géneros que forman parte de este filo muestran una enorme diversidad en cuanto a su morfología (Atlas, RM., 1988); poseen una amplia variedad en su fisiología y sus capacidades metabólicas, de las que se han extraído una gran cantidad de antibióticos. Comprenden más de 300 géneros, de los cuales, *Bifidobacteriales* forman un componente principal de la microbiota en el tracto gastrointestinal de los seres humanos y otros mamíferos, con actividades probióticas útiles (Ventura M., *et al.*, 2009).

Muchas especies de *Bifidobacterias* colonizan el intestino de los infantes durante las primeras semanas de vida, debido a la selección de la leche materna o fórmula (Roger L. C., *et al.*, 2010). El primero en colonizar es *B. breve*, pero en general, son bacterias fermentativas que forman principalmente ácido láctico y acético a través del catabolismo de los carbohidratos, en particular los oligosacáridos (Tabbers, MM., *et al.*, 2011).

El ácido siálico es un componente específico de los oligosacáridos de la leche humana (HMO) y es catalizado por *B. breve* ya que su genoma contiene un grupo de genes cuyo único propósito es la absorción y el metabolismo de este ácido (Egan, M., *et al.*, 2014).

Algunas especies pertenecientes a este filo son patógenos para el humano, tales como el género *Mycobacterium* (*M. tuberculosis* y *M. leprae*), responsables del mayor número de muertes humanas por infecciones bacterianas a nivel mundial.

Fusobacteria

Incluye a bacterias gram negativas, no formadoras de esporas, presentes en cavidades orales y vagina, y más recientemente en el tracto gastrointestinal; son anaerobios obligados que fermentan carbohidratos, péptidos y aminoácidos, esta fermentación crea butirato y en algunos casos ácido acético, como subproductos metabólicos importantes.

El género *Fusobacterium*, está representado por *F. nucleatum*, el cual se pensaba que era principalmente un componente de la microbiota oral de seres humanos y sólo un residente ocasional del tracto gastrointestinal. Sin embargo, un estudio realizado por

Emma Allen Vercoe y colaboradores, 2011, demostró una asociación entre *Fusobacterium spp* invasiva (incluyendo *F. nucleatum*) y células con tejidos de apéndice inflamado, lo que sugiere que el intestino podría ser un nicho hasta ahora no reconocido para este patógeno. Por otra parte, se ha encontrado a esta especie más frecuentemente en pacientes con enfermedad de Crohn que en individuos sanos, en un 50 y 17.6%, respectivamente (Dharmani, P., *et al.*, 2011).

Verrucomicrobia

Bacterias gram negativas, de forma cocoide con una estructura celular inusual, que incluyen protuberancias celulares como verrugas. Sus miembros son aerobios estrictos, anaerobios facultativos o anaerobios estrictos. Son bacterias ubicuas, habitando lugares extremos, como ambientes con temperaturas que van de los 75-90 °C, aguas ricas en sulfuros y ambientes con pH extremadamente bajo; y es ocasionalmente observada en el intestino. Este filo se divide en tres clases principales: *Opitutae*, *Spartobacteria* y *Verrucomicrobiae*.

Algunas especies de *Verrucomicrobia* han sido identificadas en el intestinal humano, como *Akkermansia muciniphila*, una bacteria anaerobia estricta, originalmente aislada de una muestra fecal humana, pero asociada a la mucosa debido a su capacidad para producir enzimas que degradan mucina (constituyente del moco), que puede servir como una barrera para proteger el epitelio subyacente de la fijación de patógenos y también como una fuente de nutrientes para las bacterias comensales. La degradación de mucina es considerada como una enfermedad, ya que la pérdida de la capa de moco protector puede exponer a las células del tracto gastrointestinal a patógenos. 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 M., *et al.*, 2008).

1.3 Composición y cambios de la microbiota intestinal a lo largo de la vida

La composición inicial de la microbiota intestinal se determina inmediatamente después del nacimiento y depende fundamentalmente de dos factores: el tipo de nacimiento y la alimentación (Fanaro, S., *et al.*, 2003). En el primer caso, cuando el parto se produce de forma natural, el recién nacido es colonizado por la microbiota vaginal y/o intestinal de la madre y por los microorganismos del ambiente. Por otra parte, estudios comparativos han demostrado que niños con alimentación materna y niños alimentados con leche de fórmula, desarrollan una microbiota diferente (Harmsen H.J., *et al.*, 200a). En los

primeros, dominan las poblaciones de *Bifidobacterias*, mientras que la presencia de *Clostridios* y *Coliformes* es más baja. Por el contrario, los bebés alimentados con leche de fórmula presentan una microbiota más compleja con presencia de *Bacteroides*, *Bifidobacterias*, *Clostridios*, *Streptococcus* y *Coliformes*, en proporciones similares (Kleessen, B., *et al.*, 1995). Tras el destete y comenzando con la introducción de los suplementos alimenticios, se empieza a desarrollar una microbiota mucho más diversa. A partir de los tres años, la microbiota va evolucionando hacia la que será la microbiota del adulto. El número de *Bacteroides* y *Cocos*, bacterias gram-positivos anaerobias, aumenta hasta incluso superar a las *Bifidobacterias* (Mackie, R.I., *et al.*, 1999), mientras que los *Coliformes* y *Streptococcus* disminuyen (Favier, C.F., *et al.*, 2002).

Funcionalmente, el cambio del microbioma intestinal de los recién nacidos hacia adultos, incluye el enriquecimiento de bacterias que participan en la fermentación anaeróbica, la degradación de complejos de carbohidratos (por ejemplo, glicosilhidrolasas) y en la disminución de azúcares simples (lactosa/galactosa/sacarosa), así como el transporte y metabolismo de las proteínas (Domínguez-Bello, *et al.*, 2010). Estudios recientes de la microbiota en ancianos describen que el cambio hacia un estado más frágil se correlaciona con un desequilibrio global de la diversidad microbiana, particularmente con un aumento general de *Bacteroides* y disminución en *Firmicutes* (Tabla 1), que corresponden a una disminución en glutarato y ácidos grasos de cadena corta con propiedades anti-inflamatorias (Yatsunenko T., *et al.*, 2012).

En condiciones de salud, el número y la variedad de especies, es decir, la diversidad bacteriana, y el aumento de la riqueza, referido como el número de especies, en ciertos grupos taxonómicos, alcanzan su mayor complejidad durante la edad adulta. A pesar de las variaciones inter e intra individuales, el microbioma intestinal es prácticamente estable en adultos sanos. En los ancianos, como en los lactantes, el microbioma intestinal es más inestable y también tiene una diversidad inferior con respecto a los adultos.

Tabla 1. Composición de la microbiota intestinal humana a través de la vida. Los filos bacterianos se encuentran listados de mayor a menor abundancia en cada etapa (D'Argenio, V. y Salvatore, F., 2015).

Etapas	Composición microbiana a nivel de filo	Factores que modifican
Infantes (hasta los 2-3 años)	<i>Actinobacteria</i> , <i>Proteobacteria</i> , <i>Firmicutes</i> , <i>Bacteroidetes</i>	Parto vaginal vs cesárea, edad de gestación, hospitalización, lactancia vs fórmula láctea, edad de ingesta de alimentos sólidos, tratamiento con antibióticos
Adulto	<i>Firmicutes</i> , <i>Bacteroidetes</i> ,	Dieta, ciclo hormonal, viajes, terapias,

Senectud (> 70 años)	<i>Actinobacteria, Proteobacteria Firmicutes, Actinobacteria, Bacteroidetes, Proteobacteria</i>	enfermedades Cambios en el estilo de vida, cambios nutricionales, incremento en la susceptibilidad de infecciones y enfermedad inflamatoria, uso de más medicamentos
----------------------	---	---

Como se ha descrito, a lo largo de la vida, el número de *Clostridios* (*Firmicutes*) va aumentando mientras que la proporción de *Bifidobacterias* (*Bacteroidetes*) disminuye. En la senectud es frecuente el aislamiento de *Clostridium difficile* y aparecen mayores niveles de hongos y *Enterobacterias* en comparación con la microbiota de individuos jóvenes (Hopkins, M.J., *et al.*, 2001). Además se sabe que la microbiota intestinal en el adulto constituye un equilibrio dinámico que puede variar entre los grupos humanos e incluso de persona a persona debido a las diferencias específicas del hospedero (Tannock, 1993).

La microbiota intestinal depende también de los sustratos o nutrientes aportados por la dieta y se han descrito grandes diferencias en la composición de la microbiota del intestino entre grupos humanos con hábitos alimenticios diferentes (Tabla 2) (Noack-Loebel, C., *et al.*, 1983). Aunque la asociación entre el tipo de dieta y los distintos grupos microbianos aún no está completamente clara, se han observado mayores niveles de *Bacteroides* y *Clostridios* y una menor presencia de bacterias lácticas en comunidades occidentales (con una ingesta alta en grasa, proteínas de origen animal y un bajo contenido en fibra), en comparación con la microbiota de otras comunidades con dietas ricas en fibra como las orientales (Hayashi, H., *et al.*, 2002a).

Tabla 2. Efectos de la dieta sobre la microbiota y la salud del huésped (Calum J., Walsh, *et al.*, 2014).

DIETA	EFEECTO SOBRE LA MICROBIOTA	EFEECTO SOBRE EL HOSPEDERO
Rica en polisacáridos de origen vegetal	Aumento <i>Bacteroidetes</i> , <i>Firmicutes</i> disminuido. Asociado con <i>Prevotella</i>	Menor tiempo de tránsito intestinal en comparación con la dieta rica en proteínas y grasas animales.
Comparación entre consumo de carne/vegetales, vegetariano y lactovegetariano	Aumento de los grupos <i>Clostridium</i> IV y XIVa	No reportado
Rica en grasas, carbohidratos simples dieta “occidental”	Aumento: <i>Firmicutes</i> , Disminuido: <i>Bacteroidetes</i>	Obesidad inducida por la dieta.
Reducción del consumo de carbohidratos	Reducción de <i>Bifidobacterium</i> , <i>Roseburia</i> spp. y <i>Eubacterium rectale</i>	No reportado

Alto contenido de proteínas y grasa animal	Aumento: <i>Bacteroides</i> , Disminución: <i>Firmicutes</i> . Asociado con el enterotipo <i>Bacteroides</i> .	Disminución del peso independientemente de las calorías consumidas
Menos frutas, verduras y pescado	Reducción de la riqueza de genes microbianos.	Aumento de la resistencia a la insulina, niveles de triglicéridos séricos en ayunas, colesterol LDL y la inflamación
Reducción en la variedad de alimentos	Aumento: <i>Bacteroides</i> Disminución de la diversidad en general	Aumento de la fragilidad y la mala salud en general.
Cambió de una dieta vegetariana a una dieta en productos animales	Decremento: <i>Prevotella</i> Incremento: <i>Bacteroides</i> .	No reportado

2. Efectos de la microbiota intestinal en la salud y enfermedad

Como se ha mencionado, la microbiota está involucrada en la modulación de la homeostasis de los seres humanos a través de la producción y almacenamiento de energía (Clemente J.C., *et al.*, 2012), así como diversas funciones metabólicas como la fermentación y la absorción de carbohidratos ingeridos (Gill, *et. al.*, 2006). De igual forma, la microbiota intestinal interactúa con el sistema inmunológico, promoviendo señales que favorecen la maduración de las células inmunológicas y con ello el desarrollo normal del sistema inmune (Chow, J. *et al.*, 2010). Además, la microbiota normal regula la estructura anatómica y fisiológica del intestino, aumentando la superficie de absorción y promoviendo la renovación de las células de las vellosidades, incrementa el contenido intraluminal y acelera el tránsito intestinal. Se ha postulado incluso que los microorganismos interactúan con el hospedero, modulando la expresión de genes relacionados con diversas funciones intestinales (Hooper, L.V., *et al.*, 2001).

Conjuntamente, estos microorganismos constituyen un enorme potencial enzimático en el intestino, desempeñando una amplia variedad de funciones metabólicas. Una de las más importantes es la hidrólisis o degradación de los componentes de la dieta (glúcidos, proteínas, lípidos). A través de este proceso se obtienen energía y nutrientes, tanto para los propios microorganismos intestinales como para el hospedero. La fermentación de los carbohidratos resulta en una disminución del pH y producción de metabolitos como los ácidos grasos de cadena corta (AGCC). Los AGCC más abundantes en el intestino son el ácido acético, el butírico y el propiónico, los cuales tienen una gran importancia en la fisiología y nutrición del intestino. La mayor parte de los AGCC producidos en el colon se absorben en la mucosa. El epitelio del colon consume casi por completo el butirato formado, constituyendo la principal fuente de energía para los colonocitos.

Además, el butirato se ha relacionado también con la reversión de células neoplásicas, pudiendo participar en la prevención de procesos cancerígenos (Gibson G.R., *et al.*, 1992; Scheppach W., *et al.*, 1995).

La degradación de las proteínas por la microbiota también genera AGCC, produciendo al mismo tiempo una serie de compuestos secundarios potencialmente tóxicos como aminas, amonio, fenoles, tioles e indoles (Rowland, I.R., 1995). Sin embargo, la capacidad metabólica de estos microorganismos incluye también la degradación de compuestos tóxicos, favoreciendo de esta manera la eliminación de sustancias carcinogénicas y/o mutagénicas (Parodi, P.W., 1999).

La microbiota del intestino lleva a cabo una variedad de reacciones metabólicas que producen algunos compuestos importantes (Tabla 3). La composición de la microbiota intestinal y la dieta influyen en la producción del tipo y la cantidad de dichos compuestos. Entre estos productos se encuentran la vitamina B₁₂ y K, que son absorbidas en el colon. En adición, los esteroides producidos en el hígado, liberados desde la vesícula biliar, son modificados en el intestino por la microbiota y los compuestos esteroides bioactivos modificados son absorbidos aquí.

Otros productos generados por la actividad de la fermentación bacteriana y metanógenos, incluyen gas y algunas sustancias odoríferas. Los adultos normales expelen varios cientos de mililitros de gases desde los intestinos cada día, de los cuales, cerca de la mitad es nitrógeno (N₂). La fermentación de algunos alimentos metabolizados por las bacterias del intestino, resulta en la producción de hidrógeno (H₂) y dióxido de carbono (CO₂). El H₂ y CO₂, producto de las bacterias fermentativas, es convertido a metano (CH₄) por los organismos metanógenos, que se encuentran en el intestino de muchos adultos, pero no de todos.

Tabla 3. Contribución metabólica de microorganismos intestinales. Productos generados por la actividad de la fermentación bacteriana y por los metanógenos en el tracto intestinal (Madigan, M. T., *et al.*, 2015)

PROCESOS	PRODUCTOS
Producción de gas	CO ₂ , CH ₄ , H ₂
Síntesis de vitaminas	Tiamina, riboflavina, piridoxina, B ₁₂ y K
Producción odorífera	H ₂ S, NH ₃ , aminas, indol, ácido butírico
Producción de ácido orgánico	Acético, propiónico, ácido butírico (AGCC)
Reacciones de glicosidación	β-Glucoronidasa, β-Galactosidasa, β-Glucosidasa, α-Glucosidasa, α-Galactosidasa
Metabolismos de esteroides (ácidos biliares)	Esterificación, esteroides deshidroxilados, oxidados o reducidos

Los microorganismos en el intestino también participan en la síntesis de vitaminas (Hill, M.J., 1997) y favorecen la absorción de diversos minerales como calcio, fósforo, magnesio y hierro (Miyazawa, E., *et al.*, 1996).

La diversidad microbiana del tracto gastrointestinal aumenta durante el trayecto de la boca al recto. En el intestino delgado el ambiente es fundamentalmente oxigénico y la mayoría de las reacciones microbianas son hidrolíticas. Por el contrario, el intestino grueso es anóxico y las reacciones bioquímicas son normalmente reductoras, aunque existen grandes diferencias en la función de la sección del colon. Los productos de la fermentación de carbohidratos (AGCC, gases y etanol) están presentes en altas concentraciones en el ciego y colon ascendente, donde la disponibilidad de sustratos es mayor. Por el contrario, los productos de la degradación de proteínas (amonio, ácidos grasos de cadena ramificada, compuestos fenólicos y sulfurados volátiles) se producen fundamentalmente en el colon descendente (Macfarlane G.T., *et al.*, 1992).

Aunque la microbiota es generalmente estable dentro de los individuos a través del tiempo, la composición puede ser alterada debido a perturbaciones externas. Uno de los principales factores que puede alterar la composición de la microbiota es el uso de antibióticos (Dethlefsen, L., 2008; Jernberg, C., 2007). Si bien, los taxones particulares afectados varían entre los individuos, algunos taxones no se recuperan incluso meses después del tratamiento, en general, hay una disminución a largo plazo en la diversidad bacteriana. A medida que la comunidad bacteriana intestinal se establece de nuevo después del tratamiento con antibióticos, hay una resistencia reducida a la colonización, lo que permite que microorganismos extraños puedan superar a las bacterias comensales para causar cambios permanentes en la estructura de la microbiota. El uso repetido de antibióticos en humanos ha planteado la hipótesis de incrementar el reservorio de genes resistentes a los antibióticos en nuestro propio microbioma (Sommer, M.O., *et al.*, 2009). Por lo que estas investigaciones muestran que más allá de la alteración en la composición de los taxones, los antibióticos también afectan la expresión de los genes, la actividad de las proteínas y el metabolismo en general de la microbiota. Estos cambios pueden ocurrir a un ritmo mucho más rápido que los que implican la sustitución de taxones en la comunidad (Pérez-Cobas, A. E., *et al.*, 2012). Bajo este escenario, los cambios inducidos en la microbiota intestinal pueden estimular la funcionalidad de la microbiota hacia estados similares a los observados en condiciones de enfermedad.

2.1 Disbiosis

Tradicionalmente se pensaba que la presencia de un solo microorganismo podría ser el causante de alguna enfermedad infecciosa (Hentges, D.J., 1992), ahora se conoce que la microbiota intestinal funciona como un órgano metabólicamente activo que digiere los componentes de la dieta que no son digeribles por las células humanas y que pueden ser absorbidas y metabolizadas de esta manera por el cuerpo humano (Backhed, F., *et al.*, 2005); también está involucrada en la estimulación del sistema inmune y en proveer resistencia a patógenos. La disbiosis se define como las alteraciones de la microbiota intestinal y la respuesta adversa del hospedero a estos cambios, esta perturbación tanto en la diversidad como en las funciones metabólicas llevada a cabo por la microbiota intestinal, puede conducir a su desarrollo.

Estudios metagenómicos han demostrado que el microbioma intestinal se asocia con enfermedades humanas, tales como obesidad, diabetes tipo 2 y asma (Tabla 4), y la composición de la microbiota intestinal ha demostrado estar influenciada por la dieta, el medio ambiente y la edad. Particularmente, existe un número creciente de condiciones gastrointestinales que se han relacionado con alteraciones en la microbiota, y que conducen a trastornos funcionales digestivos, como la Enfermedad Inflamatoria Intestinal (EII) y el Síndrome de Intestino Irritable (SII). La EII, trastorno recidivante, caracterizado por la inflamación crónica del tracto intestinal, en particular el colon, se clasifica en dos tipos principales: la enfermedad de Crohn (EC) y la colitis ulcerosa (CU). De manera consistente se ha observado que los pacientes que sufren de EII albergan una microbiota intestinal alterada, presentando una reducción de la diversidad bacteriana específica y dentro del filo *Firmicutes* (Elson, Charles O. y Con, Yingzi, 2012). Los cambios en la composición de la microbiota parecen ser específicos entre la EC y CU. Por ejemplo, una disminución en la abundancia de las bacterias productoras de butirato, *Roseburia hominis* y *Faecalibacterium prausnitzii*, ha sido observada en pacientes con CU en relación con los controles (Kathleen, Machiels, *et al.*, 2013); mientras que en la EC, los pacientes presentan una pérdida de *F. prausnitzii*, además de una diversidad global reducida. Aunque estos cambios pueden ser el resultado de un aumento de la inflamación, la evidencia sugiere que es más probable que los cambios en la microbiota estén involucrados en la patogénesis de la enfermedad, ya sea debido a la intolerancia a un grupo específico de comensales o debido a un desequilibrio entre éstos y miembros nocivos de la población.

Tabla 4. Condiciones asociadas con las alteraciones en la composición del microbioma humano (Morgan, X. C., *et al.*, 2012)

ENFERMEDAD	HALLAZGOS RELACIONADOS CON EL MICROBIOMA
Asma	Aumento de la diversidad microbiana en las vías respiratorias. (<i>Comamonadaceae</i> , <i>Sphingomonadaceae</i> ; <i>Oxalobacteraceae</i> , correlacionada con hiperreactividad bronquial).
Cálculos renales	Falta de <i>Oxalobacter formigenes</i> , aumentan los niveles de oxalato en orina.
Cáncer colorrectal	Tumores enriquecidos con los microbios intestinales típicos relativos al tejido sano: <i>Citrobacter</i> , <i>Cronobacter</i> , <i>Salmonella</i> y <i>Shigella</i> .
Dermatitis atópica	Decremento de la diversidad microbiana: <i>Staphylococcus aureus</i> .
Diabetes mellitus	Aumento de bacterias Gram negativas y <i>Firmicutes</i> . Diminución de <i>Bacteroidetes</i> y <i>Lactobacillus</i> .
Enfermedad de Crohn	Disminución de <i>Firmicutes</i> , aumento de <i>Proteobacteria</i> , pérdida de <i>F. prausnitzii</i> .
Infección por <i>Salmonella/Citrobacter</i>	Disminución de <i>Firmicutes</i> , aumento de <i>Proteobacteria</i> .
Periodontitis	Cambio de <i>Actinomyces</i> y <i>Streptococcus</i> a <i>Haemophilus</i> y <i>Selenomonas</i> .
Psoriasis	Disminución de <i>Staphylococcus</i> comensales y <i>Propionibacterium</i> e incremento en <i>Proteobacteria</i> .

2.2 Síndrome de Intestino Irritable

El Síndrome de Intestino Irritable (SII) es un desorden gastrointestinal funcional caracterizado por síntomas de dolor abdominal crónico y alteraciones en los hábitos intestinales, en ausencia de una causa propiamente identificable (Ronald, Ikechi, *et al.*, 2017). La prevalencia media de esta patología se ha estimado en un intervalo de 1.1% en Francia e Irán hasta el 35.5% en México (Ami, D. Sperber, *et al.*, 2016). Siendo el SII más común entre los 20 y 40 años de edad con un predominio significativo en las mujeres (Gibson, P.R., *et al.*, 2015).

El SII puede presentarse con un amplio rango tanto de síntomas gastrointestinales como extraintestinales, los cuales incluyen:

- a) Dolor crónico abdominal con intensidad variable y exacerbaciones periódicas.
- b) Hábitos intestinales alterados que van desde diarrea, estreñimiento, diarrea alternada con estreñimiento, o hábitos intestinales normales que alternan con diarrea y/o estreñimiento.
- c) Diarrea caracterizada por heces blandas frecuentes de volumen pequeño a moderado.
- d) Estreñimiento prolongada con intervalos de diarrea o función intestinal normal con heces duras, en forma de pellet y sensación de evacuación incompleta incluso cuando el recto está vacío.

- e) Síntomas extraintestinales, como alteración de la función sexual, dismenorrea, dispareunia, aumento de la frecuencia urinaria y urgencia, y síntomas de fibromialgia (Saha. L., 2014).

El SII se diagnostica de acuerdo a los criterios de Roma, los cuales se basan en la aplicación de un cuestionario relacionado con los síntomas y aplicado para detectar trastornos gastrointestinales; conforme a estos criterios, el SII se define como dolor abdominal recurrente asociado con defecación alterada, reconociéndose cuatro subtipos:

- 1) SII con predominancia de estreñimiento (SII-E): Heces duras o grumosas mayor o igual al 25% de la veces, *versus* heces blandas o líquidas, menor al 25% de las evacuaciones intestinales.
- 2) SII con predominancia de diarrea (SII-D): Heces sueltas o de agua, mayor al 25% de las ocasiones, *versus* heces duras o grumosas, menor al 5% de las evacuaciones intestinales.
- 3) SII mixto (SII-M): Heces duras o grumosas mayor o igual al 25% de las veces, *versus* heces sueltas o líquidas, menor o igual al 25% de los movimientos intestinales.
- 4) SII no clasificado (SII-U): La consistencia de las heces es insuficiente para satisfacer los subtipos anteriores (Ronald, Ikechi, *et al.*, 2017).

Sin embargo se debe recordar que los pacientes frecuentemente pasan de un subgrupo a otro; en los pacientes con SII es habitual que se interpreten equivocadamente los síntomas de diarrea y estreñimiento. Por ende, cuando muchos de estos pacientes se quejan de “diarrea”, de hecho se están refiriendo a la eliminación frecuente de materias formadas, y, en la misma población de pacientes, el “estreñimiento” se puede referir a cualquiera de una serie de quejas vinculadas al intento de defecar y no simplemente a movimientos intestinales infrecuentes.

En el terreno clínico, se pueden utilizar otras subclasificaciones con base en los factores precipitantes:

- SII post-infeccioso (SII-PI):
- Inducido por alimentos (inducido por las comidas)
- Vinculado al estrés

La fisiopatología del SII es compleja y es considerada como una combinación de varios factores, que incluyen anormalidades motoras, aumento de la respuesta de los receptores presentes en la pared intestinal frente a estímulos que conducen a distensión e hinchazón, activación del sistema inmune de la mucosa caracterizado por alteraciones en las células inmunes, incremento en el riesgo de infecciones asociadas con virus, bacterias, protozoos o infecciones helmínticas, sensibilidad a ciertos alimentos como

intolerancia a la fructosa o sensibilidad al gluten, polimorfismos en el gen transportador de serotonina, estrés, incremento de ansiedad, depresión o fobias, alteración del eje cerebro-intestino que puede estar asociado con hipersensibilidad gastrointestinal y disfunción, y más recientemente cambios en la microbiota intestinal (Saha. L., 2014).

Aunque su etiología se piensa que es multifactorial, se ha planteado la hipótesis de que las perturbaciones en la microbiota normal, juegan un papel en la inflamación de bajo grado característico del síndrome de intestino irritable, por lo que se ha asociado con alteraciones en la microbiota intestinal (Nobaek, S., *et al.*, 2000; Pimentel, M., *et al.*, 2000).

La evidencia indirecta de que la microbiota intestinal juega un papel importante en el SII proviene de estudios epidemiológicos que identifican a la infección aguda del tracto gastrointestinal (por ejemplo, gastroenteritis aguda) como un factor predecible para su desarrollo en un subgrupo de pacientes. Estudios recientes han puesto de relieve la importancia de la microbiota intestinal en el bienestar del huésped, dado que la función intestinal alterada se asocia con SII, es posible que una disbiosis intestinal juegue un papel clave en la fisiopatología de la enfermedad.

En los últimos años, se ha demostrado que los pacientes con SII, o subgrupos de los mismos, tienen una composición alterada de la microbiota en relación con individuos sanos, basado principalmente en el análisis de la microbiota fecal (Simren M., *et al.*, 2013).

Un estudio realizado por Chen-Shuan Chung, *et al.*, 2016, analizó la microbiota intestinal por secuenciación masiva a partir de biopsias del yeyuno y muestras de heces de 28 pacientes con SII y 19 controles sanos. Los resultados mostraron que las tres principales filos en biopsias de intestino delgado de los grupos de caso/control fueron *Proteobacteria* (32,8 /47,7%), *Bacteroidetes* (25,2/15,3%), y *Firmicutes* (19,8/11,2%), y los de las heces eran *Bacteroidetes* (41.3/45.8 %), *Firmicutes* (40,7 /38,2%), y *Proteobacteria* (15,4/7,1%), respectivamente (Figura 4).

En el análisis taxonómico de la microbiota a nivel de familia, los pacientes con SII presentaron una mayor proporción de *Veillonellaceae* en las heces que los controles, *Prevotellaceae* fue la familia más abundante en los pacientes con SII; mientras que, *Mycobacteriaceae* y *Neisseriaceae* fueron menos abundantes en la mucosa yeyunal de pacientes con SII. La disminución de la familia *Neisseriaceae* se asoció con un cuadro clínico de SII de mayor gravedad. La proporción de *Firmicutes* a *Bacteroidetes* fue aproximadamente tres veces mayor en las heces de los pacientes con SII tipo diarrea, y

la proporción de *Firmicutes* a *Actinobacteria* en los pacientes con SII tipo mixtos fue cerca de nueve veces más alta que en los sujetos sanos (Chen-Shuan, Chung, *et al.*, 2016).

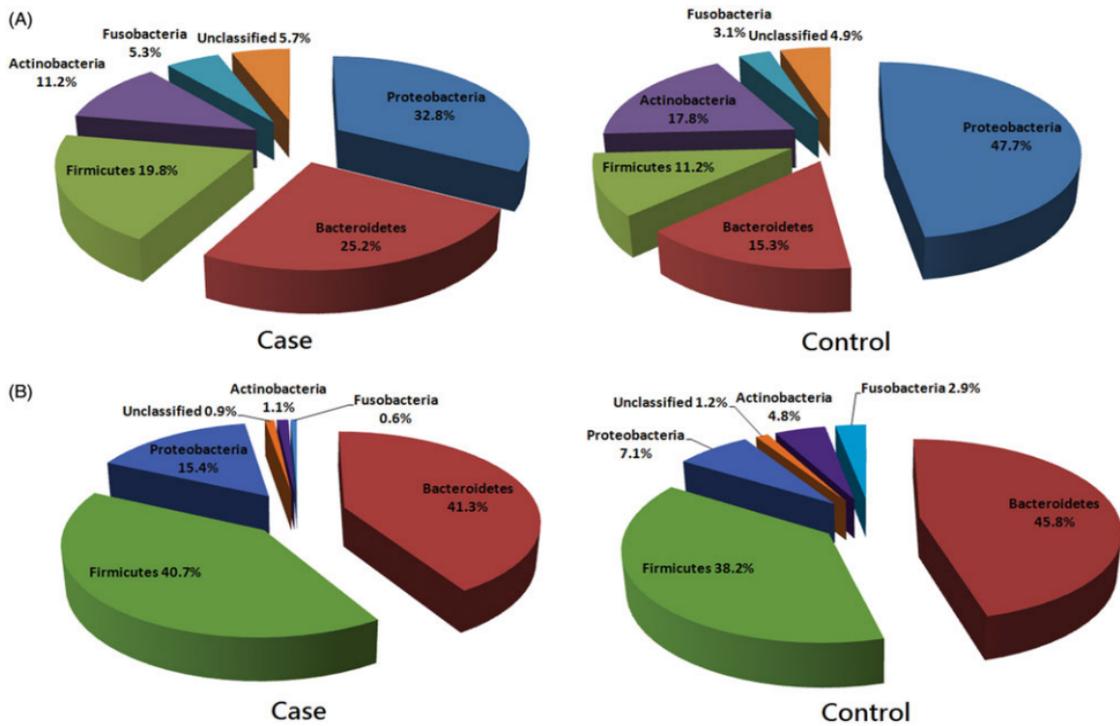


Figura 4. Proporción relativa de los filos bacterianos más comunes en sujetos sanos y sujetos con SII. (A) Muestras de yeyuno. (B) Muestras de materia fecal. (Chen-Shuan, Chung, *et al.*, 2016).

En otro estudio realizado por Aldona Dlugosz, *et al.*, 2015, se analizó la microbiota de la mucosa del intestino delgado (yeyuno proximal) por secuenciación masiva en paralelo usando la región V4 del ARNr 16S, en 25 pacientes con SII (13 con SII-D, 9 con SII-E y 13 con SII-M) y 16 individuos sanos. De este estudio se obtuvo que los filos con la abundancia total más alta en todas las muestras fueron: *Firmicutes* (43%), *Proteobacteria* (23%), *Bacteroidetes* (15%), *Actinobacteria* (9,3%) y *Fusobacteria* (7,0%); mientras que, los géneros más abundantes reportados fueron: *Streptococcus* (19%), *Veillonella* (13%), *Prevotella* (12%), *Rothia* (6,4%), *Haemophilus* (5,7%), *Actinobacillus* (5,5%), *Escherichia* (4,6%) y *Fusobacterium* (4,3%). Estos géneros estaban presentes en más del 98% de todas las muestras, excepto *Actinobacillus*, que estaba presente en 82%, no habiendo diferencias significativas entre los pacientes con SII y los controles (Aldona, Dlugosz, *et al.*, 2015).

Aunque las alteraciones de la microbiota existen en el SII, aún no se ha demostrado un perfil uniforme en la composición de la misma (Tabla 5); esta inconsistencia entre los datos actualmente disponibles puede atribuirse a la heterogeneidad de los métodos empleados para determinar el perfil de la microbiota intestinal, la variabilidad inherente de la microbiota para cada individuo, las diferencias en los criterios de inclusión de los sujetos de estudio, el tamaño de la muestra y la heterogeneidad de esta condición, lo que hace referencia a que las alteraciones de la microbiota intestinal pueden no ser consistentes a través de todos los subtipos de SII (SII-D, SII-E y SII-M). Aunado a ello, se debe reconocer que las diferencias entre los estudios pueden ser debido a la presencia de microorganismos causales o desequilibrios entre los diferentes subtipos de SII y la falta de conocimiento en la participación específica de estos microorganismos hacia la progresión del Síndrome (Distrutti, Eleonora, *et al.*, 2016).

Tabla 5. Alteraciones de la microbiota en pacientes con SII versus sujetos sanos. SII-E: SII con predominio de estreñimiento, SII-D: SII con predominio de diarrea, SII-M: SII mixto (Distrutti, Eleonora, *et al.*, 2016).

Referencia	Método	Nº de pacientes	Criterios de diagnóstico	Resultados de sujetos con SII vs sujetos sanos
Si J.M., <i>et al.</i> , 2004	Cultivo	25	Roma II	Disminución de <i>Bifidobacteria</i> Aumento de <i>Enterobacteriaceae</i>
Malinen E, <i>et al.</i> , 2005	qPCR	27	Roma II	Aumento de <i>Veillonellaceae</i> SII-E Disminución <i>Lactobacillus</i> in SII-D
Mättö J, <i>et al.</i> , 2005	Cultivo/DGGE	26	Roma II	Aumento de bacterias aerobias, temporalmente inestable
Swidsinski A, <i>et al.</i> , 2005	FISH	20	Roma II	Aumento de las bacterias de la mucosa: SII-A. Aumento de <i>Eubacteriumrectale</i> : SII-E y <i>Clostridium coccooides</i> en SII-D
Krogius-Kurikka L, <i>et al.</i> , 2009	ARNr 16S	10	Roma II	Aumento de <i>Proteobacteria</i> y <i>Firmicutes</i> y disminución de <i>Actinobacterias</i> y <i>Bacteroidetes</i> en sujetos con SII-D
Chen-Shuan Chung, <i>et al.</i> , 2016	Secuenciación <i>shotgun</i>	47	Roma III	Aumento de <i>Firmicutes</i> y <i>Bacteroidetes</i> Disminución de <i>Actinobacterias</i>

3. Técnicas para el estudio de la microbiota por secuenciación masiva tipo *shotgun* y amplicón ARNr 16S

La secuenciación es un método bioquímico que determina el orden de los nucleótidos en una secuencia de ADN. El avance en la secuenciación masiva ha provisto las

herramientas que complementan el estudio de las comunidades microbianas dentro de un ambiente. La secuenciación de alto rendimiento del gen ARNr 16S de las bacterias (Guschin, D.Y., *et al.* 1997; Tringe, S.G. y Hugenholtz, P., 2008), que forma parte de la subunidad pequeña de ribosomas en bacterias y arqueas, ha sido ampliamente utilizada para identificar especies bacterianas y realizar estudios taxonómicos. Este gen contiene generalmente nueve "regiones hipervariables" que muestran una considerable diversidad de secuencias entre las diferentes especies bacterianas y pueden ser utilizadas para la identificación de las mismas (Van de Peer, *et al.*, 1996). Las regiones hipervariables están flanqueadas por secuencias de ADN conservadas en la mayoría de las bacterias, lo que permite la amplificación por PCR de secuencias diana utilizando cebadores universales. Numerosos estudios han identificado secuencias de la región hipervariable del gen ARNr 16S, que identifican una sola especie bacteriana o diferencian entre un número limitado de especies o géneros. Sin embargo, debido a que el gen ARNr 16S es de aproximadamente 1,550 pares de bases, es difícil de secuenciarlo en su totalidad a menos de que se realice un ensamble del gen completo, por lo que el aumento de la longitud de la secuencia estudiada, disminuye la profundidad de la cobertura, resultando más difícil resolver los taxones raros. Otro inconveniente, es que las regiones variables difieren entre especies de distintas maneras, distinguiéndose algunas especies en una región variable, pero no en otra (Baker G.C., *et al.*, 2003).

Más recientemente, los enfoques de secuenciación del genoma completo, por ejemplo la metagenómica y la metatranscriptómica, han ampliado aún más las herramientas para el estudio del microbioma. La metagenómica es un término que incluye el conjunto de técnicas genómicas y herramientas bioinformáticas útiles para determinar el contenido genético de comunidades enteras de microorganismos (Torsten Thomas, *et al.*, 2012).

La secuenciación masiva tipo *shotgun* es un enfoque utilizado para el estudio de la microbiota no cultivable, basada en la extracción del ADN o ARN a partir de todas las células de una comunidad, seguida de la construcción de una librería y, en lugar de dirigirse a un locus genómico específico para su amplificación, todo el ADN es fragmentado en pequeñas piezas, las cuales son secuenciadas de manera independiente (Figura 5). Esto da lugar a secuencias de ADN (lecturas) que se alinean en lugares genómicos diferentes para los miles de genomas presentes en la muestra, incluyendo los no microbianos. Algunas de estas lecturas sirven para conocer los *loci* taxonómicamente informativos (ARNr 16S), y otros se usan para conocer las secuencias codificantes, que permiten elucidar las funciones biológicas en el genoma. Como resultado, los datos

metagenómicos proveen la oportunidad de explorar simultáneamente dos aspectos de la comunidad microbiana, qué organismos se encuentran presentes en una muestra y cuáles son sus funciones (Thomas J. Sharpton, 2014).

Técnicas actuales para el perfil del microbioma humano

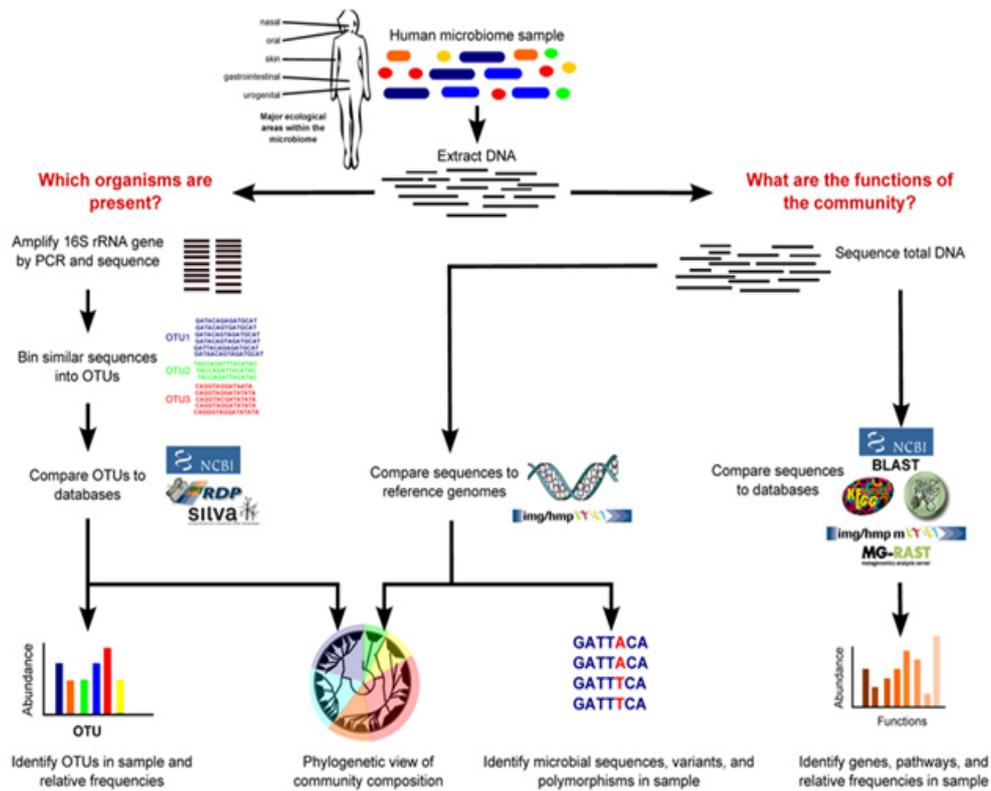


Figura 5. Enfoques de secuenciación masiva para el estudio de la microbiota. Existen dos enfoques para el estudio de muestras que contienen un alto número de especies bacterianas y otros microorganismos. Primer enfoque: Después de que se ha extraído el ADN total, la composición de la comunidad se determina mediante la amplificación y secuenciación del gen ARNr 16S. Las secuencias similares se agrupan en OTUs y se comparan con bases de datos de organismos reconocidos. Segundo enfoque: Estudio del ADN total (metagenómica) que es secuenciado y comparado con bases de datos destinados a la función. Alternativamente, el ADN de la comunidad secuenciada se puede comparar con genomas de referencia. Esto permite la identificación de variantes en las secuencias microbianas y polimorfismos, de igual forma proporciona un medio alternativo para detectar la presencia y abundancia de organismos específicos (Lederberg, 2001).

En los últimos años, la secuenciación metagenómica se ha utilizado para identificar nuevos virus (Yozwiak, NL., *et al.*, 2012), caracterizar la diversidad genómica y la función de comunidades bacterianas no cultivadas (Wrighton K. C., *et al.*, 2012), la relación entre sus miembros, los metabolitos que son consumidos y producidos, y la interacción con el hospedero; lo cual ha llevado a dilucidar nuevas e importantes proteínas para la identificación de taxones y de rutas metabólicas que diferencian a la microbiota asociada con los estados de salud y enfermedad (Morgan, *et al.*, 2012).

JUSTIFICACIÓN

En los últimos años el estudio del microbioma humano ha tomado gran importancia debido a la comprensión del papel que ejerce éste en el mantenimiento de la homeostasis. Uno de los enfoques críticos para el estudio del microbioma humano es la composición y diversidad de la comunidad microbiana, que ayudan a dilucidar los patrones de distribución y ensamblaje de estas comunidades en todos los hábitats del cuerpo y facilitan los estudios ecológicos y biológicos del mismo.

Actualmente existen investigaciones en donde se observa que los cambios en la composición de taxones y especies se encuentran asociados con el desarrollo de algunas enfermedades. A la fecha se desconoce la diversidad y composición en la población latinoamericana en sujetos clínicamente sanos y los cambios ligados a trastornos funcionales del intestino, como el Síndrome de Intestino Irritable. El conocimiento generado a partir de este estudio permitirá identificar el microbioma para el pronóstico, diagnóstico y tratamiento del SII.

HIPÓTESIS

Existe una asociación entre la composición de la microbiota y el Síndrome de Intestino Irritable que ha sido estudiada en poblaciones anglosajonas y asiáticas, dado por un aumento en la abundancia de los filos *Firmicutes* y *Actinobacteria* y una disminución de *Bacteroidetes*, por lo que si en poblaciones latinoamericanas se encuentra el mismo comportamiento, a nivel de género se esperará un aumento de *Clostridium*, *Ruminococcus*, *Roseburia* y *Propionibacterium* de los cuales, algunas especies producen ácidos grasos de cadena corta, que se encuentran relacionados con el SII.

OBJETIVO GENERAL

Analizar la composición bacteriana presente en muestras de mucosa colónica de pacientes con SII y sujetos sanos, mediante secuenciación masiva tipo *shotgun*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Estandarizar la extracción de DNA a partir de biopsias de colon descendente.
2. Determinar los OTUs presentes en las muestras mediante la anotación de las secuencias con el servidor MG-RAST.
3. Analizar las diferencias entre las comunidades bacterianas presentes en sujetos sanos y pacientes con SII.

MATERIAL Y MÉTODOS

A) Diseño del Estudio

El presente trabajo es un estudio de casos y controles en el que se describe la composición de la microbiota de 5 sujetos sanos y 5 pacientes con Síndrome de Intestino Irritable (SII).

B) Población de estudio

Para llevar a cabo este estudio se invitó a participar a pacientes programados para colonoscopia diagnóstica en el Servicio de Endoscopia del Hospital General de México “Eduardo Liceaga”. El diagnóstico de los pacientes con SII fue realizado mediante la aplicación de los cuestionarios de Roma III (Anexo III); además se les aplicó el cuestionario de Spiller para eliminar aquellos pacientes con SII causada por infección y el cuestionario de escala de gravedad de los síntomas (IBS-SSS, por sus siglas en inglés) (Anexo III), que permitió la clasificación del SII en: leve, moderado y grave.

En el caso de los sujetos sanos, se reclutaron 5 individuos por medio de invitación directa y por propaganda a los familiares de los pacientes que asistían a la Unidad de Endoscopia. A todos los sujetos se les aplicaron los cuestionarios mencionados previamente, para confirmar que no presentaran síntomas o cualquier otro trastornos gastrointestinales. Los criterios de inclusión y exclusión para los dos grupos de estudio se presentan en la Tabla 6.

Tabla 6. Criterios de inclusión y exclusión de la población de estudio.

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.

A todos los sujetos que participaron en el estudio se les proporcionó una carta de consentimiento informado, la cual leyeron y firmaron aceptando formar parte del mismo. Estos protocolos fueron aprobados por los Comités de Investigación y Ética del Hospital General de México “Eduardo Liceaga” y de la Facultad de Medicina, UNAM.

C) Toma y almacenamiento de las biopsias

La colonoscopia se realizó por médicos especialistas del Hospital General de México "Eduardo Liceaga". Las biopsias se tomaron de la porción más proximal del intestino, colectando: dos biopsias de íleon, 2 de ciego, 2 de colon ascendente, 2 de colon transverso, 2 de sigmoides, 2 de recto y 4 de colon descendente. Una vez obtenidas, las biopsias se colocaron en criotubos conteniendo 500 µl de solución de RNAlater y se transportaron a temperatura ambiente del HGM al laboratorio de Inmunología Molecular Microbiana, Facultad de Medicina, en donde se llevó a cabo el procesamiento de las 4 biopsias de colon descendente, debido a que la densidad de las bacterias aumenta progresivamente a lo largo del intestino delgado desde aproximadamente 10^4 en el yeyuno a 10^7 unidades formadoras de colonias por gramo de contenido luminal en el extremo del íleon, siendo que en el colon el contenido bacteriano alcanza 10^{12} unidades formadoras de colonia por gramo (Zoetendal, E.G., *et al.*, 2006)

Las biopsias que no fueron procesadas se almacenaron en un tanque de nitrógeno líquido para la creación de un Biobanco.

D) Extracción de DNA genómico total

La extracción de DNA genómico (ADNg) se realizó a partir de 4 biopsias de colon descendente, previamente estandarizado. Debido a la naturaleza de las muestras, antes de comenzar con la extracción del ADN, fue necesario realizar un pre tratamiento con el objetivo de lisar el tejido y facilitar la extracción del mismo.

Para ello, se dejaron secar en una campana de extracción sobre papel parafilm estéril las biopsias de cada paciente durante 10 minutos, las biopsias se pesaron en un tubo eppendorf de 1.5 ml, limpio y estéril.

Para la obtención del ADNg, se utilizó el QIAamp DNA mini kit (Qiagen), siguiendo el protocolo a partir de tejidos. Una vez colocadas las muestras en el tubo eppendorf, se agregaron 450 µl de Buffer ATL y 20 µl de proteinasa K, se mezcló suavemente por inversión del tubo por 30 s., para incubar a 56 °C durante 1 h. y 15 min. aproximadamente, o hasta que el tejido se lisara completamente. Transcurrido este tiempo se adicionaron 10 µl de RNAsa [10 mg/ml], mezclando por inversión del tubo e incubando a 37 °C por 30 min. Posteriormente se añadieron 200 µl de Buffer AL, mezclando por inclinación del tubo y se incubó a 70 °C por 10 min. Enseguida se adicionaron 200 µl de etanol frío al 100 % y se mezcló perfectamente en un vórtex.

Se realizó una transferencia de la mezcla obtenida del lisado del tejido 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 añadieron 500 µl de Buffer AW1, centrifugando a 8,000 rpm durante 1 min. Posteriormente se colocó la columna de centrifugación (QIAamp DNA Mini) en un nuevo tubo de recolecta, añadiendo 500 µl de Buffer AW2 y centrifugando a 14,000 rpm durante 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 añadieron 100 µl Buffer AE, incubando a temperatura ambiente durante 5 min y a continuación se centrifugó durante 1 min. a 8,000 rpm, obteniendo de esta manera el ADNg.

E) Cuantificación del DNA genómico total

El rendimiento de ADNg (ng) y la pureza (relación de absorbancia 260/280 nm) del ADNg total extraído a partir de las biopsias, se determinó por espectrofotometría, utilizando el equipo NanoDrop 1000 (1 µl de muestra), donde se define al DNA puro como aquel que tiene una relación de absorbancia 260/280 nm en un intervalo de 1.8 y 2.0. La contaminación por proteínas y fenol disminuye dicha relación.

F) Determinación de la integridad del DNA genómico total

Para evaluar la integridad de las muestras se realizó un gel de agarosa al 0.8% en TAE 0.5x, realizando una corrida electroforética a 70 V por 3 horas y utilizando el fago lambda (New EnglandLabs) como referencia de peso molecular para el ADNg (48.5 Kb). Para visualizar el ADNg total, el gel se tiñó en una solución de bromuro de etidio (0.5 µg/ml) durante 10 minutos y fue visualizado en el transiluminador a una luz UV de 510 nm.

G) Secuenciación masiva

Las muestras de ADNg se enviaron a secuenciar a la compañía de Macrogen Inc (Seoul, Corea), mediante el método de *shotgun* en la plataforma de Illumina HiSeq 4000, utilizando placas de secuenciación para obtener un tipo de lecturas 2 x100 paired-end o de ambos extremos.

Los requerimientos de las muestras de DNA genómico fueron las siguientes:

- Cantidad de aproximadamente 1 µg de ADNg
- D. O. 260/280 entre 1.8-2.0

H) Análisis de las secuencias

1. Calidad de las secuencias

El análisis de calidad de los datos crudos se realizó con la herramienta llamada control de calidad para datos de secuenciación masiva, FastQC (v0.11.5, Mac DMG image, Andrews S., 2010), este programa permite realizar controles de calidad en archivos obtenidos a partir de distintos métodos de secuenciación; proporcionando una estadística básica del control de calidad del contenido de las secuencias del archivo, como el tamaño, el contenido de Guanina/Citosina, entre otros parámetros, pudiendo detectar aquellas secuencias que presentan una baja calidad ($Q < 20$). El valor Q expresa numéricamente la exactitud de cada nucleótido en la secuencia, es decir el nivel de calidad Phred; este valor se encuentra asociado logarítmicamente a la probabilidad de error, siendo Q20 el valor de corte para datos de buena calidad (Andrews S., 2010).

Cada uno de los archivos de las secuencias obtenidas (forward y reverse) fueron importados al programa FastQC y analizados (Anexo II).

2. Fusión de lecturas

Las lecturas paired-end, forward y reverse, se fusionaron (merged) con el propósito de aumentar la longitud total de la lectura, utilizado el programa bioinformático PEAR (v0.9.6, Jiajie Zhang, *et al.*, 2014).

Para fusionar los archivos forward y reverse, se utilizaron los parámetros estándar del programa, usando un *p-value* de 0.01, este valor indica que el ensamblaje de las lecturas es estadísticamente significativo (99% de que las lecturas hayan hecho traslape) (Anexo II).

Parámetros estándar:

--min-overlap: Especifica el tamaño mínimo de solapamiento; default 10

--min-assembly-length: Especifica el largo mínimo posible del ensamblaje de las secuencias; default 50

Se concatenaron los archivos con las lecturas traslapadas y las lecturas que no se fusionaron de ambos archivos (forward y reverse), creando un solo archivo que tuviera tanto las lecturas crudas como las fusionadas por condición.

3. Alineamiento de las secuencias contra el Genoma Humano

Debido a la naturaleza de las muestras (biopsias de colon), la cantidad de lecturas humanas esperadas es mayor en comparación con las que no lo son (procariotas, eucariotas, otras), por lo que fue necesario realizar la separación de aquellas lecturas que no alinearan contra el Genoma Humano de aquellas que sí alinearon. Para esto se utilizó el programa Bowtie (v1.2.0, Langmead B, *et al.*, 2016), que alinea las lecturas contra un genoma de referencia, en este caso contra al Genoma Humano (*Homo sapiens* (GRCh38)) (Manual Bowtie v1.2.0, Langmead B, *et al.*, 2016) (Anexo II).

Para llevar a cabo la separación de las lecturas se establecieron los siguientes parámetros:

--local: Alineamiento local

--seedmms: Máximo número de mismatches permitidos, 2

--maqerr: Total máximo permitido de valores de calidad en todas las posiciones de lectura no coincidentes en toda la alineación, default 70.

-v: Reporta los alineamientos con al menos 5 mismatches

4. Anotación taxonómica con MG-RAST

Para llevar a cabo la anotación de las secuencias no alineadas contra el genoma humano se empleó el servidor de anotación rápida de metagenomas, MG-RAST (v4.0, Andreas Wilke, *et al.*, 2016). Para llevar a cabo este análisis fue necesario cargar los archivos al servidor MG-RAST, a través del cual se determinaron los perfiles de abundancia comparando la similitud de las secuencias contra una base de datos de proteínas M5nr que es una base de datos no redundante integrada por otras bases como: GenBank, SEED, IMG, UniProt, KEGG.

Los perfiles de abundancia, fueron determinados bajo el contexto del ancestro común más lejano (LCA); con este método se evita el problema de múltiples anotaciones taxonómicas para una sola característica. Los parámetros empleados fueron: e-value máximo de $1e-10$, identidad mínima del 70% y longitud mínima de alineación de 3.

Los perfiles de abundancia de MG-RAST fueron transformados en frecuencias relativas para un mejor manejo de los datos y mediante el uso de R, se obtuvieron las gráficas de frecuencias para los miembros más abundantes de cada nivel taxonómico.

A partir del análisis realizado con MG-RAST, se eligieron únicamente las secuencias pertenecientes a las bacterias con ayuda de los comando de Linux y de los archivos de

anotación en formato .tsv (Anexo II), descargados a partir de MG-RAST, con las anotaciones taxonómicas para cada metagenoma. Estos archivos fueron cargados en el programa de R (R Core Team, 2015) con la biblioteca reshape2 (Wickham, 2014) para realizar la transformación de dicha tabla a una tabla de abundancia, que para facilitar su observación gráfica fueron transformados en frecuencias relativas, dividiendo la abundancia de cada metagenoma, por nivel taxonómico, entre el total de abundancias por cada metagenoma. Para facilitar la visualización de las gráficas de frecuencias relativas se eligieron hasta los treinta taxones más abundantes (a partir de la categoría de familia, hasta llegar a la especie).

5. Análisis estadístico

Finalmente se realizó un análisis estadístico de las frecuencias relativas para cada nivel taxonómico usando la prueba de Mann-Whitney, con el programa SPSS v12, útil para determinar las diferencias entre las medianas de dos o más grupos.

RESULTADOS

A) Características demográficas y clínicas de la población de estudio

En el estudio se incluyeron 10 sujetos, 5 sujetos sanos y 5 pacientes con SII, siguiendo los criterios de inclusión y exclusión, y el cuestionario de Roma III para el diagnóstico del SII (Anexo III). De los pacientes con SII, tres de ellos fueron evaluados como SII con predominancia de diarrea, uno con predominancia de estreñimiento y otro mixto, es importante mencionar que ninguno de los sujetos presentó SII post-infección. En la tabla 6 se presentan las características clínicas y demográficas tanto de los pacientes con SII como de los sujetos sanos. En general en el grupo de los pacientes con SII, la mediana de 41 años, con un rango de 24 a 60 años de edad, cuatro de ellos mujeres y un hombre, dos de los cuales con sobrepeso y de acuerdo al cuestionario de escala de gravedad de los síntomas, dos pacientes presentaron un SII leve y tres moderado. En el grupo de los sujetos sanos, 3 de ellos fueron mujeres y 2 hombres, la mediana de edad fue de 28 años y un rango de 24 a 44 años de edad, dos de ellos con sobrepeso. Cabe mencionar que ninguno de los sujetos de este grupo presentó comorbilidades (Tabla 7).

Tabla 7. Características demográficas y clínicas de la población.

Sujeto	Sexo	Edad	Estado Civil	Nivel educativo	IMC2	Comorbilidades	Subtipo de SII	Severidad
SII-1	F	41	Soltera	Secundaria	Normal	Ninguna	SII-E	Leve
SII-2	F	60	Soltera	Técnico/Comercial	Sobrepeso	Ninguna	SII-D	Moderado
SII-3	F	60	Viuda	Primaria	Normal	Hiperlipidemia	SII-D	Moderado
SII-4	F	37	Soltera	Preparatoria	Normal	Ninguna	SII-D	Leve
SII-5	M	24	Soltero	Profesional	Sobrepeso	Ninguna	SII-M	Moderado
CTRL-1	M	24	Soltero	Profesional	Normal	Ninguna	-----	-----
CTRL-2	F	33	Soltera	Preparatoria	Normal	Ninguna	-----	-----
CTRL-3	F	28	Soltera	Profesional	Normal	Ninguna	-----	-----
CTRL-4	M	27	Soltero	Profesional	Sobrepeso	Ninguno	-----	-----
CTRL-5	F	44	Casada	Preparatoria	Sobrepeso	Ninguno	-----	-----

SII: Paciente con Síndrome de Intestino Irritable, E: Estreñimiento, D: Diarrea, M: Mixto, CTRL: Sujetos sanos, F: Femenino y M: Masculino.

B) Cuantificación e integridad del ADN genómico total

Los resultados de la cuantificación y pureza obtenidos para cada muestra se muestran en la tabla 8, donde la relación 260/280 promedio del ADN extraído fue de 1.80 y la relación 260/230 promedio fue de 2.05, estos valores se encuentran dentro del intervalo

normal requerido para considerar una buena pureza del ácido nucleico. La concentración promedio fue de 4.46 μg de ADN, adecuado para el proceso de secuenciación (Tabla 8).

Tabla 8. Cuantificación del ADN genómico obtenido a partir de biopsias

Muestra	Nº biopsias y peso (mg)	[ng/ μl]	Rel. 260/280	Rel. 260/230	Cantidad Total (μg)
SII-1E	4 (21.2)	61.61	1.85	1.88	6.16
SII-2D	2 (9.7)	17.15	1.73	2.07	1.71
SII-3D	4 (18.9)	53.21	1.85	1.86	5.32
SII-4D	4 (8.6)	83.55	1.79	1.94	8.35
SII-5M	4 (9.8)	20.06	1.93	2.35	2.00
CTRL-1	4 (12.9)	23.2	1.79	1.84	2.32
CTRL-2	4 (15.2)	82.2	1.80	2.39	8.22
CTRL-3	4 (15.3)	29.8	1.92	2.05	2.98
CTRL-4	4 (12.6)	46.9	1.60	2.04	4.69
CTRL-5	4 (9.1)	28.9	1.82	2.09	2.89
Promedio	13.33 mg	44.65	1.81	2.05	4.46

SII-1E: Paciente con SII 1 con predominio de estreñimiento, SII-2D: Paciente con SII 2 con predominio de diarrea, SII-5M: Paciente con SII 5 mixto, CTRL: sujetos sanos. De aquí en adelante las muestras (metagenomas) se etiquetaron como: SII-1E, SII-2D, SII-3D, SII-4D y SII-5M.

Para verificar la integridad del ADN genómico, se realizó una electroforesis en gel de agarosa, las bandas que corresponden al ADN de las muestras y el fago lambda se observan en la figura 6. En todos los casos se muestra una banda bien definida, lo cual indica que el ADN extraído tuvo una buena integridad, por lo que fue posible el envío de las muestras para su secuenciación.

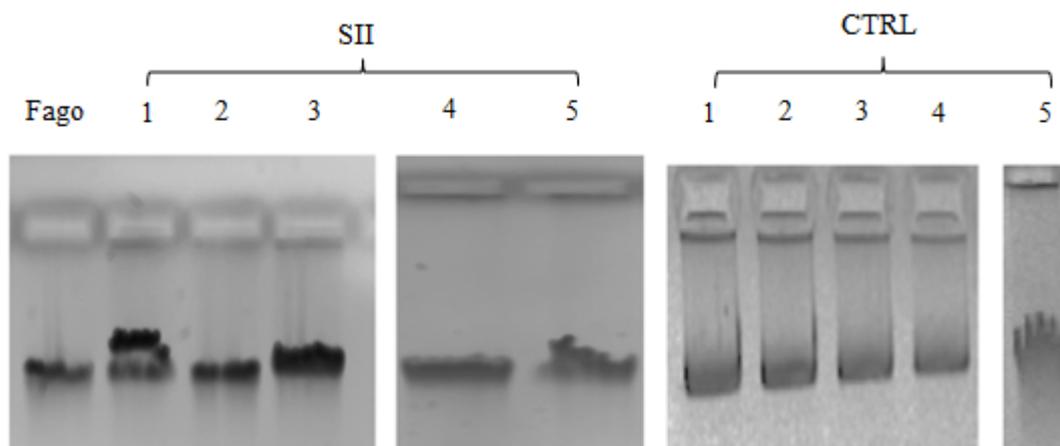


Figura 6. Visualización del ADN genómico total de las muestras procesadas. Electroforesis en gel de agarosa al 1% en TAE 0.5x, con una corrida electroforética de 3 horas a 70V. Carril uno, fago lambda (48.5 Kb), utilizado como marcador de peso molecular; en los demás carriles se observa la banda de ADN que pertenece a la muestra correspondiente. SII: pacientes con SII y CTRL: sujetos sanos. En cada carril se cargaron 50 ng de muestra y de fago.

C) Calidad de las secuencias obtenidas

Los datos generados a partir de la secuenciación se encuentran conformados por lecturas con longitud de 101 pares de bases, lo que es apreciable al dividir el número total de bases leídas sobre el total de lecturas por cada muestra.

La mayor cantidad de lecturas reportadas pertenecen a la muestra CTRL-5 por encima de los 23.5 Gb, seguida de la muestra CTRL-4 con poco más de 23 GB, CTRL-3 con 22.9 GB, CTRL-1 con 22.7 GB, SII-1 con 22 GB, SII-2 con poco más de 19 GB, SII-3 con 18.8 GB, CTRL-2 con 18.2 GB, la muestra SII-4 con 17.8 GB y finalmente la muestra con menos bases leídas corresponde a SII-5 con 16.7 GB (Tabla 9). Asimismo, el rango de lecturas totales para cada muestra está en función del número total de bases leídas.

Tabla 9. Estadísticas de los datos de secuenciación.

Muestra	Total de bases leídas (pb)	Total de lecturas	GC %	AT %	Q20 %	Q30 %
SII-1E	22,040,491,488	218, 222, 688	40.06	59.94	95.48	89.68
SII-2D	19,195,441,274	190,053,874	40.16	59.84	95.71	90.09
SII-3D	18,796,197,566	186,100,966	40.04	59.96	94.25	87.23
SII-4D	17,792,087,684	176,159,284	40.12	59.88	95.33	89.32
SII-5E	16,658,509,740	164,935,740	39.94	60.06	95.22	88.92
CTRL-1	22,773,143,872	225,476,672	40.1	59.9	96.2	91.29
CTRL-2	18,262,472,358	180,816,558	40.0	60.0	96.4	91.67
CTRL-3	22,897,365,388	226,706,588	39.94	60.06	96.1	91.05
CTRL-4	23,130,460,460	229,014,460	39.7	60.3	96.54	91.96
CTRL-5	23,568,725,922	233,353,722	40.05	59.95	96.14	91.21
Promedio	-----	-----	40.01	59.99	95.73	90.24

Total de bases leídas: Número total de bases secuenciadas. Total de lecturas: Número total de lecturas (secuenciación paired-end) GC (%): Porcentaje de Guanina-Citosina, AT (%): Porcentaje de Adenina-Timina, Q20 (%):Calidad Phred, un error en cada 100 bases, Q30 (%):Calidad Phred, un error en cada 100 bases.

En general, el porcentaje promedio de pares GC observado es inferior al de AT. El promedio de contenido total de GC fue de 40.01% y el 59.99% restante pertenece a los dinucleótidos AT, valores similares al DNA mamífero, que son consistentes con la naturaleza de la muestra.

El promedio de calidad Q20 fue de 95.73% (probabilidad de error de 1 en 100 bases), en tanto que el promedio de calidad Q30 fue de 90.24% (probabilidad de error de 1 en 1,000 bases) (Tabla 9).

D) Análisis de las secuencias

1. Calidad de las secuencias crudas y fusionadas

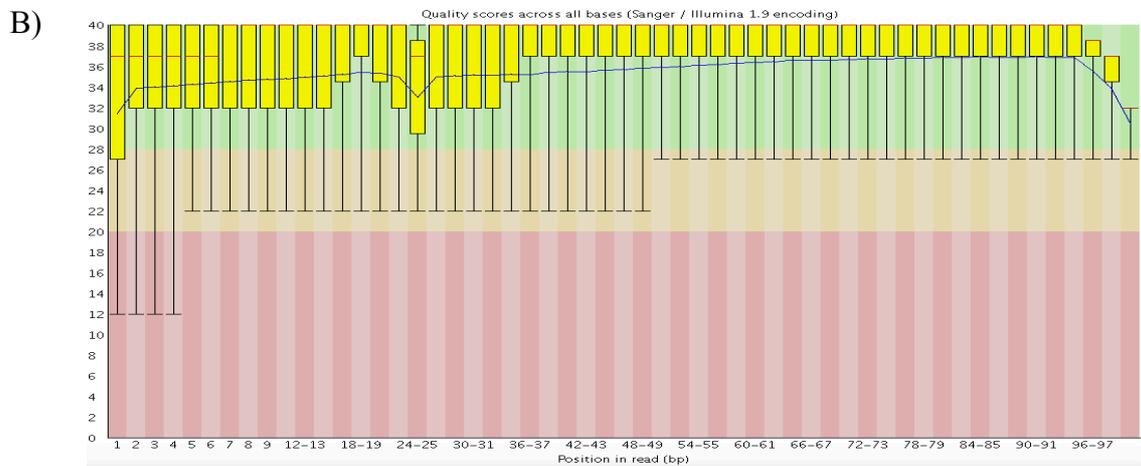
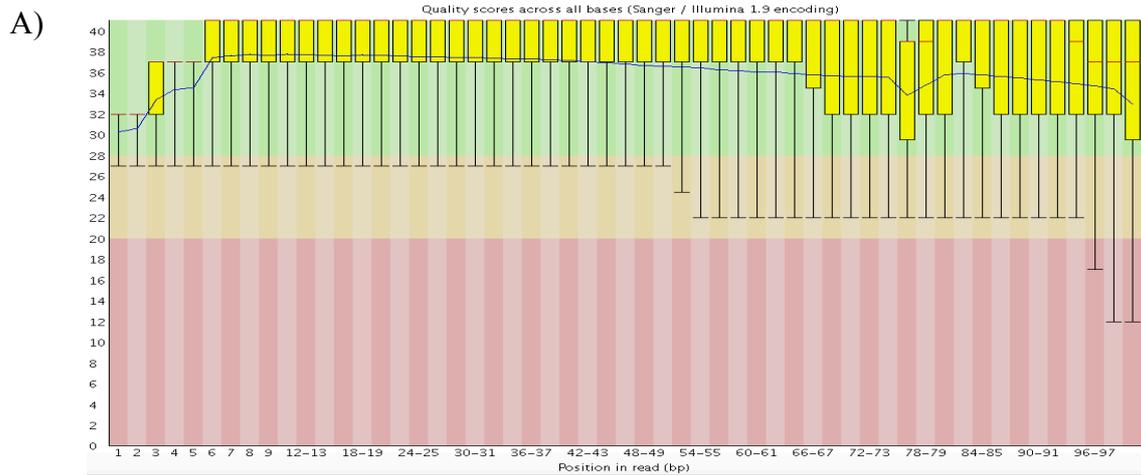
Con el propósito de conocer la calidad las lecturas crudas y fusionadas obtenidas a partir de la secuenciación y de las lecturas procesadas en PEAR, se llevó a cabo un análisis con FastQC.

De manera general en la tabla 10 se muestra la estadística para todas las muestras secuenciadas, tanto de las lecturas forward como de las reverse, antes de su fusión; en donde se observa que el largo de las secuencias es de 101 pares de bases; de la misma forma se presenta la estadística de las lecturas al ser fusionados ambos archivos, en donde se aprecia que el total de las secuencias se incrementa al doble y por lo tanto la longitud de las secuencias es mayor, de 192 pares de bases.

Tabla 10. Estadística básica generada por el programa FastQC para cada muestra

Muestra	Parámetros	Secuencias Forward	Secuencias Reverse	Secuencias Fusionadas
SII-1E	Total de secuencias	109,111,344	109,111,344	218,222,688
	Secuencias marcadas de baja calidad	0	0	0
	Longitud de las secuencias	101	101	50-192
	% GC	39	40	40
SII-2D	Total de secuencias	95,026,937	95,026,937	190,053,874
	Secuencias marcadas de baja calidad	0	0	0
	Longitud de las secuencias	101	101	50-192
	% GC	39	40	40
SII-3D	Total de secuencias	9,305,048	9,305,048	186,100,966
	Secuencias marcadas de baja calidad	0	0	0
	Longitud de las secuencias	101	101	50-192
	% GC	39	40	40
SII-4D	Total de secuencias	82,467,870	82,467,870	176,159,284
	Secuencias marcadas de baja calidad	0	0	0
	Longitud de las secuencias	101	101	50-192
	% GC	39	40	40
SII-5M	Total de secuencias	124,232,754	124,232,754	164,935,740
	Secuencias marcadas de baja calidad	0	0	0
	Longitud de las secuencias	101	101	50-192
	% GC	39	40	40
CTRL-1	Total de secuencias	112,738,336	112,738,336	225,476,672
	Secuencias marcadas de baja calidad	0	0	0

	Longitud de las secuencias	101	101	50-192
	% GC	40	40	40
CTRL-2	Total de secuencias	90,408,276	90,408,276	180,816,558
	Secuencias marcadas de baja calidad	0	0	0
	Longitud de las secuencias	101	101	50-192
	% GC	40	40	40
CTRL-3	Total de secuencias	113,351,294	113,351,294	226,706,588
	Secuencias marcadas de baja calidad	0	0	0
	Longitud de las secuencias	101	101	50-192
	% GC	39	40	40
CTRL-4	Total de secuencias	114,507,230	114,507,230	229,014,460
	Secuencias marcadas de baja calidad	0	0	0
	Longitud de las secuencias	101	101	50-192
	% GC	39	40	40
CTRL-5	Total de secuencias	116,676,861	116,676,861	233,353,722
	Longitud de las secuencias	101	101	50-192
	Secuencias marcadas de baja calidad	0	0	0
	% GC	40	40	40



C)

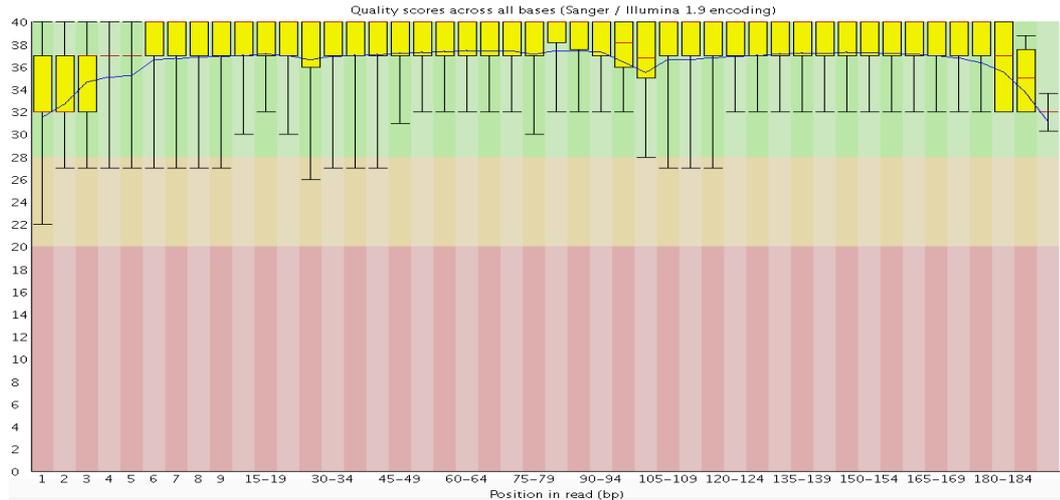


Figura 7. Histograma del puntaje de calidad por base de secuencia de la muestra SII-1E. A) Lecturas Forward, B) Lecturas Reverse, C) Lecturas fusionadas. La línea roja central representa el valor de la mediana, el cuadro amarillo representa el rango intercuartil (25-75%), los bigotes superior e inferior representan el 10% y el 90% en puntos, la línea azul representa la media. El fondo del histograma divide al eje de las abscisas (x) en la posición de las lecturas por pares de bases que poseen buena calidad (color verde), calidad moderada (naranja), y baja calidad (rojo), y el eje de las ordenadas (y) en la puntuación de calidad, que va de cero a 40, siendo ésta la máxima calidad de puntuación.

Los histogramas de la figura 7 muestran la calidad de las bases secuenciadas para la muestra SII-1E antes y después de la fusión de las secuencias, en donde se observa la gama de valores de calidad por cada posición de las bases. La mínima puntuación de calidad para la base es de 20 puntos, por tanto, cuanto mayor sea la puntuación, mejor calidad presentará la secuencia.

La calidad de las bases para las lecturas de la muestra SII-1E, tanto para las secuencias forward, reverse y las fusionadas, se encuentran por arriba del valor mínimo de calidad. Se observa que en el caso de las lecturas forward y reverse (A y B), la longitud de las mismas es hasta de 97 pb, mientras que para el archivo que contiene las lecturas fusionadas (C) aumenta poco menos que el doble, alcanzando una longitud de 184 pares de bases. También se puede apreciar que para los tres casos, los valores de calidad de los extremos, de la posición inicial y final de las lecturas, tienden a disminuir, sin embargo ninguno de ellos es más bajo que el valor de calidad mínimo esperado.

Para cada uno de los archivos de las muestras se realizó el mismo procedimiento, obteniendo un resultado homogéneo en cuanto a la calidad de las secuencias que fue siempre mayor al mínimo, es decir todas las muestras presentaron un valor de calidad mayor a 20.

2. Alineamiento de las secuencias

El alineamiento de las secuencias se realizó con el programa Bowtie, el cual generó archivos que contienen tanto las secuencias no alineadas contra el genoma de referencia como las que sí alinearon. En la tabla 11 se muestra la cantidad de estas secuencias correspondientes a lecturas procariotas y de humano por muestra. En promedio la cantidad de secuencias no alineadas fue de 19, 763,708 lecturas y de las secuencias alineadas contra el genoma humano de 193, 086,669 lecturas, las cuales fueron eliminadas del análisis.

Tabla 11. Número de secuencias alineadas y no alineadas contra el Genoma Humano.

Metagenoma	Secuencias alineadas	Secuencias no alineadas
SII-1E	192,245,614	25,977,074
SII-2D	168,867,819	21,186,055
SII-3D	173,277,836	12,823,130
SII-4D	154,552,324	21,606,960
SII-5M	136,419,918	28,515,822
CTRL-1	205,053,630	20,423,042
CTRL-2	165,325,399	15,491,159
CTRL-3	203,721,784	22,984,804
CTRL-4	209,802,244	19,212,216
CTRL-5	213,260,643	20,093,079
Promedio	193, 086,669	19, 763,708

3. Análisis de la diversidad bacteriana anotada con MG-RAST y Análisis estadístico

Una vez obtenidas las secuencias que no alinearon contra el genoma humano, éstas se cargaron en el servidor MG-RAST. Las secuencias que no alinearon contra el genoma humano se separaron en Arqueas, Bacterias, Eucariotas y Virus. En la tabla 12 se muestran los porcentajes de las secuencias de cada metagenoma para cada dominio, notándose un menor porcentaje de secuencias bacterianas en los pacientes con SII (promedio de 45.06%) en comparación con los sujetos sanos (promedio 90.55%).

Tabla 12. Porcentaje de lecturas que no alinearon contra el genoma humano asignadas con el Servidor MG-RAST.

	%	%	%	%
Metagenoma	Arqueas	Bacterias	Eucariotas	Virus
SII-1E	0.055	31.45	68.46	0.027
SII-2D	0.078	54.99	44.82	0.109
SII-3D	0.019	41.07	58.8	0.095
SII-4D	0.246	53.24	46.40	0.112
SII-5M	0.109	44.58	55.06	0.237
CTRL-1	0.135	68.71	30.59	1.468
CTRL-2	0.106	89.42	10.44	0.031
CTRL-3	0.118	99.47	0.394	0.019
CTRL-4	0.221	96.02	3.632	0.117
CTRL-5	0.117	99.16	0.594	0.026
Promedio	0.120	67.81	31.92	0.224

Una vez elegidas las secuencias bacterianas, se llevó a cabo un análisis entre las diferencias estadísticamente significativas de las abundancias de cada población, sujetos sanos y pacientes con SII, usando el paquete DESeq2 v1.14.1, basado en una distribución binomial negativa, sin embargo el programa no encontró diferencia significativa alguna. Es por ello que se usó la prueba de Mann-Whitney, empleando el programa SPSS v9.0, la cual es una prueba no paramétrica empleada para comparar si dos muestras aleatorias e independientes proceden de una misma población.

En las próximas tablas se muestran las frecuencias relativas obtenidas desde el nivel de filo hasta la especie, comparando las frecuencias relativas entre los pacientes con SII y los sujetos sanos. En las tablas se incluye el valor de p; cuando este valor es igual o menor que 0.05, indica que entre los dos grupos hay diferencia estadísticamente significativa; si el valor de p es mayor que 0.05, entonces no existe diferencia entre las frecuencias de ambos grupos.

El análisis taxonómico de la microbiota del colon descendente a nivel de filo, mostró que los más representativos fueron: *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Fusobacteria*, *Proteobacteria* y *Verrucomicrobia*, presentes en todos los metagenomas. Las *Actinobacterias* y *Proteobacterias* se encontraron con mayor frecuencia en los

sujetos con SII, comparados con los CTRL; en contraste el filo más representativo en el grupo de los sujetos sanos fue Bacteroidetes (Figura 8).

El valor estadísticamente significativo fue un aumento de los filos *Actinobacteria* y *Proteobacteria*, y una disminución en *Bacteroidetes* para el grupo de los pacientes con SII (Tabla 13).

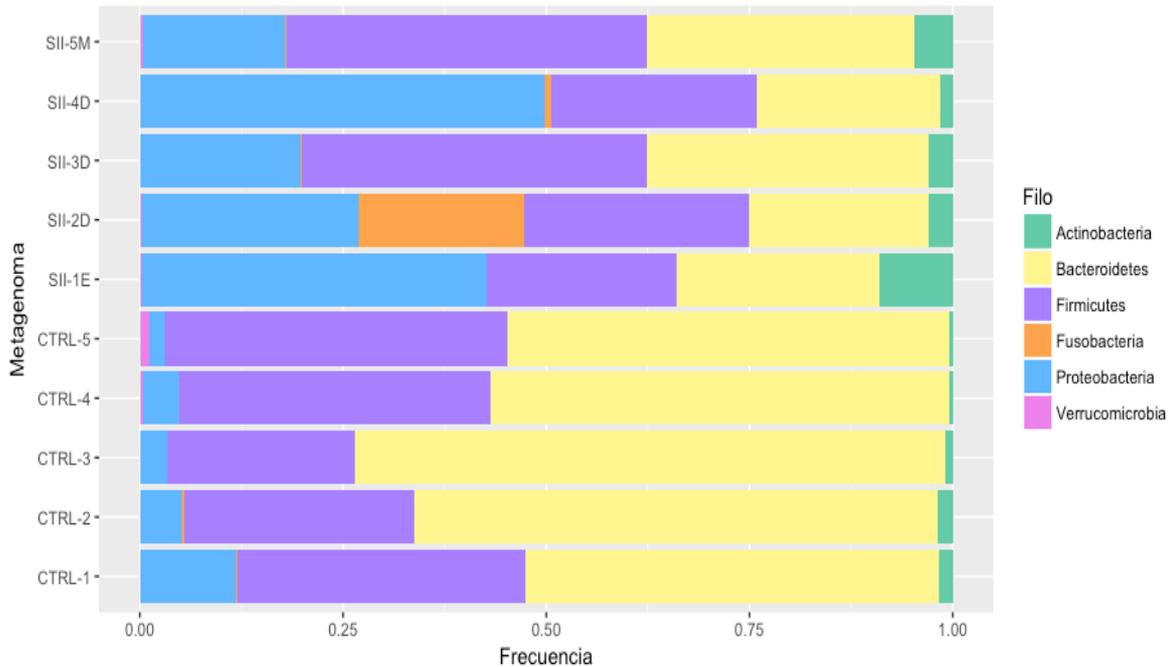


Figura 8. Frecuencia relativa de los filos en los metagenomas analizados. Los filos más frecuentes en sujetos sanos (CTRL) son *Bacteroidetes* y *Firmicutes*, mientras que en los pacientes con SII se observa un aumento en *Proteobacteria*, *Actinobacteria* y *Fusobacteria* para el sujeto SII-2D; y una disminución en *Bacteroidetes* en todos los metagenomas de esta condición.

Tabla 13. Frecuencia relativa a nivel de filo en los metagenomas de los pacientes con SII y los sujetos sanos. Filos con mayor frecuencia relativa (expresado en porcentaje) y valor de *p* estadístico.

Filo	Frecuencia relativa (%)										<i>p</i>
	Sujetos con SII					Sujetos sanos					
	1E	2D*	3D	4D	5M*	1	2	3	4*	5*	
<i>Actinobacteria</i>	9	2.9	2.9	1.8	4.6	1.6	1.5	0.8	0.47	0.49	0.028
<i>Bacteroidetes</i>	24.9	22.1	34.6	64.4	32.9	50.8	22.5	72.6	56.3	54.3	0.009
<i>Firmicutes</i>	23.4	27.5	42.3	28.2	44.3	35.4	25.3	23.0	38.3	42.1	0.917
<i>Fusobacteria</i>	0	20.4	0.16	0.31	0.10	0.13	0.70	0.01	0.04	0.09	0.347
<i>Proteobacteria</i>	42.4	26.6	19.8	5.18	17.4	11.9	22.9	3.33	4.40	0.179	0.009
<i>Verrucomicrobia</i>	0.18	0.27	0	0	0.41	0	0	0	0.39	1.21	0.914

*Sujetos con sobrepeso

A nivel de clase los taxones más abundantes presentes en los pacientes con SII de acuerdo a su frecuencia relativa fueron *Alphaproteobacteria* y *Erysipelotrichia*, con una

tendencia en *Actinobacteria*. Mientras que para los sujetos sanos *Bacteroidia* y *Deltaproteobacteria* fueron los taxones más frecuentes (Tabla 14).

Tabla 14. Frecuencia relativa a nivel de clase en los metagenomas de los pacientes con SII y los sujetos sanos. Clases encontradas con mayor frecuencia relativa (expresado en porcentaje) y valor de *p* estadístico.

Clase	Frecuencia relativa (%)										<i>p</i>
	Sujetos con SII					Sujetos sanos					
	1E	2D	3D	4D	5M	1	2	3	4	5	
<i>Actinobacteria</i>	9.63	3.25	3.81	4.61	5.20	1.78	1.58	0.91	0.49	7.42	0.076
<i>Alphaproteobacteria</i>	0.77	2.16	0.31	1.43	1.32	0.41	0.10	0	0.13	0.49	0.028
<i>Bacilli</i>	4.81	16.1	5.36	19.7	9.85	5.43	3.12	0.25	2.13	23.3	0.251
<i>Bacteroidia</i>	24.1	17.3	22.3	17.1	41.8	51.8	22.7	74.2	58.3	25.3	0.047
<i>Betaproteobacteria</i>	1.92	1.82	0.61	2.86	2.54	1.17	2.64	0.32	0.40	3.39	0.602
<i>Clostridia</i>	15.0	9.81	35.6	43.5	13.8	26.9	20.0	20.6	33.1	4.04	0.917
<i>Deltaproteobacteria</i>	0	0.19	0	0.31	0.11	0.34	0.12	0.47	1.21	0.37	0.028
<i>Epsilonproteobacteria</i>	0	2.21	0.10	0.79	2.99	0.20	0.05	0	0	0.58	0.209
<i>Erysipelotrichia</i>	2.11	1.33	2.37	2.22	1.66	1.30	0.35	0.38	0.23	0.87	0.009
<i>Flavobacteria</i>	0.57	3.25	0	0.15	0.33	0.13	0.05	0	0	0.56	0.251
<i>Fusobacteria</i>	0	21.6	0.20	0.79	8.30	0.13	0.72	0.01	0.04	1.03	0.347
<i>Gammaproteobacteria</i>	40.4	20.2	24.1	6.04	10.8	10.1	47.6	2.47	2.74	32.1	0.602
<i>Negativicutes</i>	0.38	0.24	5.05	0.31	0.44	0.06	0.75	0.31	0.63	0.05	0.465
<i>Verrucomicrobiae</i>	0.19	0.24	0	0	0.66	0	0	0	0.41	0.32	0.914

Epsilonproteobacteria, aunque no fue significativo, se observa un incremento en el sujeto con SII mixto (SII-5M), así como en un sujeto con predominio de diarrea (SII-2D).

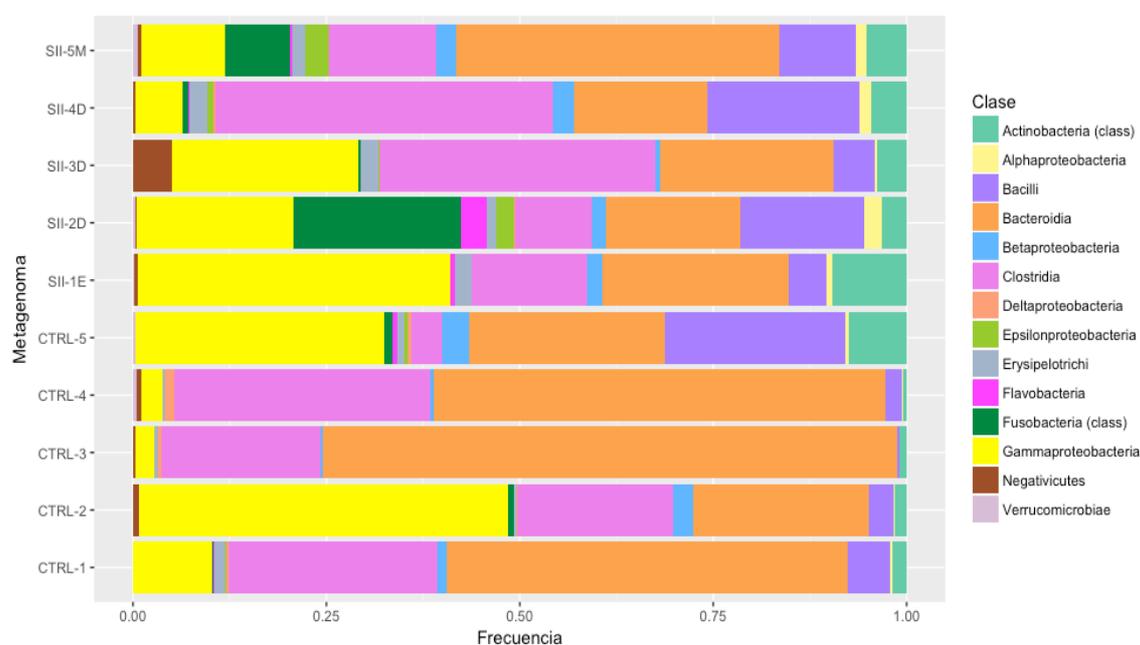


Figura 9. Frecuencia relativa de las clases en los metagenomas analizados. Las clases más frecuentes en sujetos sanos (CTRL) son *Bacteroidia* y *Clostridia*, y en pacientes con SII se observa un aumento en *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, y una disminución en *Bacteroidetes*.

La figura 9 presenta de manera gráfica las clases más frecuentes para ambas condiciones. Se puede observar que en SII las clases que aumentan su frecuencia en comparación de los sujetos sanos son: *Actinobacteria*, *Alphaproteobacteria*, *Bacilli*, *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria* y *Erysipelotrichia*; mientras que, la clase que presenta una frecuencia disminuida fue *Bacteroidia*.

A nivel de orden, los más significativos estadísticamente fueron *Actinomycetales* y *Erysipelotrichales*, en el grupo de los pacientes con SII, mientras que para el grupo de los sujetos sanos fueron: *Bacteroidales* y *Desulfovibriales* (Tabla 15).

Tabla 15. Frecuencia relativa a nivel de orden en los metagenomas de los pacientes con SII y los sujetos sanos. Órdenes con mayor frecuencia relativa (expresado en porcentaje) y valor de *p* estadístico.

Orden	Frecuencia relativa (%)										<i>p</i>
	Sujetos con SII					Sujetos sanos					
	1E	2D	3D	4D	5M	1	2	3	4	5	
<i>Actinomycetales</i>	9.83	2.87	2.16	4.79	6.28	1.52	2.38	0.02	0.29	1.32	0.016
<i>Bacillales</i>	1.25	0.58	0.08	0.49	0.60	0.48	0.21	0.04	0.25	1.46	0.347
<i>Bacteroidales</i>	26.1	18.77	36.0	17.76	25	52.2	39.3	74.4	58.5	37.5	0.009
<i>Bifidobacteroidales</i>	0.20	0	0.60	0	0.30	0.13	0.13	0.50	0.003	7.48	0.600
<i>Burkholderiales</i>	2.09	1.86	0.34	2.79	1.94	1.11	4.30	0.24	0.39	5.81	0.917
<i>Campylobacteriales</i>	0	2.23	0.08	0.82	6.43	0.20	0.08	0	0	0.48	0.295
<i>Clostridiales</i>	16.1	10.53	29.6	45.1	23.3	27.1	34.4	20.6	33.2	14.8	0.754
<i>Coriobacteriales</i>	0.31	0.31	0.37	0	0.25	0.06	0.04	0.34	0.17	0.19	0.465
<i>Desulfovibriales</i>	0	0.21	0	0.32	0.15	0.34	0.17	0.47	1.21	4.79	0.028
<i>Enterobacteriales</i>	20.7	17.87	19.2	1.81	11.3	9.56	8.03	2.23	2.36	5.44	0.117
<i>Erysipelotrichales</i>	2.30	1.43	1.98	2.30	2.54	1.31	0.60	0.38	0.23	1.30	0.009
<i>Fusobacteriales</i>	0	23.40	0.17	0.82	1.04	0.14	1.25	0.01	0.04	0.66	0.465
<i>Lactobacillales</i>	3.34	16.22	4.06	18.25	4.19	4.85	4.99	0.19	1.80	10.4	0.465
<i>Pasteurellales</i>	0	0.32	0.51	2.63	3.44	0	2.04	0.11	0.23	0.66	0.402
<i>Pseudomonadales</i>	16.73	1.75	0.17	1.15	11.3	0.62	0.39	0.04	0.08	1.69	0.076
<i>Rizhobiales</i>	0.15	0.49	0.15	0.12	0	0	0.02	0	0.04	0.01	0.251
<i>Rhodobacteriales</i>	0	0.36	0.07	0.12	0.16	0.12	0.04	0	0	0	0.251
<i>Selenomonadales</i>	0.31	0.22	3.67	0.12	0	0.06	0.69	0.28	0.55	0.11	0.602
<i>Verrocomicrobiales</i>	0.20	0.26	0	0	1.19	0	0	0	0.41	0.46	0.914

Se observa que *Campylobacteriales* se encuentra con mayor frecuencia en dos sujetos con predominio de diarrea (SII-2D y SII-4D) y en el sujeto con SII mixto (SII-5M). Por otra parte el orden *Enterobacteriales* también mostró un aumento, aunque no significativo, en el grupo de los pacientes con SII. En el caso de *Lactobacillales*, aunque tampoco presenta una significancia estadística, se observa que éste aumentó para dos sujetos con predominio de diarrea (SII-2D y SII-4D). Y finalmente *Pseudomonadales* también presentó un aumento comparado con los sujetos sanos, presente en el metagenoma del paciente con predominio de estreñimiento (SII-1E) y el paciente con SII mixto (SII-5M), posiblemente relacionados con la sintomatología.

Los taxones más abundantes presentes en los pacientes con SII de acuerdo a su frecuencia relativa fueron *Actinomycetales*, *Campylobacteriales*, *Enterobacteriales*,

Erysipelotrichales, *Lactobacillales* y *Pseudomonadales*. Por otra parte en los sujetos sanos los taxones más frecuentes fueron: *Bacteroidales* y *Desulfovibriales* (Figura 10).

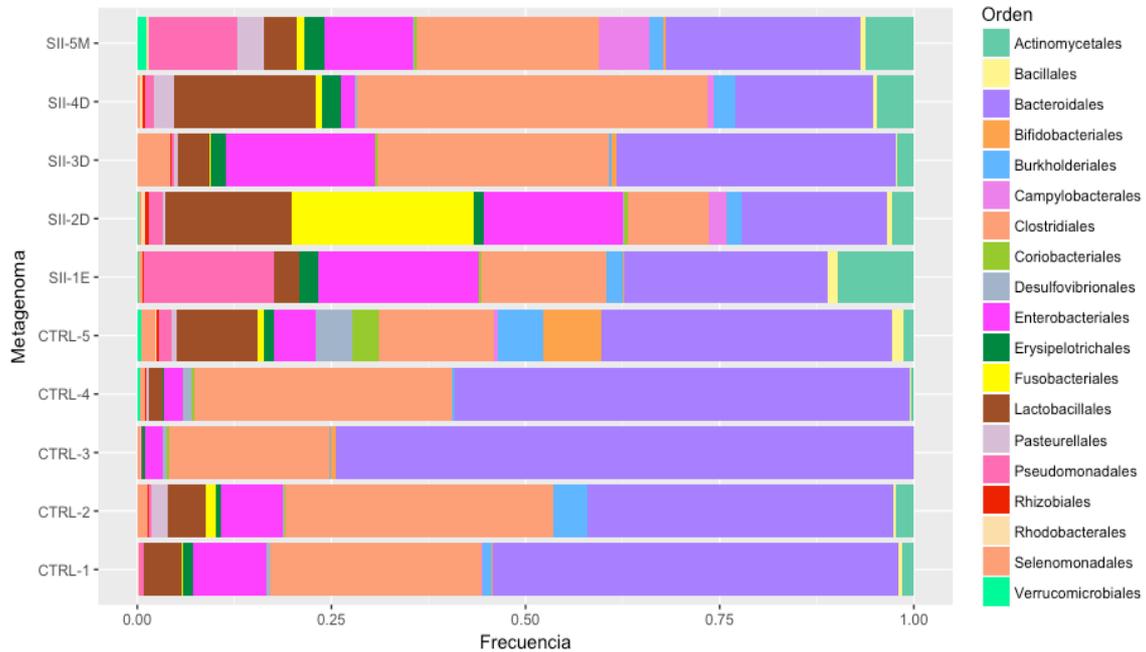


Figura 10. Frecuencia relativa de los órdenes en los metagenomas analizados. Los órdenes más frecuentes en sujetos sanos (CTRL) son *Bacteroidetes*, *Clostridiales* y *Burkholderiales*; mientras que en pacientes con SII se observa un aumento en *Actinomycetales*, *Bacillales*, *Enterobacteriales*, *Erysipelotrichales*, *Lactobacillales* y *Pseudomonadales*, y una disminución de *Bacteroidales*.

Las 28 familias más representativas en ambos grupos se presentan en la figura 11, siendo la familia *Bacteroidaceae* la que se encuentra presente en todos los metagenomas de los sujetos sanos, aunque con menor frecuencia relativa en los pacientes con SII. De manera interesante la familia *Enterococcaceae* se encuentra con mayor frecuencia en el grupo de los pacientes con SII en comparación con los sujetos sanos. Por otra parte, la familia *Pseudomonadaceae* presentó una mayor frecuencia en el metagenoma SII-1E y la familia *Fusobacteriaceae* fue la de mayor frecuencia en el metagenoma SII-2D. Adicionalmente la familia *Erysipelotrichaceae* presentó un incremento significativo. Por otra parte, *Bacteroidaceae*, *Desulfovibrionaceae* y una tendencia en *Ruminococcaceae* se encontraron disminuidas en esta población.

Las familias que tuvieron un valor de *p* estadístico en el grupo de los pacientes con SII fueron: *Enterococcaceae* y *Erysipelotrichaceae*, mientras que para el grupo de los sujetos sanos fueron: *Bacteroidaceae* y *Desulfovibrionaceae* (Tabla 16).

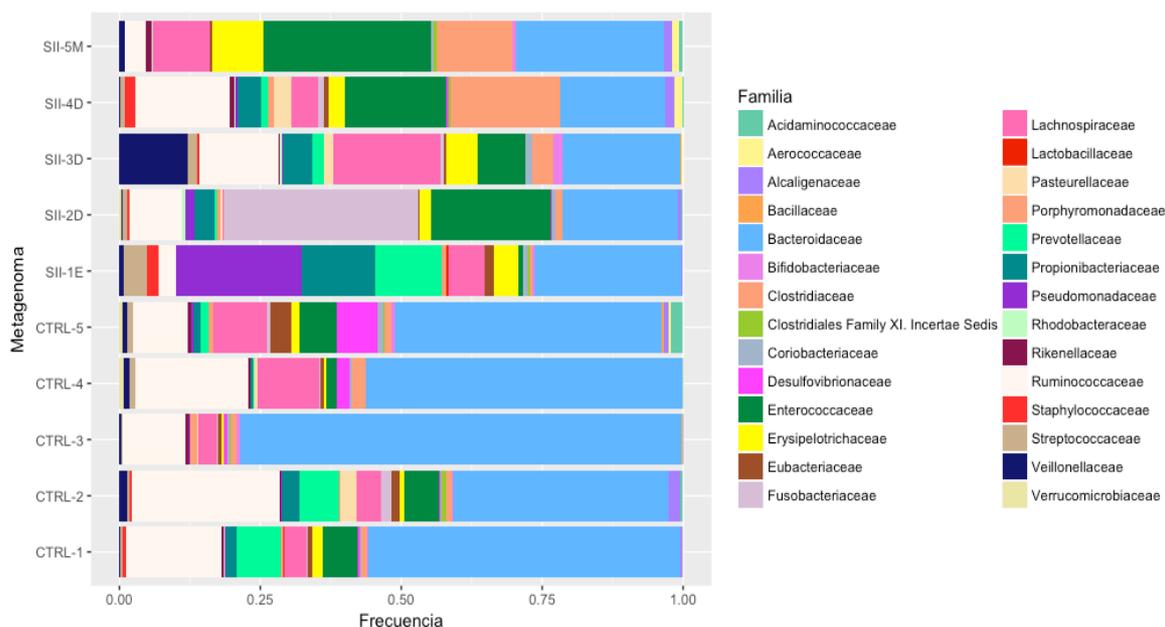


Figura 11. Frecuencia relativa de las familias presentes en los metagenomas analizados. Las familias más frecuentes en sujetos sanos (CTRL) son Bacteroidetes y Ruminococcaceae; para los pacientes con SII se observa un aumento en *Enterococcaceae*, *Erysipelotrichaceae*, *Lachnospiraceae* y *Clostridiaceae*.

Tabla 16. Frecuencia relativa a nivel de familia en los metagenomas de los pacientes con SII y los sujetos sanos. Familias con mayor frecuencia relativa (expresado en porcentaje) y valor de *p* estadístico.

Familia	Frecuencia relativa (%)										
	Sujetos con SII					Sujetos sanos					<i>p</i>
	1E	2D	3D	4D	5M	1	2	3	4	5	
<i>Acidaminococcaceae</i>	0	0.23	0.20	0.62	0	0.50	0.50	0.05	0.04	2.14	0.751
<i>Aerococcaceae</i>	0	0	0.24	1.40	1.25	0.09	0.06	0.02	0.01	0.50	0.753
<i>Alcaligenaceae</i>	0.40	0.62	0	0.16	0.15	0.49	2.07	0.10	0	0.75	0.917
<i>Bacillaceae</i>	0	0.07	0.24	0	0	0	0	0.01	0.05	0.50	0.738
<i>Bacteroidaceae</i>	25.9	20.5	20.8	18.4	26.1	55.3	38.1	78.4	56.2	47.1	0.009
<i>Bifidobacteriaceae</i>	0.40	0	1.72	0	0.62	0.19	0.18	0.64	0	0.70	0.753
<i>Clostridiaceae</i>	0.40	1.17	3.6	19.4	13.5	0.99	1.01	1.02	2.47	1.23	0.251
<i>Clostridiales Familia XI</i>	0.40	0	0	0.40	0.62	0	0.80	0.01	0.02	0.06	0.916
<i>Coriobacteriaceae</i>	0.80	0.54	1.22	0	0.31	0.09	0.12	0.47	0.35	1.17	0.602
<i>Desulfovibrionaceae</i>	0	0.31	0	0.40	0	0.39	0.25	0.60	2.17	7.09	0.045
<i>Enterococcaceae</i>	0.80	21.2	8.35	18.0	29.8	6.25	6.23	0	1.89	6.58	0.076
<i>Erysipelotrichaceae</i>	4.45	2.11	5.65	2.81	9.11	1.88	0.88	0.49	0.42	1.61	0.009
<i>Eubacteriaceae</i>	1.61	0.23	0.49	0.80	0.31	0.79	1.32	0.64	0.70	3.62	0.251
<i>Fusobacteriaceae</i>	0	34.4	0.49	1.00	0	0.19	1.87	0	0	0.57	0.917
<i>Lachnospiraceae</i>	6.47	0.15	19.16	4.81	10.0	3.96	4.41	3.38	11.03	9.54	0.602
<i>Lactobacillaceae</i>	0.40	0	0	0	0	0.19	0	0	0.06	0.11	0.518
<i>Pasteurellaceae</i>	0	0.46	1.47	3.21	0	0	2.96	0.13	0.43	0	0.690
<i>Porphyromonadaceae</i>	0.80	0.54	0	1.00	0	0.39	0.06	1.23	0.12	0.70	0.753
<i>Prevotellaceae</i>	11.74	0.39	2.21	1.20	0	7.93	7.12	0.15	0.27	1.43	0.917
<i>Propionibacteriaceae</i>	12.95	3.51	5.15	4.01	0	1.78	3.02	0.01	0.28	1.25	0.117
<i>Pseudomonadaceae</i>	22.26	1.64	0.24	0.40	0	0.29	0.18	0.05	0.10	0.39	0.251
<i>Rhodobacteraceae</i>	0	0.62	0.24	0.40	0.31	0.19	0.12	0	0.01	0	0.094
<i>Rikenellaceae</i>	0	0	0.24	0.80	0.94	0.29	0.18	0.77	0.32	0.68	0.753
<i>Ruminococcaceae</i>	3.23	9.22	14.0	16.6	3.77	16.9	26.2	11.1	19.9	9.6	0.076

<i>Staphylococcaceae</i>	2.0	0.54	0.49	1.80	0	0.69	0.25	0	0.05	0	0.209
<i>Streptococcaceae</i>	4.04	0.78	0.17	0.80	0	0.39	0.50	0.16	1.09	1.01	0.465
<i>Veillonellaceae</i>	0.80	0.15	12.0	0.20	0.94	0.09	1.38	0.29	0.95	0.95	0.754
<i>Verrucomicrobiaceae</i>	0	0.39	0	0	0	0	0	0	0.76	0.50	0.310

La familia *Propionibacteriaceae* presentó un incremento, no significativo, en los sujetos con SII con predominio de diarrea (SII-2D, SII-3D y SII-4D) y en el metagenoma del sujeto con predominio de estreñimiento (SII-1E), en contraste, no se encontró presente en el metagenoma del sujeto con SII mixto (SII-5M). Por otra parte *Pseudomonadaceae* mostró un aumento en el metagenoma del sujeto con predominio de estreñimiento (SII-1E), en comparación con los sujetos sanos, e incluso con los sujetos de la población con SII. Y aunque tampoco es un cambio significativo, la familia *Ruminococcaceae* presenta un aumento en el grupo de los sujetos sanos.

En la figura 12 se observa la gráfica de frecuencia relativa en la que se ven a los 27 géneros más frecuentes, en donde se observa que en los metagenomas del grupo de los pacientes con SII el género *Bacteroides* está disminuido en comparación con el de los sujetos sanos. En contraste el género *Enterococcus* aumentó su frecuencia relativa en los pacientes con SII, a excepción del sujeto con predominio de estreñimiento (SII-1E), mientras que los metagenomas de los sujetos sanos presentaron una menor frecuencia de este género. El género *Lactobacillus* también presentó una mayor frecuencia en el grupo de los pacientes con SII comparado con el grupo de sujetos sanos; en tanto que *Pseudomonas* y *Fusobacteria* se encontraron con mayor frecuencia en los metagenomas SII-1E y SII-2D, en comparación con los sujetos sanos.

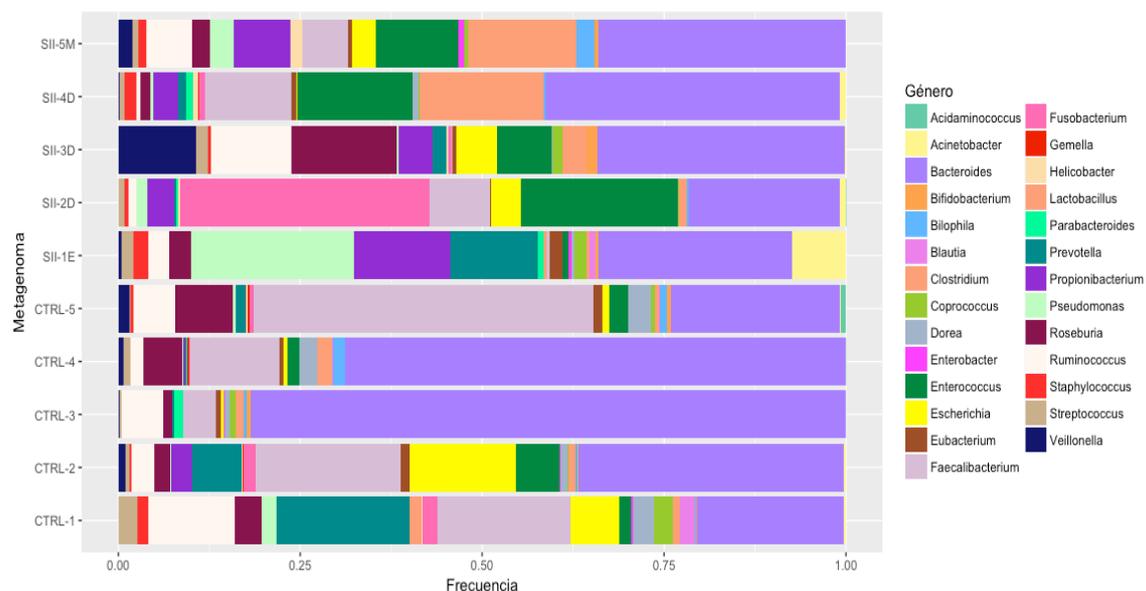


Figura 12. Frecuencia relativa de los géneros presentes en los metagenomas analizados. Los géneros más frecuentes en sujetos sanos (CTRL) fueron *Bacteroides*, *Faecalibacterium*, *Ruminococcus* y en menor medida *Prevotella*; para los pacientes con SII se observa un aumento en *Enterococcus*, *Bifidobacterium* y *Acinetobacter* en la muestra SII-1

Los valores de p estadísticamente significativos para el grupo de los pacientes con SII a nivel de género fueron: *Propionibacterium* y *Staphylococcus*, mientras que para el grupo de los sujetos sanos fueron: *Dorea*, *Faecalibacterium* y *Gemella* (Tabla 17).

Tabla 17. Frecuencia relativa a nivel de género en los metagenomas de los pacientes con SII y los sujetos sanos. Géneros con mayor frecuencia relativa (expresado en porcentaje) y valor de p estadístico.

Género	Frecuencia relativa (%)										p
	Sujetos con SII					Sujetos sanos					
	1E	2D	3D	4D	5M	1	2	3	4	5	
<i>Acidaminococcus</i>	0	0.07	0	0	0	0	0	0.01	0.03	0.69	0.290
<i>Acinetobacter</i>	0.74	0.71	0.21	0.88	0	0.28	0.30	0	0.03	0.09	0.251
<i>Bacteroides</i>	26.5	20.7	33.9	40.3	34.0	20.1	36.4	81.7	68.8	23.2	0.602
<i>Bifidobacterium</i>	0.41	0	1.53	0	0.54	0.23	0.18	0.60	0	0.57	0.753
<i>Bilophila</i>	0	0.23	0	0.35	2.47	0.04	0.24	0.35	1.58	0.86	0.346
<i>Blautia</i>	0.82	0	0	0	0	2.10	0	0.04	0	0.12	0.147
<i>Clostridium</i>	0.41	1.19	3.28	17.1	14.8	0.98	0.96	1.05	2.06	0.65	0.175
<i>Coprococcus</i>	1.65	0.07	1.31	0.17	0.54	2.52	0.18	0.92	0.03	0.49	0.917
<i>Dorea</i>	0.41	0	0.21	0.70	0	2.89	0.90	0.67	2.49	3.12	0.016
<i>Enterobacter</i>	0.41	0	0	0	0.82	0.23	0.18	0	0	0	0.911
<i>Enterococcus</i>	0.82	21.58	7.43	15.8	11.2	1.68	5.94	0.03	1.58	2.56	0.076
<i>Escherichia</i>	0	4.04	5.68	0.17	3.29	6.67	14.6	0.40	0.50	1.05	0.465
<i>Eubacterium</i>	1.65	0.23	0.43	0.70	0.54	0	1.26	0.66	0.58	1.22	0.754
<i>Faecalibacterium</i>	0.41	8.33	0.21	11.7	6.31	18.3	19.8	4.56	12.3	46.6	0.047
<i>Fusobacterium</i>	0	34.2	0.43	0.88	0	1.96	1.74	0.08	0.06	0.61	0.600
<i>Gemella</i>	0	0	0	0.17	0	0.04	0.06	0	0.28	0.28	0.041
<i>Helicobacter</i>	0	0.23	0.21	0.70	1.64	0.18	0.12	0	0	0.02	0.094
<i>Lactobacillus</i>	0.41	0.07	0	0	0	1.58	0	0	0.05	0.20	0.389
<i>Parabacteroides</i>	13.2	3.57	4.59	3.52	7.69	0	2.88	0.01	0.24	0	0.916
<i>Prevotella</i>	12.0	0.39	1.96	1.05	0	18.3	6.79	0.16	0.23	1.36	0.754
<i>Propionibacterium</i>	13.2	3.57	4.59	3.52	7.69	0	2.88	0.01	0.24	0	0.009
<i>Pseudomonas</i>	22.4	1.50	0.21	0.35	3.29	2.00	0.12	0.05	0.08	0.38	0.117
<i>Roseburia</i>	2.90	0.07	14.4	1.40	2.47	3.64	2.22	1.25	5.30	7.90	0.602
<i>Ruminococcus</i>	2.90	1.03	11.1	0.52	6.31	11.9	3.18	5.73	1.85	5.77	0.465
<i>Staphylococcus</i>	2.07	0.55	0.43	1.58	1.09	1.49	0.24	0	0.04	0.37	0.047
<i>Streptococcus</i>	1.65	0.79	1.53	0.70	0.82	2.61	0.48	0.17	0.91	0.10	0.347
<i>Veillonella</i>	0.41	0.07	10.7	0.17	1.92	0	1.02	0.21	0.69	1.58	0.754

Aunque sin un cambio estadísticamente significativo, el género *Bacteroides* se con mayor frecuencia en los sujetos sanos. En cuanto al género *Clostridium*, éste presentó un aumento en el metagenoma de un paciente con SII con predominio de estreñimiento (SII-4D) y en el metagenoma del paciente con SII mixto (SII-5M), comparados con los sujetos sanos. *Enterococcus* es otro género encontrado con mayor frecuencia en los metagenomas de los pacientes con SII, en los tres pacientes con predominio de estreñimiento (SII-2D, SII-3D y SII-4D) y en el paciente con SII mixto (SII-5M). El género *Pseudomonas* presentó un incremento en los metagenomas de los sujetos SII-1E y SII-5M. Mientras que el género *Staphylococcus* se presentó con mayor frecuencia en los metagenomas SII-1E, SII-4D y SII-5M, comparados con el grupo de los sujetos sanos. En contraste el género *Ruminococcus* se encuentra con mayor frecuencia en el grupo de los sujetos sanos.

A nivel de especie, tanto en la tabla 18 como en la figura 13 se aprecia que los taxones que incrementaron su frecuencia relativa en el grupo de los pacientes con SII comparados con los sujetos sanos.

El grupo de los sujetos sanos presentó una mayor frecuencia de *Bacteroides vulgatus* en al menos dos muestras, CTRL-1 y CTRL-3; además, *Butyrate-producing bacterium SS3/4*, está presente en tres metagenomas (CTRL-2, CTRL-4 y CTRL-5) en mayor frecuencia que los pacientes con SII. Por otra parte *Dorea longicatena*, *Ruminococcus torques*, se encuentran en mayor frecuencia en los metagenomas del grupo de los sujetos sanos. Y aunque *Faecalibacterium prausnitzii* se encuentra en una alta frecuencia para ambos grupos, hay una mayor proporción de esta especie en los sujetos sanos.

Las especies que tuvieron un valor de *p* estadísticamente significativo en el grupo de los pacientes con SII fueron *Propionibacterium acnés* y *Enterococcus faecium*, mientras que para el grupo de los sujetos sanos lo tuvieron las especies: *Clostridiales bacterium 1_7_47FAA*, *Dorea formicigenerans*, *Dorea longicatena*, *Eggerthella lenta* y *Faecalibacterium prausnitzii*.

Cabe mencionar que *Clostridiales bacterium 1_7_47FAA*, *Dorea longicatena* y *Eggerthella lenta*, con una tendencia en *Bacteroides thetaiotaomicron*, no se encuentran presentes en los metagenomas del grupo de los pacientes con SII.

Tabla 18. Frecuencia relativa a nivel de especie en los metagenomas de los pacientes con SII y los sujetos sanos. Especies con mayor frecuencia relativa (expresado en porcentaje) y valor de *p* estadístico.

Especie	Frecuencia relativa %										
	Sujetos con SII					Sujetos sanos					<i>p</i>
	1E	2D	3D	D4	5M	1	2	3	4	5	
<i>Bacteroides caccae</i>	3.07	0	0.60	3.17	2.73	0	0.52	2.80	0	2.21	0.245
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	0	0	0	0.52	0	0	0.26	0.11	0.06	0.13	0.220
<i>Bacteroides vulgatus</i>	0	0.54	3.61	8.46	1.36	7.2	0.65	8.50	0.73	0.32	0.754
<i>Bacteroides stercoris</i>	0	1.90	1.20	4.76	0	1.73	0.13	3.11	2.36	0.06	0.600
<i>Bilophila wadsworthia</i>	0	0.81	0	1.05	0	1.15	0.52	2.36	5.86	0	0.131
<i>Burkholderiales bacterium 1_1_47</i>	1.53	0	1.80	0	1.36	2.61	0	0.58	2.02	0.26	0.597
<i>Butyrate-producing bacterium SS3/4</i>	0	0	0.60	1.05	1.37	0	1.43	0	5.07	2.66	0.332
<i>Clostridiales bacterium 1_7_47FAA</i>	0	0	0	0	0	0.57	0	0.23	0.79	1.17	0.019
<i>Clostridium bolteae</i>	0	0.81	0	0.52	0	0	0.26	1.01	0.85	0.13	0.281
<i>Clostridium nexile</i>	0	0	2.40	0.52	5.47	0.86	0	0.59	0.48	0	0.590
<i>Coprococcus comes</i>	6.15	0	0	0.52	0	0.28	0.39	5.63	0.12	5.07	0.341
<i>Dorea formicigenerans</i>	1.54	0	0.60	2.11	0	5.79	1.69	2.95	6.47	7.08	0.016
<i>Dorea longicatena</i>	0	0	0	0	0	2.31	0.13	1.40	2.44	10.8	0.005
<i>Eggerthella lenta</i>	0	0	0	0	0	0	0.13	0.22	0.23	0.06	0.019
<i>Enterococcus</i>	0	47.1	17.4	27.5	4.11	10.7	8.06	0.001	3.86	4.48	0.251

<i>faecalis</i>												
<i>Enterococcus faecium</i>	0	0	0.11	0.35	1.04	0	0	0	0	0	0.054	
<i>Escherichia coli</i>	0	9.53	11.4	0	0	3.47	20.6	1.70	1.14	2.92	0.341	
<i>Eubacterium bifforme</i>	6.15	0	0	0.52	5.47	3.18	0	0	0.23	1.50	0.590	
<i>Eubacterium rectale</i>	6.15	0	0.60	1.05	4.11	0	1.17	3.83	1.35	2.92	1.000	
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	1.53	23.1	0.60	24.8	36.9	33.0	42.9	30.55	45.69	12.2	0.047	
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	0	0.54	1.81	3.70	2.73	0	1.69	0.33	0.27	1.49	0.209	
<i>Lachnospiraceae bacterium 8_1_57FAA</i>	1.53	0	0	0.52	1.36	0	0.65	0.33	0.18	0.45	0.751	
<i>Parvimonas micra</i>	1.53	0	0	1.05	0	0	1.69	0.07	0.08	0.45	0.518	
<i>Prevotella copri</i>	1.23	0.81	5.42	0	0	9.56	0.39	0.23	0.08	1.56	0.917	
<i>Propionibacterium acnés</i>	49.2	12.2	12.6	10.0	0	4.92	6.11	0.11	0.87	4.81	0.009	
<i>Roseburia inulinivorans</i>	7.69	0	31.3	2.64	0	0.28	3.90	6.66	16.72	5.72	0.600	
<i>Ruminococcus gnavus</i>	0	0.81	7.83	0.52	0	0	0	0.48	0.75	0	0.316	
<i>Ruminococcus torques</i>	0.15	1.11	0	1.05	0	10.7	2.34	24.62	0.002	4.74	0.047	
<i>Suttrella wadsworthensis</i>	0	0.54	0	3.70	0	1.44	4.29	0.75	0.02	4.74	0.072	

Bacteroides thetaiotaomicron no se encontró presente en cuatro de los cinco metagenomas con SII (SII-1E, SII-2D, SII-3D y SII-5M); *Butyrate-producing bacterium SS3/4* presentó menor frecuencia en los pacientes con SII, comparado con los sujetos sanos (CTRL-2, CTRL-4 y CTRL-5). De manera interesante *Enterococcus faecalis* presentó una mayor frecuencia en los pacientes con predominio de diarrea comparados con los sujetos sanos. *Eubacterium bifforme* mostró un aumento en los metagenomas de los pacientes con predominio de estreñimiento (SII-1E) y mixto (SII-5M). Por otra parte, las especies *Roseburia inulinivorans* y *Suttrella wadsworthensis* presentaron una mayor frecuencia en el grupo de los sujetos sanos.

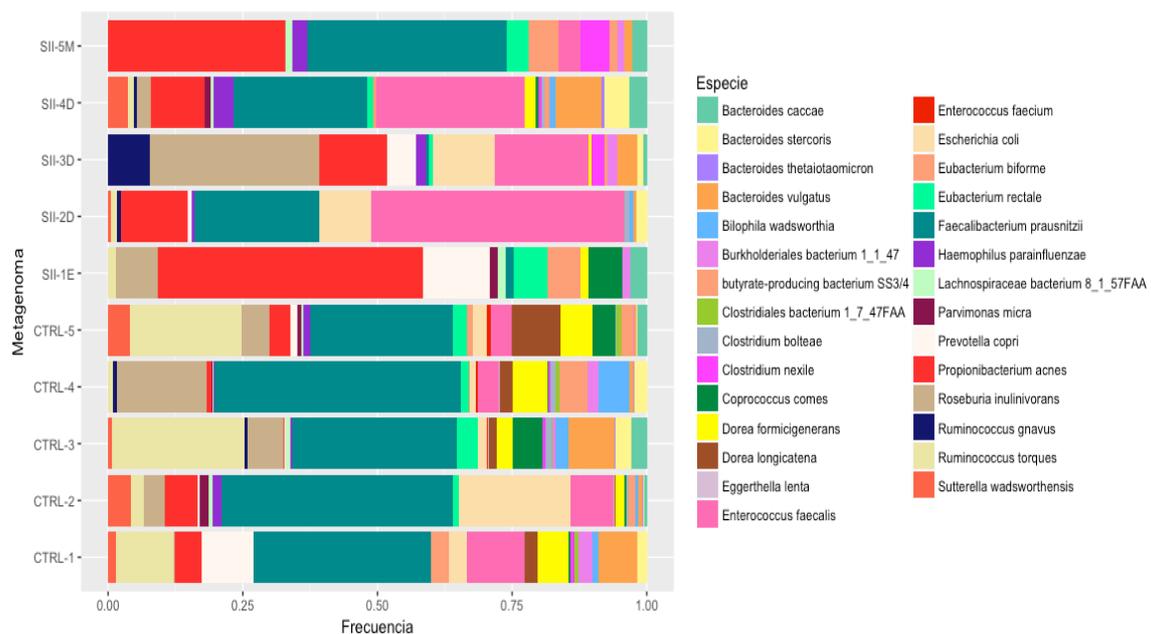


Figura 13. Gráfica de frecuencia relativa de las especies presentes en los metagenomas analizados. Las especies que tuvieron un aumento de su frecuencia en los pacientes con SII fueron: *Propionibacterium acnés*, *Enterococcus faecalis* y *Eubacterium bifforme*.

DISCUSIÓN

El principal enfoque para estudiar los cambios en la composición de la microbiota intestinal en relación con las enfermedades, se ha basado principalmente en la caracterización filogenética de la microbiota de individuos enfermos en comparación con individuos aparentemente sanos. Alteraciones de la microbiota intestinal están relacionadas como una etiología patológica para el desarrollo del SII, dichos cambios se han estudiado principalmente en muestras de materia fecal por secuenciación del gen 16S RNAr. Estos cambios en la microbiota intestinal pueden contribuir al desarrollo de un estado patológico donde se presente la respuesta inflamatoria de bajo grado (Pimentel M., *et al.*, 2011), un proceso de fermentación alterado, la modificación en la función de la barrera intestinal, alteraciones en la función inmune de la mucosa, un incremento en la permeabilidad y una inadecuada modulación en la función del eje intestino-cerebro en pacientes con SII (Jeroen Aerssens, *et al.*, 2008).

El presente estudio es uno de los primeros en América Latina que describe y analiza la composición bacteriana en las diferentes categorías taxonómicas desde el nivel de filo hasta especie, a partir de biopsias de colon descendente, utilizando secuenciación masiva tipo *shotgun* en cinco sujetos sanos y cinco pacientes con SII, quienes fueron diagnosticados con un subtipo diferente y un grado de severidad distinto: Uno con predominio de estreñimiento (SII-C1), tres con predominio de diarrea (IBS-D2, SII-D3, SII-D4) y uno mixto (SII-M5); mientras que el grado de severidad fue de leve a moderado en estos pacientes.

El conocimiento actual de la diversidad bacteriana asociada con el tracto gastrointestinal humano se basa principalmente en los análisis de las bacterias presentes en las heces, y en pocos casos se han caracterizado muestras de diferentes regiones del intestino, teniendo un conocimiento limitado sobre estas comunidades (Erwin G. Zoetendal, *et al.*, 2002). Por lo que, una contribución importante de este trabajo es que la determinación de la microbiota se llevó a cabo a nivel de tejido (biopsias de colon descendente) y no a partir de material fecal. Debido a que se ha reconocido cada vez más que la composición de la microbiota difiere significativamente en los distintos nichos, se debe determinar la dinámica espacio-temporal de la diversidad microbiana a lo largo de todo el tracto gastrointestinal (Zoetendal *et al.*, 2002), sin olvidar que la microbiota nativa establece interacciones con el microambiente del hospedero, influyendo directamente con la biología del mismo.

Nuestra población de estudio fue pequeña, sin embargo, el rendimiento del DNA obtenido a partir de cada muestra para el proceso de secuenciación fue superior al reportado previamente. La información analizada, obtenida posterior a la secuenciación, permitió determinar las diferencias entre la composición de la microbiota de pacientes con SII y sujetos clínicamente sanos; estas diferencias se presentaron a todos los niveles de la clasificación taxonómica, con resultados muy interesantes a nivel de especie.

Investigaciones previas basadas en la secuenciación del gen 16S RNAr a partir de materia fecal, han reportado de manera general que el intestino de un adulto sano está dominado por dos filos bacterianos, *Firmicutes* y *Bacteroidetes* (Tremaroli y Backhed, 2012), en proporciones más elevadas, comparados con otros filos de menor abundancia que incluyen *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia* y *Fusobacteria*. En relación con nuestro estudio, los resultados obtenidos para los metagenomas del grupo de los sujetos sanos, confirmó que los filos *Bacteroidetes* y *Firmicutes* fueron los más abundantes en comparación con los pacientes con SII. Sin embargo, existen variaciones mayores por debajo de éste nivel taxonómico.

Las diferencias significativas en los pacientes con SII en este estudio se encontraron, a nivel de filo, con un aumento de *Actinobacteria*. Curiosamente, en estudios previos se ha observado una disminución de este filo en el intestino de los pacientes con SII (Rajilić-Stojanović M, *et al.*, 2011) con un estudio que presenta una disminución específica en el subtipo con predominio de diarrea (Krogus-Kurikka L, *et al.*, 2009). En contraste, *Proteobacteria*, que también presentó un incremento en los pacientes con SII, específicamente en el metagenoma del paciente con predominio de estreñimiento, se ha reportado como un filo aumentado (Saulnier DM, *et al.*, 2011) en el SII, en particular el SII con predominio de diarrea (Krogus-Kurikka L, *et al.*, 2009), específicamente de la familia *Enterobacteriaceae* (Carroll IM, *et al.*, 2012), que abarca muchas especies patógenas gram negativas, incluyendo otras bacterias coliformes (Mättö J, *et al.*, 2005), con posibles mecanismos causantes de inflamación asociado al SII.

A nivel de clase se observó que *Epsilonproteobacteria* tuvo una tendencia a incrementar en el paciente con predominio mixto y *Erysipelotrichia* presentó un aumento significativo en los pacientes con predominio de diarrea y de estreñimiento, probablemente jugando un papel en la sintomatología. Con respecto a estos hallazgos, se sabe que *Epsilonproteobacteria*, disminuye significativamente en pacientes con SII (Siew Chien Ng, *et al.*, 2013), en tanto que *Erysipelotrichia* es más abundante en sujetos sanos (Yu Xu, *et al.*, 2017). Estos taxones abundantemente diferenciales para un

subtipo de SII, podrían considerarse como biomarcadores potenciales a nivel de clase, aunque aún se deben conocer sus funciones y cuál es el papel que juegan en el desarrollo o generación de los síntomas.

Las familias más abundantes fueron *Enterococcaceae* y *Erysipelotrichaceae*, en los metagenomas de pacientes con predominio mixto y de diarrea, respectivamente. En contraste con nuestro estudio, la familia *Erysipelotrichaceae*, se ha reportado disminuida en SII con predominio de diarrea, sugiriendo que las especies microbianas que contribuyen a mantener la homeostasis, pueden faltar en pacientes con un síntoma diarreico (Marta Pozuelo, *et al.*, 2015), o en el caso contrario, aumentado su frecuencia como sucede en nuestro estudio.

Otro hallazgo que llamó la atención de nuestros pacientes fue que el género *Bifidobacterium* no tuvo diferencia significativa en cuanto a su frecuencia en SII y sujetos sanos, como ha sido reportado en muchos estudios (Brigidi P, *et al.*, 2001), lo cual sugiere que su papel como estabilizador de la salud intestinal, en nuestro grupo de estudio no tuvo relevancia.

De manera interesante, a nivel de género *Pseudomonas* presentó una tendencia en el incremento en los pacientes con predominio de estreñimiento y mixto. Este género se encuentra conformado por varios miembros de bacterias patógenas; y aunque no se ha llegado a un consenso, en los pacientes se observa una débil tendencia a la reducción de las bacterias beneficiosas del intestino, contrarrestada por un aumento de las especies patógenas y, además por primera vez es observada una tendencia elevada en esta patología. Por otra parte, no se encontró un aumento significativo de *Clostridium*, como se esperaba, mientras que *Roseburia* se mantuvo sin cambios, *Ruminococcus* disminuyó y *Propionibacterium* fue el único género que tuvo un aumento en los pacientes con SII.

A nivel de especie se observa un aumento significativo de *Propionibacterium acnés*. Al respecto se sabe que algunos miembros como *Propionibacterium spp* son productores de ácidos grasos de cadena corta (AGCC), uno de los principales metabolitos de los carbohidratos no digeribles de la dieta, y que en los últimos años se han relacionado con los síntomas provocados por el SII. En estudios experimentales los AGCC desencadenan contracciones motoras inadecuadas y colónicas de gran amplitud, promoviendo la hipersensibilidad visceral (Tana C, umesaki Y, *et al.*, 2010).

En comparación con otros estudios (Saulnier DM, *et al.*, 2011), en nuestro estudio, la especie *Ruminococcus torques* disminuyó su frecuencia significativamente en los pacientes con SII, mientras que *R. gnavus* mantuvo una frecuencia parecida a la de los

sujetos sanos. Se sabe que a diferencia de *R. gnavus* y *R. torques*, otros miembros del Grupo XIVa, del género *Clostridium*, por ejemplo, *Roseburia* spp. (Duncan SH, *et al.*, 2002) producen ácidos grasos de cadena corta beneficiosos, tales como butirato. El butirato es la fuente de energía preferida para las células epiteliales del colon y se sugiere como supresor de la inflamación (Barcenilla A, *et al.*, 2000). Además, el butirato ayuda a mantener la función normal de la barrera intestinal, mediante la regulación del gen de la mucina epitelial del colon *MUC2170* y las proteínas de unión estrecha (Hatayama H, *et al.*, 2007). Aunque los pacientes con SII presentan niveles reducidos (López-Siles M, *et al.*, 2014) de los microorganismos productores de butirato *Eubacterium*, *Faecalibacterium* y *Roseburia* spp., se sabe que inhiben el crecimiento de especies potencialmente patógenas incluyendo *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp., y *E. coli* (Chen, C.C. y Walker, W.A., 2005), los cuales podrían ser potencialmente una causa para la generación de síntomas de SII en algunos pacientes. Además, *Faecalibacterium prausnitzii*, el comensal más abundante de la microbiota intestinal humana en individuos sanos (Miquel S., *et al.*, 2013), se encuentra asociado a la producción de butirato, lo que le proporciona propiedades antiinflamatorias, antitumorales y antibacterianas, alterando la integridad intestinal (Loris R. L, *et al.*, 2013). Cabe mencionar que en nuestro estudio esta especie, se encontró disminuida significativamente en pacientes con SII, excepto en el paciente con SII mixto. Esto podría explicar los síntomas generales causados por la ausencia de bacterias productoras de butirato en nuestra población de estudio.

No obstante, se sabe que por otra parte, el butirato influye en la expresión génica a través de la hiperacetilación de la cromatina por medio de su acción como un inhibidor no competitivo de las histonas deacetilasas en varios tipos de células. Cuyo impacto es suprimir a las citocinas proinflamatorias de células dendríticas responsables del estímulo de los linfocitos T reguladores periféricos, induciendo daño epitelial e inflamación; dependiendo de su concentración, el butirato puede inhibir el crecimiento, pero también puede funcionar como un factor trófico, induciendo la diferenciación de las células humanas en el cultivo de tejidos y previniendo o mejorando las condiciones, como la colitis ulcerosa (Topping DL, *et al.*, 2001). Es por esto, que mantener estables las poblaciones bacterianas productoras de butirato es sumamente importante para la homeostasis intestinal y el desarrollo de enfermedades inflamatorias.

Es importante resaltar que las diferencias encontradas en los resultados de este estudio comparado con estudios previos pueden ser atribuidas principalmente, a la dieta y a los

factores genéticos de cada sujeto, ya que la microbiota intestinal tiene una variabilidad inherente en cada individuo, cambiando ampliamente incluso entre individuos sanos, los criterios de diagnóstico utilizados para incluir a la población de estudio, el tipo de muestra, el tipo de método por el cual se obtuvieron los perfiles microbianos (PCR, ARNr 16S, FISH, secuenciación masiva tipo *shotgun*, etc.) y la heterogeneidad de las herramientas bioinformáticas utilizadas para su análisis (MetaPhlAn, MG-RAST, etc.). La perspectiva del presente estudio genera el interés de conocer las funciones en ambas poblaciones de estudio, ya que como se ha investigado la microbiota se encuentra relacionada de alguna manera con el desarrollo y progresión del SII, por lo que se debe considerar que no solo la composición de la microbiota nos dará el panorama del papel que tiene ésta en la fisiopatología del SII, sino además se deben conocer sus funciones. Por lo tanto, la microbiota puede estar implicada en la fisiopatología del SII a través de mecanismos metabólicos a nivel local o de las interacciones inmunológicas con el huésped, basada en la presencia de cambios en la composición taxonómica y funcional de la microbiota y la descripción de las alteraciones en las interacciones microbiota-huésped (Distritti E., *et al.*, 2016).

El presente estudio tiene algunas limitantes que hay que reconocer. En primer lugar, el tamaño de los grupos es muy pequeño, sin embargo el rendimiento del DNA y la cantidad de lecturas obtenidas a partir de la secuenciación son una fortaleza de nuestro estudio para el análisis del perfil microbiano. Cabe mencionar que aunque dos sujetos de cada grupo (SII y sujetos sanos) presentaron sobrepeso, el cual se encuentra asociado al desarrollo de obesidad, y en estudios recientes se sugiere que la microbiota intestinal está implicada en la etiología de estas alteraciones, no hizo un análisis con base en el peso. Así mismo, aunque se sabe que la dieta es un factor importante en la composición de la microbiota, no se estudió la relación que guarda con la misma.

CONCLUSIONES

1. Se observó una tendencia en el aumento de *Pseudomonadales* en pacientes con SII, género que se encuentra conformado por varios miembros de bacterias patógenas.
2. Incremento significativo en la frecuencia relativa de géneros *Propionibacterium* ($p=0.009$) y *Staphylococcus* ($p=0.047$) y una tendencia *Enterococcus* y la ausencia de diferencias en *Bifidobacterium*, como se ha descrito en otras poblaciones.
3. Hubo una disminución de productoras de butirato como el *F. prausnitzii*, pero otro lado un aumento significativo en *Propionibacterium acnés* en el metagenoma del pacientes con predominio de estreñimiento, y una ausencia de *Enterococcus faecium*, *Dorea longicatena* y *Eggerthella lenta*, en los metagenomas de los pacientes con SII.

BIBLIOGRAFÍA

1. Sperber, Ami D., *et al.* "The global prevalence of IBS in adults remains elusive due to the heterogeneity of studies: a Rome Foundation working team literatura review". *Gut*, pp. 1-8, 2016.
2. Luke K Ursell, *et al.*, "Defining the Human Microbiome", *Nutre Rev.* 2012 Aug; 70(Suppl 1): S38–S44.
3. Turnbaugh, P. J. *et al.* "A core gut microbiome in obese and lean twins". *Nature* 457, pp. 207, 2009.
4. Fredricks, D. N., Fiedler, T. L. & Marrazzo, J. M. "Molecular identification of bacteria associated with bacterial vaginosis". *N. Engl. J. Med.* 353, 1899–1911 (2005).
5. Lazarevic, V., *et al.* "Metagenomic study of the oral microbiota by Illumina high-throughput sequencing", *J Microbiol Methods*, 79(3): pp 266, 2009.
6. Qin J., *et al.*, "A human gut microbial gene catalog established by metagenomic sequencing". *Nature*. 4; 464(7285): 59–65, 2010.
7. Peterson, Jane, *et al.*, "The NIH Human Microbiome Project". *Genome Res.*, 19(12): 2317–2323, 2009.
8. Morgan, Xochitl C., Nicola Segata, Curtis Huttenhower. "Biodiversity and Functional Genomics in the Human Microbiome". *Trends Genet.*, 29(1): 51–58., 2013.
9. Ratner, J. A., *et al.* "A Metagenomic Approach to Characterization of the Vaginal Microbiome Signature in Pregnancy". *PLoS One*. (6):e36466. doi: 10.1371/journal.pone.0036466, 2012.
10. Turnbaugh, Peter J. y Gordon, Jeffrey I. "The core gut microbiome, energy balance and obesity". *J Physiol*, 587(Pt 17): pp. 4155, 2009.
11. Adlerberth I., Wold AE. "Establishment of the gut microbiota in Western infants". *Acta Paediatr.*; 98(2):229-38. doi: 10.1111/j.1651-2227.2008.01060.x., 2009.
12. Ley R.E., *et al.* "Evolution of mammals and their gut microbes". *Science*; 320(5883):1647-51. doi: 10.1126/science.1155725. Epub 2008 May 22.
13. Randall, T.D. y Mebius R.E. "The development and function of mucosal lymphoid tissues: a balancing act with micro-organisms". *Mucosal Immunol.*; 7(3):455-66. doi: 10.1038/mi.2014.11. Epub 2014 Feb 26, 2014.
14. Kamada N., *et al.* "Regulated virulence controls the ability of a pathogen to compete with the gut microbiota". *Science.*; 336(6086):1325-9. doi: 10.1126/science.1222195, 2012.
15. Arumugam M., *et al.* "Enterotypes of the human gut microbiome". *Nature.*; 473(7346):174-80. doi: 10.1038/nature09944, 2011.
16. Lopetuso, Loris R., *et al.* "Commensal Clostridia: leading players in the maintenance of gut homeostasis". *Gut Phatogens*, vol 5, 2013.
17. Zocco, M.A., *et al.* "*Bacteroides thetaiotaomicron* in the gut: Molecular aspects of their interaction". Elsevier, vol. 39, pp. 707-712, 2007.
18. Madigan, Michael T., *et al.* "Brock Biology of Microorganisms". 14° ed., Ed. Benjamin-Cummings Publishing Company, 2015.
19. Atlas, R.M., *et al.* "Microbiology: fundamentals and applications", 1988
20. Ventura, Marco, *et al.* "Genome-scale analyses of health-promoting bacteria: probiogenomics". *Nature Reviews Microbiology*, vol. 7, pp. 61-71, 2009.
21. Roger, L.C., *et al.* "Examination of faecal *Bifidobacterium* populations in breast- and formula-fed infants during the first 18 months of life". *Microbiol Read Engl*, vol. 156, pp. 3329-3341, 2010.

22. Tabbers, M.M., *et al.* "Is *Bifidobacterium breve* effective in the treatment of childhood constipation? Results from a pilot study". *BioMed Central*, vol. 10, pp. 10-19, 2011.
23. Egan, M., *et al.* "Cross-feeding by *Bifidobacterium breve* UCC2003 during co-cultivation with *Bifidobacterium bifidum* PRL2010 in a mucin-based médium". *BMC Microbiol*, vol 14, pp. 282, 2014.
24. Dharmani, P., *et al.* "*Fusobacterium nucleatum* Infection of Colonic Cells Stimulates MUC2 Mucin and Tumor Necrosis Factor Alpha". *Infection and Immunity*, vol 79, pp. 2597–2607, 2011.
25. Derrien, M., *et al.*, "The Mucin Degradar *Akkermansia muciniphila* Is an Abundant Resident of the Human Intestinal Tract". *Applied and Environmental Microbiology*, vol 74, pp. 1646–1648, 2008.
26. Fanaro S., Chierici R., Guerrini P., Vigi V. "Intestinal microflora in early infancy: composition and development". *Acta Paediatr Suppl*, vol. 91, pp. 48-55, 2003.
27. Harmsen H.J., *et al.* "Analysis of intestinal flora development in breast-fed and formula fed infants by using molecular identification and detection methods". *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, vol. 30, pp. 61-67, 2000a.
28. Kleessen B., Bunke H., Tovar K., Noak J., Sawatzki G. "Influence of two infants formulas and human milk on the development of the faecal flora in newborn infants". *Acta Pediatr*, vol. 84, pp. 1347-1356, 1995.
29. Mackie R.I., Sghir A., Gaskins H.R. "Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract". *Am J Clin Nutr.*, vol 69(5), pp.1035S-1045S, 1999.
30. Favier CF, Vaughan EE, de Vos WM, Akkermans ADL. "Molecular monitoring of succession of bacterial communities in human neonates". *Appl Environ Microbiol* vol. 68, pp. 219-226, 2002.
31. Dominguez-Bello, Maria G. , *et al.* "Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns". *PNAS*, vol. 107, no. 26, pp. 11971–11975, 2010.
32. Yatsunenko T., *et al.* "Human gut microbiome viewed across age and geography". *Nature*; vol. 486 (7402), pp. 222-227, 2012.
33. D'Argenio, V. y Salvatore, F. "The role of the gut microbiome in the healthy adult status". *Elsevier, Clinica Chimica Acta*, vol. 451, pp. 97-102, 2015.
34. Noack-Loebel C., Kuster E., Rusch V., Zimmermann K. "Influence of different dietary regiments upon the composition of the human fecal flora". *Prog Food Nutr Sci*, vol. 7, pp.127-131, 1983.
35. Hayashi, H., Sakamoto M., Benno Y. "Fecal microbial diversity in a strict vegetarian as determined by molecular analysis and cultivation". *Microbiol Immunol*, vol. 46, pp. 819-831, 2002a.
36. Calum J. Walsh, *et al.* "Beneficial modulation of the gut microbiota". *Elsevier, FEBS Letters*, pp. 4120-4127, 2014.
37. Hopkins M.J., Sharp R., Macfarlane GT. "Age and disease related changes in intestinal bacterial populations assessed by cell culture, 16S RNA abundance and community cellular fatty acid profiles". *Gut*, vol. 48, pp. 198-205, 2001.
38. Clemente, J.C., *et al.* "The Impact of the Gut Microbiota on Human Health: An Integrative". *View Cell*, vol. 148, pp. 1258-1270, 2012.
39. Chow, J., *et al.* "Host–Bacterial Symbiosis in Health and Disease". *Adv. Immunol*, vol. 107, pp. 243-274, 2010.

40. Hooper L.V., *et al.* "Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine". *Science*, vol. 291, pp. 881-884, 2001.
41. Gibson G.R., *et al.* "Contrasting effects of butyrate on the expression of phenotypic markers of differentiation in neoplastic and non-neoplastic colonic epithelial cells in vitro". *J Gastroenterol Hepatol*, vol. 7, pp.165-172, 1992.
42. Scheppach W., Bartram HP, Richter F. "Role of short-chain fatty acids in the prevention of colorectal cancer". *Eur. J. Cancer*, vol 31^a, pp. 1077-1080, 1995.
43. Rowland I.R. "Toxicology of the colon. Role of the intestinal microflora". En:Gibson G, Macfarlane GT(eds). *Human Colonic Bacteria: Role in Nutrition, Physiology and Pathology*. C.R.C. Press Boca Raton, Florida. pp 155-174, 1995.
44. Parodi P.W. "The role of intestinal bacteria in the causation and prevention of cancer: modulation by diet and probiotics". *Aust J Dairy Technol*, vol. 54, pp.103-121, 1996.
45. Hill, M.J. "Intestinal flora and endogenous vitamin synthesis". *Eur J Cancer Prev*, vol. 6, pp. S43-S45, 1997.
46. Miyazawa E., Iwabuchi A, Yoshida T. "Phytate breakdown and apparent absorption of phosphorous, calcium and magnesium in germ free and conventional rats". *Nutr. Res.*, vol. 16, pp. 603-613, 1996.
47. Macfarlane G.T., *et al.* "Comparison of fermentation reactions in different regions of the human colon". *J. Appl. Bacteriol*, vol. 72, pp. 57-64, 1992.
48. Dethlefsen, Les, *et al.*, "The Pervasive Effects of an Antibiotic on the Human Gut Microbiota, as Revealed by Deep 16S rRNA Sequencing". *Plos Biology*, 2008
49. Jernberg, C., Löfmark, S., Jansson, J.K. "Long-term ecological impacts of antibiotic administration on the human intestinal microbiota". *The ISME Journal*, vol 1, pp.56-66, 2007.
50. Sommer M. O., Dantas G., Church G. M. "Functional characterization of the antibiotic resistance reservoir in the human microflora". *Science* vol. 325, pp. 1128–1131, 2009.
51. Perez-Cobas A. E., Gosalbes M. J., Friedrichs A., Knecht H., Artacho A., Eismann K., *et al.* "Gut microbiota disturbance during antibiotic therapy: a multiomic approach". *Gut* vol. 62, pp. 1591–1601, 2012.
52. Hentges D.J. "Gut flora and disease resistance. In: Fuller R, ed. *Probiotics: the Scientific Basis*". London: Chapman and Hall, pp. 87-110, 1992.
53. Backhed, F., *et al.* "Host-Bacterial Mutualism in the Human Intestine". *Science*, vol. 307, pp. 1915-1920, 2005.
54. Sokol H., Seksik P. "The intestinal microbiota in inflammatory bowel diseases: time to connect with the host". *Curr Opin Gastroenterol*, vol. 26(4), pp. 327-31, 2010.
55. Elson, Charles O. y Con, Yingzi . "Host-microbiota interactions in inflammatory bowel disease". *Gut Microbes*, vol. 3(4), pp. 332–344, 2012.
56. Machiels, K., *et al.* "A decrease of the butyrate-producing species *Roseburia hominis* and *Faecalibacterium prausnitzii* defines dysbiosis in patients with ulcerative colitis". *Gut* doi, vol. 10, pp. 1136, 2013.
57. Hansen R., *et al.* "Microbiota of de-novo pediatric IBD: increased *Faecalibacterium prausnitzii* and reduced bacterial diversity in Crohn's but not in ulcerative colitis". *Am J Gastroenterol.*; 107(12):1913-22. doi: 10.1038/ajg.2012.335, 2012.
58. Elson, Charles O. y Con, Yingzi. "Host-microbiota interactions in inflammatory bowel disease". *Gut Microbes*, vol 1(3), pp. 232-344, 2012.

59. Kathleen, Machiels, *et al.* "A decrease of the butyrate-producing species *Roseburia hominis* and *Faecalibacterium prausnitzii* defines dysbiosis in patients with ulcerative colitis". *Gut*, vol. 63, 2013.
60. Morgan, X. C., *et al.* "Dysfunction of the intestinal microbiome in inflammatory bowel disease and treatment". *Genome Biol.* 13:R79 10.1186/gb-2012-13-9-r79, 2012.
61. Ronald, Ikechi, *et al.* "Irritable Bowel Syndrome: Clinical Manifestations, Dietary Influences, and Management". *MDPI Healthcare*, vol. 5, pp. 2-14, 2017.
62. Ami, D. Sperber, *et al.* "The global prevalence of IBS in adults remains elusive due to the heterogeneity of studies: a Rome Foundation working team literatura review". *Neurogastroenterology*, 2016.
63. Gibson, P.R., *et al.* "Food components and irritable bowel síndrome". *Gastroenterology* vol. 148, pp. 1158–1174 e4, 2015.
64. Saha, L. "Irritable bowel syndrome: Pathogenesis, diagnosis, treatment, and evidence-based medicine". *World J. Gastroenterol*, vol. 20, pp. 6759–6773, 2014.
65. Nobaek, S., *et al.* "Alteration of intestinal microflora is associated with reduction in abdominal bloating and pain in patients with irritable bowel síndrome". *Am J Gastroenterol* vol. 95, pp. 1231–1238, 2000.
66. Pimentel, M., Chow EJ, Lin HC. "Eradication of small intestinal bacterial overgrowth reduces symptoms of irritable bowel síndrome". *Am J Gastroenterol* vol. 95, pp. 3503–3506, 2000.
67. Simren M, Barbara G, Flint HJ, *et al.* "Intestinal microbiota in functional bowel disorders: A Rome foundation report". *Gut* vol. 62, pp. 159–176, 2013.
68. Chen-Shuan, Chung, *et al.* "Differences of microbiota in small bowel and faeces between irritable bowel syndrome patients and healthy subjects". *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, vol. 51, pp. 410-419, 2016.
69. Aldona, Dlugosz, *et al.* "No difference in small bowel microbiota between patients with irritable bowel syndrome and healthy controls". *Scientific Reports*, vol. 5, 2015.
70. Guschin, D.Y., *et al.* "Oligonucleotide microchips as genosensors for determinative and environmental studies in microbiology". *Appl Environ Microbiol* vol. 63, pp. 2397-2402, 1997.
71. Distritti, Eleonora, *et al.* "Gut microbiota role in irritable bowel syndrome: New therapeutic strategies". *World Journal of Gastroenterology*, vol. 22, pp. 2219-2241, 2016.
72. Tringe, S.G. y Hugenholtz, P. "A renaissance for the pioneering 16S rRNA gene". *Elsevier*, vol. 11, pp. 442-446, 2008.
73. Van de Peer, S Chapelle y R De Wachter. "A quantitative map of nucleotide substitution rates in bacterial rRNA". *Nucleic Acids Res.* 24(17): 3381–3391, 1996.
74. Baker GC, Smith JJ. y Cowan DA. "Review and re-analysis of domain-specific 16S primers". *J Microbiol Methods.* 55(3):541-55, 2003.
75. Torsten Thomas, Jack Gilbert y Folker Meyer. "Metagenomics - a guide from sampling to data analysis". *BioMed Central Vol. 2*, pp. , 2012.
76. Thomas J. Sharpton. "An introduction to the analysis of shotgun metagenomic data". *Front Plant Sci.*; 5: 209, 2014.

77. Yozwiak N. L., *et al.* "Virus identification in unknown tropical febrile illness cases using deep sequencing". *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6:e1485 10.1371/journal.pntd.0001485, 2012.
78. Wrighton K. C., *et al.* "Fermentation, hydrogen, and sulfur metabolism in multiple uncultivated bacterial phyla". *Science* 337 1661–1665 10.1126/science.1224041, 2012.
79. Morgan, C. Xochitl y Huttenhower, Curtis. "Chapter 12: Human Microbiome Analysis". *Plos Computacional Biology*, vol 10, 2012.
80. Lederberg, J. y McCray, A. "Ome sweet 'omics - A genealogical treasury of words". *SCIENTIST*, vol. 8, pp. 15, 2001.
81. Fleischmann, RD., *et al.* "Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd". *Science*, vol 289, pp. 496-512, 1995.
82. Collins, Francis S., Morgan Michael, Patrinos Aristides. "The Human Genome Project: Lessons from Large-Scale Biology". *Science*, vol. 300, pp. 286-290, 2003.
83. Bertram, AK, *et al.* "Generation of multimillion-sequence 16S rRNA gene libraries from complex microbial communities by assembling paired-end illumina reads". *Applied and Enviromental Microbiology*, vol. 11, pp. 3846-3852, 2011.
84. Caporaso, J. Gregory, *et al.* "Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms". *The ISME Journal: Multidisciplinary Journal Microbial Ecology*, vol. 6(8), pp. 1621-1624, 2012.
85. Illumina, An Introduction to next-generation sequencing technology. www.illumina.com/technology/next-generation-sequencing.html
86. Schloss P.D. y Handelsman J. "A statistical toolbox for metagenomics: assessing functional diversity in microbial communities". *BMC Bioinformatics* 9:34 10.1186/1471-2105-9-34, 2008.
87. Sharpton T.J., *et al.* "PhyLOTU: a high-throughput procedure quantifies microbial community diversity and resolves novel taxa from metagenomic data". *PLoS Comput. Biol.* 7:e1001061 10.1371/journal.pcbi.1001061, 2011.
88. Kunitz V., *et al.* "A bioinformatician's guide to metagenomics". *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 72 557–578 10.1128/MMBR.00009-08, 2008.
89. Sharpton T. J. "An introduction to the analysis of shotgun metagenomic data". *Frontiers in Plant Science*, vol. , 2014.
90. Luo C., Tsementzi D., Kyrpides N. C., Konstantinidis K. T. "Individual genome assembly from complex community short-read metagenomic datasets". *ISME J.* 6 898–901 10.1038/ismej.2011.147, 2012.
91. Zoetendal, E.G., *et al.* "A microbial world within us". *Molecular Microbiology*, 10.1111/j.1365-2958.2006.05056.x, 2006.
92. QIAamp DNA Mini and Blood mini Handbook, Qiagen ,1° Ed., pp. 32-35, 2016.
93. TruSeq DNA PCR free Library Prep, Reference Guide, Illumina, pp. 10-22, 2015.
94. Andrews S. "FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data", 2010. Available online at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>.
95. Jiajie Zhang, *et al.* "PEAR: A fast and accurate Illumina Paired-end reAd mergeR". *Bioinformatics*, vol. 30(5), pp. 614-620, 2014.
96. Cox, M.P., D.A. Peterson, and P.J. Biggs. "SolexaQA: At-a-glance quality assessment of Illumina second-generation sequencing data". *BMC Bioinformatics*, 11:485, 2010.

97. Langmead B, Trapnell C, Pop M, Salzberg SL. "Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome". *Genome Biol* 10:R25.
98. Andreas Wilke, *et al.* "Manual de MG-RAST para la versión 4". Argonne National Laboratory, University of Chicago, pp. 19-26, 2016.
99. Overbeek, R., Olson, R., Pusch, G. D., Olsen, G J., Davis, J. J., Disz, T., Stevens, R. "The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST)". *Nucleic Acids Research*, vol. 4 (D1), pp. 1–9, 2014.
100. Longstreth GF Thompson, WG Chey WD, *et al.* Functional bowel disorders *Gastroenterology*, 2006; 130:1480-91.
101. Bharadwaj S., Barber M.D., Graff L.A. y Shen B. "Symptomatology of irritable bowel syndrome and inflammatory bowel disease during the menstrual cycle". *Gastroenterology Report*, vol. 3(3), pp. 185-293, 2015.
102. Cho I. y Blser M.J. "The human microbiome: at the interference of health and disease". *Nature Reviews Genetics* , pp 260-270, 2012.
103. Francois-Pierre, J. Martin, *et al.* "Panorganismal Gut-Microbiome-Host metabolic crosstalk". *Journal of Proteome research*, vol. 8, pp. 2090-2105, 2009.
104. Kerckhoffs AP, Ben-Amor K, Samsom M, van der Rest ME, de Vogel J, Knol J, Akkermans LM. "Molecular analysis of faecal and duodenal samples reveals significantly higher prevalence and numbers of *Pseudomonas aeruginosa* in irritable bowel syndrome". *J Med Microbiol.* 2011 Feb; 60(Pt 2):236-45.
105. Kassinen A., *et al.* "The fecal microbiota of irritable bowel syndrome patients differs significantly from that of healthy subjects". *Gastroenterology*, vol. 133, pp. 24-33, 2007.
106. Eckburg, P. B., Lepp, P. W. y Relman, D. A. "Archaea and Their Potential Role in Human Disease". *Infect. Immun.* 71, 591–596, 2003.
107. The Human Microbiome Project Consortium. "Structure, function and diversity of the healthy human microbiome". *Nature*, vol. 486, pp. 207-2014, 2012.
108. Uhlik O, Lewis MC, Strejcek M, Musilova L, Mackova M, Leigh MB *et al* (2013) Stable isotope probing in the metagenomics era: a bridge towards improved bioremediation. *Biotechnol Adv* vol. 31(2), pp. 154–165.
109. Tap J, *et al.* "Towards the human intestinal microbiota phylogenetic core". *Environ Microbiol*, vol. 11(10), pp. 2574-84, 2009.
110. Parkes, G.C., *et al.* "Distinct microbial populations exist in the mucosa-associated microbiota of sub-groups of irritable bowel syndrome". *Neurogastroenterology and Motility*, vol. 2, pp. 31-39, 2012.
111. Noor, S. O., *et al.* "Ulcerative colitis and irritable bowel patients exhibit distinct abnormalities of the gut microbiota". *BMC Gastroenterology*, vol. 10(134), 2010.
112. Morgen CS y Sorensen TI. "Obesity: global trends in the prevalence of overweight and obesity". *Nat Rev Endocrinol*, vol 10, pp. 513–514, 2014.
113. Kallus S.J. y Brandt L.J. "The intestinal microbiota and obesity". *J Clin Gastroenterol*, vol. 46, pp. 16–24, 2012.
114. Koliada A, *et al.* "Association between body mass index and *Firmicutes/Bacteroidetes* ratio in an adult Ukrainian population". *BMC Microbiology*, vol. 17, 2017.
115. Hugon, P., *et al.* "A comprehensive repertoire of prokaryotic species identified in human beings". *Lancet Infect. Dis.*, vol. 15, pp. 1211–1219, 2015.

116. Gomes AM y Malcata FX. “*Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics”. *Trends Food Sci Technol*, vol. 10, pp. 139–157, 1999.
117. Balsari A, et al. “The fecal microbial population in the irritable bowel syndrome”. *Microbiologica*, vol, 5, pp. 185–194, 1982.
118. Kassinen A., et al. “The fecal microbiota of irritable bowel syndrome patients differs significantly from that of healthy subjects”. *Gastroenterology*, vol. 133(1), pp. 24-33, 2007.
119. Kerckhoffs AP, Samsom M, van der Rest ME, et al. “Lower *Bifidobacteria* counts in both duodenal mucosa-associated and fecal microbiota in irritable bowel syndrome patients”. *World J Gastroenterol*, vol. 15, pp. 2887–2892, 2009.
120. Parkes GC., et al. “Distinct microbial populations exist in the mucosa-associated microbiota of sub-groups of irritable bowel syndrome”. *Neurogastroenterol Motil*, vol. 24(1), pp. 31-9, 2012.
121. Carroll IM, Ringel-Kulka T, Siddle JP, Ringel Y. “Alterations in composition and diversity of the intestinal microbiota in patients with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome”. *Neurogastroenterol Motil*, vol. 24(6), pp. 521-30, 2012.
122. Saulnier DM, et al. “Gastrointestinal microbiome signatures of pediatric patients with irritable bowel syndrome”. *Gastroenterology*, vol. 141(5), pp. 1782-91, 2011.
123. Lyra A, et al. “Diarrhoea-predominant irritable bowel syndrome distinguishable by 16S rRNA gene phylotype quantification”. *World J Gastroenterol*, vol. 15, pp. 5936–5945, 2009.
124. Rajilić-Stojanović M, et al. “Global and deep molecular analysis of microbiota signatures in fecal samples from patients with irritable bowel syndrome”. *Gastroenterology*, vol. 141(5), pp.1792-801, 2011.
125. Duncan SH, et al. “*Roseburia intestinalis* sp. nov., a novel saccharolytic, butyrate-producing bacterium from human faeces”. *Evol Microbiol*, vol 52, pp. 1615-20, 2002.
126. Barcenilla A, et al. “Phylogenetic relationships of butyrate-producing bacteria from the human gut”. *Environ Microbiol*, vol. 66(4), pp. 1654-61, 2000.
127. Lopez-Siles M., et al. Mucosa-associated *Faecalibacterium prausnitzii* and *Escherichia coli* co-abundance can distinguish Irritable Bowel Syndrome and Inflammatory Bowel Disease phenotypes. *Med Microbiol*, vol 304(3-4), pp. 464-75, 2014.
128. Chen CC, Walker WA. “Probiotics and prebiotics: role in clinical disease states”. *Adv Pediatr*, vol. 52(), pp. 77-113, 2005.
129. Miquel, S., et al. “*Faecalibacterium prausnitzii* and human intestinal health”. *Microbiolgy*, vol. 16(3), pp. 1-7, 2013.
130. Derrien M, et al. “Mucin-bacterial interactions in the human oral cavity and digestive tract”. *Gut Microbes*, vol. 1(4), pp. 254-268, 2010 Jul.
131. Ponnusamy K., et al. “Microbial community and metabolomic comparison of irritable bowel syndrome faeces”. *J Med Microbiol*, vol. 60(Pt 6), pp. 817-27, 2011.
132. Krogius-Kurikka L. A., et al. “Microbial community analysis reveals high level phylogenetic alterations in the overall gastrointestinal microbiota of diarrhoea-predominant irritable bowel syndrome sufferers”. *BMC Gastroenterol*, vol. 17(9), pp. 95, 2009.

133. Kerckhoffs AP., *et al.* “Lower Bifidobacteria counts in both duodenal mucosa-associated and fecal microbiota in irritable bowel syndrome patients”. *World J Gastroenterol*, vol. 21 15(23), pp. 2887-92, 2009.
134. Saulnier DM, *et al.* “Gastrointestinal microbiome signatures of pediatric patients with irritable bowel syndrome. *Gastroenterology*, vol. 141(5), pp. 1782-91, 2011.
135. Krogius-Kurikka L, *et al.* “Microbial community analysis reveals high level phylogenetic alterations in the overall gastrointestinal microbiota of diarrhoea-predominant irritable bowel syndrome sufferers”. *BMC Gastroenterol*, vol. 17, pp. 95, 2009.
136. Mättö J, *et al.* “Composition and temporal stability of gastrointestinal microbiota in irritable bowel syndrome--a longitudinal study in IBS and control subjects”. *FEMS Immunol Med Microbiol*, vol. 43(2), pp. 213-22, 2005.
137. Malinen E, *et al.* “Analysis of the fecal microbiota of irritable bowel syndrome patients and healthy controls with real-time PCR”. *Am J Gastroenterol*, vol. 100(2), pp. 373-82, 2005.
138. Rinttilä T, Lyra A, Krogius-Kurikka L, Palva A. “Real-time PCR analysis of enteric pathogens from fecal samples of irritable bowel syndrome subjects”. *Gut Pathog*, vol. 26; 3(1):6, 2011.
139. Duncan, S.H., *et al.* “Human colonic microbiota associated with diet, obesity and weight loss”. *Journal of Obesity*, vol. 32, pp. 1720-1724, 2008.
140. Riesenfeld CS, Schloss PD, Handelsman J. “Metagenomics: genomic analysis of microbial communities”. *Annu Rev Genet*, vol. 38, pp. 525-52, 2004.
141. Distrutti, E., *et al.* “Gut microbiota role in irritable bowel syndrome: New therapeutic strategies”. *World Journal of Gastroenterology*, vol. 22(7), pp. 2219-2241, 2016.
142. Xia LC, Cram JA, Chen T, Fuhrman JA, Sun F. “Accurate genome relative abundance estimation based on shotgun metagenomic reads”. *PLoS One*, vol. 6(12):e27992, 2011.
143. Tringe SG, *et al.* “Comparative metagenomics of microbial communities”. *Science*, vol. 308(5721), pp. 554-7, 2005 Apr 22.
144. Oulas, A., *et al.* “Metagenomics: Tools and Insights for Analyzing Next-Generation Sequencing Data Derived from Biodiversity Studies”. *Bioinformatics and Biol Insights*, vol. 9, pp. 75-88, 2015.
145. Torsten Thomas, Jack Gilbert and Folker Meyer. “Metagenomics - a guide from sampling to data analysis”. *Microbial Informatics and Experimentation*, vol. 2(3), DOI: 10.1186/2042-5783-2-3, 2012.

ANEXO I

EXTRACCIÓN DE DNA GENÓMICO TOTAL (QIAamp DNA mini kit)

SOLUCIONES UTILIZADAS

Reactivos y soluciones para electroforesis

- Agarosa (Invitrogen)
- TBE 10X, 1X, 0.5 X
- Gel de agarosa al 1%
- Marcador de peso molecular (Fago Lambda)
- Buffer de carga 50x
- Bromuro de etidio

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

- TAE 10x
 - Tris base 108g
 - Ácido acético glacial 55g
 - EDTA 0.5 M 40 mL.

Se lleva a 1000 mL con agua destilada, si hay precipitaciones debe descartarlas. Se almacena a temperatura Ambiente hasta su uso.

- TAE 1x

Tomar 50 mililitros de TBE 10X y diluirlo en 450mililitros de agua destilada.

- TAE 0.5x

Tomar 250 mililitros de TAE 1X y diluirlo en 250mililitros de agua destilada

ANEXO II

COMANDOS USADOS PARA EL ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS

- CALIDAD DE LAS SECUENCIAS

El programa **FastQC** v0.11.5 (Mac DMG image) se descargó desde la siguiente página:

<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/download.html>

en el apartado de: FastQC A quality control application for high throughput sequence data, versión FastQC v0.11.5 (Mac DMG image).

- FUSIÓN DE LAS LECTURAS

El programa de **PEAR** (versión 0.9.6, Jiajie Zhang, et al., 2014) se descargó del siguiente link:

<http://sco.h-its.org/exelixis/web/software/pear/files/pear-0.9.10-bin-64.tar.gz>

Con las siguientes líneas de comando instalar el programa:

- Descomprimir el archivo:

```
$ tar -xzf pear-0.9.10-bin-64.tar.gz
```

- Ubicarnos en el directorio que contiene al programa:

```
$ cd pear-0.9.10-bin-64
```

- Configuración e instalación del programa:

```
$ ./autogen.sh
```

```
$ ./configure
```

```
$ make
```

- Ejecutar el siguiente comando para cerciorarse de que esté instalado

```
$ pear -h
```

Este es el comando usado para la fusión de las lecturas forward y reverse

```
$ pear -f ../data/SII1CD1.fastq -r ../data/SII1CD2.fastq p-value de 0.0001 --min-overlap 10 --min-assembly-length 50 -o mergeReads_SII-1CD_PEAR.fastq
```

Esta línea crea un solo archivo (SII_1CD concatenated.fq) que contiene todas las lecturas crudas y fusionadas por condición:

```
$ cat mergeReads_SII_1-2_PEAR.fastq.assembled.fastq mergeReads_SII-CD_PEAR.fastq.unassembled.forward.fastq mergeReads_SII_12_PEAR.fastq.unassembled.reverse.fastq > SII_1CD_concatenated.fq
```

- RECORTE DE LECTURAS DE BAJA CALIDAD

El programa de SolexaQA se descargó a partir del archivo fuente, desde la siguiente dirección:

<https://sourceforge.net/projects/solexaqa/files/latest/download?source=files>

- Se ejecutaron el siguiente comando para descomprimir el archivo:

```
$ gzip -d SolexaQA++_v3.1.5.gz
```

- El siguiente comando se ejecutó para hacer el trimming de las lecturas (para cada archivo) con un punto de corte de 15

```
$ ./SolexaQA++ dynamictrim SII_1CD_concatenated.fq --phredcutoff 15
```

- ALINEACIÓN DE LAS SECUENCIAS

El programa Bowtie se descargó del siguiente link, versión 1.2.10:

<https://sourceforge.net/projects/bowtie-bio/files/bowtie/1.0.0/bowtie-1.0.0-macos-i386.zip/download>

Con las siguientes líneas de comando instalar el programa:

- Descomprimir el archivo:

```
$ gzip -d bowtie-1.0.0-macos-i386.zip
```

- Configuración e instalación del programa:

```
$ ./configure
```

```
$ make
```

```
$ make install
```

Esta es línea de comando con la que se corrió el programa

```
$ bowtie1 -local -x Chr22_cat -U SII-1CD_unmapped.fq -S SII-1CD_unmapped.sam
```

Alternativamente

```
$ ./bowtie -a -v2 -p4 -chunkmbs 300 -un seq_no-alignSII_1_f.fastq  
indexes/GCA_000001405.15_GRCh_no_alt_analysys_set -q SII_2_1.fastq  
humanos_SII_2_f.sam > bowtie_SII_f.log  
_binary -fastq seq_noalignSII-1_fr.fastq  
velvetg k-meros_35 -cov_cutoff auto -min_conting_lgth 200
```

ANEXO III
CUESTIONARIOS APLICADOS A LOS SUJETOS

Proyecto: Microbiota y Microbioma nuevas aproximaciones en Medicina: de la teoría microbiana de la enfermedad a la relación macrobioma y salud.

Hoja de Identificación

Datos Generales

Código de Identificación: _____ Fecha: _____

Dirección: _____

_____ Teléfono Casa: _____

Tel. Trabajo: _____

Edad: _____ Fecha de Nacimiento: _____ Sexo: _____

Estado Civil: _____ Ocupación: _____

Años de Educación (Nivel de Educación): _____

() Primaria, () Secundaria, () Preparatoria / Bachillerato, () Normal Básica,

() Carrera Técnica o Comercial () Profesional () Maestría o Doctorado

() Paciente () Voluntario

Enfermedad que padece-

Diagnóstico? _____

Medicamentos

Actuales?: _____

En los últimos 3 meses ha tomado antibióticos? Si () No (),

Cuáles? _____

En los últimos 3 meses ha recibido antibióticos para los ojos? Si () No (),

Cuáles? _____

En los últimos 3 meses se ha aplicado gotas para los ojos? Si () No (),

Cuáles? _____

Anticoagulantes Si () No (),

Cuáles? _____

Antiagregantes plaquetarios Si () No (),

Cuáles? _____

Indicación de la Colonoscopia actual (Para
pacientes): _____

Tiempo con síntomas gastrointestinales:

Diarrea _____ Estreñimiento _____

Ambos _____

Diagnóstico
colonoscópico: _____

Se tomaron todas las biopsias del protocolo? Si () No ()

Razones? _____

Alguna eventualidad durante la colonoscopia? Si () No ()

Cuáles? _____

Reporte de las biopsias llevadas a
Patología: _____

CUESTIONARIO ROMA III (ADULTOS)

Síntomas del esófago

PREGUNTA	RESPUESTA
1. En los últimos 3 meses ¿con qué frecuencia sintió un nudo en la garganta, o como que la tenía llena o había algo atorado [atascado] en ella?	<input type="checkbox"/> 0. Nunca → Saltar a la pregunta 4 <input type="checkbox"/> 1. Menos de un día al mes <input type="checkbox"/> 2. Un día al mes <input type="checkbox"/> 3. Dos o tres días al mes <input type="checkbox"/> 4. Un día a la semana <input type="checkbox"/> 5. Más de un día a la semana <input type="checkbox"/> 6. Todos los días
2. ¿Ha tenido esta sensación durante 6 meses o más?	<input type="checkbox"/> 0. No <input type="checkbox"/> 1. Si
3. ¿Esta sensación ocurre entre las comidas (cuando no está comiendo)?	<input type="checkbox"/> 0. No <input type="checkbox"/> 1. Si
4. ¿Le duele al tragar cuando come o bebe?	<input type="checkbox"/> 0. Nunca <input type="checkbox"/> 1. Algunas veces <input type="checkbox"/> 2. A menudo <input type="checkbox"/> 3. La mayoría de las veces <input type="checkbox"/> 4. Siempre
5. En los últimos 3 meses, ¿con qué frecuencia sintió dolor o molestias en el medio del pecho (no relacionados con problemas del corazón)?	<input type="checkbox"/> 0. Nunca → Saltar a la pregunta 8 <input type="checkbox"/> 1. Menos de un día al mes <input type="checkbox"/> 2. Un día al mes <input type="checkbox"/> 3. Dos o tres días al mes <input type="checkbox"/> 4. Un día a la semana <input type="checkbox"/> 5. Más de un día a la semana <input type="checkbox"/> 6. Todos los días
6. ¿Ha tenido este dolor en el pecho durante 6 meses o más?	<input type="checkbox"/> 0. No <input type="checkbox"/> 1. Sí
7. Cuando tuvo el dolor en el pecho, ¿con qué frecuencia lo sintió como ardor o quemazón?	<input type="checkbox"/> 0. Nunca <input type="checkbox"/> 1. Algunas veces <input type="checkbox"/> 2. A menudo <input type="checkbox"/> 3. La mayoría de las veces <input type="checkbox"/> 4. Siempre
8. En los últimos 3 meses, ¿con qué frecuencia tuvo acidez o agruras (una sensación molesta de ardor o quemazón en el pecho)?	<input type="checkbox"/> 0. Nunca → Saltar a la pregunta 10 <input type="checkbox"/> 1. Menos de un día al mes <input type="checkbox"/> 2. Un día al mes <input type="checkbox"/> 3. Dos o tres días al mes <input type="checkbox"/> 4. Un día a la semana <input type="checkbox"/> 5. Más de un día a la semana <input type="checkbox"/> 6. Todos los días

CUESTIONARIO DE SII-PI DE SPILLER

Código de Identificación: _____

1. En qué año le apareció su Síndrome de Intestino Irritable?

2. Le apareció súbitamente un día en particular o apareció gradualmente?

Apareció súbitamente ____

Fue apareciendo gradualmente ____

No me puedo recordar ____

3. Usted cree que le apareció con o inmediatamente luego de una enfermedad infecciosa?

Si ____

No ____

No se ____

3a. Si su respuesta fue SI, en ese momento su doctor le solicitó un estudio de material fecal/heces (coprológico, coproparasitoscópico) para ser analizada, y en ese caso, se encontró alguna infección?

Si ____

No ____

3b. En caso de que Si le encontraron una infección, diga el nombre la infección o el agente, si la recuerda: _____

Lista Abajo

a. Salmonela ____

b. Shigella ____

c. Campylobacter ____

d. Virus ____

e. Otra (Por favor especifique) _____

f. No lo se ____

3c. Esta enfermedad ocurrió durante o inmediatamente luego de un viaje? Si ____ No ____

3d. A donde viajó? (País o Ciudad dentro de México)

4. En el momento en el que empezó la enfermedad, presentó usted?

a. Fiebre Si ____ No ____

b. Diarrea Si ____ No ____

c. Vómito Si ____ No ____

d. Diarrea con Sangre Si ____ No ____

CUESTIONARIO DE SEVERIDAD DE SII (IBS-SSS)

CODIGO: _____ FECHA: _____

INSTRUCCIONES PARA LA ESCALA DE GRAVEDAD DE SINTOMAS DEL SII (IBS SYMPTOM SEVERITY SCALE)

Este cuestionario está diseñado para permitirnos registrar y monitorizar la severidad de sus síntomas del Síndrome de Intestino Irritable (SII). Es de esperar que sus síntomas varíen en el tiempo, por lo cual trate de contestar las preguntas basado en cómo se siente en la actualidad (Durante los 10 últimos días). Toda la información será totalmente confidencial.

1. En las preguntas donde existan varias respuestas posibles, por favor encierre en un círculo la respuesta más apropiada para usted.
2. Algunas preguntas requieren que usted marque la respuesta más apropiada para usted.
3. Algunas preguntas requieren que usted marque con una cruz en una línea que nos permita valorar la gravedad de un problema en particular.

Por ejemplo:

Que tan severo fue su dolor?

Por favor marque una cruz (+) en cualquier lugar dentro de la línea entre 0-100% para indicar de la manera más precisa posible, la severidad de sus síntomas.

Este ejemplo muestra una severidad de aproximadamente 90%.



CODIGO: _____ FECHA: _____

ESCALA DE SINTOMAS DEL SII

a) Actualmente *sufre usted* *sufre usted* de dolor abdominal?

SI NO

Para uso oficial solamente

CALIFICACION

b) Si su respuesta es SI, qué tan severo es su dolor abdominal?

0%
┆

100%
┆

□

Sin dolor	No muy fuerte	Un poco fuerte	Fuerte	Extremadamente fuerte
-----------	---------------	----------------	--------	-----------------------

d) Por favor escriba el número de días en que usted ha tenido este dolor por cada 10 días.

Por ejemplo, si escribe 4, significa que usted tiene dolor durante 4 de los 10 días. Si tiene Dolor durante los 10 días, escriba 10.

□

□

Número de días con dolor.

b) Actualmente *sufre de distensión** abdominal?

SI NO

**(inflamación, hinchazón, sensación de abdomen tenso)*

**(Si es mujer, por favor ignore la distensión relacionada con los períodos menstruales)*

b) Si su respuesta es Si, que tan severo es su distensión/tensión abdominal?

0%
┆

100%
┆

□

Sin distensión	No muy fuerte	Un poco fuerte	Fuerte	Extremadamente fuerte
----------------	---------------	----------------	--------	-----------------------

0% **Que tan satisfecho está usted con sus evacuaciones?**

┆

100%
┆

□

Muy satisfecho	Algo satisfecho	Insatisfecho	Muy insatisfecho
----------------	-----------------	--------------	------------------

Por favor indique con una cruz en la línea de abajo, que tanto el Síndrome de Intestino Irritable le está afectando o interfiriendo con su vida en general.

0%
┆

100%
┆

□

Nada	No mucho	Mucho	Completamente
------	----------	-------	---------------