



FACULTAD DE MEDICINA  
UNIVERSIDAD DE CANTABRIA

**GRADO EN MEDICINA**

**TRABAJO FIN DE GRADO**

**MICROBIOTA INTESTINAL EN LA SALUD  
Y EN LA ENFERMEDAD**

**GUT MICROBIOTA IN HEALTH AND DISEASE**

**Autor:** Dña. Andrea Gómez Arce

**Director:** Dña. Asunción Seoane Seoane

**Santander, Junio 2016**

# Índice

<b>RESUMEN/ABSTRACT</b> .....	1
<b>2. INTRODUCCIÓN</b> .....	2
2.1. Glosario .....	3
<b>3. ESTUDIO DE LA MICROBIOTA</b> .....	3
3.1. Preparación de las muestras .....	4
3.2. Métodos de análisis en el estudio de la microbiota fecal .....	4
3.2.1. Técnicas basadas en el cultivo .....	6
3.2.2. Secuenciación del gen 16S rRNA .....	6
3.2.3. Secuenciación de nueva generación .....	6
3.2.4. Metagenómica .....	7
3.2.5. Ciencias Ómicas .....	8
3.3. Estudios de la microbiota intestinal a gran escala .....	9
<b>4. MICROBIOTA EN LA SALUD</b> .....	10
4.1. Estructura y composición del tracto gastrointestinal .....	10
4.2. Core microbiano y enterotipos .....	12
4.3. Evolución de la microbiota en el desarrollo humano .....	13
4.4. Factores modificadores de la microbiota intestinal .....	13
4.4.1. Factores intrínsecos .....	13
4.4.2. Factores extrínsecos .....	14
4.5. Funciones de la microbiota: Relación de beneficio .....	16
4.5.1. Función metabólica .....	17
4.5.2. Función protectora .....	18
4.5.3. Función trófica .....	19
4.5.4. Función nerviosa .....	20
4.5.5. Función hepática .....	20

4.6. Medidas de salud intestinal .....	20
<b>5. MICROBIOTA EN LA ENFERMEDAD .....</b>	<b>22</b>
5.1. Enfermedades relacionadas con alteraciones en la microbiota .....	23
5.1.1. Enfermedad inflamatoria intestinal .....	24
5.1.2. Síndrome del intestino irritable .....	26
5.1.3. Cáncer colorrectal .....	27
5.1.4. Infección por <i>Clostridium difficile</i> .....	28
5.1.5. Obesidad y Síndrome metabólico .....	29
5.1.6. Diabetes Mellitus tipo II .....	30
5.1.7. Enfermedad cardiovascular .....	31
5.1.8. Enfermedades hepáticas .....	31
5.1.9. Enfermedad reumática .....	32
5.1.10. Alergias y enfermedades atópicas .....	32
5.1.11. Enfermedades psiquiátricas .....	32
<b>6. MANIPULACIÓN DE LA MICROBIOTA .....</b>	<b>33</b>
6.1. Alimentación .....	34
6.1.1. Prebióticos .....	36
6.2. Antimicrobianos .....	37
6.3. Probióticos .....	39
6.3.1. Condiciones para su uso. Funciones.....	39
6.3.2. Beneficios .....	40
6.4. Trasplante de microbiota fecal .....	40
6.4.1. Metodología .....	40
6.4.2. Aplicaciones .....	42
6.4.3. Efectos adversos .....	44
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>46</b>

## RESUMEN

La microbiota intestinal, formada por más de 100 billones de organismos, es el ecosistema más complejo y densamente poblado que coloniza el cuerpo humano. El conocimiento sobre el papel de la microbiota y su relación de beneficio mutuo con el huésped ha aumentado notablemente gracias al reciente desarrollo de las tecnologías de secuenciación del ADN de nueva generación y la metagenómica. La colonización del intestino comienza en el nacimiento y la microbiota está expuesta a constantes modificaciones a lo largo de la vida por estímulos como la dieta, los viajes, los fármacos, la actividad física, las enfermedades o la vejez, entre otros. Esto nos sugiere que la microbiota tiene un papel muy importante en el mantenimiento de la salud del cuerpo humano, realizando funciones como la protección frente a patógenos, la estimulación del desarrollo del sistema inmune y del metabolismo, la producción de vitaminas o la regulación del tránsito intestinal. Las alteraciones tanto cualitativas como cuantitativas de la microbiota, producen un estado patológico denominado "disbiosis", caracterizada por una disminución de la diversidad microbiana y asociada a la aparición y el desarrollo de numerosas enfermedades, tanto gastrointestinales como sistémicas. Esta relación ha sido necesaria para establecer el uso de estrategias terapéuticas basadas en la modulación de la microbiota, incluyendo cambios en la dieta, el uso de prebióticos y probióticos o el trasplante de materia fecal.

**Palabras clave:** Microbiota, metagenómica, diversidad microbiana, disbiosis, enfermedades, trasplante de materia fecal

## ABSTRACT

The intestinal microbiota, consisting on more than 100 trillion organisms, is the most complex and densely populated ecosystem that colonizes the human body. Knowledge about the role of the microbiota and the mutually beneficial relationship with the host has greatly increased due to the recent development of next generation DNA sequencing technologies and metagenomics. The gut colonization begins at birth and microbiota is exposed to constant changes due to a variety of stimuli such as diet, travel, drugs, physical activity, disease or old age. This suggest that microbiota plays an important role in maintaining the human body health, performing functions such as protection against pathogens, stimulation of the immune system development and metabolism, production of essential vitamins or regulation of the intestinal transit. Both qualitative and quantitative alterations of microbiota produce a condition called "dysbiosis", characterized by the decrease of microbial diversity and associated with the appearance and development of numerous diseases, both gastrointestinal and systemic. This relationship has been necessary to establish the use of therapeutic strategies based on modulation of the microbiota, including changes in diet, use of prebiotics and probiotics or stool transplantation.

**Key words:** Microbiota, metagenomics, microbial diversity, dysbiosis, diseases, stool transplantation

## 2. INTRODUCCIÓN

La microbiota intestinal, también llamada nuestro “órgano olvidado” (D’Argenio y Salvatore 2015), es el ecosistema más complejo y densamente poblado que coloniza el cuerpo humano (Tedjo et al. 2015). En la última década se ha convertido en un importante foco de investigación, no solo en microbiología, sino también en medicina. Gracias a los avances en el desarrollo de nuevos métodos moleculares, especialmente las tecnologías de secuenciación del ADN de nueva generación y la metagenómica, ha mejorado notablemente nuestro conocimiento sobre la microbiota y su relación de mutualismo beneficioso con el huésped.

Nuestro intestino alberga más de 100 billones de organismos, principalmente bacterias, aunque también incluye virus, arqueas y algunos microorganismos eucariotas unicelulares (D’Argenio y Salvatore 2015). Se estima que la microbiota intestinal contiene 1014 tipos de especies bacterianas diferentes, superando 10 veces en número las células del huésped y llegando a pesar alrededor de 2 Kg de nuestro peso (Jalanka 2014), (D’Argenio y Salvatore 2015). Las bacterias que componen la microbiota codifican 5 millones de genes, constituyendo el denominado microbioma intestinal, un genoma adquirido y extremadamente dinámico, 100 veces mayor que el genoma humano.

El microbioma intestinal no se transmite y fija únicamente de forma vertical como en el caso del genoma humano, sino que es modificado a lo largo de la vida por diferentes factores tanto extrínsecos como intrínsecos, tales como los eventos tempranos de la vida, la dieta, los tratamientos farmacológicos, la actividad física o la vejez (D’Argenio y Salvatore 2015). Esto nos sugiere que la microbiota tiene un papel muy importante en el mantenimiento de la salud del cuerpo humano (Guinane y Cotter 2013), llevando a cabo numerosas funciones cruciales para su homeostasis, como la protección frente a patógenos, la estimulación del desarrollo del sistema inmune, la estimulación del metabolismo, la producción de vitaminas, la regulación del tránsito intestinal, etc.

Las bacterias tienen preferencias ambientales específicas, siendo ciertas bacterias casi exclusivas de ciertas áreas del cuerpo, donde tienen ventajas frente a otras bacterias. Las bacterias que forman la microbiota intestinal colonizan el intestino mediante la interacción con las moléculas de superficie de las células epiteliales. La colonización bacteriana se puede llevar a cabo mediante tres tipos de relación: mutualismo, comensalismo y oportunismo. Muchas de las bacterias intestinales tienen una relación de mutualismo con el huésped, mediante la cual ambos organismos se benefician con la coexistencia. Sin embargo, la relación más común es la de comensalismo, en la que sólo uno de los organismos es el que se beneficia, mientras que el otro ni se beneficia ni se perjudica. Por otro lado, las bacterias oportunistas, que en condiciones normales no causan enfermedad, sí la pueden inducir en condiciones favorables (Biedermann y Rogler 2015).

## 2.1. Glosario

<b>Microbiota</b>	Conjunto de comunidades microbianas que coloniza un determinado nicho ecológico
<b>Microbioma</b>	Genoma colectivo del conjunto de simbioses que colonizan un nicho ecológico o animal anfitrión
<b>Metagenoma</b>	Genoma colectivo del conjunto de microorganismos que constituyen una comunidad ecológica
<b>Metagenómica</b>	Estudio del material genético de las muestras recuperadas directamente de un determinado entorno biológico para conocer su composición microbiana, evitando la necesidad de aislamiento y cultivo individual de sus componentes.
<b>Enterotipo</b>	Clasificación de la comunidad de la microbiota intestinal humana en tres grupos, de acuerdo a la distinta composición del ecosistema
<b>Disbiosis</b>	Desequilibrio en la composición bacteriana de un nicho ecológico en comparación con el patrón considerado normal
<b>Xenobiótico</b>	Sustancia cuya estructura química es extraña a la naturaleza, poco frecuente o inexistente ya que es sintetizada artificialmente por el hombre en el laboratorio

## 3. ESTUDIO DE LA MICROBIOTA

En la última década, el conocimiento sobre la microbiota intestinal se ha visto revolucionado por el desarrollo de las tecnologías de secuenciación del ADN de nueva generación, caracterizadas por ser independientes de cultivo, a diferencia de las técnicas utilizadas tradicionalmente. Esto ha permitido mejorar notablemente la investigación metagenómica, lo que nos ha proporcionado alcanzar una mejor comprensión sobre el papel de la microbiota, tanto en la salud como en la enfermedad.

### 3.1. Preparación de las muestras

El material más utilizado para el estudio de la microbiota son las muestras fecales, ya que no requieren métodos invasivos y tienen fácil acceso, aunque en ciertas ocasiones también se pueden tomar muestras mediante biopsia. El estudio de la microbiota es muy complejo debido a la alta diversidad microbiana presente en la muestra fecal y las dificultades pre-analíticas que pueden aparecer, como la extracción incorrecta del ADN o la alteración de la muestra en el almacenamiento.

Para analizar correctamente la microbiota fecal, es crucial que la toma de muestras y el almacenamiento no alteren la composición microbiana. La conservación óptima de las muestras de heces se basa en el mantenimiento a temperatura ambiente durante un máximo de 24 horas antes de la extracción de ADN. Alternativamente, las muestras se pueden conservar inmediatamente después de la recogida a  $-20^{\circ}\text{C}$  y almacenarse a  $-80^{\circ}\text{C}$  durante períodos más largos (Jalanka 2014).

Además la diversidad microbiana está influenciada también por el tipo de paciente, incluyendo los hábitos intestinales y la medicación, y la descongelación de las muestras durante el transporte, que debe ser evitada. Si la congelación directa no es factible, se recomienda el almacenamiento de las heces a temperatura ambiente o a  $+4^{\circ}\text{C}$  durante un máximo de 24 horas (Tedjo et al. 2015). Recientemente se ha llevado a cabo un estudio sobre el efecto de los diferentes métodos de almacenamiento de las muestras fecales en sujetos tanto sanos como enfermos, ampliando así la heterogeneidad poblacional y la validez externa de los resultados. Los resultados obtenidos concluyeron que las muestras fecales almacenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 1 semana, a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas y a temperatura ambiente durante 24 horas, mantenían una estructura bacteriana similar a la de las muestras almacenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  a los 10 minutos (Tedjo et al. 2015).

La mayoría de los estudios moleculares se basan en el análisis del ADN, por lo que se requiere una extracción óptima de este, con un método adecuado al tipo de bacteria a estudiar, ya que los principales filos bacterianos presentes en la microbiota, *Firmicutes* (Gram positivo) y *Bacteroidetes* (Gram negativo) difieren en la estructura de su pared celular, lo que nos plantea un desafío con el material de partida. Las bacterias Gram positivas requieren un método más riguroso de extracción para la lisis de la pared, planteando el riesgo de no ser lo suficientemente representadas dentro de la comunidad microbiana, sin embargo, las bacterias Gram negativas presentan una pared de peptidoglicano más fina y fácil de manejar.

La mayoría de los métodos se basan en la disrupción mecánica, enzimática o química de la pared celular, o una combinación de estos procedimientos. Varios estudios han tratado de comparar los métodos de extracción de heces, indicando claramente que la combinación de procedimientos mecánicos, obtenidos normalmente mediante colisión de esferas o “bead-beating”, ya sea con la lisis química o enzimática, es la forma más efectiva para adquirir una visión realista de la microbiota (Jalanka 2014).

### 3.2. Métodos de análisis en el estudio de la microbiota fecal (Tabla 1)

**Tabla 1.** Resumen de las técnicas empleadas en el estudio de la microbiota intestinal, y sus principales características, ventajas e inconvenientes (Jalanka 2014).

Técnica	16S rRNA	Sensibilidad	Ventajas	Limitaciones
<b>Cultivo</b>	No	Moderada	Información funcional de los organismos y caracterizar nuevas especies	Trabajo muy laborioso. La mayoría de la microbiota intestinal no se puede cultivar
<b>FISH<sup>a</sup></b>	Si	Alta	Revela taxones y también a nivel de especie. La enumeración de las bacterias no depende del número de copias de 16S rRNA	No identifica nuevos taxones. Requiere cepas de referencia para su validación
<b>qPCR<sup>b</sup></b>	Si	Alta	Detecta taxones específicos o superiores	Trabajo laborioso para su validación. Requiere cepas de referencia para el análisis cuantitativo
<b>DGGE<sup>c</sup></b>	Si	Baja	Visión rápida y barata de las bacterias predominantes en el ecosistema	Baja reproducibilidad y sensibilidad
<b>Microarrays filogenéticos</b>	Si	Alta	Detección rápida y extensa de muestras microbianas intestinales basada en secuencias ya conocidas	No detecta nuevos filotipos
<b>Secuenciación de nueva generación</b>	Si	Alta	Alto rendimiento. Detecta nuevas especies	Requiere análisis bioinformáticos complejos. La formación de quimeras en la PCR representa el mayor sesgo
<b>Metagenómica</b>	Genoma completo	Alta	Información sobre la composición y potencial genético de la microbiota intestinal. Alto rendimiento, detecta nuevas especies	Requiere análisis bioinformáticos complejos. Información limitada por los genomas de referencia disponibles y la información filogenética.

<sup>a</sup>. Fluorescent in situ hybridization (FISH); <sup>b</sup>. PCR cuantitativa (qPCR); <sup>c</sup>. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)

### *3.2.1. Técnicas basadas en el cultivo*

Tradicionalmente, el estudio de la microbiota se ha basado en el cultivo de las muestras y el posterior aislamiento e identificación de los microorganismos mediante pruebas fenotípicas clásicas: morfológicas, fisiológicas y bioquímicas. El cultivo de la microbiota fecal en medios selectivos y diferenciales es en apariencia el método más simple y directo, sin embargo, no posee una alta fiabilidad debido a la existencia de bacterias no cultivables. El 99% de las bacterias son anaerobias estrictas y muchas de ellas extremadamente sensibles al oxígeno, lo que obliga a procurar estrictas condiciones reductoras durante el procesado y el cultivo.

A pesar de esto, ha habido un gran avance en esta área debido al desarrollo de medios de cultivo específicos para especies más exigentes. Un estudio reciente ha acuñado el término “culturómica”, desarrollando nuevas técnicas de cultivo asociadas a la técnica de espectrometría de masas MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight), para identificar microorganismos que previamente no se podían cultivar (Guinane y Cotter 2013). Esta estrategia elimina las especies más abundantes o fáciles de cultivar, facilitando el estudio del resto mediante métodos de filtración, uso de antibióticos o cócteles de fagos, permitiendo así identificar 174 especies no descritas hasta el momento.

Otros métodos como la electroforesis en gel de poliacrilamida y la PCR cuantitativa van dirigidos a la detección de una bacteria específica, por lo que no son adecuados en el estudio de la microbiota en su totalidad (D’Argenio y Salvatore 2015).

### *3.2.2. Secuenciación del gen 16S rRNA*

El estudio de la microbiota ha mejorado mucho con el uso de métodos de análisis independientes de cultivo, que emplean variaciones genéticas comunes en todas las bacterias además de diferencias específicas de cada especie como el 16S rRNA (Biedermann y Rogler 2015)

El gen 16S rRNA, está presente en la subunidad pequeña del ribosoma de todas las bacterias, siendo ideal para la aproximación filogenética, permitiendo la identificación taxonómica de las especies bacterianas. Contiene regiones de DNA ultraconservadas, además de secuencias hipervariables, presentes exclusivamente en especies bacterianas específicas, por lo que permite clasificar los diferentes filotipos microbianos (Jalanka 2014). Además existe una relación entre el contenido del rRNA y la tasa de crecimiento de las bacterias intestinales, por lo que el contenido del 16S rRNA puede utilizarse para estimar la biomasa microbiana y las bacterias fisiológicamente activas (Hullar, Burnett-Hartman, y Lampe 2014), así como su estabilidad y diversidad en el tiempo.

### *3.2.3. Secuenciación de nueva generación (SNG)*

Los avances tecnológicos en la secuenciación del ADN que se han producido en los últimos años han permitido el desarrollo de los métodos de secuenciación de nueva generación (SNG), también denominada secuenciación masiva paralela (*massive parallel sequencing*). Estas nuevas plataformas como 454 (Roche), MiSeq (Illumina), SOLID (Life Technologies) o Ion-Torrent (Life Technologies) permiten secuenciar millones de fragmentos de ADN de forma paralela y a un coste cada vez más reducido. En los últimos años, estos métodos han dominado el estudio de la microbiota, aumentando el rendimiento de la secuenciación y la gestión así como reduciendo los costes. La SNG permite la caracterización en profundidad del microbioma tanto cualitativa como cuantitativamente (D'Argenio y Salvatore 2015), y se puede utilizar para secuenciar las regiones variables del gen 16S rRNA o fragmentos de ADN metagenómico (*shotgun sequencing*). El procedimiento, como la mayoría de los métodos, está precedido de una PCR, lo que implica la aparición de sesgos de amplificación. El único método de SNG que no se precede de una PCR es la plataforma de secuenciación PacBio (Jalanka 2014), basada en la tecnología SMRT (Single Molecule Real time) secuenciando moléculas individuales del ADN original.

A pesar de las grandes ventajas que proporcionan estos métodos, como el alto rendimiento y la detección de nuevas especies, todavía quedan por resolver algunos problemas técnicos, ya que la SNG depende de la actualización de las bases de datos, la información funcional y las herramientas bioinformáticas (D'Argenio y Salvatore 2015). Sin embargo, se ha producido un gran avance en la secuenciación de ADN de última generación, generándose 576,7 Gb de datos de secuencias de ADN microbiano a partir del ADN total de muestras fecales de 124 adultos europeos, mediante el Genome Analyzer GAIIx de Illumina (Qin et al. 2010).

### 3.2.4. Metagenómica

Las tecnologías de secuenciación masiva han permitido el análisis del ADN de ecosistemas complejos, tales como el intestino humano (Devaraj, Hemarajata, y Versalovic 2013). La metagenómica es un campo nuevo en el que se persigue obtener secuencias del genoma de los diferentes microorganismos que componen una comunidad, en este caso bacterias, extrayendo y analizando su ADN de forma global. Uno de los abordajes más utilizados consiste en que el ADN de una muestra ambiental, una vez extraído, es fragmentado (*shotgun*) y secuenciado al azar y los datos resultantes de la secuenciación de ADN son analizados en conjunto mediante algoritmos de ensamblaje, o sin ensamblar, para monitorizar las capacidades funcionales de la comunidad en su totalidad. El rápido desarrollo de las tecnologías de secuenciación de nueva generación ha hecho posible generar grandes bases de datos de metagenómica (Walker et al. 2014).

La mayor ventaja de este procedimiento es que evita el cultivo y el sesgo de amplificación que acompaña a la PCR, ya que el ADN se analiza directamente, lo que permite identificar bacterias hasta el nivel de especie (D'Argenio y Salvatore 2015). Además proporciona información sobre la diversidad de microorganismos y proporciona datos funcionales sobre las rutas metabólicas afectadas y la contribución

del microbioma en los estados de salud y enfermedad. También cabe destacar que la metagenómica es la única tecnología que permite secuenciar el viroma completo (Walker et al. 2014).

Sin embargo, también presenta ciertas limitaciones, incluyendo la incapacidad de interpretar una proporción significativa de los datos debido a la falta de información en las bases de datos de referencia (D'Argenio y Salvatore 2015). Otra limitación es que puede ser difícil el ensamblaje de genomas, particularmente de los miembros menos abundantes de la microbiota o de las comunidades que contienen especies estrechamente relacionadas (Walker et al. 2014).

### *3.2.5. Ciencias Ómicas*

Las tecnologías “Ómicas”, proporcionan la oportunidad de asociar la estructura de la microbiota con su función en la salud y la enfermedad (Hullar, Burnett-Hartman, y Lampe 2014). El enfoque funcional de la metagenómica requiere integrarse con otros enfoques para determinar con más exactitud la actividad específica de los microbios. En este punto aparecen la metatranscriptómica, metaproteómica y metabonómica, útiles en el estudio a tiempo real de los aspectos funcionales de la microbiota intestinal a lo largo del tracto GI (Devaraj, Hemarajata, y Versalovic 2013).

- Metatranscriptómica: Análisis de la expresión genética, mediante el estudio de ARN total transcrito.
- Metaproteómica: Análisis de los productos proteicos bacterianos.
- Metabólica: Análisis de los perfiles metabólicos.

La metatranscriptómica se basa en el análisis de la expresión genética bacteriana mediante el estudio del ARN total transcrito por el conjunto de la comunidad microbiana (Walker et al. 2014). Nos proporciona una visión completa de los perfiles de expresión genética y datos funcionales de un medio, mediante el análisis del transcriptoma, permitiendo detectar la respuesta de los microorganismos a las perturbaciones ambientales (D'Argenio y Salvatore 2015). Un ejemplo de su aplicación ha sido la demostración del consumo de productos lácteos fermentados como inductores de la expresión de genes codificantes de enzimas involucradas en el metabolismo de carbohidratos y polisacáridos de origen vegetal (Walker et al. 2014). Otro ejemplo, ha sido la aplicación para detectar diferencias de expresión de numerosos genes en respuesta al consumo de antibióticos y xenobióticos (Walker et al. 2014).

En cuanto a la metaproteómica, se basa en el estudio del conjunto de proteínas que una comunidad microbiana puede producir. A diferencia de la metatranscriptómica, relativamente estática, la metaproteómica se modifica constantemente debido a las interacciones entre el genoma y el ambiente (Mollerach 2006), por lo que nos proporciona información sobre la actividad funcional. La metaproteómica fecal ha mostrado una gran ventaja frente a los estudios basados en el RNA, ya que los productos, estudiados mediante cromatografía líquida y espectrometría de masas,

presentan una mayor estabilidad temporal e incluyen enzimas metabólicos, chaperonas y proteínas de estrés (Guinane y Cotter 2013).

Para concluir, la metabolómica puede ser descrita como el estudio de las respuestas metabólicas a los productos químicos, al medioambiente y a las enfermedades, y aporta información acerca del estado fisiológico y funcional de la microbiota intestinal. Además, la metabolómica ofrece perfiles metabólicos globales de un individuo en tiempo real, lo que nos ayuda a evaluar las diferentes vías metabólicas que interaccionan con la dieta e influyen en la salud y la enfermedad humana, como la reducción de sulfato o de nitrato y la formación secundaria de ácido biliar (Devaraj, Hemarajata, y Versalovic 2013). La metabolómica ha mejorado drásticamente mediante su aplicación conjunta con la resonancia magnética nuclear, que ha permitido analizar miles de metabolitos simultáneamente, pero presenta limitaciones de resolución y sensibilidad (Guinane y Cotter 2013).

### **3.3. Estudios de la microbiota intestinal a gran escala**

En la última década se han llevado a cabo dos estudios muy importantes, El Proyecto Metagenómica del tracto intestinal humano en Europa (MetaHIT) y el proyecto Microbioma Humano de US (HMP). Ambos han trabajado conjuntamente con el fin de establecer las bases de una microbiota intestinal sana y las alteraciones en la enfermedad mediante la secuenciación a gran escala.

MetaHIT ha investigado la correlación entre la microbiota intestinal y las enfermedades intestinales, particularmente obesidad y el síndrome del intestino irritable (SII), secuenciando el ADN fecal de 124 individuos y demostrando que la mayoría de ellos compartían el 40% de los genes. Además encontraron que el 99,1% de los genes pertenecían a bacterias, la mayoría de los restantes a arqueas, y un número muy reducido de genes (0,1%) a eucariotas y virus (Qin et al. 2010).

HMP estudió la composición de la microbiota en 690 muestras de 15 regiones del organismo de 300 sujetos sanos, además generó un catálogo de 800 genomas microbianos de diferentes regiones del cuerpo humano, proporcionando una visión completa de las variaciones entre especies y genes microbianos en el intestino (Guinane y Cotter 2013).

## 4. MICROBIOTA EN LA SALUD

Antes de hablar de la relación entre la microbiota y la salud, debe definirse el término “Salud intestinal”. En 1948, la OMS especificó “Salud es un estado de completo bienestar físico, mental y social, no solamente la ausencia de afecciones o enfermedad”. En relación a la salud del tracto gastrointestinal (GI), podríamos añadir a esta definición aspectos como la ausencia de molestias gastrointestinales, una digestión y absorción de alimentos, estado inmunológico y microbiota intestinal normales, y una buena calidad de vida. La riqueza o diversidad bacteriana, es considerada un indicador de estado de salud, relacionándose la disminución de la diversidad con numerosas enfermedades como la obesidad y enfermedades inmunes e inflamatorias (D’Argenio y Salvatore 2015).

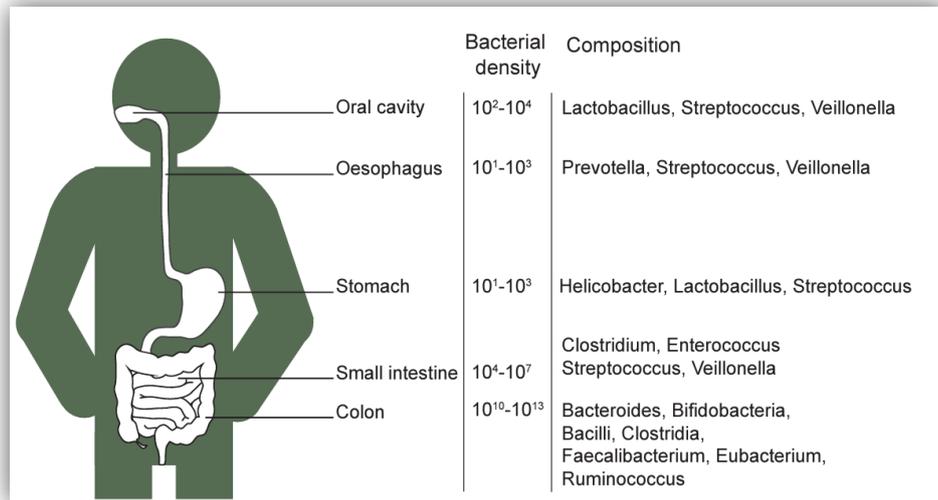
### 4.1. Estructura y composición del tracto gastrointestinal

El tracto GI tiene alrededor de 7 metros de longitud, existiendo una gran variabilidad en la composición y diversidad microbianas en sus diferentes regiones (Biedermann y Rogler 2015). A medida que se avanza distalmente aumenta la carga bacteriana, a la vez que disminuye el oxígeno y el pH evoluciona de ácido a neutro. Estos factores, junto con otros como el tiempo de tránsito, la capa de moco o los movimientos peristálticos, producen variaciones en la composición bacteriana de las diferentes regiones del tracto GI. El epitelio intestinal es esencial en el mantenimiento del equilibrio entre el huésped y las bacterias para garantizar la homeostasis y evitar una respuesta inmune innecesaria (Villanueva-Millán, Matute, y Revuelta 2015).

La mayoría de la microbiota del humano adulto vive en el intestino, y dentro de este, en el colon, donde la densidad bacteriana excede  $10^{11}$  células/g, lo que equivale a 1-2 kg del peso corporal. Además, se ha estimado que el microbioma intestinal contiene más de 5 millones de genes y alrededor de 1000 especies diferentes, todas pertenecientes a un pequeño número de filos.

Como se ha mencionado anteriormente, la microbiota intestinal se compone mayoritariamente de bacterias. Debido a la baja concentración de oxígeno presente en el intestino, las anaerobias son las mayoritarias (Villanueva-Millán, Matute, y Revuelta 2015), encontrándose en menor medida las anaerobias facultativas y las aerobias. En orden de importante numérica las especies más abundantes (90%) son miembros de los filos *Firmicutes* y *Bacteroidetes*, y con un menor número los filos *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Fusobacteria*, y *Cyanobacteria*, entre otros (Walsh et al. 2014). El filo *Firmicutes* está constituido por bacterias Gram positivas, entre las que cabe destacar las clases *Clostridia* y las bacterias productoras de ácido láctico, *Lactobacillus* y *Leuconostoc*. En cuanto al filo *Actinobacteria*, también Gram positivas, se encuentran las bacterias *Collinsella* y *Bifidobacterium*, siendo esta última la predominante en el nacimiento, persistiendo en la edad adulta en bajo grado (Konturek et al. 2015).

Debido a los factores tanto extrínsecos como intrínsecos que influyen la composición y distribución de la microbiota, el número de bacterias encontradas a lo largo del tracto GI varía tanto longitudinal como transversalmente. A lo largo del tracto gastrointestinal, tanto la densidad bacteriana como la diversidad y composición, aumentan progresivamente, encontrándose la mayor parte de los microorganismos en el colon (Figura 1)



**Figura1.** Características de la microbiota a lo largo del tracto gastrointestinal (Jalanka 2014)

El intestino delgado es la región más ácida y con mayores niveles de oxígeno y antimicrobianos, por lo que su microbiota es dominada por anaerobios facultativos de crecimiento rápido que toleran el efecto de los ácidos biliares y los antimicrobianos, a la vez que compiten con el huésped y otras bacterias por los carbohidratos simples presentes. El ciego y colon contienen la comunidad microbiana con mayor densidad y diversidad de todo el cuerpo, siendo los microorganismos aquí presentes responsables del metabolismo de polisacáridos resistentes a la degradación previa por el intestino delgado. Debido a la baja concentración de antimicrobianos, el lento tránsito y la falta de fuentes de carbono simple, se facilita el crecimiento de anaerobios fermentadores de polisacáridos, *Bacteroidaceae* y *Clostridia* (Donaldson, Lee, y Mazmanian 2016).

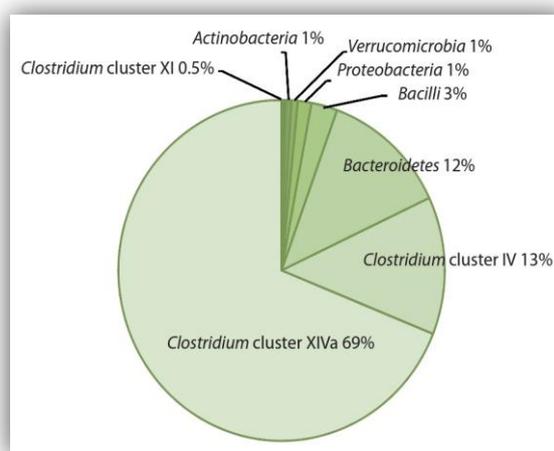
En cuanto a las variaciones en el eje transversal del intestino, se puede observar que la mayor parte de los microorganismos que habitan el tracto GI se encuentran en el lumen, mientras que una pequeña parte está adherida a las capas mucosas. Además, toda la pared del colon se pliega sobre sí misma, formando compartimentos entre los pliegues con mayor cantidad de mucosa, que sirve como nutriente para ciertas bacterias, y los hace diferentes al compartimento luminal central (Donaldson, Lee, y Mazmanian 2016). Las bacterias adheridas a la mucosa son las más propensas a interactuar con el sistema inmune del huésped, mientras que las que habitan el lumen son las más importantes en las interacciones metabólicas con los alimentos y otros productos de la digestión (Villanueva-Millán, Matute, y Revuelta 2015).

Además, cabe destacar la presencia de los llamados microhábitats intestinales, reservorios de gran diversidad bacteriana, que incluyen las criptas colónicas, la mucosa

interna y el apéndice. Estas estructuras son cruciales para facilitar la homeostasis inmune, proteger las especies comensales de las competidoras y repoblar la microbiota intestinal cuando es alterada o ciertas especies son eliminadas (Donaldson, Lee, y Mazmanian 2016).

#### 4.2. Core microbiano y enterotipos

Dada la alta variabilidad interindividual en la microbiota, se ha identificado el llamado “Núcleo del microbioma intestinal”, un conjunto de especies bacterianas (30% de los filotipos detectados) compartido por adultos sanos (Figura 2), lo que sugiere el papel de la microbiota en el mantenimiento de la salud (D’Argenio y Salvatore 2015). En una gran cohorte europea se encontró que todos los adultos sanos albergaban alrededor de 160 especies, varias de las cuales se repetían entre los individuos, aunque con prevalencias muy variables (Jalanka 2014) (Qin et al. 2010).



**Figura 2.** Núcleo del microbioma intestinal. Principales especies bacterianas (Jalanka 2014)

Según la abundancia de las principales especies la microbiota intestinal se puede dividir en tres estados de equilibrio o de simbiosis, denominados “enterotipos”:

- Enterotipo 1: *Bacteroides* (filo *Bacteroidetes*)
- Enterotipo 2: *Prevotella* (filo *Bacteroidetes*)
- Enterotipo 3: *Ruminococcus* (filo *Firmicutes*)

Esta categorización parece independiente del sexo, la edad, la nacionalidad o el índice de masa corporal (IMC), sin embargo, se cree que podría estar relacionada con la dieta, ya que el enterotipo 1 ha sido asociado con dieta rica en proteínas y grasa, a diferencia del enterotipo 2, asociado al consumo de hidratos de carbono (Robles-Alonso y Guarner 2013).

A pesar de la existencia de este núcleo microbiano, a nivel de especies bacterianas, hay grandes variaciones inter-individuales (Hullar, Burnett-Hartman, y Lampe 2014). Esta especificidad de la microbiota en cada sujeto es una combinación de factores medioambientales, que modifican la microbiota inmediatamente después del nacimiento, y factores genéticos. Así, cada individuo tiene su propia microbiota, por lo que el microbioma intestinal de cada persona es como una huella (Konturek et al. 2015).

### 4.3. Evolución de la microbiota en el desarrollo humano

La microbiota intestinal “sana” se caracteriza por ser una comunidad relativamente estable, pero hay ciertas épocas en la vida de las personas en las que se producen alteraciones drásticas en la estructura y función microbiana. Aunque se ha demostrado que el intestino fetal ya podría estar en contacto con microbios presentes en el líquido amniótico (Villanueva-Millán, Matute, y Revuelta 2015), la mayor parte del desarrollo de la microbiota comienza en el nacimiento. Es en esta época post-natal, cuando la microbiota está influenciada por numerosos factores, incluyendo el tipo de parto (vaginal vs cesárea), la dieta (lactancia materna vs artificial), las condiciones sanitarias, el uso de antibióticos y suplementación con prebióticos o probióticos, así como la composición microbiana de la madre y el padre (Guinane y Cotter 2013)(Villanueva-Millán, Matute, y Revuelta 2015).

Los primeros colonizadores incluyen enterobacterias y enterococos, seguidos de organismos anaerobios estrictos como *Bifidobacterium* spp, *Clostridium* spp, *Bacteroides* spp. y estreptococos anaerobios, cuando el suministro de oxígeno presente inicialmente se agota (Walsh et al. 2014). La maduración de la microbiota continúa cuando se introducen los sólidos en la dieta del lactante y se desarrolla hasta los 2 años, edad a partir de la cual es similar a la del adulto (Guinane y Cotter 2013). El establecimiento inicial de la microbiota implica un gran impacto en el riesgo de desarrollar varias enfermedades infantiles que podrían persistir en la edad adulta, como el asma, las alergias, enfermedades inflamatorias inmunes crónicas, la diabetes tipo I, la obesidad y el eccema (Villanueva-Millán, Matute, y Revuelta 2015).

Como hemos mencionado, a partir de los 2 años de vida, la microbiota intestinal comienza a convertirse en su forma adulta, manteniéndose relativamente estable hasta la vejez. En las últimas etapas de la vida la microbiota disminuye en diversidad y dinamismo, caracterizándose por un aumento de *Bacteroides* respecto a *Firmicutes*, un aumento de *Proteobacteria*, una disminución de *Bifidobacterium* y modificaciones en el género *Clostridium* (Villanueva-Millán, Matute, y Revuelta 2015) (Walsh et al. 2014). Se cree que estas alteraciones de la microbiota se deben a cambios fisiológicos asociados a la edad, tales como un bajo grado de inflamación y cambios en los hábitos alimenticios, que pueden llevar a un estado de disbiosis (Guinane y Cotter 2013).

### 4.4. Factores modificadores de la microbiota intestinal

#### 4.4.1. Factores intrínsecos

Hay numerosos factores presentes en el organismo y en la propia microbiota que influyen en la distribución y composición microbiana.

Dieta y nutrientes. En algunos casos, la capacidad de las bacterias para colonizar el intestino viene determinada por su habilidad para utilizar ciertos nutrientes. Un ejemplo, es la capacidad de ciertas bacterias del colon, como *Bacteroides* spp, para

fermentar polisacáridos complejos de la dieta, y así mantener su sostenibilidad en esta región del intestino.

Antimicrobianos. Los antimicrobianos, secretados por las células de Paneth de la base de las criptas del colon, limitan el crecimiento de las bacterias próximas a la superficie de la mucosa. La concentración de estas moléculas va disminuyendo según se avanza en el tracto GI, por lo que hay una mayor concentración y diversidad de bacterias distalmente. Muchas bacterias desarrollan resistencia a los antimicrobianos mediante la modificación del lípido A de la membrana externa (presente en bacterias Gram negativas) confiriendo resistencia a péptidos antimicrobianos catiónicos, o mediante genes de resistencia a especies reactivas de oxígeno (producidas por el metabolismo aeróbico del huésped), expresando en su membrana enzimas como la catalasa o la superóxido dismutasa (Donaldson, Lee, y Mazmanian 2016).

Mucosa y adhesión. El acceso de las bacterias al epitelio está limitado por la viscosidad de la mucosa, que limita la movilidad bacteriana, y por la inmunogenicidad de la flagelina, que es un ligando para el receptor TLR-5. Sin embargo, hay bacterias patógenas como algunos *E. coli* y *Shigella flexneri* que degradan la mucosa a través de la secreción de una serín-proteasa Pic. La proteasa Pic además desencadena una hipersecreción de moco, impidiendo así la capacidad de las bacterias de la microbiota de competir con esos patógenos (Donaldson, Lee, y Mazmanian 2016). La composición de la microbiota también está influenciada por la capacidad de adhesión al epitelio, especialmente en el intestino delgado. Las bacterias se adhieren a la mucosa y al epitelio a través de proteínas de la membrana externa, cápsulas, lectinas, adhesinas y fimbrias.

Inmunomodulación. Las bacterias no patógenas deben ser toleradas por el sistema inmune para poder persistir en el intestino. La mucosa intestinal contiene grandes cantidades de sIgA (IgA secretora) que interactúan con la microbiota comensal, formando biofilms, que sirven como barrera contra la adhesión de patógenos. Además, los anticuerpos naturales han evolucionado para reconocer los polisacáridos capsulares bacterianos. Otra alternativa es la inmunomodulación inducida por las propias bacterias, mediante la interacción con las células epiteliales y las células presentadoras de antígenos, así como la producción de metabolitos de señalización (Donaldson, Lee, y Mazmanian 2016).

#### 4.4.2. Factores extrínsecos

La compleja composición de la microbiota intestinal está influenciada por numerosos factores medioambientales, como la dieta, la actividad física, el clima, el uso de medicación, el tabaco, el alcohol, la edad, el género, el estrés, etc.

Dieta. Se sabe que la dieta tiene un papel crucial en la determinación de la composición de la microbiota intestinal. Durante los primeros años de vida, mediante la lactancia materna se transmite la microbiota presente en la leche al intestino del bebé, se consigue protección frente a patógenos gracias a los anticuerpos maternos secretados y además, mediante la utilización de los polisacáridos como principal

fuerza de carbono, se produce una selección positiva de ciertas especies. Por ejemplo, varias especies de *Bacteroides* pueden utilizar oligosacáridos fucosilados como fuente de carbono, lo que sugiere que las propiedades prebióticas de la leche facilitan la colonización intestinal por estos microorganismos. Otro factor determinante de la composición microbiana es la transición a los alimentos sólidos, ya que es en este periodo donde la microbiota alcanza la similitud con la de los adultos (Donaldson, Lee, y Mazmanian 2016).

Una vez establecida la microbiota, los cambios en la nutrición también pueden alterar su composición, como en el caso del paso de una dieta mixta a una vegetariana (Biedermann y Rogler 2015). Recientemente, un estudio en ratones demostró que la dieta occidental, rica en azúcar y grasas, conduce a una alteración de la microbiota. Alimentando a ratones durante 1 semana con una dieta rica en grasas, se evidenciaba un aumento significativo de la permeabilidad del epitelio intestinal, acompañado de un aumento en la expresión de IL-10 (citoquina anti-inflamatoria) y de bacterias de la clase *Clostridia*. Además, después de la primera semana, se vio un aumento del flujo transcelular intestinal correlacionado con bacterias del orden *Bacteriales*, coincidiendo con el aumento de la adiposidad, peso corporal y niveles plasmáticos de LDL y el aumento de la expresión en el íleon de IL-1 $\beta$  (citoquina pro-inflamatoria) (Konturek et al. 2015).

Medicación. La administración de antibióticos es la forma más importante y común de perturbación de la microbiota (Villanueva-Millán, Matute, y Revuelta 2015). Los antibióticos de amplio espectro pueden afectar a un 30% de las bacterias de la comunidad intestinal, produciendo rápidos y significantes cambios en la diversidad y riqueza taxonómica (Francino 2016), además de cambios en la expresión de genes involucrados en la resistencia a antibióticos, la actividad de las proteínas y el metabolismo microbiano.

En niños, se ha visto que la exposición temprana a antibióticos reduce la diversidad de la microbiota y altera su composición, disminuyendo *Bifidobacterium* y aumentando *Proteobacteria*. Además en niños no tratados con antibióticos, pero con madres tratadas antes del parto, se ven las mismas alteraciones. Los antibióticos aumentan la susceptibilidad a las infecciones, alteraciones inmunes y alteraciones metabólicas. Una de las infecciones más frecuentes es la diarrea asociada a la toma de antibióticos, producida por patógenos nosocomiales como *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* y *Clostridium difficile*, que puede causar una infección de larga evolución e incluso una colitis pseudomembranosa potencialmente letal. Además en inmunodeprimidos, el tratamiento con antibióticos puede producir un aumento de *Enterococcus* resistente a vancomicina en el intestino, que puede evolucionar a una bacteriemia (Francino 2016).

En cuanto a las alteraciones inmunes, el uso de antibióticos se ha asociado a un aumento del riesgo de desarrollar enfermedades inflamatorias, autoinmunes y atópicas durante los primeros años de vida, como la Enfermedad Inflamatoria Intestinal (EII), desarrollada años o incluso décadas después de la administración del antibiótico (Biedermann y Rogler 2015). Por último, en relación con el metabolismo, se ha visto que los cambios en la composición y diversidad microbiana, así como los

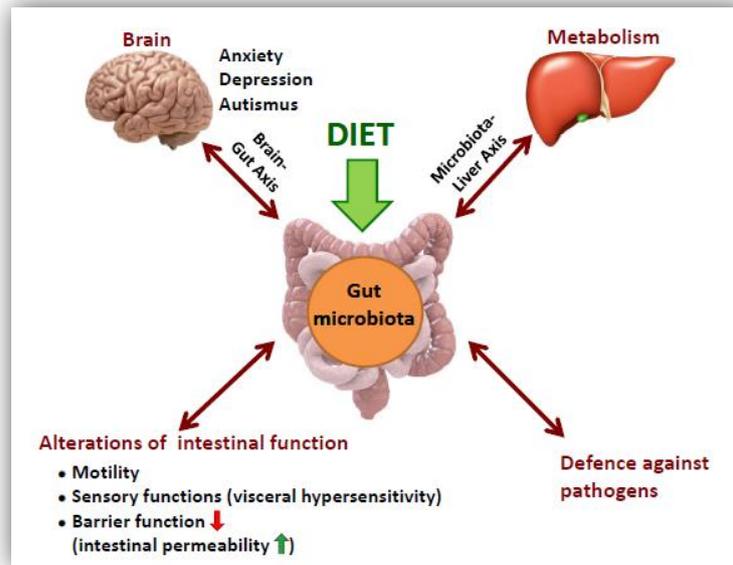
cambios en la expresión de genes bacterianos y vías metabólicas inducidos por la exposición continuada a antibióticos, se asocian a un aumento del peso corporal, contribuyendo además al desarrollo del síndrome metabólico en individuos obesos (Francino 2016). En individuos tratados con  $\beta$ -lactámicos se ha visto la presencia de una microbiota con alteración del repertorio enzimático dirigido a la degradación de hidratos de carbono, resultando en un desequilibrio del metabolismo de los glúcidos, similar al observado en obesos. Una vez que finaliza la toma del antibiótico, la microbiota tarda un tiempo en recuperarse y volver a un estado parecido al original, pero la mayoría de las veces no se recupera totalmente y las alteraciones pueden permanecer largos periodos de tiempo, meses e incluso años.

Edad. Es evidente que la microbiota intestinal es diferente en la vejez. No se sabe si esta diferencia se debe a la propia fisiología humana o a la acumulación de cambios en los factores moduladores de la microbiota a lo largo de la vida (Biedermann y Rogler 2015). El proceso de envejecimiento produce cambios en la fisiología intestinal, como hipoclorhidria gástrica, alteraciones de la motilidad, uso de medicamentos, cambios degenerativos en el sistema nervioso entérico, etc., dando lugar a profundas alteraciones de la composición, diversidad y funcionalidad de la microbiota intestinal. La microbiota de personas añosas se ha asociado al aumento de enfermedades tanto gastrointestinales, como la infección por *Clostridium difficile*, así como a enfermedades extra-intestinales, como el síndrome metabólico, la diabetes mellitus tipo II (DM-II), enfermedad de hígado graso, aterosclerosis, etc. (Konturek et al. 2015).

Tabaco. Se sabe que el tabaco tiene efectos perjudiciales en la enfermedad de Crohn, mientras que en la colitis ulcerosa actúa como factor protector. Pero la mayor relación del tabaco con la microbiota, se representa por la ganancia de peso tras dejar de fumar, atribuida al aumento del consumo de comida como sustituto oral y reflejada en el aumento de *Firmicutes* y Actinobacterias (Biedermann y Rogler 2015).

#### **4.5. Funciones de la microbiota: Relación de beneficio**

La co-evolución del huésped y la microbiota ha resultado en una relación de beneficio mutuo. La microbiota produce un gran impacto en la fisiología del cuerpo humano, tanto en la salud como en la enfermedad. Algunos beneficios incluyen la protección frente a patógenos potenciales, la digestión de los polisacáridos, la producción de vitaminas esenciales, la estimulación de la angiogénesis, la regulación de los depósitos de grasa y la modulación del sistema inmune del huésped (Walsh et al. 2014), afectando directa o indirectamente a la mayoría de nuestras funciones fisiológicas (Shreiner, Kao, y Young 2015). Figura 3.



**Figura 3.** Papel fisiológico de la microbiota intestinal: el efecto bidireccional de la microbiota en el eje cerebro-intestino, la defensa contra patógenos, el efecto en el metabolismo y las alteraciones de la función intestinal, incluyendo la permeabilidad, sensibilidad y motilidad (Konturek et al. 2015)

#### 4.5.1. Función metabólica

La microbiota intestinal es un factor importante en la obtención de energía de la dieta y puede afectar al metabolismo de todo el organismo y alterar los parámetros fisiológicos en múltiples compartimentos corporales. Las importantes funciones metabólicas incluyen el catabolismo de las toxinas y carcinógenos de la dieta, la síntesis de micronutrientes, la síntesis de vitaminas, la fermentación de sustancias indigeribles y la absorción de electrolitos y minerales (Devaraj, Hemarajata, y Versalovic 2013).

- Metabolismo de glúcidos. Los microbios contienen muchos genes que codifican gran variedad de enzimas activas sobre carbohidratos que un individuo por sí solo no contiene. Estas enzimas incluyen glucosidasas, carbohidrato esterasas, glicosiltransferasas y polisacaridasas (Devaraj, Hemarajata, y Versalovic 2013), y proporcionan acceso a abundantes fuentes de hidratos de carbono que de otro modo se perderían, extrayendo energía de nutrientes inaccesibles. Los polisacáridos no digeribles, como la oligofructosa, son metabolizados por la microbiota a oligosacáridos y monosacáridos y después son fermentados a ácidos grasos de cadena corta (AGCC) (Villanueva-Millán, Matute, y Revuelta 2015).
- Metabolismo de lípidos. Las bacterias intestinales, incluyendo los probióticos, producen una gran variedad de ácidos grasos beneficiosos para la salud. Las bifidobacterias intestinales producen ácido linoleico conjugado que parece modular la composición de ácidos grasos en el tejido hepático y adiposo en ratones (Devaraj, Hemarajata, y Versalovic 2013). Además las bacterias

intestinales generan ácidos grasos de cadena corta (AGCC) mediante la fermentación de los carbohidratos de la dieta antes mencionados, como acetato, butirato y propionato, que son absorbidos rápidamente.

Los AGCC son utilizados como sustratos para múltiples procesos metabólicos (Villanueva-Millán, Matute, y Revuelta 2015), son muy importantes para la mucosa intestinal como fuente de energía y para la modulación del sistema inmune y la tumorigénesis en el intestino. Un AGCC muy abundante y activo en el intestino es el butirato, que juega un papel muy importante en el cáncer de colon, siendo un factor cancerígeno concentración dependiente (Shreiner, Kao, y Young 2015). Además los AGCC se han asociado a un aumento de la saciedad y una reducción del consumo de comida, controlando la ganancia de peso corporal. La microbiota intestinal también influye en el metabolismo del colesterol, afectando a la conversión de los ácidos biliares en ácidos biliares secundarios y con ello a la circulación enterohepática (Figura 3), la síntesis de nuevos ácidos biliares, la emulsificación y la absorción de colesterol (Villanueva-Millán, Matute, y Revuelta 2015).

- Metabolismo de proteínas. Las proteínas y péptidos de la dieta deben ser hidrolizados a aminoácidos mediante las proteinasas y peptidasas lumbales. Ciertos microbios como las bifidobacterias y lactobacilos producen compuestos biológicos activos derivados de aminoácidos, incluyendo gran variedad de aminos biógenas, gracias a la existencia de diversas enzimas microbianas (Devaraj, Hemarajata, y Versalovic 2013).

La microbiota normal sintetiza y excreta vitaminas excesivas para sus necesidades, proporcionando vitaminas al organismo. Entre esas vitaminas se encuentran la vitamina K, vitamina B12 y otras vitaminas del grupo B (Biedermann y Rogler 2015). Además también está involucrada en la metabolización de polifenoles, contribuyendo a sus propiedades beneficiosas antioxidantes (Villanueva-Millán, Matute, y Revuelta 2015), y la digestión de xiloglucanos (por miembros del filo *Bacteroidetes*), una hemicelulosa que se encuentra en vegetales de la dieta como la lechuga y las cebollas (Shreiner, Kao, y Young 2015).

#### 4.5.2. Función protectora

La microbiota intestinal protege al intestino contra la colonización por patógenos exógenos y endógenos (Figura 3) mediante la competición directa por los nutrientes y la modulación del sistema inmune (Villanueva-Millán, Matute, y Revuelta 2015).

En la superficie de la mucosa intestinal, tiene lugar una competición entre las diferentes especies bacterianas. La microbiota normal evita la colonización por patógenos al competir por los sitios de unión y los nutrientes esenciales. Normalmente, las bacterias adheridas a la capa mucosa tienen una relación más beneficiosa con el huésped que las lumbales y un descenso en las primeras puede inducir el crecimiento, adhesión e invasión de las bacterias patógenas. Esta es la razón

por la que *Clostridium difficile* solo puede inducir colitis cuando el número de bacterias beneficiosas disminuye debido al tratamiento antibiótico (Biedermann y Rogler 2015).

Además, la microbiota intestinal es crucial para el desarrollo adecuado del sistema inmune. Las interacciones entre la microbiota y el sistema inmune del huésped son numerosas, complejas y bidireccionales. El sistema inmune debe aprender a tolerar la microbiota comensal y responder adecuadamente a los patógenos, y la microbiota es crucial en la educación del sistema inmune para funcionar correctamente (Shreiner, Kao, y Young 2015). Uno de los componentes del sistema inmune más importante es la barrera de moco que separa la microbiota de las células epiteliales, formada a su vez por dos capas: una capa poco adherida en contacto con el lumen y otra firmemente adherida protegiendo las células epiteliales. La capa interior es impermeable a los microbios, previniendo la mayoría de los contactos con el huésped. Además se convierte constantemente en la capa exterior, que proporciona nutrientes y sitios de unión de bacterias (Biedermann y Rogler 2015).

La mucosa intestinal actúa como una barrera física, junto con las uniones estrechas entre las células epiteliales, para evitar el contacto entre las células del huésped y la microbiota intestinal. Por otro lado, la microbiota intestinal estimula el desarrollo del sistema inmune adaptativo y del tejido linfático (Placas de Peyer) (Biedermann y Rogler 2015), además regula la respuesta inmune innata y adaptativa, por ejemplo, a través de la vía de iniciación de la respuesta específica de las células T (Jalanka 2014). La microbiota normal estimula la producción de anticuerpos de reacción cruzada (principalmente IgA) que se secretan en el lumen del intestino y que también impiden las infecciones bacterianas. Además, ciertos productos microbianos pueden albergar un potencial regulador inmune directo, como el que se muestra con el polisacárido A producido por *Bacteroides fragilis* (un organismo ubicuo y mutualista en el intestino), que puede modular y corregir las deficiencias de células T y los desequilibrios de TH1/TH2, así como de los subconjuntos de células T helper y otras poblaciones de células inmunes. Así, la microbiota normal induce un mecanismo de protección para la prevención de infecciones en el tracto GI (Biedermann y Rogler 2015).

#### 4.5.3. Función trófica

La microbiota intestinal modula la proliferación y diferenciación de las células epiteliales mediante los AGCC producidos en la fermentación de los carbohidratos (Devaraj, Hemarajata, y Versalovic 2013). El AGCC más importante involucrado en esta función es el butirato, que puede modificar la microestructura intestinal y es capaz de acelerar la maduración de la mucosa durante el desarrollo e inducir la reparación tras un daño (Villanueva-Millán, Matute, y Revuelta 2015). Además las bacterias intestinales producen gran variedad de sustancias como peróxidos y otros productos metabólicos altamente específicos que ayudan en el crecimiento y metabolismo epitelial (Biedermann y Rogler 2015).

#### 4.5.4. *Función nerviosa*

Recientemente se ha demostrado que la microbiota influye en el metabolismo cerebral a través del eje microbiota intestinal-cerebro (Figura 3), participando en la salud y enfermedad cerebral, el desarrollo, el aprendizaje, la memoria y el comportamiento. El intestino posee su propio sistema nervioso, conocido como el sistema nervioso entérico, que comunica constantemente con el sistema nervioso central a través de nervios como el vago (Villanueva-Millán, Matute, y Revuelta 2015).

Los microorganismos liberan sustancias biológicas activas como AGCC con efectos inmunomoduladores y sensoriales. Los AGCC actúan como sustratos energéticos y afectan directamente el tracto GI mediante la alteración del fenotipo de las células epiteliales del colon. Pueden actuar como supresores tumorales y modulan el sistema neuroendocrino entérico, además están involucrados en la regulación genética de los procesos anti-inflamatorios. Los ACGC actúan como un desencadenante ambiental en las enfermedades psiquiátricas del espectro autista, por lo que los microbios y sus metabolitos no solo regulan el sistema inmune de la mucosa intestinal, sino que también ejercen efectos en el sistema nervioso (Konturek et al. 2015)(Figura 3).

#### 4.5.5. *Función hepática*

Hay una relación anatómica y funcional entre la microbiota y el hígado, el eje intestino-hígado, a través del cual se transfieren moléculas relacionadas con la microbiota a este órgano (Figura 3). Hay una creciente evidencia de que un mal funcionamiento del eje intestino-hígado (sobrecrecimiento bacteriano intestinal, disbiosis y aumento de la permeabilidad) es un factor de riesgo en el desarrollo y progresión de hígado graso no alcohólico y la obesidad. (Villanueva-Millán, Matute, y Revuelta 2015).

### 4.6. **Medidas de salud intestinal**

Debida a la gran variabilidad individual, es prácticamente imposible detallar con exactitud la composición de la microbiota en personas sanas. Sin embargo, hay ciertos componentes que pueden ser usados como parámetros tanto subjetivos, como objetivos, de salud intestinal (Tabla 2) (Jalanka 2014). Dentro de los parámetros subjetivos cabe destacar el estado general del paciente, el estado psicológico, los síntomas GI que presenta, la consistencia de las heces y los hábitos dietéticos. Mientras que los parámetros objetivos incluyen el estudio de la función GI con la medición de la velocidad de tránsito, la digestión, la permeabilidad, la motilidad y el pH, así como el estudio de la función inmune e inflamatoria con la medición de las citoquinas y la integridad epitelial.

**Tabla 2.** Medidas de salud intestinal: Parámetros objetivos y subjetivos.

PARÁMETROS SUBJETIVOS		
MEDIDA	MÉTODO	DESCRIPCIÓN
<b>Salud general</b>	Cuestionarios de calidad de vida	Validación de la salud general y el bienestar
<b>Estado psicológico</b>	Criterios de ansiedad y depresión	Medidas de evaluación de la depresión y la ansiedad muy empleadas en controles sanos y pacientes.
<b>Síntomas GI</b>	Criterios de severidad de SII	Evaluación de los síntomas intestinales y su severidad
<b>Consistencia de las heces</b>	Escala de heces de Bristol	Escala de 7 niveles que diagnostica sujetos con estreñimiento (tipos 1 y 2), heces normales (tipos 3 y 4) y diarrea (tipos 5 a 7)
<b>Dieta</b>	Cuestionario de frecuencia de alimentos	Evaluación de la dieta habitual del sujeto

PARÁMETROS OBJETIVOS		
MEDIDA	MÉTODO	DESCRIPCIÓN
<b>Función GI</b>	Velocidad de tránsito	Test de Hinton: ingesta de marcadores radiactivos y monitorización del progreso por el tracto GI por rayos X
	Digestión	Medida de los nutrientes, como grasas o macronutrientes, de las heces o la sangre
	Permeabilidad	Evaluación de la integridad de la barrera intestinal basada en el paso de pequeñas partículas indigeribles del intestino a la orina.
	Motilidad	Medida de los movimientos peristálticos y de la tensión de la pared intestinal
	pH	El pH de las heces refleja la tasa de producción de los ácidos orgánicos por las bacterias
<b>Inmunidad e inflamación</b>	Medida de las citoquinas	Medida de citoquinas inflamatorias (IL-6, IL-1 y TNF- $\alpha$ ) o anti-inflamatorias (IL-10) o la expresión de estos genes
	Integridad epitelial	Visualización de la capa epitelial, p.ej mediante histología

Adaptado de: (Jalanka 2014). SII: Síndrome del intestino irritable

Respecto a los síntomas GI se han identificado asociaciones entre la microbiota y síntomas como dolor e hinchazón intestinal, relacionados con la escasez de bifidobacterias. Además la hinchazón abdominal se ha correlacionado con la abundancia de bacterias no cultivables como *Anaerotruncus colihominis* y *Ruminococcus callidus*.

Otra medida de salud intestinal es la diversidad de la microbiota, consistente en la riqueza de especies (cantidad de especies diferentes) y la abundancia relativa de estas especies. Se cree que una alta diversidad es beneficiosa para un ecosistema, permitiendo hacer frente a las condiciones de estrés. Además una alta diversidad se asocia a una baja variación temporal de la microbiota y se ha demostrado que es una característica sujeto-específica. Varios estudios indican que la disminución en la diversidad se asocia a enfermedades como el síndrome del intestino irritable, la enfermedad intestinal inflamatoria y la obesidad (Jalanka 2014).

## 5. MICROBIOTA EN LA ENFERMEDAD

La alteración de la microbiota, entendida esta como el paso de un estado de “normobiosis” o salud intestinal, a un estado de “disbiosis”, se ha asociado a la aparición de numerosas enfermedades, aunque en la mayoría de los casos todavía no se ha establecido una clara relación. La disbiosis se caracteriza por una disminución de la riqueza y diversidad microbiana producida por factores intrínsecos y extrínsecos, que da lugar a enfermedades tanto en el tracto gastrointestinal como sistémicas (Tedjo et al. 2015) (Konturek et al. 2015).

El medioambiente, la genética y la inmunidad del huésped forman una triada interactiva que ha demostrado regular la función de los TLR (Receptores tipo Toll), por lo que un desequilibrio en alguno de estos componentes puede promover una respuesta inmune inadecuada, contribuyendo a la formación de un inflammasoma, y con ello a la aparición de procesos inflamatorios en el intestino, tales como la Enfermedad Inflamatoria Intestinal (EII) y el cáncer colorrectal (CCR) (Konturek et al. 2015).

Por otro lado, las bacterias intestinales pueden agruparse en una matriz polimérica formando biofilms. Estas estructuras contactan con las células epiteliales del intestino y pueden llegar a invadir la mucosa intestinal, desarrollando un estado patológico caracterizado por una perturbación de la función epitelial y una inflamación crónica. Además, la presencia de biofilms se correlaciona con la invasión bacteriana de los tejidos, dando lugar a cambios en la fisiología tisular y un aumento de la proliferación celular, propiedad característica de la transformación oncogénica (Dejea et al. 2014).

### 5.1. Enfermedades relacionadas con alteraciones en la microbiota

Hay una creciente lista de enfermedades tanto infecciosas como no infecciosas relacionadas con la composición de la microbiota intestinal. Ciertas enfermedades gastrointestinales (Tabla 3), como la Enfermedad de Crohn y la Colitis ulcerosa (enfermedades inflamatorias intestinales), el Síndrome del intestino irritable, el cáncer colorrectal, la enfermedad celíaca y algunas enfermedades infecciosas bacterianas como la colitis por *Clostridium difficile*, se caracterizan por la presencia de disbiosis microbiana. Además, el desequilibrio en la microbiota, así como el aumento de cepas bacterianas específicas, se asocia con un aumento de enfermedades extra-gastrointestinales (Tabla 4) como la diabetes, el síndrome metabólico, la obesidad, la aterosclerosis, la artritis reumatoide, el hígado graso no alcohólico, la depresión, el autismo o la esclerosis múltiple (Biedermann y Rogler 2015).

**Tabla 3.** Relación entre disbiosis y enfermedades gastrointestinales.

ENFERMEDADES GASTROINTESTINALES	
ENFERMEDAD	HALLAZGOS PRINCIPALES
<b>Enfermedad de Crohn</b>	Reducción de la diversidad, inestabilidad temporal, disminución de <i>Firmicutes</i> , <i>Faecalibacterium prausnitzii</i> y <i>Roseburia hominis</i> . Aumento de <i>Gammaproteobacteria</i>
<b>Colitis ulcerosa</b>	Reducción de la diversidad, disminución de los niveles de <i>Firmicutes</i> , <i>Roseburia hominis</i> y <i>Faecalibacterium prausnitzii</i>
<b>Síndrome del intestino irritable</b>	Disbiosis, sobrecrecimiento bacteriano. Aumento de la relación <i>Firmicutes</i> : <i>Bacteroidetes</i> , disminución de <i>Bifidobacterium</i> y <i>Faecalibacterium</i> spp. Eje microbiota-intestino-cerebro
<b>Cáncer colorrectal</b>	Disminución de las bacterias productoras de butirato, inflamación de bajo grado inducida por la microbiota y aumento de <i>Fusobacterium</i>
<b>Infección por <i>Clostridium difficile</i></b>	Disminución de la diversidad. Buena respuesta al trasplante de materia fecal de individuos sanos
<b>Enterocolitis necrotizante</b>	Aumento de la respuesta inmune en nacidos pretérmino inducida por miembros de la familia <i>Enterobacteriaceae</i>
<b>Enfermedad celíaca</b>	Aumento de <i>Firmicutes</i> , <i>Proteobacteria</i> y <i>Sutterella wadsworthensis</i> , con disminución de la proporción de <i>Actinobacteria</i> en niños con riesgo por predisposición genética

Adaptada de: Jalanka 2014

**Tabla 4.** Relación entre disbiosis y enfermedades sistémicas.

ENFERMEDADES SISTÉMICAS	
ENFERMEDAD	HALLAZGOS PRINCIPALES
<b>Síndrome metabólico y DM tipo II</b>	Menor diversidad, menor nivel de <i>Firmicutes</i> productor de AGCC. El trasplante de microbiota fecal aumenta la sensibilidad de la insulina
<b>Obesidad</b>	Disminución de la diversidad, aumento en la relación <i>Firmicutes/Bacteroidetes</i> , aumento de la capacidad para almacenar energía y mantener una inflamación de bajo grado
<b>Enfermedad cardiovascular</b>	Aumento del metabolismo microbiano con producción de trimetilamina-n-oxidasa (metabolito pro-aterosclerótico)
<b>Enfermedades hepáticas</b>	Disbiosis intestinal, disminución del número de bacterias. Desarrollo del Síndrome del intestino permeable.
<b>Enfermedades reumáticas</b>	Disminución de <i>Bifidobacterium</i>
<b>Enfermedades atópicas</b>	Disminución de la diversidad, aumento de <i>Clostridium</i> clusters IV y XVIa
<b>Depresión</b>	Aumento de <i>Oscillibacter</i> y <i>Alistipes</i> , los probióticos alivian los síntomas
<b>Autismo</b>	Aumento de los niveles de <i>Lachnospiraecae</i> spp. La ingesta de <i>Bacteroides fragilis</i> reduce los síntomas en ratones. Aumento de los niveles de <i>Sutterella</i> spp. y <i>Ruminococcus torques</i> en humanos
<b>Artritis</b>	Aumento de los niveles de <i>Proteobacteria</i> y <i>Bacteroidetes</i>
<b>Diabetes tipo 1</b>	Disminución de la diversidad, aumento del ratio <i>Firmicutes/Bacteroidetes</i>

Adaptada de: Jalanka 2014

### 5.1.1. Enfermedad inflamatoria intestinal

La Enfermedad Inflamatoria Intestinal (EII) se caracteriza por una inflamación crónica y recidivante del tracto GI, e incluye dos entidades patológicas, la Enfermedad de Crohn (EC) y la Colitis ulcerosa (CU) (Walsh et al. 2014). Clínicamente se caracterizan por la aparición de dolor, vómitos, diarrea y otras complicaciones como pérdida de peso y cambios conductuales (Donaldson, Lee, y Mazmanian 2016).

La EII es multifactorial, pero se sabe que las bacterias juegan un papel muy importante en su fisiopatogenia, ya que se ha detectado la presencia de disbiosis en ambas entidades. Hay más de 160 factores genéticos inespecíficos asociados a un aumento del riesgo de desarrollar ambas enfermedades, además se ha visto una concordancia entre gemelos monocigóticos en comparación con dicigóticos (Walsh et al. 2014).

La mayoría de los factores genéticos de riesgo en la EII forman parte del sistema inmune innato, responsable de la defensa aguda contra las bacterias. Entre estos genes de riesgo se encuentran los receptores de reconocimiento de patrones como NOD2, TLR4, CARD8, CARD9 y NLRP3, además de los genes de autofagia tales como ATG16L1, IRGM y LRRK2, que destruyen las bacterias cuando entran en las células epiteliales. En la enfermedad de Crohn pueden encontrarse además como factores de riesgo los péptidos antimicrobianos defensinas, participantes en la respuesta antibacteriana, así como diferentes elementos responsables del mantenimiento de la integridad de la barrera epitelial (IBD5, DLG5, PDGER4, DMBT1 y XBP1). Interesantemente, se ha demostrado que muchos de los factores genéticos de riesgo de la EII, están también implicados en otras enfermedades como lupus eritematoso sistémico (PTPN22), espondilitis anquilosante (ERAP2), psoriasis (PTPN22), asma (IBD5), diabetes tipo II (GCKR), enfermedad celíaca (PTPN22), diabetes tipo I (PTPN22), artritis reumatoide (PTPN22) y esclerosis múltiple (PTGER4, STAT3). Esto puede indicar la existencia de una relación entre estas enfermedades y la microbiota intestinal (Biedermann y Rogler 2015).

No obstante la *odds ratio* de los factores genéticos es baja y hay una clara evidencia de que los factores medioambientales (ligando específicos de TLRs y antígenos derivados de las bacterias comensales) contribuyen en gran medida al inicio de la enfermedad (Konturek et al. 2015).

En la EII, se observa que en la superficie mucosa tiene lugar un aumento de la concentración de bacterias y una disminución de la diversidad microbiana (Donaldson, Lee, y Mazmanian 2016). Se cree que la inflamación y ulceración del colon son iniciadas por un estado de disbiosis, ya que la microbiota intestinal presenta una serie de componentes esenciales en el desarrollo de lesiones en la mucosa. La característica principal de la disbiosis es la disminución de las bacterias anti-inflamatorias *Bacteroidetes* y *Firmicutes*, en particular *Clostridium leptum* y *Clostridium coccoides* (Guinane y Cotter 2013), y el aumento de las proteobacterias pro-inflamatorias (Konturek et al. 2015). Tabla 3.

Además se ha visto que los cambios en la composición microbiana parecen ser diferentes en la CU y la EC. Mientras que en la CU se ha visto una disminución de las bacterias productoras de butirato como *Roseburia hominis* y *Faecalibacterium prausnitzii*, en la EC se ha visto lo contrario, un aumento de *Faecalibacterium prausnitzii* y *gammaproteobacteria* (Tabla 3) y una disminución de la diversidad total (Guinane y Cotter 2013)(Walsh et al. 2014). En contraste con la teoría de la disbiosis, algunos investigadores han sugerido que ciertas bacterias podrían ser las causantes de la enfermedad, como la familia *Enterobacteriaceae*, asociada a pacientes con CU y *E.coli* adherente e invasiva, identificada en la mucosa ileal de pacientes con EC (Guinane y Cotter 2013).

### 5.1.2. Síndrome del intestino irritable

El síndrome del intestino irritable (SII) es una de las enfermedades gastrointestinales más comunes en el mundo occidental, afectando aproximadamente a un 10-15% de la población (Jalanka 2014). Es una enfermedad crónica cuyo diagnóstico se basa en la exclusión de otras enfermedades orgánicas y en los síntomas, que incluyen dolor abdominal, hinchazón y una función intestinal alterada (Walsh et al. 2014). Los pacientes son clínicamente muy heterogéneos por lo que se dividen en varios subtipos según la manifestación principal (Jalanka 2014):

- SII-D: Diarrea
- SII-C: Estreñimiento
- SII-A: Hábitos intestinales alternos

La etiología del SII es multifactorial (Guinane y Cotter 2013), identificándose en su patogenia: la predisposición genética, caracterizada por la existencia de alteraciones en genes que codifican proteínas involucradas en la función de barrera de las células epiteliales y en la respuesta inmune contra las bacterias intestinales; episodios previos de ansiedad y depresión, y el sexo femenino (Jalanka 2014). Además se ha demostrado un bajo grado de inflamación intestinal asociado a la alteración de la composición de la microbiota intestinal (Walsh et al. 2014).

Se ha demostrado que la microbiota intestinal juega un importante papel en la patogénesis de los trastornos GI funcionales como el SII (Konturek et al. 2015). Este rol se basa en múltiples evidencias:

- La sintomatología característica puede aumentar con la alteración de la microbiota intestinal mediante el uso de probióticos y prebióticos, además de antibióticos como la rifaximina (Jalanka 2014).
- La composición de la microbiota en los pacientes con SII es significativamente diferente a la de sujetos sanos (Konturek et al. 2015).
- Alrededor de un 10% de los pacientes con SII desarrollan la enfermedad tras un episodio de gastroenteritis (síndrome del intestino irritable post-infeccioso) (Jalanka 2014).

Uno de los mecanismos por el que la microbiota promueve el desarrollo del SII es a través del eje microbiota-intestino-cerebro, produciendo cambios en la percepción de los síntomas intestinales en el sistema nervioso central (Shreiner, Kao, y Young 2015). Además la disbiosis microbiana facilita la adhesión de patógenos a la pared intestinal (Guinane y Cotter 2013).

La microbiota intestinal de los pacientes con SII es significativamente diferente a la de los controles sanos (Walsh et al. 2014), viéndose un aumento de *Firmicutes*, y más específicamente *Ruminococcus*, *Clostridium* y *Dorea*, además de una disminución de *Bifidobacterium* y *Faecalibacterium* spp (Tabla 3) (Guinane y Cotter 2013). Uno de los

filotipos bacterianos más fuertemente asociado al SII es *Ruminococcus torques*, demostrándose una mayor abundancia en pacientes con el síndrome. Esta bacteria posee flagelinas pro-inflamatorias y tiene la capacidad de degradar la mucosa, asociándose a un aumento de la sensación dolorosa (Jalanka 2014). También se ha evidenciado la alteración en la abundancia de arqueas metanogénicas en los subtipos SII-D y SII-C. Estos microorganismos convierten el hidrógeno intestinal en metano, sustancia que disminuye el tránsito intestinal (Jalanka 2014).

El sobrecrecimiento bacteriano intestinal también se ha propuesto como un posible factor en la etiología del SII. Puede dar como resultado la sobreproducción de gas en el intestino delgado mediante la degradación de carbohidratos, contribuyendo a la sintomatología del SII. Las bacterias más comunes aisladas en este cuadro son *E. coli*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Bacteroides* y *Enterococcus* (Walsh et al. 2014).

### 5.1.3. Cáncer colorrectal (CCR)

El cáncer colorrectal (CCR) es la tercera causa de muerte por cáncer en el mundo, y aunque no se ha identificado un único microorganismo causante, se sabe que la microbiota intestinal juega un importante papel en su desarrollo (Walsh et al. 2014). Se cree que los componentes de la microbiota intestinal generan genotoxicidad produciendo alteraciones genéticas y epigenéticas (Biedermann y Rogler 2015).

La carcinogénesis se asocia a la microbiota mediante dos rutas:

Directa. Los patógenos colonizan el epitelio e interactúan con el sistema inmune innato a través de la unión de las partículas antigénicas con los receptores de reconocimiento de patrones (PRR). Por ejemplo, *Helicobacter pylori* es considerado un carcinógeno de clase I por la IARC (Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer), causante de cáncer gástrico y linfoma MALT, y *Salmonella typhi* se asocia a cáncer de vesícula. Además se ha evidenciado una disminución de las bacterias productoras de butirato (Tabla 3) y un aumento de la incidencia de bacterias oportunistas en el cáncer colorrectal (Walsh et al. 2014), incluyendo *Streptococcus bovis*, *Fusobacterium nucleatum*, *H. pylori*, *Coriobacteriales* y *Bacteroides fragilis enterotoxigénico* (Hullar, Burnett-Hartman, y Lampe 2014).

Un análisis mediante la secuenciación del 16S rRNA de la microbiota colorrectal, ha revelado un aumento de la presencia del género *Fusobacterium* en tejidos tumorales (Tabla 3), incluyendo *F. nucleatum*, *F. mortiferum* y *F. necrophorum*, lo que sugiere su contribución a la tumorigénesis mediante un mecanismo inflamatorio, ya que la inflamación crónica es un factor de riesgo para el desarrollo del CCR (Guinane y Cotter 2013). También se ha demostrado en un modelo animal que la mono-colonización con *E. coli* NC101 promueve la aparición de CCR. Identificando y delecionando los genes de esta bacteria que pertenecen a la llamada isla genotóxica, se reduce la progresión e invasión del tumor (Biedermann y Rogler 2015).

A medida que progresa el tumor, el microambiente que lo rodea es cada vez más anaerobio, y más susceptible a la infección. Pero lo que no está claro aún es si el tumor

crea ese ambiente ideal para los patógenos, o son los patógenos los que preceden al carcinoma. Según el último mecanismo, los microbios infectan la mucosa intestinal, resultando en una inflamación local crónica, con la consiguiente proliferación celular, producción de citoquinas y lesión del ADN por aumento de las especies reactivas de oxígeno. Este daño del ADN se va acumulando en las células infectadas, así como las adyacentes, apareciendo mutaciones en genes supresores tumorales y oncogenes que dan lugar a cambios morfológicos que eventualmente progresan hacia un tumor maligno (Hullar, Burnett-Hartman, y Lampe 2014).

Indirecta. La microbiota intestinal influye en la tumorigénesis mediante dos mecanismos, produciendo metabolitos a partir de fuentes exógenas, como la dieta, o induciendo la exposición de componentes endógenos en la circulación, como hormonas esteroideas o ácidos biliares (Hullar, Burnett-Hartman, y Lampe 2014).

Respecto a los metabolitos producidos cabe destacar el sulfuro de hidrógeno, producido por bacterias reductoras de sulfato, en su mayoría *Delta-Proteobacteria*, y que ha demostrado tener efectos citotóxicos y genotóxicos. Otro metabolito producido por la microbiota es el nitrito, que interacciona con compuestos orgánicos para formar compuestos con el grupo NO capaces de formar aductos de ADN e inducir mutaciones. La concentración de estos compuestos está influenciada por la dieta, existiendo un aumento del riesgo de cáncer de colon asociado al consumo de carne roja y procesada, ya que ésta aumenta la cantidad de residuos nitrogenados.

Por el contrario, hay ciertas bacterias como *Enterococcus faecium* o *Lactobacillus mucosae* involucradas en el metabolismo de flavonoides, agentes presentes en los alimentos de origen vegetal con efectos anticancerígenos (propiedad antioxidante) (Hullar, Burnett-Hartman, y Lampe 2014). Además la microbiota favorece el paso de componentes endógenos a la circulación sistémica. Las bacterias colónicas pertenecientes al género *Clostridium* son capaces de producir ácido desoxicólico, un ácido biliar secundario implicado en la formación de cálculos biliares y la carcinogénesis colorrectal. Otro ejemplo es la asociación del cáncer de mama con la exposición a estrógenos, proceso favorecido por la microbiota intestinal, que puede aumentar los niveles de estas hormonas mediante la desconjugación o bien afectar a la composición (o tipos) de hormonas circulantes (hidroxilación/deshidroxilación y metilación/desmetilación) (Hullar, Burnett-Hartman, y Lampe 2014).

Otro factor microbiano implicado en el CCR es la presencia de biofilms bacterianos invasivos en la mucosa intestinal, presentes en el 89% de los tumores del colon derecho y en el 12% de los tumores del colon izquierdo. Los biofilms bacterianos se asocian a una disminución de E-cadherina de las células colónicas, lo que produce un aumento de la permeabilidad epitelial, y un aumento de IL-6 y Stat3, una citoquina pro-inflamatoria y su efector final, que inducen el desarrollo de CCR mediante el aumento de la proliferación celular, la disminución de la apoptosis y/o la angiogénesis (Dejea et al. 2014).

#### 5.1.4. Infección por *Clostridium difficile*

La infección por *Clostridium difficile* es el mejor ejemplo de enfermedad desarrollada como resultado de la alteración de la microbiota intestinal, y en la que el tratamiento, basado en la manipulación microbiana (trasplante de microbiota), ha demostrado ser muy efectivo (Shreiner, Kao, y Young 2015). La colitis inducida por la *Clostridium difficile* es una de las enfermedades infecciosas del tracto GI emergentes en los pacientes ancianos, y aparece como una grave complicación del uso de antibióticos y la hospitalización prolongada. Además tiene un carácter recurrente, y el propio desarrollo de recurrencias aumenta la resistencia a los antibióticos después de cada episodio (Konturek et al. 2015).

*Clostridium difficile* produce una inflamación intestinal que puede dar lugar desde una diarrea, hasta una colitis pseudomembranosa o incluso una colitis fulminante. Uno de los principales agentes implicados en la patogénesis es la alteración de la microbiota y la disminución de la diversidad (Tabla 3). Esta alteración es producida por numerosos factores como el uso de antibióticos, la edad mayor de 65 años, la larga hospitalización y otros medicamentos como los inhibidores de la bomba de protones (Konturek et al. 2015).

#### 5.1.5. Obesidad y Síndrome metabólico

Actualmente hay una pandemia mundial de obesidad (Biedermann y Rogler 2015). Es un trastorno complejo de causa multifactorial, resultado de un desequilibrio prolongado entre el consumo y el gasto energético (Walsh et al. 2014). La dieta moderna, basada en alimentos de alta energía y el sedentarismo son los mayores factores contribuyentes (Walsh et al. 2014), pero se ha visto también que la microbiota tiene un papel muy importante (Guinane y Cotter 2013) en el desarrollo de la obesidad y en la resistencia a la insulina (Villanueva-Millán, Pérez-Matute, y Oteo 2015).

Recientemente, ha surgido un gran interés en la posible implicación de la microbiota intestinal en el aumento de la prevalencia de obesidad, existiendo una evidencia creciente de la importante contribución de los microorganismos en la respuesta del huésped a los nutrientes y en la regulación del peso corporal (Devaraj, Hemarajata, y Versalovic 2013). Todavía no está claro el mecanismo, pero se sabe que las alteraciones en la microbiota y en la permeabilidad intestinal inducen un estado inflamatorio típico de la obesidad (Tabla 4) (D'Argenio y Salvatore 2015).

Las bacterias intestinales y las arqueas influyen en la expresión de genes involucrados en el metabolismo energético, favoreciendo la absorción de nutrientes, la integridad de la barrera mucosa, el metabolismo xenobiótico, la angiogénesis y la maduración intestinal. Además, las bacterias pueden mediar cambios hormonales, modulando la saciedad y la extracción de energía, o induciendo un estado crónico de inflamación (Biedermann y Rogler 2015). Estudios recientes han demostrado que la microbiota promueve la absorción de monosacáridos en el intestino y que induce la lipogénesis hepática del huésped (Devaraj, Hemarajata, y Versalovic 2013). Además Cani et al. postularon otro mecanismo según el cual el lipopolisacárido de las bacterias Gram

negativas residentes en el intestino pueden ser el desencadenante del aumento de la inflamación observada en el síndrome metabólico (Devaraj, Hemarajata, y Versalovic 2013).

En pacientes obesos se observa una diversidad microbiana disminuida, así como un aumento en la relación *Firmicutes/Bacteroidetes* (Donaldson, Lee, y Mazmanian 2016) y un aumento de *Actinobacteria* (Biedermann y Rogler 2015). Verdam et al. demostraron también el aumento de *Clostridium* cluster XIVa (filo *Firmicutes*), que incluye bacterias productoras de butirato como *Faecalibacterium prausnitzii*, estimulante de una respuesta antiinflamatoria. En niños obesos se ha visto una disminución de *Bacteroidetes vulgatus*, un aumento de *Lactobacillus* spp y un aumento de bacterias aerotolerantes que generan productos fácilmente convertibles en AGCC (Villanueva-Millán, Pérez-Matute, y Oteo 2015). Tabla 4.

La relación entre la alteración de la microbiota y la patogenia de la obesidad se demuestra con estudios animales en los que se ha visto que el trasplante de la microbiota intestinal, desde ratones obesos a ratones libres de gérmenes, produce un aumento del peso en estos últimos. Otra demostración es que la terapia con vancomicina produce una disminución de la sensibilidad periférica a la insulina en pacientes con síndrome metabólico (Konturek et al. 2015).

La manipulación de la microbiota intestinal puede ser una estrategia terapéutica importante en la regulación del balance energético en individuos obesos, diabéticos o con síndrome metabólico (Devaraj, Hemarajata, y Versalovic 2013).

#### 5.1.6. Diabetes Mellitus tipo II (DM-II)

La Diabetes Mellitus tipo II es una enfermedad metabólica relacionada principalmente con la obesidad y la resistencia a la insulina, ambas influenciadas por factores genéticos y ambientales (Guinane y Cotter 2013). En los últimos años se han realizado numerosos estudios que han evidenciado una alteración en la microbiota de los pacientes diabéticos (Walsh et al. 2014).

En un estudio realizado mediante la secuenciación del 16S rRNA en pacientes diabéticos, se ha demostrado una disminución de *Firmicutes*, específicamente la clase *Clostridia*, y un aumento de *Bacteroidetes* y la clase *Betaproteobacteria* (Tabla 4). También cabe destacar otro estudio metagenómico en el que se ha identificado un moderado grado de disbiosis en pacientes diabéticos y un aumento de ciertos patógenos oportunistas, como *Clostridium* spp., *Akkermansia muciniphilia*, *Bacteroides* spp. y *Desulfovibrio* spp. (Guinane y Cotter 2013). Estos estudios proporcionan numerosos marcadores que podrían ayudar en la identificación de pacientes con DM-II mediante el análisis de muestras fecales (Walsh et al. 2014).

### *5.1.7. Enfermedad cardiovascular (ECV)*

Se ha identificado un mayor de riesgo de desarrollar enfermedad coronaria y eventos cerebrovasculares en presencia de una alteración de la microbiota intestinal, específicamente en mujeres con EII, indicando la existencia de una relación entre el intestino y el sistema CV. Esta relación se debe a dos causas: la alteración de la función de la barrera intestinal, que induce el paso de productos bacterianos a la circulación, contribuyendo al desarrollo de aterosclerosis, así como de insuficiencia cardíaca (Biedermann y Rogler 2015); Y, por otro lado, el aumento del metabolismo microbiano de la fosfatidilcolina de la dieta, produciendo trimetilamina-n-oxidasas (TMAO) (Tabla 4), un metabolito pro-aterosclerótico que aumenta el riesgo de CV (Shreiner, Kao, y Young 2015).

### *5.1.8. Enfermedades hepáticas*

Uno de los descubrimientos más importantes de los últimos años es el profundo impacto producido por el desequilibrio de la microbiota intestinal en la función del hígado, vía eje microbiota-hígado. Una de las consecuencias de la disbiosis es el “Síndrome del intestino permeable”, caracterizado por un aumento de permeabilidad intestinal y de los microbios que pasan a su través, produciendo endotoxemia metabólica y con ello un bajo grado de inflamación. Consecuentemente, se produce un aumento de las citoquinas pro-inflamatorias en el hígado o páncreas. El síndrome del intestino permeable y la disbiosis se han relacionado con el desarrollo de la enfermedad hepática no alcohólica, la esteatohepatitis no alcohólica, la diabetes mellitus y el síndrome metabólico (Konturek et al. 2015).

La enfermedad por hígado graso no alcohólico se ha convertido en la enfermedad hepática crónica más común, cuyo factor más importante en el desarrollo y progresión es el mal funcionamiento del eje intestino-hígado (disbiosis intestinal, disminución del número de bacterias, aumento de la permeabilidad...) (Tabla 4) (Villanueva-Millán, Pérez-Matute, y Oteo 2015).

Otra implicación de la microbiota es en el desarrollo de encefalopatía hepática como complicación de la cirrosis. El daño en la función hepática junto con la presencia de shunts portosistémicos, permiten que los metabolitos tóxicos producidos por la microbiota intestinal evadan el catabolismo hepático y crucen la barrera hemato-encefálica, produciendo toxicidad cerebral, y constituyendo la encefalopatía hepática (Donaldson, Lee, y Mazmanian 2016).

Además la microbiota también participa en el desarrollo de cáncer de hígado, tanto de forma directa como indirecta. De forma directa mediante el paso de los productos bacterianos a través de la barrera intestinal a la vena porta, contribuyendo a la senescencia de las células estrelladas. Y de forma indirecta mediante su implicación en el desarrollo del síndrome metabólico y la esteatohepatitis no alcohólica (Biedermann y Rogler 2015).

#### 5.1.9. Enfermedad reumática

Hay gran evidencia de que la microbiota intestinal contribuye al desarrollo de las enfermedades reumáticas. La fisiopatología de estas enfermedades se basa en la interacción entre los factores de riesgo genéticos y ambientales. Las enfermedades reumáticas comparten loci de riesgo comunes con el Síndrome del Intestino Irritable como PTPN2 o PTPN22. En pacientes con enfermedades reumáticas se ha visto una disminución de *Bifidobacteria* (Tabla 4), bacterias del grupo *Bacteroides-Porphyromonas-Prevotella*, del subgrupo *Bacteroides fragilis* y del grupo *Eubacterium rectale-Clostridium coccoides* (Biedermann y Rogler 2015).

#### 5.1.10. Alergias y enfermedades atópicas

Las bacterias intestinales sirven como un “entrenamiento” del sistema inmunitario durante la infancia, por lo que la interacción entre estos dos componentes es muy importante en la prevención de enfermedades atópicas y alergias. A pesar de que se han identificado alteraciones en la microbiota de niños alérgicos, no se ha encontrado una microbiota específica como factor de riesgo. Se ha visto, por ejemplo, que los niños colonizados por clase *Clostridia* (Tabla 4), con aumento de *Clostridium* cluster IV y XVIa (típicamente abundantes en adultos), tienen un riesgo aumentado de dermatitis atópica en los siguientes 6 meses (Biedermann y Rogler 2015). Otro ejemplo es la disminución de la diversidad microbiana presente en el asma infantil durante el primer mes de vida (Donaldson, Lee, y Mazmanian 2016).

Por otro lado, se han identificado genes de riesgo en pacientes atópicos, incluidos numerosos genes relevantes en la función de barrera de la piel, indicando de nuevo el papel de las bacterias en este proceso. Además, ciertos factores como tener hermanos mayores y el tipo de parto influyen la composición de la microbiota intestinal y modulan el riesgo de atopía (Biedermann y Rogler 2015).

#### 5.1.11. Enfermedades psiquiátricas

Las interacciones de la microbiota con el cerebro constituyen una interesante área de investigación que podría contribuir a nuevos conocimientos sobre las predisposiciones individuales en la cognición, la personalidad, el estado de ánimo, el sueño y la conducta alimentaria. Esta interacción puede ayudar a comprender numerosas enfermedades neuropsiquiátricas como trastornos afectivos, autismo, depresión o esquizofrenia (Konturek et al. 2015). El periodo postnatal representa un periodo crítico en el desarrollo cerebral, influenciado por el desarrollo de una buena comunicación entre el intestino y el cerebro, que contribuye al riesgo de desarrollar enfermedades mentales (Luna y Foster 2015).

Ejemplos de relación entre la microbiota y las enfermedades psiquiátricas son el aumento de *Oscillibacter* y *Alistipes* en la depresión, y el aumento de *Lachnospiraecae* spp., de *Sutterella* spp. y *Ruminococcus torques* en el autismo (Jalanka 2014) (Tabla 4).

La dieta, los cambios en el estilo de vida y el ejercicio físico modifican la microbiota intestinal, influenciando así el eje intestino-cerebro y con ello el comportamiento, pudiendo producir trastornos como ansiedad y depresión (Luna y Foster 2015). Una prueba aleatoria desmostró que en mujeres que habían recibido un suplemento con bifidobacterias, se producían cambios significativos en el rendimiento laboral y la actividad de las regiones cerebrales importantes para el procesamiento de emociones y sensaciones (Biedermann y Rogler 2015). Por otro lado, se ha visto que la alimentación a largo plazo con dieta rica en grasa aumenta el comportamiento ansioso y depresivo en ratones, mientras que el tratamiento con probióticos puede reducir el estrés crónico, inducido por una plasticidad cerebral anormal y una disminución de la neurogénesis (Luna y Foster 2015).

## 6. MANIPULACIÓN DE LA MICROBIOTA

Hay una evidencia creciente de la implicación de la microbiota en la salud y la enfermedad intestinal. La modulación de la microbiota intestinal ha ganado un considerable interés como estrategia terapéutica para el tratamiento de diferentes enfermedades.

Dentro de las técnicas de manipulación de la microbiota hay una gran variedad de opciones (Figura 4), tales como los cambios en la alimentación (incluyendo el uso de prebióticos), el uso de antimicrobianos, el uso de probióticos y el trasplante de microbiota fecal (Walsh et al. 2014).



**Figura 4.** Estrategias en la manipulación de la microbiota intestinal (Walsh et al. 2014)

## 6.1. Alimentación

Los factores medioambientales, entre los que se incluye la dieta, juegan un papel muy importante en la modificación de la composición de la microbiota intestinal. Gracias a dicha implicación, podemos llegar a la conclusión de que modificando la alimentación, se puede conseguir un beneficio potencial para la salud.

La cantidad, el tipo y el equilibrio de los principales componentes de la dieta, es decir, proteínas, carbohidratos y grasas, tienen un gran impacto en la microbiota intestinal y varía considerablemente en función de la geografía, disponibilidad de alimentos, cultura y edad, entre otros (Walsh et al. 2014). Como mencionamos en el apartado “4.5.1. *Función metabólica*” de la microbiota intestinal, los ácidos grasos de cadena corta (AGCC), principalmente butirato, propionato y acetato, son los productos finales de la degradación de los hidratos de carbono y proteínas por los microbios intestinales. Los AGCC abarcan una amplia gama de efectos fisiológicos en el huésped, siendo el más importante, su oxidación por las células de la mucosa para proporcionar energía.

Durante los últimos años se han realizado numerosos estudios sobre la influencia de la alimentación en la composición de la microbiota intestinal (Tabla 5).

**Tabla 5.** Influencia de la alimentación en la microbiota intestinal

<b>Dieta</b>	<b>Efecto sobre la microbiota</b>	<b>Efecto sobre la persona</b>
Rica en polisacáridos derivados de las plantas	Aumento de <i>Bacteroidetes</i> , disminución de <i>Firmicutes</i> Asociación con enterotipo rico en <i>Prevotella</i> y <i>Xylanibacter</i>	Tránsito intestinal más rápido en comparación con dieta rica en proteínas y grasas animales
Omnívora en comparación con vegetariana y lacto-vegetariana	Aumento de <i>Clostridium</i> clusters IV y XIVa	No reportado
Rica en grasas e hidratos de carbono simples, “dieta occidental”	Aumento de <i>Firmicutes</i> , disminución de <i>Bacteroidetes</i>	Obesidad inducida por dieta. El posterior trasplante de la microbiota de obesos a ratones libres de gérmenes aumenta la adiposidad
Ingesta reducida de hidratos de carbono	Disminución de <i>Bifidobacterium</i> , <i>Roseburia</i> spp. y <i>Eubacterium rectale</i>	No reportado
Productos de origen animal. Alto contenido en proteínas y grasas animales	Aumento de diversidad y bacterias tolerantes a la bilis, incluyendo <i>Bacteroides</i> . Disminución de <i>Firmicutes</i> . Asociación con enterotipo rico en <i>Bacteroides</i>	Disminución de peso independiente de las calorías consumidas
Pobre en frutas, verduras y pescado	Reducción de la riqueza en genes microbianos	Aumento de la resistencia a la insulina, los niveles de triglicéridos en suero en ayunas, el colesterol LDL y la inflamación
Variedad reducida debido a cuidados de larga duración	Aumento de <i>Bacteroidetes</i> y reducción de la diversidad total	Aumento de la fragilidad y disminución de la salud
Cambio de una dieta vegetariana a una dieta normal	Disminución de <i>Prevotella</i> , aumento de <i>Bacteroides</i>	No reportado

Adaptado de: Walsh et al. 2014

Uno de los estudios fue realizado con niños de Burkina Faso, alimentados a base de una dieta rica en vegetales y pobre en grasas y proteínas animales. Se observó un aumento de *Bacteroidetes* en relación con una disminución de *Firmicutes*, además de una gran cantidad de *Prevotella* y *Xylanibacter*, en comparación con niños Europeos con una dieta variada. El género *Xylanibacter* (ausente en los niños europeos) contiene genes para la hidrólisis de xilano y celulosa, planteando la hipótesis de que los niños de Burkina Faso, tienen una microbiota intestinal específica que les ayuda a aumentar la energía extraída de fibra dietética, además de conferirles protección contra la inflamación y las enfermedades del colon no infecciosas (De Filippo et al. 2010).

Otro estudio, investigó el efecto de dieta compuesta exclusivamente por productos de origen animal en la microbiota intestinal, demostrando que produce un aumento del número de bacterias tolerantes a la bilis y una disminución del número de *Firmicutes* (contribuyentes a la degradación de los polisacáridos de las plantas) (Walsh et al. 2014).

Por otro lado, un estudio publicado recientemente observó que la cantidad de calorías consumidas también influyen en la composición microbiana, es decir, la microbiota no sólo se afecta por la cantidad de grasa de la dieta, sino también por el número de calorías consumidas. Este estudio también demostró que los ratones con una alimentación baja en grasa unida a una restricción de calorías, envejecían más saludables y tenían una mayor esperanza de vida (Walsh et al. 2014).

#### 6.1.1. Prebióticos

Otro aspecto a destacar es el uso de prebióticos, compuestos de hidratos de carbono presentes en la dieta, no digeribles, que estimulan el crecimiento o la actividad de los microorganismos autóctonos, resultando en un beneficio para la salud. La mayoría son oligo o polisacáridos de fructosa o de galactosa, y su objetivo principal es favorecer el desarrollo de bifidobacterias, capaces de degradar glúcidos complejos, con lo que se inhibe el desarrollo de microorganismos foráneos y se contribuye a la recolonización de la mucosa, por ejemplo, tras un tratamiento con antibióticos (Suárez 2013). Además se utilizan como agentes laxantes, debido a su capacidad de aumentar el peristaltismo, y en la prevención y tratamiento de la encefalopatía hepática (Walsh et al. 2014). Este último efecto se debe a que la fermentación de los prebióticos genera ácidos grasos que neutralizan los grupos amonio generados por la desaminación de diversos nutrientes, como los aminoácidos (Suárez 2013).

## 6.2. Antimicrobianos

La manipulación de la microbiota intestinal mediante el uso de antimicrobianos se está convirtiendo en una estrategia terapéutica atractiva. El éxito de estas terapias depende del espectro de cada antimicrobiano, pero hay que tener en cuenta que aquellos con amplio espectro pueden producir consecuencias indeseables como la progresión de resistencias, un grave problema sanitario presente actualmente (Walsh et al. 2014).

El efecto de un antibiótico en la microbiota intestinal está influenciado por varios factores, incluyendo su efecto antimicrobiano (bactericida o bacteriostático), su mecanismo de acción, la distribución de genes de resistencia a antibióticos en la población y la estructura de la microbiota (Pérez-Cobas et al. 2013). Debido a los efectos indeseables de los antibióticos de amplio espectro sobre la microbiota intestinal, se puede deducir el beneficio conseguido al utilizar antibióticos de espectro reducido.

La microbiota intestinal tiene la capacidad de producir bacteriocinas, péptidos antimicrobianos sintetizados en el ribosoma de ciertas bacterias, capaces de producir una respuesta inmune (Guinane y Cotter 2013). Las bacteriocinas, al tener un espectro reducido, se emplean para inhibir el crecimiento de bacterias similares, obteniendo una baja toxicidad y alta potencia (Walsh et al. 2014). Además tienen la ventaja de producir el efecto *in situ*, evitándose así la degradación a lo largo del tracto GI y la necesidad de ser encapsulado. Se ha demostrado que las bacteriocinas son útiles en el control de patógenos GI *in vivo*, incluyendo *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Campylobacter jejuni* y *C. difficile* (Guinane y Cotter 2013), y en el control del metabolismo (Tabla 6) (Walsh et al. 2014).

En la Tabla 6, podemos ver varios ejemplos de la manipulación microbiana con antimicrobianos para el control de microorganismos patógenos y el control del metabolismo del huésped. El uso de la bacteriocina thuricin CD de espectro reducido inhibe el crecimiento de *Clostridium difficile* exclusivamente, lo que proporciona un claro beneficio en comparación con antibióticos de amplio espectro (Walsh et al. 2014). Una bacteriocina que también ha demostrado beneficio sobre la microbiota intestinal es la Abp118, producida por *Lactobacillus salivarius* UCC 118, que protege de la infección por *Listeria monocytogenes* y tiene efectos en el metabolismo, reduciendo el peso corporal.

**Tabla 6.** Manipulación de la microbiota intestinal mediante el uso de diferentes antimicrobianos y efectos sobre el huésped

ANTIMICROBIANO	EFEECTO SOBRE LA MICROBIOTA	EFEECTO SOBRE LE HUÉSPED
Thuricin CD (bacteriocina)	Elimina <i>C. difficile</i> sin alterar la composición microbiana total	No examinado
Abp118 (bacteriocina)	Protege de la infección por <i>Listeria monocytogenes</i> . Aumenta <i>Bacteroidetes</i> y <i>Proteobacteria</i> , disminuye <i>Actinobacteria</i>	Reduce la ganancia de peso en los cerdos temporalmente
Vancomicina	Disminución de <i>Firmicutes</i> y <i>Bacteroidetes</i> , aumento de <i>Proteobacteria</i>	Reduce la ganancia de peso, los niveles de glucosa en ayuno, el TNF $\alpha$ y los TAGS en plasma en ratones con obesidad inducida por la dieta
Penicilina y/o Vancomicina o clortetraciclina (sub-terapéutico)	Aumento de <i>Firmicutes</i> ( <i>Lachnospiraceae</i> ) en relación con <i>Bacteroidetes</i>	Aumento de la densidad mineral ósea y la adiposidad en ratones
Mezcla de 5 cepas probióticas	Reducción de <i>Salmonella</i> Typhimurium entérica en cerdos	Reducción de la incidencia, gravedad y duración de la diarrea en cerdos y aumento de peso
<i>Lactobacillus gasseri</i> SBT2055	No examinado	Disminución de la adiposidad abdominal, peso corporal, IMC, circunferencia de la cadera, niveles de TAGs, y reducción de la expresión de genes relacionados con la lipogénesis y pro-inflamatorios

Adaptado de: Walsh et al. 2014

Otro antimicrobiano con efectos sobre la microbiota y el metabolismo es la vancomicina oral (Tabla 6). Un estudio observó que la suplementación de una dieta rica en grasa con vancomicina producía una disminución significativa de *Firmicutes* y

*Bacteroidetes*, un aumento de *Proteobacteria* y una disminución marcada en el aumento de peso, la glucemia en ayunas, el TNF $\alpha$  en plasma y los triglicéridos, en comparación con controles con obesidad inducida por la dieta (Walsh et al. 2014) (Guinane y Cotter 2013).

### **6.3. Probióticos**

Los probióticos han sido definidos por la OMS como microorganismos vivos que cuando se administran en cantidades adecuadas confieren un beneficio para la salud del huésped. Cada vez está más extendido el uso de probióticos para modular la microbiota intestinal. En la práctica pertenecen fundamentalmente a dos grupos microbianos: lactobacilos y bifidobacterias, probablemente los únicos inocuos bajo cualquier circunstancia (Suárez 2013).

Los simbióticos son mezclas de probióticos y prebióticos que generan una acción saludable sinérgica (Suárez 2013).

#### *6.3.1. Condiciones para su uso. Funciones*

Los probióticos requieren una serie de condiciones para poder ejercer su efecto beneficioso: adaptación a las condiciones del tracto GI, buena adherencia al epitelio, generación de sustancias antimicrobianas, ausencia de resistencias a antibióticos transmisibles, y sobre todo, ensayos clínicos que certifiquen sus buenas propiedades (Suárez 2013). En cuanto a sus funciones, se clasifican en tres niveles según la localización y método (Walsh et al. 2014):

- Interferencia con el crecimiento o supervivencia de los microorganismos patógenos de la luz intestinal
- Aumento de la función de la barrera mucosa o el sistema inmune de la mucosa
- Influencia más allá del intestino: sistema inmune sistémico y otros órganos.

Por ejemplo, un estudio reveló que los ratones con obesidad inducida por la dieta, tratados con *Lactobacillus curvatus* HY7601 y *Lactobacillus plantarum* KY1032 sufrieron cambios como la disminución de ganancia de peso y acumulación de grasa, disminución de insulina plasmática, leptina, colesterol total y biomarcadores de toxicidad hepática, en comparación con aquellos tratados con placebo. Otro estudio demostró que el tratamiento con probióticos puede prevenir y tratar la obesidad y la diabetes a través de la modulación de la microbiota. Se observó un aumento del número de bacterias productoras de butirato, relacionado con un aumento de la secreción de la hormona reductora del hambre GLP-1 (péptido similar al glucagón,

estimula la secreción de insulina), así como la regulación positiva de genes implicados en la síntesis y excreción de GLP-1 (Walsh et al. 2014).

### *6.3.2. Beneficios*

El uso de probióticos para restaurar la microbiota intestinal, ha dado resultados prometedores en el tratamiento de enfermedades como CU, obesidad, infección por *C. difficile*, SII y alergias, entre otras (Guinane y Cotter 2013). Los probióticos proporcionan múltiples beneficios en el tracto GI (Suárez 2013):

- Disminución de síntomas GI: un ejemplo típico es la resolución de la intolerancia a la lactosa con el uso de lactobacilos, que la degradan e impiden que llegue sin digerir al intestino grueso, y con ello que aparezcan los síntomas característicos de flatulencia, distensión abdominal y diarrea, entre otros.
- Reposición de la microbiota: reversión de la diarrea causada por el tratamiento con antibióticos o por rotavirus en niños. El organismo probiótico recubre la mucosa que había quedado desierta constituyendo una solución de emergencia que atenúa los síntomas y facilita la recolonización.
- Otros: tratamiento de enterocolitis necrotizante, típica de niños prematuros, EI y colitis pseudomembranosa.

## **6.4. Trasplante de microbiota fecal (TMF)**

El TMF es un tratamiento para restaurar la composición microbiana normal del intestino mediante la introducción de microbiota fecal obtenida de un donante sano en el tracto gastrointestinal de un individuo enfermo (Matsuoka et al. 2014).

### *6.4.1. Metodología*

A pesar del aumento de la aplicación del TMF, no hay un protocolo estandarizado y todavía se considera prematuro en cuanto a mecanismo de acción y consecuencias (Konturek et al. 2015). La eficacia del procedimiento varía según múltiples factores como la selección del donante, la preparación del material fecal, la preparación del receptor y la ruta de administración, entre otros (Matsuoka et al. 2014).

**Tabla 7.** Metodología del trasplante de microbiota fecal.

<b>METODOLOGÍA DEL TRASPLANTE DE MICROBIOTA FECAL</b>	
Selección del donante	Cónyuge, familiar, amigo o voluntarios sanos
Preparación de las heces	Frescas o preservadas. Individuales o agrupadas
Preparación	Con o sin preparación intestinal, inhibidores bomba de protones, y antibióticos
Ruta de administración	Nasogástrica, esofagogastroduodenoscopia, colonoscopia, enema rectal
Indicaciones	Infección por <i>C.difficile</i> , Colitis ulcerosa, enf. Crohn, SII, diabetes mellitus, trastornos autoinmunes, enf. Cardiovasculares, alergia

Adaptado de: Matsuoka et al. 2014

Selección del donante. El primer paso incluido en el proceso es la selección del donante de heces. Cada donante debe ser estudiado en profundidad, ya que el mayor factor de riesgo es la transmisión de agentes infecciosos. Se requiere información sobre enfermedades infecciosas actuales o pasadas, viajes, hábitos sexuales, hábitos de defecación, terapias antibióticas recientes (criterio de exclusión), uso de medicamentos inmunosupresores y exposición a VIH o hepatitis, además de historia de enfermedades inflamatorias, autoinmunes, alérgicas, metabólicas o malignas (Konturek et al. 2015). Además se requiere un análisis de sangre y heces para excluir posibles enfermedades transmisibles (Matsuoka et al. 2014).

Habitualmente se seleccionan como donantes personas cercanas al paciente o voluntarios sanos (Tabla 7). Sin embargo, se ha visto una mayor eficacia del tratamiento utilizando donantes voluntarios sanos, ya que producen modificaciones más significativas al no compartir aspectos ambientales o genéticos con el paciente y, además, proporcionan mayor flexibilidad en la elección (Matsuoka et al. 2014). Además se ha visto que el TMF directo de familiares o conocidos tiene una mayor incidencia de infecciones víricas que el de donantes voluntarios sanos (Weil y Hohmann 2015).

Una aplicación interesante del TMF es el uso de comunidades microbianas sintéticas, que tienen la ventaja de que son controladas, asegurando la ausencia de virus y patógenos, y son reproducibles (Walsh et al. 2014).

Preparación de la muestra. Habitualmente las heces se recogen el día del trasplante y se conservan en agua o solución salina (Tabla 7). Se homogenizan y se filtran para obtener una suspensión líquida (Gupta, Allen-Vercoe, y Petrof 2016) (Matsuoka et al. 2014). La cantidad efectiva de heces requeridas es entre 50-100 g, en preparación fresca o congelada (Konturek et al. 2015).

Ruta de administración. El material obtenido puede ser introducido en el tracto gastrointestinal del receptor por diferentes rutas: vía nasogástrica, vía nasoyeyunal, esofagogastroduodenoscopia, colonoscopia o enema rectal (Tabla 7) (Gupta, Allen-Vercoe, y Petrof 2016). La elección de la vía de administración dependerá del tipo de enfermedad y la región anatómica afectada (Matsuoka et al. 2014).

- Colonoscopia: es el método más utilizado, el preferido por los pacientes y posiblemente el de mayor eficacia, además permite la evaluación directa del intestino para descartar otras patologías. La desventaja es el alto coste, la necesidad de sedación y los riesgos de complicaciones.
- Vía nasogástrica / nasoyeyunal: es mínimamente invasiva y muy barata, pero tiene la desventaja de que aumenta el riesgo de aspiración y vómitos.
- Gastroscoopia y enteroscopia: no tienen riesgo de aspiración y vómitos, pero son métodos invasivos, requieren sedación y se asocian con altos costes.
- Heces en cápsulas: no es invasivo, y minimiza los riesgos y costes de la endoscopia. La efectividad necesita ser demostrada en futuros estudios (Konturek et al. 2015).

Preparación del receptor. Depende de la ruta de administración utilizada (Tabla 7). Si se realiza mediante colonoscopia, el receptor del trasplante toma previamente antibióticos para eliminar las bacterias pre-existentes y así permitir que la microbiota del donante colonice el intestino con efectividad. Si el método utilizado es la sonda nasogástrica es necesaria la administración de inhibidores de la bomba de protones, para aumentar la supervivencia de las bacterias trasplantadas. Además se requiere loperamida para retener la solución fecal en el intestino (Matsuoka et al. 2014).

#### 6.4.2. Aplicaciones

La primera aplicación terapéutica del TMF se produjo en 1958 para una colitis pseudomembranosa (Matsuoka et al. 2014). Es un método muy efectivo en el tratamiento de la infección por *C. difficile* refractaria y previene en un 90% las recurrencias (Konturek et al. 2015). Además el TMF parece ser una terapia prometedora en pacientes con EII, SII, obesidad y síndrome metabólico, enfermedades cardiovasculares, púrpura trombocitopénica idiopática e incluso esclerosis múltiple (Tabla 7) (Walsh et al. 2014).

Infección por *Clostridium difficile*. Es una enfermedad que muestra un carácter recurrente, y el desarrollo de recurrencias aumenta la resistencia a los antibióticos. La terapia inicial se basa en antibióticos como metronidazol o vancomicina, pero falla en un 19-30% de los casos. Recientemente se ha introducido un nuevo antibiótico, la fidaxomicina, que ha demostrado una mayor efectividad frente a vancomicina en las recurrencias. A pesar de este avance, la efectividad de la terapia antibiótica después de un episodio refractario disminuye dramáticamente, por lo que es necesaria otra modalidad de tratamiento (Konturek et al. 2015).

*Clostridium difficile* crece en el colon cuando hay una disminución de la diversidad debido al tratamiento con antibióticos, por lo tanto, el TMF, cuya finalidad es reponer esa diversidad y restaurar la homeostasis intestinal, es un tratamiento ideal, con un éxito del 90% (Matsuoka et al. 2014). El TMF debe ser considerado para el tratamiento de ICD recurrente, cuando no responde a la terapia antibiótica convencional o cuando hay una alta comorbilidad y hospitalización. Para el tratamiento de la ICD moderada, está indicado cuando no hay respuesta a la terapia convencional tras 1 semana y para el tratamiento de la ICD severa, está indicado cuando no hay una respuesta tras 48 horas de terapia antibiótica a dosis plenas. La guía de tratamiento de *C. difficile* del American College of Gastroenterology también se plantea el uso de TMF como terapia alternativa para la ICD recurrente que no responde a vancomicina en régimen con reducción gradual/pulsos (Gupta, Allen-Vercoe, y Petrof 2016).

En un ensayo clínico aleatorizado se vio que la introducción de heces de donante en el duodeno de pacientes con ICD recurrente tenía una tasa de curación del 81%, en comparación con un 31% en pacientes tratados con vancomicina oral. (Gupta, Allen-Vercoe, y Petrof 2016). Un estudio demostró que sólo 1 de cada 16 pacientes tratados sufre una recurrencia de la colitis durante los 90 días siguientes al tratamiento con TMF (Walsh et al. 2014). Otro estudio comparó la microbiota de pacientes con infección por *C. difficile* antes y después del trasplante de microbiota fecal y encontró que antes del procedimiento tenía una deficiencia de *Bacteroidetes* y *Firmicutes* pero 14 días después del trasplante la microbiota había cambiado a una muy similar a la del donante, dominada por *Bacteroides* spp (Walsh et al. 2014).

Enfermedad inflamatoria intestinal. La indicación del TMF en la EII se basa en la respuesta inmune patológica a las bacterias y/o la presencia de bacterias patógenas que describen la enfermedad (Konturek et al. 2015). El TMF ha demostrado restaurar la disbiosis microbiana de los pacientes con EII, caracterizada por una reducción de la diversidad y del número de bacterias (Matsuoka et al. 2014). Todavía hay muchas cuestiones abiertas acerca del papel del TMF en el manejo del SII, como la ruta de administración, la frecuencia de aplicación, el screening del donante, la preparación de las heces, la administración de antibióticos, etc (Konturek et al. 2015).

El meta-análisis realizado por Colman et al. (Colman, Ruben J, 2014) reveló que el 45% de los pacientes conseguían una remisión clínica y reducían el consumo de medicamentos antiinflamatorios tras el trasplante. En un ensayo aleatorizado reciente se ha visto que con el tratamiento de la colitis ulcerosa mediante TMF vía nasoyeyunal se conseguía la remisión de un 30,4% de pacientes tratados con material fecal, frente a un 20% de pacientes tratados con placebo, aunque los resultados no son estadísticamente significativos (Konturek et al. 2015). Y respecto a la enfermedad de Crohn (EC), la información sobre la eficacia del TMF es limitada y solo se han reportado dos casos de éxito (Matsuoka et al. 2014).

Enfermedades metabólicas. Estudios preliminares han indicado que el trasplante de microbiota fecal podría tener un efecto beneficioso en la prevención y tratamiento de enfermedades metabólicas (Konturek et al. 2015). Recientemente, un estudio ha encontrado que la transmisión de heces desde personas delgadas a obesas aumenta la sensibilidad a la insulina, la diversidad de la microbiota intestinal y las bacterias productoras de butirato (agente activador de la gluconeogénesis) (Gupta, Allen-Vercoe, y Petrof 2016).

Trastornos gastrointestinales funcionales. Se caracterizan por la presencia de síntomas gastrointestinales con ausencia de anomalías anatómicas o bioquímicas, y parece que el TMF podría tener un efecto terapéutico en su tratamiento pero todavía queda mucho por estudiar para demostrar la eficacia. En un estudio clínico con 45 pacientes con estreñimiento crónico a los que se administró TMF, mediante colonoscopia y un posterior enema de retención, se observó una remisión inmediata de los síntomas en el 89% de los pacientes (Gupta, Allen-Vercoe, y Petrof 2016). Otro estudio administró el TMF en 13 pacientes con SII vía esofagogastroduodenoscopia y encontró una remisión en el 70% de los pacientes a los 6-18 meses (Gupta, Allen-Vercoe, y Petrof 2016).

#### 6.4.3. Efectos adversos

El TMF se considera un tratamiento seguro y bien tolerado. Los efectos secundarios más comunes son la diarrea transitoria, los cólicos abdominales y el estreñimiento. Además se incluye el riesgo de infección aguda, reacciones alérgicas y la transmisión potencial de bacterias que aumentan la predisposición a enfermedades crónicas como EII, SII, cáncer colorrectal, DMII o síndrome metabólico. El evento adverso que más preocupa es la transmisión de agentes infecciosos, por esa razón, los donantes de heces deben ser confirmados negativamente para patógenos entéricos (*Yersinia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter jejuni*, toxina de *Clostridium difficile*, *E. coli* enteropatógeno, helmintos y parásitos) y virus (hepatitis A, B y C, VIH-1 y 2) (Matsuoka et al. 2014).

Un reciente estudio ha observado el aumento de peso tras el TMF, demostrando la transferencia del fenotipo metabólico mediante la microbiota. Además algunos pacientes con EII tuvieron fiebre o bacteriemia por *E. coli* después del trasplante (Konturek et al. 2015).

## BIBLIOGRAFÍA

- Biedermann, Luc, y Gerhard Rogler. 2015. «The Intestinal Microbiota: Its Role in Health and Disease». *European Journal of Pediatrics* 174 (2): 151-67. doi:10.1007/s00431-014-2476-2.
- Colman RJ, Rubin DT. 2014. «Fecal microbiota transplantation as therapy for inflammatory bowel disease: a systematic review and meta-analysis ». *J Crohns Colitis* 2014; 8: 1569-1581.
- D'Argenio, Valeria, y Francesco Salvatore. 2015. «The role of the gut microbiome in the healthy adult status». *Neonatal Laboratory Medicine: Past and Future Decade* 451, Part A (diciembre): 97-102. doi:10.1016/j.cca.2015.01.003.
- De Filippo, Carlotta, Duccio Cavalieri, Monica Di Paola, Matteo Ramazzotti, Jean Baptiste Poullet, Sebastien Massart, Silvia Collini, Giuseppe Pieraccini, y Paolo Lionetti. 2010. «Impact of Diet in Shaping Gut Microbiota Revealed by a Comparative Study in Children from Europe and Rural Africa». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (33): 14691-96. doi:10.1073/pnas.1005963107.
- Dejea, Christine M., Elizabeth C. Wick, Elizabeth M. Hechenbleikner, James R. White, Jessica L. Mark Welch, Blair J. Rossetti, Scott N. Peterson, et al. 2014. «Microbiota Organization Is a Distinct Feature of Proximal Colorectal Cancers». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (51): 18321-26. doi:10.1073/pnas.1406199111.
- Devaraj, Sridevi, Peera Hemarajata, y James Versalovic. 2013. «The Human Gut Microbiome and Body Metabolism: Implications for Obesity and Diabetes». *Clinical Chemistry* 59 (4): 617-28. doi:10.1373/clinchem.2012.187617.
- Donaldson, Gregory P., S. Melanie Lee, y Sarkis K. Mazmanian. 2016. «Gut Biogeography of the Bacterial Microbiota». *Nature Reviews Microbiology* 14 (1): 20-32. doi:10.1038/nrmicro3552.
- Francino, M. P. 2016. «Antibiotics and the Human Gut Microbiome: Dysbioses and Accumulation of Resistances». *Antimicrobials, Resistance and Chemotherapy*, 1543. doi:10.3389/fmicb.2015.01543.

- Guinane, Caitriona M., y Paul D. Cotter. 2013. «Role of the gut microbiota in health and chronic gastrointestinal disease: understanding a hidden metabolic organ». *Therapeutic Advances in Gastroenterology* 6 (4): 295-308. doi:10.1177/1756283X13482996.
- Gupta, Shaan, Emma Allen-Vercoe, y Elaine O. Petrof. 2016. «Fecal Microbiota Transplantation: In Perspective». *Therapeutic Advances in Gastroenterology* 9 (2): 229-39. doi:10.1177/1756283X15607414.
- Hullar, Meredith A. J., Andrea N. Burnett-Hartman, y Johanna W. Lampe. 2014. «Gut Microbes, Diet, and Cancer». *Cancer Treatment and Research* 159: 377-99. doi:10.1007/978-3-642-38007-5\_22.
- Jalanka, Jonna. 2014. «Characterization of Intestinal Microbiota in Healthy Adults and the Effect of Perturbations», diciembre. <https://helda.helsinki.fi/handle/10138/136670>.
- Konturek, P. C., D. Haziri, T. Brzozowski, T. Hess, S. Heyman, S. Kwiecien, S. J. Konturek, y J. Koziel. 2015. «Emerging Role of Fecal Microbiota Therapy in the Treatment of Gastrointestinal and Extra-Gastrointestinal Diseases». *Journal of Physiology and Pharmacology: An Official Journal of the Polish Physiological Society* 66 (4): 483-91.
- Luna, Ruth Ann, y Jane A. Foster. 2015. «Gut Brain Axis: Diet Microbiota Interactions and Implications for Modulation of Anxiety and Depression». *Current Opinion in Biotechnology* 32 (abril): 35-41. doi:10.1016/j.copbio.2014.10.007.
- Matsuoka, Katsuyoshi, Shinta Mizuno, Atsushi Hayashi, Tadakazu Hisamatsu, Makoto Naganuma, y Takanori Kanai. 2014. «Fecal Microbiota Transplantation for Gastrointestinal Diseases». *The Keio Journal of Medicine* 63 (4): 69-74. doi:10.2302/kjm.2014-0006-RE.
- Mollerach, Marta. 2006. «Genómica y Proteómica: oportunidades y desafíos para la Microbiología». *Revista argentina de microbiología* 38 (1): 1-3.
- Pérez-Cobas, Ana Elena, Alejandro Artacho, Henrik Knecht, María Loreto Ferrús, Anette Friedrichs, Stephan J. Ott, Andrés Moya, Amparo Latorre, y María José Gosalbes. 2013. «Differential Effects of Antibiotic Therapy on the Structure and Function of Human Gut Microbiota». *PLoS One* 8 (11): e80201. doi:10.1371/journal.pone.0080201.

- Qin, Junjie, Ruiqiang Li, Jeroen Raes, Manimozhiyan Arumugam, Kristoffer Solvsten Burgdorf, Chaysavanh Manichanh, Trine Nielsen, et al. 2010. «A human gut microbial gene catalog established by metagenomic sequencing». *Nature* 464 (7285): 59-65. doi:10.1038/nature08821.
- Robles-Alonso, Virginia, y Francisco Guarner. 2013. «Progreso en el conocimiento de la microbiota intestinal humana». *Nutrición Hospitalaria* 28 (3): 553-57. doi:10.3305/nh.2013.28.3.6601.
- Shreiner, Andrew B., John Y. Kao, y Vincent B. Young. 2015. «The Gut Microbiome in Health and in Disease». *Current Opinion in Gastroenterology* 31 (1): 69-75. doi:10.1097/MOG.0000000000000139.
- Suárez, J. E. 2013. «Microbiota autóctona, probióticos y prebióticos». *Nutrición Hospitalaria* 28 (enero): 38-41.
- Tedjo, Danyta I., Daisy M. A. E. Jonkers, Paul H. Savelkoul, Ad A. Masclee, Niels van Best, Marieke J. Pierik, y John Penders. 2015. «The Effect of Sampling and Storage on the Fecal Microbiota Composition in Healthy and Diseased Subjects». Editado por Guido Favia. *PLOS ONE* 10 (5): e0126685. doi:10.1371/journal.pone.0126685.
- Villanueva-Millán, M. J., Patricia Pérez Matute, y José Antonio Oteo Revuelta. 2015. «Gut microbiota: a key player in health and disease. A review focused on obesity». *Journal of physiology and biochemistry* 71 (3): 509-25.
- Walker, Allan W. 2014. «Phylogeny, Culturing, and Metagenomics of the Human Gut Microbiota». *Trends in Microbiology* 22 (5): 267-74. doi:10.1016/j.tim.2014.03.001.
- Walsh, Calum J., Caitriona M. Guinane, Paul W. O'Toole, y Paul D. Cotter. 2014. «Beneficial Modulation of the Gut Microbiota». *FEBS Letters* 588 (22): 4120-30. doi:10.1016/j.febslet.2014.03.035.
- Weil, Ana A., y Elizabeth L. Hohmann. 2015. «Fecal Microbiota Transplant: Benefits and Risks». *Open Forum Infectious Diseases* 2 (1): ofv005. doi:10.1093/ofid/ofv005.

