

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Farmacia

Departamento de Microbiología y Parasitología



TESIS DOCTORAL

**Herramientas para el estudio de la
microbiota y aplicaciones terapéuticas basadas
en su modulación**

Memoria para optar al Grado de Doctor
presentada por

PEDRO MANUEL PONCE ALONSO

Directores

Dra. Rosa del Campo Moreno

Dr. Rafael Cantón Moreno

Madrid

La Dra. **Rosa del Campo Moreno**, Investigador Senior del Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS),

El Dr. **Rafael Cantón Moreno**, Jefe de Servicio del Hospital Universitario Ramón y Cajal de Madrid y Profesor Asociado de la Universidad Complutense de Madrid,

CERTIFICAN QUE:

PEDRO MANUEL PONCE ALONSO ha realizado en el Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Ramón y Cajal de Madrid, bajo su dirección, el trabajo que presenta para optar al grado de Doctor, con el título:

**Herramientas para el estudio de la microbiota y aplicaciones
terapéuticas basadas en su modulación**

Y para que así conste, firmamos la presente certificación en Madrid:

Fdo.: Dra. Rosa del Campo Moreno

Fdo.: Dr. Rafael Cantón Moreno



A Alicia

A mis padres y hermanas

Agradecimientos

En primer lugar, a la Dra. Rosa del Campo. Tu entusiasmo incombustible y tu talla profesional y humana suponen el mejor espejo en el que todos los investigadores nos debemos mirar. Gracias por apostar por mí en un momento en el que estaba perdido, por ser una mentora excepcional y enseñarme tantas cosas, por tu paciencia y por tu cariño. He tenido la gran suerte de crecer como microbiólogo y como investigador junto a ti, y esta Tesis es el fruto de todo ello.

Al Dr. Rafael Cantón. Por tu cercanía desde el primer momento en que llegué al laboratorio con 24 años, por las oportunidades que me has brindado y por ser el mejor adalid del trabajo y la perseverancia. Gracias por tu orientación y tus consejos, que me han ayudado tanto a nivel profesional como personal.

A todos los técnicos, facultativos, investigadores y residentes con los que he tenido la suerte de trabajar en el Servicio de Microbiología del Hospital Ramón y Cajal. En especial a estos últimos, porque sin vosotros el laboratorio no sería lo mismo. Habéis sido a un tiempo compañeros, mentores, alumnos, y algunos incluso buenos amigos. Vaya a donde vaya, y estéis donde estéis, siempre os tendré presentes.

A Alicia. Por cambiarme la vida, por ser mi compañera de aventuras y la mejor persona que he conocido. Por hacerme feliz cada día. Lo que soy ahora te lo debo a ti.

A mi familia. Por inculcarme desde muy pequeño la curiosidad y la pasión por la Ciencia, y apoyarme en las decisiones tomadas. Por estar ahí siempre, por quererme sin condición, por ser mi viento de popa.

Á miña terra, Galicia. Porque nas tuas fragas e regatos xurdiu a miña paixón pola natureza e as cousas pequenas.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	11
I. MICROBIOTA	13
1. Definición	13
2. Características	13
3. Funciones	15
4. Relevancia clínica	16
4.1. Infección por <i>Clostridioides difficile</i>	16
4.2. Enfermedad inflamatoria intestinal	17
4.3. Obesidad	17
4.4. Diabetes	18
4.5. Enfermedad hepática	18
4.6. Cáncer	18
4.7. Enfermedades psiquiátricas y neurodegenerativas	19
4.8. Otras patologías	19
II. TÉCNICAS DE ESTUDIO DE LA MICROBIOTA	21
1. Estudio composicional	21
1.1. Desarrollo tecnológico	21
1.2. Consideraciones metodológicas	23
1.2.1. Bacterias	24
1.2.2. Hongos	24
1.2.3. Virus	25
1.3. Análisis bioinformático	25
1.3.1. Análisis primario	26
1.3.2. Análisis secundario	26
1.3.3. Análisis terciario	27
1.3.4. Consideraciones para análisis metagenómico	28
1.4. Limitaciones	28
2. Estudio funcional	29
2.1. Metaproteómica	29
2.2. Metabolómica	31

3. Estudios multiómicos	32
III. MODULACIÓN DE LA MICROBIOTA	33
1. Historia de la transferencia de microbiota fecal	33
2. Selección de donantes	34
3. Recogida y tratamiento de muestras	38
4. Preparación del receptor	40
5. Seguimiento clínico y control microbiológico	41
6. Indicaciones actuales	42
7. Otras aplicaciones en estudio	43
7.1. Enfermedad inflamatoria intestinal	43
7.2. Encefalopatía hepática	44
7.3. Cáncer	44
7.4. Descolonización de bacterias multirresistentes	44
7.5. Otras patologías	45
8. Riesgos y efectos adversos	45
9. Rentabilidad	47
10. Regulación	47
11. Otras técnicas de modulación de la microbiota	48
HIPÓTESIS GENERAL	49
CAPÍTULO I: Búsqueda de biomarcadores de caries en la microbiota oral de niños gemelos monocigóticos mediante <i>machine-learning</i>	53
I. ANTECEDENTES	55
II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	56
III. MATERIAL Y MÉTODOS	57
1. Diseño del estudio	57
2. Caracterización de la microbiota oral	57
3. Construcción de modelos predictivos de caries	58
3.1. Análisis exploratorio	58
3.2. Modelos mediante <i>machine-learning</i>	59
IV. RESULTADOS	60
1. Reclutamiento de pacientes y controles	60
2. Caracterización de la microbiota oral	60
3. Construcción de modelos predictivos de caries	65

3.1. Microbiota núcleo	65
3.2. Modelos mediante <i>machine-learning</i>	65
V. DISCUSIÓN	67
CAPÍTULO II: Impacto del tratamiento antibiótico supresor prolongado en la microbiota intestinal	71
I. ANTECEDENTES	73
II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	74
III. MATERIAL Y MÉTODOS	75
1. Diseño del estudio	75
2. Procesamiento de las muestras	75
3. Análisis bioinformático y estadístico	76
3.1. Procesamiento de lecturas	76
3.2. Análisis de diversidad	76
3.2.1. Diversidad alfa	77
3.2.2. Diversidad beta	77
4. Análisis de viabilidad bacteriana	78
IV. RESULTADOS	79
1. Datos clínicos y efectos adversos	79
2. Análisis culturómico de colonización intestinal	81
3. Caracterización de la microbiota fecal	81
3.1. Alfa diversidad	81
3.2. Beta diversidad	82
4. Análisis de viabilidad bacteriana	88
V. DISCUSIÓN	89
CAPÍTULO III: Impacto de la cirugía bariátrica en la microbiota intestinal y el metaboloma en obesidad mórbida	93
I. ANTECEDENTES	95
II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	97
III. MATERIAL Y MÉTODOS	98
1. Diseño del estudio	98
2. Caracterización de la microbiota intestinal	99
3. Caracterización del metaboloma fecal	100
3.1. Ácidos grasos de cadena corta	100

3.2. Aminoácidos y otros compuestos nitrogenados	101
4. Análisis estadístico	101
5. Análisis predictivo de pérdida de peso	102
IV. RESULTADOS	103
1. Reclutamiento de pacientes y evolución clínica	103
2. Caracterización de la microbiota intestinal	105
2.1. Análisis de diversidad	105
2.2. Análisis taxonómico	107
3. Caracterización del metaboloma intestinal	111
3.1. Ácidos grasos de cadena corta	111
3.2. Aminoácidos, aminas biógenas y GABA	113
3.3. Amonio	115
4. Resolución de la diabetes	116
5. Modelo predictivo Lasso	117
V. DISCUSIÓN	118

[CAPÍTULO IV: Optimización de la selección de donante para la transferencia de microbiota fecal en Colitis Ulcerosa mediante un test *in vitro* de respuesta inmunológica](#)

I. ANTECEDENTES	124
II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	126
III. MATERIAL Y MÉTODOS	127
1. Fundamento del test	127
2. Optimización del test	128
2.1. Extracción de células inmunocompetentes	128
2.2. Obtención de extractos de microbiota fecal	129
2.3. Optimización de parámetros del test	129
2.2. Reproducibilidad en mucosa vs. sangre periférica	129
3. Validación del test en Colitis Ulcerosa	130
3.1. Pacientes	130
3.2. Extracción de células inmunocompetentes	130
3.3. Aplicación del test y selección de donante	130
3.4. Transferencia de microbiota fecal	131
3.5. Evaluación de la implantación de microbiota	131

3.5.1. Procesamiento de muestras y secuenciación	131
3.5.2. Análisis bioinformático	132
3.6. Evaluación y seguimiento clínico	133
IV. RESULTADOS	134
1. Optimización del test	134
1.1. Viabilidad celular y optimización de parámetros	134
1.2. Rendimiento y reproducibilidad del test	136
2. Validación clínica en Colitis Ulcerosa	139
2.1. Pacientes	139
2.2. Selección de donantes por test y transferencia de microbiota	139
2.3. Evaluación microbiológica de la transferencia de microbiota	141
2.3.1. Muestras y rendimiento de la secuenciación	141
2.3.2. Diversidad alfa	142
2.3.3. Diversidad beta	142
2.4. Evaluación clínica de la transferencia de microbiota	146
V. DISCUSIÓN	147
CONCLUSIONES	151
BIBLIOGRAFÍA	155
ANEXOS	171

LISTADO DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNr	ADN ribosomal
AGCC	Ácidos grasos de cadena corta
ARN	Ácido ribonucleico
ASVs	<i>Amplicon sequence variants</i>
CU	Colitis Ulcerosa
DEEMM	Etoximetilenemalonato de dietilo
DGGE	Electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante
DMT2	Diabetes mellitus tipo 2
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FNTα	Factor de necrosis tumoral alfa
GABA	Ácido γ -aminobutírico
ICD	Infección por <i>Clostridioides difficile</i>
IMC	Índice de masa corporal
MAMPs	<i>Microbe associated molecular patterns</i>
MS	Espectrometría de masas
NGS	<i>Next generation sequencing</i>
OTUs	<i>Operational taxonomic units</i>
PCoA	Análisis de coordenadas principales
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PMA	Monoazida de propidio
RMN	resonancia magnética nuclear
RYGB	<i>Bypass gástrico en Y de Roux</i>
SG	Gastrectomía en manga (<i>Sleeve</i>)
TAS	Tratamiento antibiótico supresor
TMF	Transferencia de microbiota fecal
UHPLC	Cromatógrafo de Líquidos de Ultra Alta Resolución

ÍNDICE DE FIGURAS

- **Figura 1.** Visión general de las principales plataformas de secuenciación.
- **Figura 2.** *Pipeline* bioinformático para análisis composicional bacteriano.
- **Figura 3.** Diversidad alfa según el grupo (sanos, caries, control).
- **Figura 4.** Abundancia a nivel de filo según el grupo (sanos, caries, control).
- **Figura 5.** Abundancia a nivel de género según el grupo (sanos, caries, control).
- **Figura 6.** Análisis de coordenadas principales de beta diversidad según el grupo (sanos, caries, control) y por pares.
- **Figura 7.** Análisis de interacción taxonómica (núcleo de microbiota).
- **Figura 8.** Diversidad alfa según clase de antibiótico.
- **Figura 9.** Abundancia a nivel de filo según clase y duración del tratamiento.
- **Figura 10.** Abundancia a nivel de género según clase y duración del tratamiento.
- **Figura 11.** Análisis de coordenadas principales de distancias Bray-Curtis según clase y duración del tratamiento.
- **Figura 12.** Análisis de abundancia diferencial según clase de antibiótico.
- **Figura 13.** Mapa de calor de los 37 géneros más abundantes.
- **Figura 14.** PCR-DGGE para evaluar la viabilidad bacteriana.
- **Figura 15.** Infografía que representa los dos principales tipos de cirugía bariátrica.
- **Figura 16.** Pérdida del exceso de peso, según tipo de cirugía bariátrica.
- **Figura 17.** Análisis de diversidad beta en pacientes sometidos a cirugía bariátrica.
- **Figura 18.** Composición taxonómica de la microbiota fecal de los pacientes sometidos a cirugía bariátrica.
- **Figura 19.** Análisis de abundancia diferencial en pacientes sometidos a cirugía bariátrica.
- **Figura 20.** Estudio de correlación entre la abundancia del filo Bacillota y el exceso de peso.
- **Figura 21.** Evolución de los niveles de ácidos grasos de cadena corta en pacientes sometidos a cirugía bariátrica.
- **Figura 22.** Evolución de los niveles de amonio en pacientes sometidos a cirugía bariátrica.
- **Figura 23.** Infografía del test de compatibilidad receptor-donante para transferencia de microbiota fecal.

- **Figura 24.** Evaluación y ajuste de parámetros del test.
- **Figura 25.** Evaluación de integridad citoquímica tras extracción celular.
- **Figura 26.** Comparación de respuesta inmunológica periférica y de la mucosa de cadáveres frente a la microbiota de donantes sanos.
- **Figura 27.** Variabilidad intra-cadáver de la respuesta inmunológica de la mucosa frente a la microbiota de donantes sanos.
- **Figura 28.** Resultados del test de compatibilidad sobre los pacientes con Colitis Ulcerosa.
- **Figura 29.** Composición de la microbiota de donantes, pacientes con infección recurrente por *Clostridioides difficile* y pacientes con Colitis Ulcerosa (pre y post transferencia).
- **Figura 30.** Análisis de coordenadas principales de diversidad beta de donantes, pacientes con infección recurrente por *Clostridioides difficile* y pacientes con Colitis Ulcerosa (pre y post transferencia).
- **Figura 31.** Seguimiento clínico de los pacientes con Colitis Ulcerosa tras la transferencia de microbiota fecal.

ÍNDICE DE TABLAS

- **Tabla 1.** Criterios de inclusión y exclusión para validación de donantes de heces.
- **Tabla 2.** Pruebas analíticas de cribado para certificar de donantes de heces.
- **Tabla 3.** Datos demográficos de los individuos con y sin caries.
- **Tabla 4.** Rendimiento de clasificación de los 5 modelos *machine-learning* para predicción de caries.
- **Tabla 5.** Datos epidemiológicos y clínicos de los pacientes con tratamiento antibiótico supresor.
- **Tabla 6.** Características clínicas y demográficas de los pacientes sometidos a cirugía bariátrica.
- **Tabla 7.** Valores de ácidos grasos de cadena corta medidos en los pacientes sometidos a cirugía bariátrica.
- **Tabla 8.** Valores de aminoácidos medidos en los pacientes sometidos a cirugía bariátrica.
- **Tabla 9.** Valores de aminas biógenas medidos en los pacientes sometidos a cirugía bariátrica.
- **Tabla 10.** Valores de regresión Lasso obtenidos para los géneros bacterianos predictores de pérdida de peso.
- **Tabla 11.** Datos clínicos de los pacientes con Colitis Ulcerosa sometidos a transferencia de microbiota fecal.
- **Tabla 12.** Listado de muestras de heces analizadas para evaluar la implantación microbiológica tras la transferencia de microbiota fecal.

RESUMEN

La última década ha supuesto una auténtica revolución en la caracterización de las comunidades microbianas que colonizan nuestro organismo, explorando su posible implicación en numerosas patologías y diseñando estrategias para su modulación. A pesar de la ingente cantidad de estudios publicados sobre microbiota humana, la heterogeneidad metodológica, el reto que supone el análisis de ecosistemas complejos y la ausencia de acuerdo para definir una microbiota normal han dificultado el alcance de conclusiones sólidas para muchas de las preguntas planteadas. Esta Tesis Doctoral tiene como objetivo principal estudiar la microbiota en distintos procesos fisiológicos y patológicos desde un punto de vista tanto composicional como funcional, empleando distintas tecnologías ómicas e incorporando técnicas basadas en el aprendizaje automático. Además, en el último capítulo se expone un método de optimización de la modulación de la microbiota mediante un abordaje basado en el estudio de la compatibilidad donante-receptor.

En el **primer capítulo** se planteó un estudio prospectivo para evaluar la implicación de la microbiota oral en la aparición de caries, estudiando la microbiota bacteriana de dos cohortes de gemelos monocigóticos con y sin caries, haciendo especial hincapié en la búsqueda de biomarcadores mediante técnicas de aprendizaje automático. El principal hallazgo fue la descripción de una incipiente, aunque leve, diferenciación de la microbiota oral concomitante a la aparición del proceso cariogénico, que sin embargo no permitió identificar ningún biomarcador robusto basado en la microbiota oral. Los modelos de clasificación para predecir la caries empleando la huella de microbiota oral mostraron una precisión modesta pero insuficiente.

En el **segundo capítulo** se analizó la microbiota fecal de pacientes con infección protésica crónica sometidos a tratamiento antibiótico supresor, un perfil muy específico de paciente no estudiado previamente y que constituye un modelo ideal para medir el impacto de un consumo prologado de antibióticos sobre la microbiota intestinal. Se evaluaron tanto cambios en la composición de las bacterias intestinales como alteraciones en su viabilidad, así como la adquisición de bacterias resistentes a múltiples antibióticos y patógenos oportunistas. El tratamiento antibiótico supresor presentó un perfil de seguridad elevado, con baja tasa de efectos adversos y de selección de bacterias multirresistentes y patógenos oportunistas. El estudio de la microbiota fecal reveló una elevada heterogeneidad del efecto de la antibioterapia en la composición de la microbiota intestinal, primando la especificidad

de cada individuo sobre el impacto propio de cada grupo de antibióticos o de la duración del tratamiento. Además, la viabilidad de la microbiota fecal no se vio mermada para ninguna de las clases de antibióticos.

En el **tercer capítulo** se monitorizó el impacto de la dieta pre-quirúrgica y de la cirugía bariátrica en la composición y funcionalidad de la microbiota intestinal de personas con obesidad mórbida, estratificando según el tipo de cirugía (*sleeve* o *bypass*). Para ello, se emplearon técnicas de metagenómica, metaproteómica y metabolómica para la determinación de la composición bacteriana fecal y la concentración de ácidos grasos de cadena corta, aminoácidos, aminas biogénas y amonio en cuatro tiempos (basal, tras una dieta pre-quirúrgica, 1 y 3 meses tras la cirugía). Las variables recogidas se integraron mediante análisis *big data* y se emplearon para la construcción de un modelo predictivo basado en aprendizaje automático para detectar marcadores de pérdida de peso. Se observó una pérdida de peso similar en ambos tipos de cirugía, pero con una evolución opuesta en la composición bacteriana. Estas diferencias fueron principalmente en relación al filo Bacillota, cuya abundancia además se asoció al exceso de peso. A nivel metabólico los cambios fueron mucho menos patentes, destacando el aumento progresivo del amonio fecal en los individuos sometidos a *bypass*. Inesperadamente, los cambios derivados de la dieta fueron escasos y no se lograron identificar predictores robustos de pérdida de peso.

En el **cuarto capítulo** se exploró la utilidad de la transferencia de microbiota fecal para el tratamiento de la Colitis Ulcerosa, buscando mejorar su éxito terapéutico mediante el diseño de un test para la selección del donante de microbiota fecal. Este test monitoriza la respuesta inmunitaria *in vitro* de la mucosa del receptor frente a la microbiota fecal de distintos posibles donantes, con el fin de escoger la que genere una mayor tolerancia inmunológica. En un primer paso, se evaluó y optimizó el rendimiento del test enfrentando células inmunocompetentes de cadáveres y diferentes extractos de microbiota fecal, para posteriormente validar su utilidad clínica en pacientes con Colitis Ulcerosa sometidos a transferencia de microbiota. El test demostró la presencia de respuestas inmunológicas diferenciales que permitían guiar la selección de donante. Asimismo, permitió evidenciar que las células inmunocompetentes de la mucosa intestinal desarrollan una respuesta tolerogénica generalizada frente a la estimulación con microbiota extraña. Sin embargo, el test no mejoró el rendimiento clínico de la transferencia de microbiota fecal en Colitis Ulcerosa, sugiriendo que la compatibilidad inmunológica no parece ser un factor esencial que condicione el éxito terapéutico de este procedimiento.

SUMMARY

The last decade has been a true revolution in the characterization of the microbial communities that colonize our organism, exploring their possible involvement in numerous pathologies and designing strategies for their modulation. Despite the huge number of studies published on human microbiota, the methodological heterogeneity, the challenge of analyzing complex ecosystems and the lack of agreement on the definition of a normal microbiota have made it difficult to reach solid conclusions. The main objective of this PhD Thesis is to study the microbiota in different physiological and pathological processes from a compositional and functional point of view, using different omics technologies and incorporating analytical techniques based on machine-learning. In addition, the last chapter presents a method for optimizing microbiota modulation using an approach based on the study of donor-recipient immunological compatibility.

In the **first chapter**, a prospective study was carried out to evaluate the involvement of the oral microbiota in the development of caries, studying the bacterial microbiota of two cohorts of monozygotic twins with and without caries, with special emphasis on the search for biomarkers using machine-learning techniques. The main finding was the description of an incipient, albeit mild, differentiation of the oral microbiota concomitant to the onset of the cariogenic process, which however did not allow the identification of any robust biomarker based on the oral microbiota. Classification models to predict caries using the oral microbiota fingerprint showed modest but insufficient accuracy.

The **second chapter** analyzed the fecal microbiota of patients with chronic prosthetic infection undergoing suppressive antibiotic therapy, an ideal model to measure the impact of prolonged antibiotic consumption on the gut microbiota. Both changes in the composition of intestinal bacteria and alterations in their viability were evaluated, as well as the acquisition of bacteria resistant to multiple antibiotics and opportunistic pathogens. Suppressive antibiotic therapy presented a high safety profile, with a low rate of adverse effects and selection of multidrug-resistant bacteria and opportunistic pathogens. The study of the fecal microbiota revealed a high heterogeneity of the effect of antibiotic therapy on the composition of the intestinal microbiota, with the specificity of each patient taking precedence over the impact of each group of antibiotics or the duration of treatment. In addition, the viability of the fecal microbiota was not impaired for any of the antibiotic classes.

In the **third chapter**, the impact of pre-surgical diet and bariatric surgery on the composition and functionality of the intestinal microbiota of morbidly obese individuals was monitored, stratifying according to the type of surgery (sleeve or bypass). For this purpose, metagenomics, metaproteomics and metabolomics were used to determine fecal bacterial composition and the concentration of short-chain fatty acids, amino acids, biogenic amines and ammonium at four time points (baseline, after a pre-surgical diet, 1 month, and 3 months after surgery). The collected variables were integrated by big data analysis and used for the construction of a predictive model based on machine-learning to detect markers of weight loss. Similar percentage of weight loss was observed in both types of surgery, but with opposite evolution in the bacterial composition of each group. These differences were mainly related to the phylum Bacillota, whose abundance was also associated with excess weight. At the metabolic level, the changes were much less evident, highlighting the progressive increase in fecal ammonium in the individuals who underwent bypass surgery. Unexpectedly, diet-derived changes were scarce, and no robust predictor of weight loss was identified.

The **fourth chapter** explored the usefulness of fecal microbiota transfer for the treatment of Ulcerative Colitis, seeking to improve its therapeutic success by designing a test for fecal microbiota donor selection. This test monitors the *in vitro* immune response of the recipient's mucosa to the fecal microbiota of different possible donors, in order to choose the one that generates the greatest immunological tolerance. In a first step, the performance of the test was evaluated and optimized by confronting immunocompetent cells from cadavers and different fecal microbiota extracts. Then, its clinical utility was validated in patients with Ulcerative Colitis submitted to microbiota transfer. The test demonstrated the presence of differential immunological responses that allowed guiding donor selection. It also showed that immunocompetent intestinal mucosal cells develop a generalized tolerogenic response to stimulation with foreign microbiota. However, the test did not improve the clinical performance of fecal microbiota transfer in Ulcerative Colitis, suggesting that immunological compatibility does not seem to be an essential factor conditioning the therapeutic success of this procedure.

INTRODUCCIÓN

I. MICROBIOTA

1. Definición

El término microbiota define al conjunto de microorganismos (bacterias, hongos, arqueas, virus y parásitos) que se alojan en nuestro cuerpo e interactúan con nuestras células [1]. Por el contrario, el microbioma es un concepto mucho más amplio que hace referencia a todo el ecosistema, incluyendo a las comunidades microbianas, sus genes y metabolitos, así como las condiciones ambientales y del hospedador.

2. Características

Todos los seres humanos albergamos distintas comunidades microbianas, cada una de ellas condicionada por el ambiente físico-químico de su localización anatómica, siendo la alojada en el tracto digestivo la más numerosa y compleja. A su vez, el tracto digestivo contiene diferentes ecosistemas bien diferenciados: cavidad oral, esófago, estómago, intestino delgado y colon, existiendo un gradiente de microorganismos en el tracto intestinal desde la boca hasta el ano, siendo el estómago el menos poblado por su pH ácido, mientras que en el ciego se localizan las mayores concentraciones bacterianas (10^{14} microorganismos/g de heces) [2]. La cantidad total de microorganismos que albergamos en nuestro cuerpo iguala o incluso supera al número de células humanas y contribuye con 100-150 veces más genes [3], lo que refleja su enorme potencial metabólico y la importancia que presenta para el funcionamiento y equilibrio de nuestro cuerpo [4].

Se considera que la microbiota intestinal alcanza su madurez a partir de los 2-3 años de edad y permanece más o menos estable durante toda la etapa adulta. Esta microbiota está constituida por un núcleo permanente que comprende alrededor de 40 especies, que representan el 75% del ecosistema en términos de abundancia [5]. Se han descrito una gran cantidad de factores que afectan a la composición de la microbiota, siendo los principales la raza, el sexo, la edad y sobre todo la dieta, que es el factor modulador más relevante [6]. Una de las características clave de la microbiota es su resiliencia, es decir su capacidad de permanecer o volver a su estado original tras un estímulo o perturbación [7]. Es importante tener en cuenta que cuando la perturbación se repite en un breve espacio de tiempo, o es muy duradera, los cambios pueden ser irreversibles, sobre todo cuando se afectan a las especies minoritarias, a las que se otorga un importante papel para el correcto funcionamiento de todo el ecosistema.

La cavidad oral alberga aproximadamente 700 especies de bacterias diferentes, de las que podemos encontrar unas 300 en cada individuo, con nichos específicos en la saliva, la lengua, la mucosa oral, las superficies dentales mineralizadas y los tejidos periodontales [8]. A nivel gástrico, el bajo pH explica la baja carga bacteriana (entre 10^1 y 10^3 unidades formadoras de colonia/g), cuya composición está fuertemente influenciada por la presencia o ausencia de *Helicobacter pylori* [9]. La microbiota del intestino delgado está adaptada a un tránsito rápido, gran cantidad de nutrientes, pH ácido, y alto contenido de oxígeno, bilis, y péptidos antimicrobianos. Aquí encontramos una microbiota fermentativa anaerobia tolerante [10], cuya concentración máxima se alcanza en el íleon, coincidiendo con la absorción de la mayoría de los nutrientes por parte del enterocito. Por el contrario, el tránsito del colon es lento y con baja concentración de fuentes de carbono para la microbiota. Esto condiciona la abundancia de microorganismos con capacidad de asimilar los restos de alimentos que no se han digerido antes, particularmente carbohidratos complejos como la fibra. Además, la ausencia de oxígeno explica que la mayoría de las especies sean anaerobias. En general, se acepta que esta microbiota está compuesta principalmente por bacterias, destacando dos filos mayoritarios (Firmicutes -recientemente renombrado como Bacillota- ~60% y Bacteroidota ~30%) y varios minoritarios (Actinomycetota, Proteobacteria -recientemente renombrado como Pseudomonadota- y Verrucomicrobiota) [6]. En un intento de simplificar y definir patrones de microbiota discretos, se han identificado tres géneros relevantes (*Bacteroides*, *Prevotella* y *Ruminococcus*) cuya abundancia define los llamados enterotipos [11]. Esta clasificación basada en enterotipos, aunque simplifica en exceso la complejidad de la microbiota y permanece bajo debate [12], podría tener utilidad clínica a la hora de estratificar pacientes con fines terapéuticos o de prevención.

En la actualidad no existe una definición de microbiota “normal”, en general se suele hablar de eubiosis y disbiosis en relación a distintas patologías [13], pero no se han definido claramente los criterios para diferenciar ambos estados. Es importante también saber que lo que puede tener una composición diferente puede tener funcionalidad equivalente, es decir, la microbiota puede estar compuesta por especies diferentes cuyo metabolismo final sea el mismo. Del mismo modo, también podemos detectar ecosistemas con composiciones similares en las que las rutas metabólicas sean opuestas. Se han creado bases de datos para recopilar y almacenar todos los datos de los estudios de microbiota tanto en Europa [MetaHIT (<http://www.metahit.eu/>)], como en Estados Unidos [Human

Microbiome Project (<https://hmpdacc.org/>), lo que facilita la comparación entre las poblaciones humanas, pero aun así no existe un consenso de normalidad por la gran variabilidad que existe. En nuestro país, sólo recientemente se ha logrado caracterizar a gran escala la microbiota intestinal de personas sanas [14].

Además de bacterias, la microbiota también está compuesta, aunque en menor proporción, por organismos eucariotas, sobre todo levaduras. El término micobioma, referido al conjunto de los hongos que convive e interactúa con nuestras células, se utilizó por primera vez en 2010 [15] y los primeros estudios datan de 2013 [16]. Los hongos no se incluyen generalmente en los estudios de caracterización de la microbiota humana debido a su menor representación (0,1% de la microbiota total) y a su escaso papel patogénico, aunque en los últimos años se han publicado importantes trabajos en relación al tracto digestivo [17] y respiratorio [18,19], así como de la interacción hongos-bacterias [20].

Por último, más allá de las bacterias y los hongos, cada vez se está dando más importancia al viroma humano, mucho menos estudiado debido a las dificultades metodológicas que se explicarán más adelante. La fracción viral de la microbiota representa por sí sola $\sim 10^{12}$ partículas virales (desde las $\sim 10^9$ - 10^{10} partículas/g de heces y $\sim 10^8$ /ml de fluido respiratorio, a las $\sim 10^6$ /cm² de piel y $\sim 10^5$ /ml de sangre), sin contabilizar los profagos insertos en los genomas bacterianos [21,22]. Los fagos (virus de bacterias) desempeñan un papel fundamental en el mantenimiento de la homeostasis intestinal al interactuar con la comunidad bacteriana, lo que claramente justifica su estudio [23]. Uno de los grandes hallazgos fruto de este tipo de análisis fue el descubrimiento en 2018 de los fagos crAssphage, que suponen hasta el 50% del viroma intestinal e infectan de forma específica al filo Bacteroidota [24].

3. Funciones

Las funciones de la microbiota humana se clasifican en estructurales, protectoras y metabólicas. A nivel intestinal, las funciones estructurales se traducen en la preservación de la integridad de la barrera epitelial y al mantenimiento de la capa de moco. Esto último es crítico para la integridad del sistema, ya que la mucosidad producida por las células caliciformes supone una barrera que garantiza el aislamiento entre el lumen y el epitelio [25]. El *biofilm* bacteriano que recubre a este moco preserva su integridad y a la vez ejerce una función protectora frente a la colonización o invasión de potenciales agentes patógenos (ocupación de nicho ecológico), algo análogo a lo que ocurre en la microbiota de la piel.

Por otro lado, la microbiota tiene un papel fundamental en preservar la homeostasis inmunológica, a través de una señalización tolerogénica que evita una respuesta exacerbada frente a los numerosos antígenos del exterior. En el caso de la microbiota intestinal esta señal tiene una influencia sistémica [26], mientras que la microbiota de la piel ejerce un efecto inmunomodulador a nivel local [27].

En cuanto a las funciones metabólicas, destacan la producción de vitamina K y de los ácidos grasos de cadena corta (AGCC), la desconjugación de ácidos biliares por bacterias intestinales anaeróbicas, principalmente *Bacteroides*, *Eubacterium*, y *Clostridium*, la producción de sustancias antibacterianas como las bacteriocinas, microcinas y colicinas, la fermentación de alimentos no digeribles e incluso la metabolización de fármacos [28]. Dentro de estos, los AGCC son las moléculas producidas por la microbiota intestinal que más se han estudiado y a las que más atributos funcionales se han atribuido. Constituyen los metabolitos volátiles bacterianos que se producen tras la digestión de los carbohidratos complejos no digeribles. Tienen una vida media muy corta, y aunque existen muchos, los mayoritarios son el ácido acético, el ácido butírico y el ácido propiónico. Su concentración puede variar entre 20-140 mM, en relación con un patrón pro o anti-inflamatorio de la microbiota [29]. Los AGCC son imprescindibles para el correcto funcionamiento del epitelio intestinal, ya que son fuente de energía no sólo para las bacterias, sino también para los enterocitos e influyen en la permeabilidad de la barrera intestinal [30]. Estos metabolitos también están implicados en la inducción de señales de tolerancia inmunológica a nivel local [31], siendo el butirato el más importante, y al que se relaciona con altas densidades de los géneros *Clostridium*, *Eubacterium* y *Roseburia*. Por último, también se les ha atribuido actividad neurotransmisora a distancia, conformando el conocido como eje intestino-cerebro [32].

4. Relevancia clínica

Debido al creciente conocimiento de la contribución de la microbiota en la homeostasis de nuestro cuerpo, su posible implicación en numerosas patologías tanto intestinales como extra-intestinales ha recibido gran atención de la comunidad científica en la última década [33]. Este hecho ha venido potenciado además por la aparición y desarrollo de nuevas técnicas ómicas para descifrar su composición y/o funcionamiento.

4.1. Infección por *Clostridioides difficile*

La infección por *Clostridioides difficile* (ICD) es una de las enfermedades nosocomiales más importantes, con gran impacto en la calidad de vida de los pacientes y con elevado consumo de recursos sanitarios [34]. La alteración de la microbiota intestinal y de su función de ocupación de nicho, principalmente a través del consumo de antibióticos, es el principal factor predisponente para el desarrollo de la enfermedad, al permitir la colonización y posterior proliferación del patógeno en el colon. Además, una vez instaurada la infección, esta alteración se profundiza todavía más debido a la acción de las toxinas bacterianas, la consiguiente diarrea y la inflamación de las mucosas. La característica producción de esporas de este microorganismo es la responsable de las recurrencias de la infección después de finalizar el tratamiento antibiótico, que afectan en torno al 20% de los pacientes tras una primera infección, siendo habitual que tras esta primera recurrencia se repitan más episodios. Esta es la única patología en la que la modulación de la microbiota intestinal ha demostrado superioridad respecto al tratamiento antibiótico de elección [35,36], como se verá más adelante. En el [Capítulo II](#) de la presente Tesis se explorarán los efectos de una exposición antibiótica prolongada en la microbiota intestinal, incluyendo la emergencia de ICD.

4.2. Enfermedad inflamatoria intestinal

Un grupo de patologías con amplia documentación en relación a la microbiota es el de la enfermedad inflamatoria intestinal. Los pacientes con enfermedad de Crohn y Colitis Ulcerosa (CU) presentan un perfil de microbiota alterado, destacando la disminución de *Clostridium* y otras bacterias productoras de butirato, unido a una reducción de la diversidad bacteriana [37]. La hipótesis que podría explicar esta asociación se apoya en la función inmunomoduladora de la microbiota intestinal, que en estos pacientes se ve alterada debido al adelgazamiento de la capa de moco, favoreciendo el contacto directo entre la microbiota y el enterocito, induciendo y cronificando la inflamación [38]. En el [Capítulo IV](#) de la presente Tesis se profundizará más en el papel de la microbiota en esta patología.

4.3. Obesidad

Dentro de los trastornos que se han relacionado con la microbiota, uno de los más estudiados es la obesidad. Diversos trabajos han revelado la existencia de una interacción entre el microbioma intestinal y el metabolismo del hospedador, influyendo en la adiposidad y el aumento de peso, y repercutiendo en las vías metabólicas e inflamatorias, así como en la saciedad a través del eje intestino-cerebro [39,40]. Inicialmente se prestó

especial atención al balance Bacillota/Bacteroidota (antes Firmicutes/Bacteroidetes) a nivel intestinal, ya que se describió un aumento de Bacillota en individuos obesos [41]. Sin embargo, en los últimos años este hecho se ha puesto en duda dada la falta de reproducibilidad entre estudios [42], dejando todavía muchas incógnitas por resolver. Además, estudios de intervención para la pérdida de peso, como la cirugía bariátrica, han demostrado la bidireccionalidad de esta interacción, afectando a la composición de la microbiota y a su metabolismo [43], un tema que se aborda ampliamente en el [Capítulo III](#) de esta Tesis Doctoral.

4.4. Diabetes

En relación también a las funciones metabólicas de la microbiota intestinal, se han encontrado importantes alteraciones de la misma en pacientes con diabetes tipo 1 [44] y tipo 2 [45]. En este caso, parece que la funcionalidad más que la identidad de los taxones implicados es la que determina la influencia de la microbiota en esta patología [46]. Además, el reconocido impacto microbiológico de fármacos frente a la diabetes como la metformina, añade más dificultad a la caracterización de la microbiota de estos pacientes [47].

4.5. Enfermedad hepática

La disbiosis intestinal y la disfunción de la barrera intestinal contribuyen a la enfermedad hepática crónica mediante una regulación anormal del eje intestino-hígado [48]. Así, por ejemplo, los lipopolisacáridos de la microbiota son un factor clave para inducir la respuesta inflamatoria del tejido hepático. En la encefalopatía hepática se ha visto que puede existir un síndrome de sobrecrecimiento bacteriano importante, lo que explica que el principal tratamiento de esta patología sea la descontaminación intestinal con antibióticos no absorbibles [49].

4.6. Cáncer

En diferentes trabajos se ha comunicado alteraciones de la microbiota tanto en el microambiente tumoral, en el tejido tumoral como incluso en entornos no adyacentes, lo que indicaría una fuerte correlación entre la microbiota y el desarrollo tumoral [50]. Sin embargo, los mecanismos de esta correlación siguen sin estar claros. Por una parte, el tumor podría remodelar los perfiles microbianos creando condiciones más propicias para ciertos taxones. Por otro lado, la propia microbiota podría promover la carcinogénesis a través de un proceso patogénico directo, incluyendo el establecimiento de un entorno inflamatorio

que afecte a la inmunidad del hospedador. Dos ejemplos monoespecíficos clásicos son *Helicobacter pylori* y el cáncer gástrico [51] o *Streptococcus gallolyticus* y el cáncer de colon [52], aunque desde el advenimiento de las nuevas tecnologías de secuenciación se han postulado muchos otros en relación a la composición global del ecosistema: microbiota intestinal y cáncer de colon [53], próstata [54] o pulmón [55], microbiota oral y diversos tipos de cáncer [56], microbiota respiratoria y cáncer de pulmón [18], microbiota tumoral y cáncer de mama [57], etcétera.

Además de como factor causal o predisponente, la microbiota ha mostrado influir en la respuesta del cáncer frente a inmunoterapia, en especial las nuevas terapias dirigidas frente a los *immunocheckpoints* PD-1/PD-L1 [58,59]. La explicación más plausible detrás de este fenómeno es que la microbiota estimula al sistema inmune humano, bien de forma inespecífica, bien ejerciendo reactividad antigénica cruzada con los epítomos del tumor [60]. En cualquier caso, esto abre un emergente campo de investigación que tiene por objetivo final la individualización de los tratamientos antitumorales en función de la microbiota particular de cada individuo, o incluso su modulación, como se expondrá más adelante.

4.7. Enfermedades psiquiátricas y neurodegenerativas

En los últimos años se ha demostrado la implicación de la microbiota intestinal en la regulación de las funciones cerebrales a través del eje intestino-cerebro, y cómo alteraciones en su composición pueden causar desregulación de metabolitos bacterianos y el aumento de las citoquinas inflamatorias que causan neuroinflamación [61]. Esto ha hecho que se haya relacionado con la predisposición y evolución de varias enfermedades neurodegenerativas bien conocidas, como el Parkinson, el Alzheimer o la Esclerosis Múltiple, así como desórdenes psiquiátricos como el autismo. Especialmente relevantes son los trabajos publicados en relación a este último, donde se ha conseguido reproducir un fenotipo autista en ratones libres de microorganismos tras implantar microbiota de pacientes con esta enfermedad [62], o promover una respuesta terapéutica sostenida durante 2 años en pacientes sometidos a transferencia de microbiota fecal [63].

4.8. Otras patologías

Existe evidencia acumulada de la conexión de la microbiota con muchas otras enfermedades, quedando fuera del objetivo de esta introducción explicar pormenorizadamente cada una de ellas, dada la enorme acumulación de datos (32.338

entradas en PubMed a fecha 08/11/2021 al buscar “*Microbiome AND Disease*”, acotado a los últimos 5 años). Por citar algunas, existen estudios en enfermedades infecciosas como el VIH [64] o la sepsis [65], patologías dermatológicas [66], enfermedad del injerto contra huésped [67], caries y gingivitis [68] (tema que será tratado en profundidad en el [Capítulo I](#) de esta tesis doctoral), etcétera.

Por último, es relevante recordar que a pesar de la ingente cantidad de datos que se ha generado en los últimos años, el papel de la microbiota en muchas patologías todavía no se comprende totalmente, algo motivado por la heterogeneidad de los estudios, la dificultad para el control de los numerosos factores que afectan a la microbiota, la subóptima correlación entre composición y funcionalidad, por limitaciones derivadas de las propias técnicas (que se explicarán en detalle seguidamente) y por la ya comentada falta de consenso a la hora de definir una microbiota normal.

II. TÉCNICAS DE ESTUDIO DE LA MICROBIOTA

La reciente revolución de las tecnologías ómicas, incluyendo la metagenómica, la metatranscriptómica, la metaproteómica y la metabolómica, nos ha permitido caracterizar con una resolución sin precedentes a las comunidades microbianas que colonizan nuestro organismo [1]. Estas técnicas han permitido no sólo describir y cuantificar microorganismos, sino evaluar las posibles funciones codificadas por estas comunidades microbianas, cuantificar las actividades metabólicas que se producen dentro de la complejidad del ecosistema y finalmente relacionarlas con el desarrollo y el tratamiento de enfermedades humanas.

Aunque se han realizado esfuerzos notables para la estandarización de este tipo de estudios, como el diseño de *checklists* [69], la realidad es que todavía existe una considerable heterogeneidad metodológica que dificulta la interpretación y la reproducibilidad de los mismos. En este apartado se exponen brevemente los distintos abordajes técnicos para el estudio de la microbiota, tanto a nivel composicional como funcional, haciendo énfasis en sus fortalezas y limitaciones.

1. Estudio composicional

Las técnicas de caracterización microbiológica basadas en secuenciación masiva han permitido evidenciar que realmente la microbiota intestinal humana está compuesta por unas 400-500 especies bacterianas, la mayoría de ellas incultivables [70]. Esta tecnología tiene un mayor recorrido para el análisis de la composición bacteriana (a través del gen 16S ADN_r) y fúngica (a través de la región intergénica ITS1), mientras que el estudio del viroma está mucho menos desarrollado debido a la falta de huellas moleculares universales [71].

1.1. Desarrollo tecnológico

La genómica, definida como el estudio del contenido molecular, organización, función y evolución de la información genética contenida en un genoma, ha avanzado a pasos agigantados desde que en el año 1990 arrancara oficialmente el Proyecto Genoma Humano [72]. La Figura 1 resume las características de las principales plataformas de secuenciación genómica disponibles. Estas plataformas se sustentan en 3 tipos de tecnologías genómicas denominadas de primera, segunda o tercera generación.

La primera generación se basa en la automatización de la tecnología Sanger clásica [73], que combina la PCR con dideoxinucleótidos (ddNTPs) marcados con fluorocromos y

la detección de fragmentos mediante electroforesis capilar. Esta tecnología permite secuenciar fragmentos de hasta 1.000 pares de bases (pb) con alta fiabilidad, pero gran coste económico por base y tiempo elevado de análisis.

La segunda generación, también conocida como *Next Generation Sequencing* (NGS) y en menor medida como *Massive Parallel Sequencing* (MPS) o *High Throughput Sequencing* (HTS), es actualmente la más utilizada para estudios composicionales, siendo el verdadero motor que ha conducido a la revolución en el estudio de la microbiota. Permite secuenciar millones de pequeños fragmentos de ADN de forma simultánea, generando un gran número de lecturas por base secuenciada y abaratando enormemente el coste por base, permitiendo así el análisis de genomas completos o incluso de comunidades microbianas. La primera plataforma en aparecer fue la 454® de Roche, en el año 2005 [74], basada en la pirosecuenciación, esto es, detección del pirofosfato liberado durante la síntesis del ADN mediante el acoplamiento de una reacción enzimática que genera luz detectable. Posteriormente, otras empresas como Ion Torrent (con su plataforma PGM®, basada en semiconductores) y, especialmente, Illumina (MiSeq®, NextSeq®, entre otras; todas basadas en terminadores reversibles) desplazaron a la primera por su mayor rendimiento y menor coste. Todas tienen en común su alta capacidad de secuenciación y la necesidad de realizar una etapa previa de preparación de librerías genómicas, con el hándicap de que los fragmentos secuenciados son cortos (150-600 pb) [75], lo que impide por ejemplo la secuenciación del gen ADNr 16S completo (~1.500 pb).

Para solucionar los problemas en relación al tamaño, se han desarrollado nuevas tecnologías llamadas de tercera generación, como PacBio® y Oxford Nanopore®, que permiten la secuenciación de fragmentos de gran tamaño (hasta 100 kilobases) en un tiempo mucho menor, pero sacrificando el rendimiento y por tanto la fiabilidad de la asignación nucleotídica, lo que explica que todavía no hayan sustituido a la segunda generación en la mayoría de aplicaciones [76].

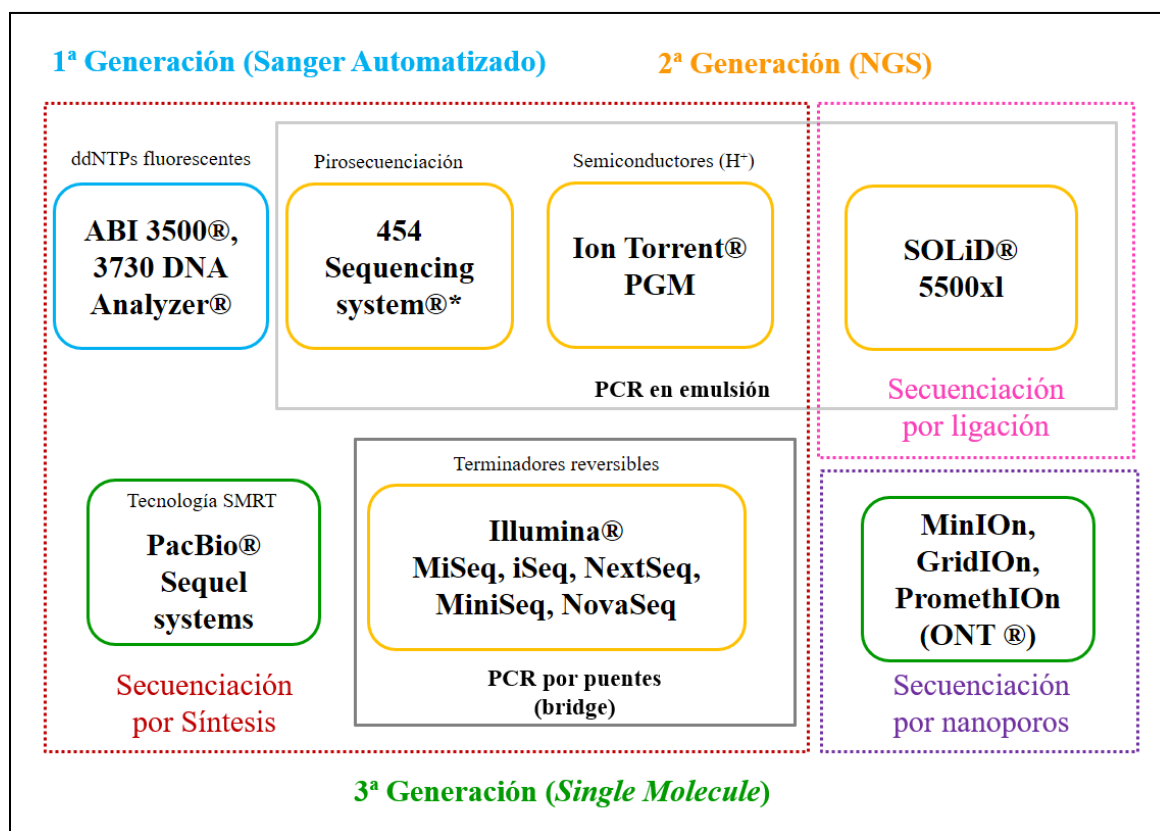


Figura 1. Visión general de las principales plataformas de secuenciación genómica. En color azul se encuadra a aquellas pertenecientes a la primera generación, en naranja a las de segunda generación y en verde a las de tercera generación. * La plataforma 454® no se comercializa desde el año 2014.

1.2. Consideraciones metodológicas

El proceso comienza con la obtención de material genético de calidad a partir de la muestra clínica de interés. Existen numerosos métodos de extracción y purificación, desde kits comerciales hasta protocolos manuales y automatizados. Además de conseguir una buena concentración de material genético, también es importante alcanzar una buena pureza eliminando totalmente las proteínas que puedan interferir en los procesos de amplificación posteriores.

Otro aspecto común a considerar es la necesidad de incorporar tanto controles negativos que permitan descartar contaminación durante la extracción, preparación de librerías o durante la carrera de secuenciación, como *mock communities* (constructos de composición taxonómica conocida) para controlar sesgos de enriquecimiento o depleción

de ciertos taxones durante el proceso de secuenciación o durante el posterior análisis bioinformático [77].

Por último, la metodología de secuenciación varía sensiblemente según la fracción de la microbiota que queramos analizar, tal y como se expone a continuación.

1.2.1. Bacterias

Para el análisis metataxonómico a nivel de bacterias se utiliza habitualmente la secuenciación masiva basada en amplicones, lo que implica que durante la fase de preparación de librerías se realiza una amplificación previa de la región que se quiere secuenciar. Esta región, que sirve de marcador bacteriano universal, es el gen 16S ADN_r, que codifica para el ARN_r de la subunidad 30S del ribosoma. Este gen es un buen marcador taxonómico para la mayoría de especies, dada su alta conservación, que permite el diseño de cebadores universales, y la presencia de zonas variables cuya secuencia es especie-específica. Habitualmente las zonas que se amplifican para los estudios de microbiota son V3-V4 o V1-V2, ya que como se ha comentado las plataformas de segunda generación no permiten la amplificación del gen completo. La elección de una zona de amplificación u otra puede condicionar los resultados finales, por lo que es muy importante a la hora de comparar estudios saber qué zona se ha secuenciado [78]. Una vez secuenciadas, las lecturas se asignan taxonómicamente al enfrentarse a distintas bases de datos públicas, en las que se recogen secuencias que se han caracterizado previamente (la mayoría provenientes de estudios de microbiota humana). Las más empleadas son las genéricas, como Greengenes [79], SILVA [80] y RDP [81], aunque existen algunas que son específicas de región anatómica, como por ejemplo HOMD (microbiota oral) [82].

1.2.2. Hongos

Para caracterizar las comunidades de hongos se emplea también la estrategia de secuenciación de amplicones, pero en este caso es la región intergénica ITS la que actúa como marcador taxonómico. Esta región de longitud variable (500-700 pb) se localiza entre los genes que codifican para subunidades ribosómicas y se divide a su vez en las subregiones ITS1 e ITS2, que están separadas por la región conservada 5,8S [83]. La gran mayoría de trabajos utilizan cebadores no degenerados ITS1F/ ITS2 (dirigidos a la región ITS1). La selección de los cebadores es crítica ya que algunos, como el ITS1 y el ITS1-F, están sesgados hacia la amplificación de basidiomicetos, mientras que otros, como ITS2 e ITS4, están sesgados hacia la sobre-representación de ascomicetos [84]. Las principales

bases de datos de referencia para la asignación taxonómica de hongos son UNITE [85] y SILVA [80].

1.2.3. Virus

El estudio del viroma es mucho más complejo metodológicamente, ya que no existe un marcador genético universal para los virus (ADN o ARN). En este caso la única aproximación posible es realizar secuenciación metagenómica, también conocida como *shotgun metagenomics* [71]. Esta aproximación se caracteriza por la secuenciación de todo el material genético de la muestra, sin preamplificar una diana concreta. En el caso de los virus, los protocolos incluyen generalmente un proceso de filtrado y/o ultrapurificación para enriquecer la muestra en partículas virales. Este proceso tiene la desventaja de favorecer la retención de los virus más abundantes y de infraestimar la abundancia de virus ARN. Otros métodos de desarrollo más reciente, como los basados en citometría de flujo con marcaje y selección de las partículas virales, parecen limitar la introducción de estos sesgos [86]. En cualquier caso, es importante destacar que las bases de datos específicas para virus tienen todavía pocas entradas y están poco depuradas (*curated*), lo que aunado al hecho de que el 95% de las secuencias depositadas pertenecen a virus no cultivados, hace que todavía sea un reto explotar datos metagenómicos de viroma de forma concluyente.

1.3. Análisis bioinformático

La gran cantidad de datos generada en los procesos de secuenciación ha motivado el desarrollo de herramientas bioinformáticas para su análisis. En la Figura 2 se muestra un ejemplo de *pipeline* para el análisis de secuencias de origen bacteriano (región V3-V4 de 16S ADNr) secuenciadas en una plataforma MiSeq® (Illumina). A grandes rasgos, el análisis bioinformático de datos metataxonómicos incluye tres etapas: primaria, secundaria y terciaria, que se explican brevemente a continuación.

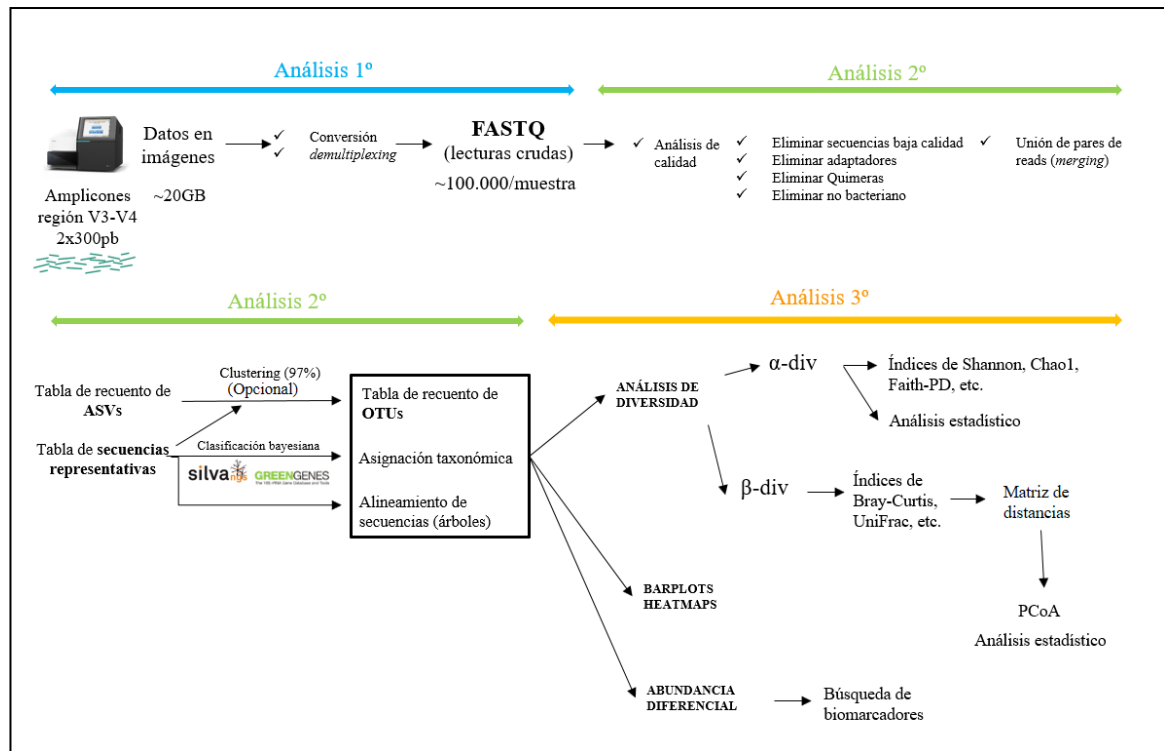


Figura 2. Ejemplo de *pipeline* bioinformático para la caracterización composicional bacteriana a partir de datos de secuenciación *paired-end* de la región V3-V4 del gen 16S ADNr. ASVs: *amplicon sequence variants*; OTUs: *operational taxonomic units*; PCoA: análisis de coordenadas principales.

1.3.1. Análisis primario

Incluye la transformación de las lecturas del secuenciador (imágenes) en *base-callings* (bases), con la valoración de calidad asociada a cada base asignada. Es un proceso cerrado que suele realizar de forma automática el *software* del propio secuenciador. Además, suele incluir también el proceso de *demultiplexing*, por el que cada lectura se asigna a su muestra de origen (gracias a un *barcode* único que se añade a cada librería antes de la secuenciación). El *output* de este proceso en el caso de plataformas Illumina son archivos FASTQ.

1.3.2. Análisis secundario

Se refiere al filtrado y depuración de las lecturas, así como a su recuento y clasificación. Incluye habitualmente:

- Recorte y filtrado de secuencias de baja calidad. En el caso de hongos, además se realiza un paso de recorte adicional o *trimming*, debido a que la región ITS no presenta el

mismo tamaño en todos los hongos, a diferencia del ADNr 16S bacteriano, de tamaño conservado.

- Filtrado de secuencias de tamaño inferior al esperado.
- Unión de secuencias *forward* y *reverse* (en el caso de protocolos *paired-end* de Illumina).
- Búsqueda y generación de secuencias representativas (*amplicon sequence variants*, ASVs) y de tablas de recuento por muestra.
- Asignación taxonómica de ASVs. Se suelen emplear clasificadores bayesianos, entrenados frente a la base de datos de interés.
- Eliminación de ASVs no asignadas al grupo taxonómico a estudio.
- Normalización de datos: Proceso que normaliza el número de lecturas por muestra para su comparación posterior. Existen distintos abordajes de normalización, sin existir un acuerdo sobre cuál el más adecuado.

1.3.3. Análisis terciario

Este proceso incluye la explotación estadística de los datos de secuenciación, teniendo en cuenta las variables clínicas de las muestras estudiadas y aprovechando herramientas del campo de la Ecología. En primer lugar, se analiza la alfa-diversidad (riqueza de taxones diferentes en cada muestra) mediante el cálculo de índices como el de Shannon, Chao1 o Faith-PD. Estos parámetros tienen en cuenta la cantidad de especies, su distribución, y en el caso del último también su relación filogenética. Por otro lado, los análisis de beta-diversidad comparan la composición entre grupos de muestras (establecidos según las variables clínicas recogidas) empleando índices que representan su similitud/disimilitud, como Bray-Curtis, Jaccard o UniFrac, entre otros. Dichas diferencias pueden someterse a análisis estadísticos para evaluar su significación y/o representarse gráficamente (por ejemplo, a través de PCoA). Además, se pueden realizar análisis de abundancia diferencial que identifiquen qué taxones explican en mayor medida las diferencias entre grupos, como por ejemplo a través de la herramienta *linear discriminant analysis effect size* (LEfSe) [87] basado en el *linear discriminant analysis* (LDA). Existen distintas plataformas en entorno Linux o en plataforma web que facilitan el análisis, integrando las diversas herramientas. Algunas de ellas son QIIME2 [88], Mothur [89] o paquetes de R como Phyloseq [90].

1.3.4. Consideraciones para análisis metagenómico

Así como el análisis bioinformático de datos metataxonómicos de comunidades bacterianas y fúngicas está bastante estandarizado, no ocurre lo mismo en el estudio del viroma. Como ya se ha explicado, al no haber fase de preamplificación del material de interés, los datos derivados de *shotgun metagenomics* son propensos a un alto ruido de fondo. Los estudios de caracterización taxonómica de virus se basan en el ensamblaje *de novo* para recuperar los genomas virales de los metagenomas, para luego anotar funcionalmente los genes y establecer el rango de hospedador bacteriano. La exigencia computacional de este tipo de estudios es considerablemente mayor y la metodología todavía es muy diversa y sensible a sesgos de distintos tipos [71].

1.4. Limitaciones

El análisis composicional de la microbiota mediante secuenciación masiva presenta una serie de limitaciones que deben considerarse [91]:

- La técnica de almacenamiento de la muestra, así como la extracción y purificación del material genético puede favorecer o perjudicar la retención de ciertos taxones. Por ejemplo, los virus ARN se ven infrarrepresentados tras aplicar técnicas de ultracentrifugación.
- La elección de los cebadores puede influir en el resultado final. Por ejemplo, la región V3-V4 del ADNr 16S es insuficiente en algunos casos para identificar con fiabilidad la especie bacteriana, y funciona especialmente mal para los géneros *Streptococcus* y *Lactobacillus* por la baja afinidad de los cebadores. Además, la necesidad de realizar una PCR implica que los taxones más abundantes en la muestra se van a ver sobrerrepresentados en detrimento de los más escasos [70]. Los estudios basados en *shotgun metagenomics* eliminan estos problemas.
- La elección de la base de datos de referencia también puede introducir sesgos a favor o en contra de ciertos taxones.
- La “composicionalidad” de los datos. Esta característica, inherente a este tipo de análisis, implica que los datos de abundancia se expresan siempre de forma relativa (en porcentaje), y no como abundancia absoluta (recuento total de un taxón concreto en cada muestra). Esto supone que, a la hora de comparar porcentajes entre muestras, la disminución de un taxón altera automáticamente los porcentajes del

resto de taxones, pudiendo mostrarse alteraciones que no son reales e ignorando disminuciones en la densidad global de la microbiota. Algunos estudios han tratado de combinar recuento mediante citometría de flujo y análisis metataxonómico para soslayar este problema, aunque el coste aumenta considerablemente [92].

- El estudio taxonómico de los microorganismos que conforman la microbiota puede no ser suficiente para explicar su influencia en procesos fisiopatológicos, ya que muchas especies pueden ser metabólicamente equivalentes en un ecosistema dado, y las diferencias en su proporción pueden por tanto ser irrelevantes para explicar estos procesos. Además, como ya se ha expuesto repetidas veces, la falta de consenso a la hora de definir una composición “normal” de microbiota dificulta la interpretación de este tipo de estudios.

2. Estudio funcional

Para llegar a entender la influencia global de la microbiota en el ecosistema, además de conocer los microorganismos presentes debemos revelar también su funcionalidad. Para ello, se pueden realizar estudios de metatranscriptómica (qué genes se están expresando), metaproteómica (qué proteínas se están produciendo) y metabolómica (cuáles son los metabolitos finales). La secuenciación del ARN mide los genes transcritos activamente, es decir, los transcritos, en las muestras de microbioma. Sin embargo, la presencia de ARN mensajero no significa necesariamente que los genes se expresen o se traduzcan en proteínas. Por el contrario, la metaproteómica y especialmente la metabolómica se han posicionado como herramientas muy útiles para complementar a estudios metataxonómicos y, aunque son más técnicas más complejas y con menor recorrido, se espera que tengan un papel creciente a la hora de dilucidar el potencial de la microbiota en la salud y en la enfermedad humana. A continuación, se exponen los aspectos más importantes de estas disciplinas.

2.1 Metaproteómica

La metaproteómica no se limita a detectar y caracterizar las proteínas presentes en una muestra, sino a relacionar sus funciones y las vías metabólicas en las que participan con los microorganismos que las producen. El término metaproteómica fue propuesto en 2004 [93], pero sólo recientemente la metaproteómica ha dado el salto a estudios de gran escala, impulsado por el desarrollo de espectrometría de masas (MS) de alta resolución y técnicas de proteómica cuantitativa. Estos avances han permitido la caracterización de más de

50.000 grupos proteicos a partir de estudios de microbioma [94]. A pesar de estos avances, se estima que las técnicas actuales solo tienen resolución para detectar del 10 al 20% del proteoma intestinal y el 30% de los taxones, presentando mayor dificultad en la detección de aquellas proteínas específicas de taxones minoritarios. Aun así, esta tecnología es fundamental para el estudio de las interacciones microbiota-hospedador, aplicándose con éxito en patologías como la enfermedad inflamatoria intestinal [95], la cirrosis hepática [96] o el VIH [64].

El esquema de trabajo experimental típico consiste en: (1) extracción de proteínas de las muestras de microbioma, (2) digestión proteolítica de las proteínas, (3) separación de péptidos mediante HPLC-MS/MS y (4) identificación y cuantificación de proteínas microbianas enfrentándolas a bases de datos. Por último, la información obtenida se utiliza para el análisis taxonómico y funcional. La técnica de extracción es crítica, ya que los microorganismos u orgánulos que presentan resistencia a la lisis celular, como por ejemplo las esporas, conllevan sesgos según la técnica empleada [97]. Actualmente la estrategia que minimiza estos problemas es la que emplea un detergente fuerte (SDS) combinado con disrupción mecánica (ultrasonicado) [94].

El análisis bioinformático de este tipo de estudios supone todo un reto. En primer lugar, por la falta de estandarización metodológica y la gran cantidad de datos generados. Además, las bases de datos actuales disponibles no están bien curadas. Por ejemplo, en el intestino humano se han catalogado ~9,9 millones de genes; sin embargo, se estima que entre el 40 y el 80% de ellos no están bien anotados [98]. Para facilitar los análisis, es recomendable acotarlos según el grupo de péptidos de interés, fraccionando las bases de datos utilizadas para mitigar errores tipo II en asignación de péptidos [99], así como incluir una base de datos de péptidos humanos (suponen hasta el 10% de los péptidos en heces). Existen herramientas de software dedicadas, como MetaLab [100] o MetaProteomeAnalyzer [101], que facilitan el procesamiento de los datos obtenidos mediante MS.

Finalmente, como aspectos a desarrollar en un futuro se incluyen: aumentar el número de muestras que se pueden procesar de forma simultánea (habitualmente restringido a una) [102], depurar y aumentar las bases de datos, identificar sistemáticamente modificaciones postraduccionales, que pueden ser importantes en funciones fisiológicas como la virulencia bacteriana [103] y, fundamentalmente, estandarizar la metodología tanto a nivel de *wet-lab* como de *dry-lab*.

2.2 Metabolómica

La metabolómica estudia las respuestas metabólicas globales y dinámicas de un sistema vivo a estímulos o factores genéticos. El metaboloma incluye todos los metabolitos presentes en una muestra, tanto intracelulares como excretados. Los metabolitos pueden derivar de la microbiota (por ejemplo, lipopolisacárido y butirato) o del hospedador (por ejemplo, péptidos antimicrobianos). Además, muchos metabolitos en el intestino son producidos por el co-metabolismo humano y de su microbiota. La metabolómica ha despertado especial interés como herramienta no solo para describir el estatus metabólico de distintas enfermedades, sino para desentrañar las interacciones bidireccionales entre la microbiota intestinal y distintos fármacos, con el fin de guiar un tratamiento o incluso predecir pronóstico [104].

La metabolómica mide directamente los metabolitos presentes en una muestra mediante técnicas analíticas como la espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN) o la MS. La RMN es más reproducible y válida para cualquier metabolito, mientras que la MS requiere más pre-procesamiento y tiene problemas con metabolitos no ionizables, pero es mucho más sensible que la RMN. Dada esta ventaja en la sensibilidad [105], el campo de la metabolómica se ha ido desplazando cada vez más hacia los enfoques basados en MS.

El principal reto de la metabolómica en los estudios de microbioma es la dificultad para distinguir los metabolitos humanos y microbianos, y su asignación a taxones específicos [106]. Un abordaje sencillo para esta asignación es el estudio integrado de la covariación de metabolitos y taxones [107]. Otros enfoques, como el marcaje proteico con isótopos estables (*protein-SIP*) [108], también puede vincular el metabolismo de un sustrato específico con taxones concretos y ayudar a reconstruir el metabolismo del microbioma.

Como ocurre en metaproteómica, las condiciones de manipulación y pretratamiento de la muestra suponen un paso crítico que puede alterar los resultados [94]. El primer paso consiste en paralizar la actividad metabólica (*quenching*), para después realizar la extracción (empleando solventes orgánicos, como el metanol). Los análisis metabolómicos pueden dividirse en dirigidos o no dirigidos. Un análisis dirigido investiga los cambios cuantitativos de metabolitos predeterminados utilizando estándares analíticos, mientras que un enfoque no dirigido mide cualquier metabolito por encima del límite de detección [109].

La metabolómica no dirigida se ha utilizado ampliamente para el descubrimiento de biomarcadores e identificación de vías metabólicas relacionadas con enfermedades, e implica una gran exigencia computacional para realizar análisis sólidos. Las técnicas dirigidas emplean cromatografía líquida o sólida acopladas a la MS, lo que reduce la complejidad de las muestras y permite monitorizar de forma precisa rutas metabólicas concretas.

Por último, el análisis bioinformático implica la extracción de lecturas, alineación, anotación y exploración de las bases de datos de espectros, y el análisis estadístico, incluyendo comparación entre muestras, identificación de rutas y redes para los metabolitos significativos, e integración con otros tipos de datos ómicos. Existen distintas herramientas disponibles para facilitar este tipo de análisis, como MetaboAnalyst [110], así como bases de datos más o menos específicas, como la Human Fecal Metabolome Database (HFMD) [111]. Sin embargo, ninguna de estas herramientas alcanza actualmente un rendimiento y fiabilidad óptimos. El desarrollo y optimización a este nivel se antoja fundamental para permitir que los estudios metabolómicos tomen mayor relevancia en un futuro [94].

2.3. Estudios multiómicos

La integración de los distintos enfoques ómicos proporciona la visión más completa posible del microbioma. Por desgracia, la integración de conjuntos de datos multiómicos no es una tarea sencilla, debido a la mayor complejidad y diversidad de los datos recogidos, lo que conlleva a la escasez de este tipo de estudios en la actualidad [104]. Esta integración depende en gran medida del desarrollo de herramientas bioinformáticas eficientes y de métodos estadísticos avanzados, como la estadística multivariante y el denominado *machine-learning* o aprendizaje automático [112,113]. La aplicación de este tipo de enfoques basados en la inteligencia artificial y en el aprendizaje automático probablemente revolucionará nuestra capacidad para integrar e interpretar los datos multiómicos [114]. En resumen, aunque la integración de datos multiómicos constituye un reto sin precedentes, con apenas una decena de trabajos que han explorado su uso, esta estrategia se posiciona como una herramienta prometedora para caracterizar de forma exhaustiva la composición, funcionalidad y actividad metabólica del microbioma.

III. MODULACIÓN DE LA MICROBIOTA

El conocimiento y estudio de la microbiota humana y su implicación en distintas enfermedades pueden emplearse para diseñar acciones terapéuticas basadas en la modificación de dicho ecosistema. Como ya se ha comentado previamente, no existe definición para identificar una composición alterada y la disbiosis debe considerarse un concepto funcional. Modificar la funcionalidad de un ecosistema tan complejo como el intestinal supone un reto, en especial debido a la resiliencia o robustez del mismo frente al cambio, al desconocimiento del papel individual de cada componente microbiano dentro del ecosistema y en relación con la patología a tratar, y a la dificultad para reemplazar componentes concretos. La transferencia de una microbiota intestinal a partir de un donante sano es actualmente la estrategia más utilizada, y la que ha mostrado mejores resultados, especialmente en el tratamiento de la ICD [115]. Aunque el término trasplante de microbiota fecal se utiliza comúnmente, el nombre correcto de esta técnica es el de transferencia de microbiota fecal (TMF).

1. Historia de la transferencia de microbiota fecal

Aunque el uso médico de la TMF es relativamente reciente, las primeras referencias históricas se remontan al siglo IV d.C. en China, donde se han encontrado documentos que describen la preparación de una "sopa amarilla" para tratar la diarrea, compuesta de una mezcla de agua y heces de una persona sana. Existen otras referencias históricas, como la ingesta de heces de caballos para aliviar la disentería entre los soldados de trinchera. Durante la I Guerra Mundial, todo un batallón murió de deshidratación provocada por diarrea infecciosa, excepto un soldado que mantuvo su ritmo intestinal intacto [116]. De las heces de este soldado se aisló una cepa de *Escherichia coli* que se denominó *E. coli* Nissle 1917 y que en la actualidad se comercializa como el probiótico Mutaflor® (Pharma-Zentrale, Alemania).

En 1958, Eiseman *et al.* publicaron la curación completa de 4 pacientes en estado crítico que padecían una enfermedad conocida entonces como "colitis pseudomembranosa" [117]. La resolución de la diarrea se produjo tras la administración oral de heces preparadas de voluntarios sanos. Esta fue la primera publicación científica en la que se hace referencia a las posibilidades terapéuticas de esta técnica, en una enfermedad que ahora se sabe que está causada por *Clostridioides difficile*, antes *Clostridium difficile* [118]. Sin embargo, pasaron más de 50 años antes de que la TMF se incluyera en las guías de tratamiento de la

ICD. De hecho, la técnica era prácticamente desconocida para la comunidad médica hasta 2013, cuando Keller *et al.* publicaron los primeros resultados de un ensayo clínico en el que se comparaba la eficacia de la TMF en el tratamiento de la ICD recurrente respecto a la terapia antibiótica convencional con vancomicina [35]. El estudio se realizó con sólo 35 pacientes al constatar que la TMF lograba una tasa de curación del 93%, frente al 32% obtenido con vancomicina, el tratamiento estándar. Desde la publicación de este ensayo, la TMF se ha incluido en las guías terapéuticas para el tratamiento de la ICD recurrente [119–122] y ha dado lugar a numerosos estudios que han explorado su potencial aplicación en otras patologías [123,124].

2. Selección de donantes

Reclutar y certificar donantes de heces no es una tarea sencilla, dados los estrictos criterios de inclusión. Publicaciones anteriores señalan que en torno al 2-5% de la población es elegible y normalmente sólo se acepta a 1 de cada 4 voluntarios [125,126]. En los últimos años, la creación de bancos de heces se ha convertido en una práctica habitual para garantizar la disponibilidad continua de muestras con la necesaria certificación [127,128].

Para ser donante de heces, los voluntarios deben comprender perfectamente el proceso y sus riesgos, mantener una buena comunicación con su médico y cumplir todos los criterios de inclusión y ninguno de exclusión (Tabla 1). Los protocolos disponibles basados en la evidencia para el cribado de donantes coinciden en su mayoría en su contenido y estructura [129,130]. El primer requisito es una entrevista personal para evaluar el estado de salud general del donante y su estilo de vida en cuanto al riesgo de enfermedades transmisibles, seguida de una anamnesis completa para descartar enfermedades que puedan afectar a la microbiota intestinal. A continuación, deben realizarse pruebas a nivel fecal y nasal exhaustivas y un cribado serológico completo para determinar si el candidato a donante es portador de agentes potencialmente infecciosos. Las pruebas también deben comprobar si hay recuentos sanguíneos anormales o disfunción hepática (Tabla 2). Por último, el protocolo de cribado debe adaptarse a la epidemiología local de las enfermedades infecciosas.

Tabla 1. Criterios de inclusión y exclusión para la validación de los donantes de heces. Protocolo vigente en el Hospital U. Ramón y Cajal.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN	CRITERIOS DE EXCLUSIÓN			
	INFECCIOSOS	GASTROINTESTINALES	USO DE DROGAS	OTROS
• 18-65 años • IMC: 18-30 • Buena salud general y ritmo intestinal adecuado. • Consentimiento informado firmado y aprobado por un Comité de Ética.	• Infección reciente • Antecedentes de VIH, hepatitis B/C, sífilis, HTLV, malaria o tuberculosis • Hábitos sexuales de riesgo • Trasplante de órganos/tejidos y transfusiones en el último año • Tatuaje, piercing o acupuntura en los últimos 6 meses • Riesgo de Creutzfeldt-Jakob • Viajes a países tropicales • Vacunación con vacunas vivas atenuadas (<6 meses) • Trabajadores sanitarios, por riesgo de colonización por microorganismos multirresistentes. Trabajadores con animales, por riesgo de zoonosis	• Enfermedad inflamatoria intestinal • Síndrome inflamatorio intestinal, estreñimiento o diarrea funcional crónica • Enfermedad celíaca y otros trastornos digestivos crónicos • Antecedentes o alto riesgo de cáncer gastrointestinal • Cualquier sintomatología digestiva significativa en los últimos 3 meses o sangre en las heces	• Consumo de drogas ilícitas • Uso de antibióticos (<3 meses) • Inhibidores de la bomba de protones (< 3 meses) • Uso de inmunosupresores o quimioterapia (<3 meses)	• Proceso de cáncer activo o antecedentes de cáncer en los últimos 10 años • Cirugía gastrointestinal mayor previa (excluyendo la apendicectomía) • Hepatopatía • Enfermedad renal crónica • Enfermedades autoinmunes y sistémicas • Diabetes mellitus • Síndrome metabólico • Enfermedades neurológicas y psiquiátricas • Enfermedad vascular significativa

IMC: índice de masa corporal.

Tabla 2. Pruebas analíticas que se deben realizar a los donantes para certificar su elegibilidad. Protocolo vigente en el Hospital U. Ramón y Cajal.

PRUEBAS EN SANGRE	PRUEBAS EN HECES
• Hemograma y hemostasia • Bioquímica (creatinina, urea, glucosa, sodio, potasio, cloro, calcio, magnesio, fósforo, ácido úrico, GOT, ALT, GGT, fosfatasa alcalina, bilirrubina total, albúmina, CRP) • Perfil lipídico (triglicéridos y colesterol total, HDL y LDL) • Hormonas tiroideas • Cuantificación de inmunoglobulinas en suero • Estudio microbiológico en sangre: - VIH: ELISA anti-VIH, antígeno p24 y carga viral - Hepatitis B: antígeno de superficie (AgHBs), anticuerpos del núcleo (AchBc IgG e IgM), anticuerpos de superficie (AchBs), evaluación de carga viral y periodo ventana - Hepatitis C: ELISA anti-VHC, evaluar la carga viral y el periodo ventana de infección - Hepatitis A y E: IgM e IgG - Sífilis: RPR y FTA-ABS - Citomegalovirus y virus de Epstein Barr: IgM e IgG - <i>Entamoeba histolytica</i> - Considerar HTLV 1/2 y <i>Strongyloides stercoralis</i> en áreas geográficas de alto riesgo	• <i>Clostridioides difficile</i>: GDH y presencia de toxinas A y B • Cultivo rutinario de heces para descartar enteropatógenos • Estudio de larvas y huevos de parásitos en las heces (muestras de 3 días sucesivos) • Antígeno de <i>Giardia intestinalis</i> • Norovirus • Calprotectina • Sangre oculta en heces • Detección de colonización rectal de bacterias multirresistentes: BLEE y/o enterobacterias productoras de carbapenemasas, SARM y ERV
	SARS-CoV-2
	• Detección de IgM e IgG en suero • Realizar PCR en exudado nasofaríngeo para descartar infección activa y en heces para descartar presencia de partículas virales • Mantener las heces en cuarentena a la espera de posibles síntomas

GOT: transaminasa glutámico oxalacética, ALT: alanina aminotransferasa, GGT: gamma-glutamyl transferasa, CRP: proteína C reactiva, GDH: glutamato deshidrogenasa, BLEE: betalactamasa de espectro extendido, SARM: *S. aureus* resistente a meticilina, ERV: enterococo resistente a vancomicina.

La posible colonización intestinal del donante por bacterias multirresistentes es uno de los aspectos más importantes. En 2019, la Administración de Medicamentos y Alimentos de los Estados Unidos (FDA) emitió una alerta después de que en el contexto de un ensayo clínico dos pacientes inmunodeprimidos sufrieran una infección por *E. coli* productora de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) tras la realización de TMF a partir de un donante colonizado por esa cepa, lo que provocó la muerte de uno de los pacientes [131]. Este es, hasta el momento, el efecto adverso más grave secundario a TMF, y pone de manifiesto la necesidad del cribado de cepas multirresistentes en los donantes. En receptores inmunodeprimidos (una situación común en pacientes que reciben TMF), el cribado del donante debe incluir además el despistaje en heces de *Vibrio cholerae*, *Listeria monocytogenes* y tinción de Kinyoun para *Cyclospora*, *Isospora* y *Cryptosporidium*.

La donación de heces se ha visto recientemente afectada por la pandemia de SARS-CoV-2, dado que el virus se elimina a través de las heces [132]. En cualquier situación de sospecha de infección actual o de eventos de riesgo de contacto, las muestras de heces deben ponerse en cuarentena durante un máximo de 14 días hasta que se pueda confirmar que el donante está libre de infección. Además, se puede realizar la extracción de ARN y la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa a partir de las heces; sin embargo, las muestras de heces no son especialmente adecuadas para esta metodología, dado que el ARN viral puede degradarse fácilmente y la extracción/amplificación puede fallar [133,134].

Por último, la especificidad del donante no parece ser un factor relevante en la ICD, dado que no hay evidencias de que el éxito clínico de la TMF dependa del donante ni se ha caracterizado un perfil de microbiota que sea más adecuado [135,136]. Inicialmente, los donantes se seleccionaban entre los propios familiares del paciente. Sin embargo, en los últimos años la mayoría de los profesionales clínicos han pasado a utilizar bancos de heces de donantes anónimos [127,137]. Los datos disponibles sugieren que la ICD recurrente sólo requiere la adición de un ecosistema microbiano completo para aumentar la diversidad del microbioma intestinal devastado. Esto, sin embargo, podría no ser aplicable a otras patologías donde se está investigando el uso de la TMF [138–143]. En el [Capítulo IV](#) de la presente tesis doctoral se aborda este problema y se busca optimizar la selección de donante de heces en pacientes con CU.

3. Recogida y tratamiento de muestras

Las muestras de heces deben recogerse en un recipiente estéril suficientemente grande y cómodo para el donante. Se requiere un mínimo de 50 g de heces para el cribado, pero se recomienda recoger la deposición completa. Existen varios kits comerciales de recogida para la TMF que cumplen los criterios de esterilidad, y algunos de ellos también contienen dispositivos que crean una atmósfera anaeróbica que preserva la integridad de la microbiota hasta su llegada al laboratorio (GutAlive®, MicroViable therapeutics, Gijón, España).

Las muestras de heces deben llegar al laboratorio en las 6 horas siguientes a su recogida. Las muestras pueden mantenerse a 4°C durante este periodo de tiempo. En casos excepcionales en los que las muestras no puedan transportarse al laboratorio en pocas horas, pueden congelarse a -20°C pero deben transportarse en las mismas condiciones, dado que los ciclos de congelación/descongelación pueden afectar a la viabilidad de los microorganismos [144]. La descongelación de una muestra de heces debe ser progresiva, de -80°C a -20°C durante 24 horas y luego de -20°C a 4°C durante otras 24 horas.

Una vez que la muestra llega al laboratorio, debe garantizarse su trazabilidad mediante el registro de todos los datos disponibles, principalmente la identificación del donante, la hora de depósito y cualquier incidente potencialmente relevante comunicado por el donante. Se recomienda encarecidamente el uso de bases de datos en línea como REDCap (<https://www.project-redcap.org>) para la introducción y el almacenamiento de datos. Deben rechazarse las muestras con identificación inadecuada o cuyo origen sea incierto.

Las muestras deben abrirse y procesarse en una cabina de flujo laminar. Se debe decidir si se acepta o se rechaza la muestra en función de su aspecto y consistencia; una deposición mal formada es principal criterio de rechazo. Siempre se deben conservar alícuotas congeladas (-80°C) de la muestra para poder realizar pruebas adicionales si se producen efectos adversos después de la TMF. Se han publicado diversos protocolos para el procesamiento de las heces. Todos dan prioridad a la preservación de la viabilidad bacteriana, en particular minimizando la exposición de la muestra al aire para evitar la muerte de los microorganismos anaerobios [145]. Se han empleado varios disolventes, desde el yogur hasta la solución salina, para la suspensión de las heces. El agua es el líquido óptimo para la administración por colonoscopia porque se absorbe inmediatamente a través del colon. La colonoscopia y la administración por sonda nasogástrica requieren una

solución fecal líquida que puede obtenerse suspendiendo la muestra de heces en 500 ml de agua o solución salina. Tras eliminar los restos sólidos por centrifugación o filtrado, el producto puede administrarse directamente. La coordinación adecuada con el profesional que va a infundir el preparado es un factor clave para minimizar el tiempo desde el procesamiento hasta la administración. La solución debe estar a temperatura ambiente antes de su uso.

En cambio, la liofilización requiere la adición de crioconservantes como la trehalosa, el glicerol o la leche semidesnatada para mantener las bacterias vivas durante el proceso [146]. La suspensión no debe realizarse con mezcladores mecánicos ya que permiten la exposición al aire. El más recomendado es el mezclador Stomacher® (Seward, Worthing, Reino Unido), o similar, con bolsas de plástico adecuadamente resistentes. La liofilización permite la deshidratación completa de la muestra por sublimación, proceso por el cual las bacterias pueden conservarse durante un período prolongado, incluso a temperatura ambiente, sin perder su viabilidad. Este proceso permite transformar la muestra desde un estado sólido, que se consigue congelando la muestra de heces (generalmente a -50°C) a un estado gaseoso sin pasar por el estado líquido. Se recomienda la criopreservación para minimizar la muerte bacteriana y la encapsulación puede realizarse manualmente o mediante el uso de dispositivos específicamente diseñados. Se prefieren las cápsulas gastrorresistentes, ya que liberan su contenido en el intestino, protegiendo a las bacterias del entorno ácido del estómago. También es importante tener en cuenta el tamaño de la cápsula, ya que los pacientes pueden tener dificultades para tragar cápsulas grandes. Por lo general, se emplean cápsulas de tamaño 0. Para los pacientes de edad avanzada y otros con problemas de deglución, las cápsulas pueden administrarse con gelatina o yogur para facilitar la deglución. Es importante supervisar la administración de las cápsulas para evitar posibles aspiraciones o vómitos.

Por último, es aconsejable conservar alícuotas del proceso (productos líquidos o en cápsulas) para hacer recuento de bacterias cultivables viables y controlar las pérdidas de procesamiento. Aunque no existe ninguna recomendación oficial al respecto, la vida útil de los preparados de microbiota suele estimarse en 6 meses, suponiendo que las soluciones líquidas se almacenen adecuadamente a -80°C y que las cápsulas se conserven a temperatura ambiente y en ausencia de humedad.

4. Preparación del receptor

Cada receptor de TMF debe ser considerado individualmente, teniendo en cuenta su historia clínica y sus características. En el caso de la ICD, la terapia antibiótica con vancomicina oral se prescribe generalmente al menos 3 días antes de la TMF, con la intención de reducir la carga de *C. difficile* y mantener al paciente estable. El antibiótico debe suspenderse 24 horas antes del procedimiento de TMF para evitar la muerte de las bacterias del donante [147]. En el caso de la ICD refractaria grave puede considerarse la posibilidad de no suspender la antibioterapia y mantenerla incluso después de la TMF para asegurar la estabilidad del paciente. Puede realizarse una segunda TMF si la diarrea no desaparece una vez que el paciente esté estabilizado.

Cuando el procedimiento se va a realizar por colonoscopia, se requiere una preparación intestinal que reduce la densidad de *C. difficile* y permite el paso del colonoscopio. Aunque no se ha demostrado la relación directa entre el uso de soluciones evacuantes y la eficacia de la TMF, la mayoría de los expertos recomiendan administrarlas el día anterior a la TMF en aquellos pacientes cuya situación clínica lo permita [119]. La TMF se realiza bajo sedación con un colonoscopio estándar. Por lo tanto, el paciente debe firmar un consentimiento informado para el procedimiento de colonoscopia, además del consentimiento informado específico para la TMF. La insuflación de gas debe minimizarse al máximo durante el procedimiento para evitar la expulsión del líquido transferido. El procedimiento habitual es depositar todo el preparado líquido en el ciego, para permitir que la microbiota suspendida se disemine por todo el colon. Si no se puede llegar al ciego, el contenido debe liberarse lo más distalmente posible. Después de la administración, el colonoscopio debe retirarse cuidadosamente sin aspirar para evitar la eliminación del líquido de TMF. Varios autores, ante la inviabilidad de realizar una colonoscopia, han implementado la TMF por enema [148], aunque esta vía ha demostrado ser subóptima, y su uso debe restringirse a casos excepcionales.

Cuando la TMF se realiza mediante cápsulas orales con heces liofilizadas, el paciente no necesita preparación. Sin embargo, es aconsejable administrar las cápsulas en ayunas o sin haber ingerido nada en las 4-6 horas anteriores. Algunos autores recomiendan el uso de una solución descontaminante con antibióticos orales no absorbibles, como la colistina, la nistatina, la tobramicina y la vancomicina, antes de la TMF para mejorar su implantación [64].

5. Seguimiento clínico y control microbiológico

Una vez realizada la TMF, lo más importante es la evolución clínica del paciente y la vigilancia de aparición de efectos adversos [149]. El día en que se realiza el procedimiento, los pacientes deben estar en reposo absoluto, y la ingesta de alimentos puede reanudarse 6 horas después de la transferencia. Las complicaciones importantes y los efectos adversos significativos durante las primeras horas después de la TMF son inusuales, pero los pacientes deben permanecer en observación y ser trasladados directamente al servicio de urgencias si se produce alguna complicación. Normalmente se observa una mejora clínica casi inmediata en la ICD, incluso si las primeras heces post-TMF son diarreicas. Sin embargo, debe realizarse un seguimiento clínico durante al menos 8 semanas, que puede ser telefónico para evitar las visitas innecesarias al hospital.

La principal causa de fracaso clínico en ICD es la administración de antibióticos durante o después de la TMF [150,151]. La terapia antimicrobiana destruye la integridad de la microbiota transferida, comprometiendo su efecto beneficioso. Para prevenir esta situación, se debe proporcionar un documento a los pacientes para que lo entreguen a sus médicos de atención primaria en el que se indique que las terapias con antibióticos deben evitarse en la medida de lo posible, especialmente clindamicina, carbapenemas, fluoroquinolonas, cefalosporinas e inhibidores de betalactamasas. Las tetraciclinas (doxiciclina), los macrólidos (azitromicina) y el linezolid deben considerarse para las infecciones respiratorias y cutáneas, mientras que los aminoglucósidos (gentamicina) y el cotrimoxazol son las opciones más adecuadas para las infecciones del tracto urinario.

Aunque no es estrictamente necesario y muchos laboratorios carecen de medios para realizarlo, se recomienda el seguimiento microbiológico de la TMF siempre que sea posible mediante el estudio metataxonómico de las heces. Para ello, se recogen muestras de heces del receptor, generalmente después de la primera semana, y otra después de 1 mes. Se ha estimado que la microbiota transferida se mantiene en el receptor durante al menos 3 meses, incluso si se implanta de forma incompleta, con una gran variabilidad para cada par donante-receptor [152,153]. Un estudio reciente [154] ha demostrado la retención de parte de la microbiota implantada en el 71% de los receptores hasta 5 años después de la TMF, y ha logrado correlacionar el éxito terapéutico en ICD recurrente con el grado de implantación microbiológica en los pacientes. Por último, los cambios metabólicos en el receptor, en particular la producción de AGCC, pueden también ser monitorizados para determinar el impacto de la TMF en la conducción de cambios funcionales.

6. Indicaciones actuales

La ICD recurrente es la única indicación clínica aprobada de la modulación de la microbiota mediante TMF, en concreto a partir de la segunda recurrencia (tercer episodio de diarrea) y en casos especiales, como el megacolon tóxico refractario a los antibióticos [119–122]. Sin embargo, dado que cada país tiene su propio modelo sanitario con diferentes regulaciones, algunos centros utilizan la TMF para tratar otras enfermedades. La tasa de eficacia global de la TMF a partir del segundo episodio de recurrencia alcanza el 80%-90% [36]. Se ha demostrado que las heces de donantes autorizados son válidas, ya sean congeladas o frescas, y sin diferencias significativas en la eficacia cuando se administran por sonda nasogástrica, colonoscopia o cápsulas con heces liofilizadas [155].

La ICD es principalmente una enfermedad nosocomial cuya historia natural comienza con la destrucción de la microbiota intestinal secundaria a un agente externo, generalmente antibióticos (especialmente clindamicina, cefalosporinas o fluoroquinolonas), seguido de la adquisición de esporas de *C. difficile* del entorno hospitalario a través de la ruta fecal-oral [156]. Las esporas pueden sobrevivir a través del tracto gastrointestinal hasta llegar al colon, donde los ácidos biliares desencadenan su transformación en la forma vegetativa. Los principales factores de virulencia de *C. difficile* son sus toxinas (TcdA y TcdB), que provocan daños tisulares en el epitelio intestinal y la consiguiente diarrea sanguinolenta y mucosa. La ICD se considera resuelta cuando no se produce diarrea durante las primeras 48 horas tras la finalización del tratamiento y se considera finalmente resuelta si la diarrea no reaparece en las siguientes 12 semanas. El veinte por ciento de los pacientes con ICD experimentan una recurrencia causada por el mismo microorganismo, siendo a partir de entonces mucho más propensos a recaer, aumentando su riesgo de mortalidad en cada episodio.

A pesar de la alta eficacia, seguridad y baja tasa de efectos adversos demostrados por la TMF, su uso sólo se recomienda cuando se han agotado las opciones terapéuticas convencionales [157]. Varios grupos han propuesto aplicar la TMF desde el primer episodio de ICD, pero un reciente metaanálisis ha demostrado que esta técnica no alcanza tasas de curación superiores respecto a la terapia antibiótica convencional [158]. Además, las dudas respecto a la seguridad a largo plazo de la TMF han contribuido también a frenar su aplicación más temprana.

7. Otras aplicaciones en estudio

Actualmente se están investigando numerosas aplicaciones potenciales basadas en la modulación de microbiota, principalmente mediante TMF. A fecha de 22 de octubre de 2021, había registrados 348 ensayos clínicos autorizados de TMF (<https://clinicaltrials.gov>). La mayoría de los estudios de TMF no relacionados con la ICD incluyen el tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal (especialmente la CU), la potenciación o sensibilización frente a tratamientos inmunomoduladores para el cáncer, la descolonización de bacterias multirresistentes y el tratamiento de enfermedades hepáticas. A continuación, se resume la evidencia acumulada en las principales líneas de investigación más allá de la ICD.

7.1. Enfermedad inflamatoria intestinal

Aunque la eficacia de la TMF en la CU es claramente inferior a la de la ICD, cada vez hay más pruebas del beneficio clínico y endoscópico de la TMF respecto al placebo. En una revisión sistemática Cochrane de 2018, la tasa de remisión global en la semana 8 fue del 37% (52/140) para los pacientes sometidos a TMF en comparación con el 18% (24/137) para los que recibieron placebo [159]. Curiosamente, se obtuvieron mayores tasas de remisión cuando se mantuvieron las condiciones anaeróbicas durante la manipulación de las heces del donante. A diferencia de la ICD, se ha descrito un fenómeno de superdonante en varias series, esto es, donantes cuyas heces se asocian con una mayor tasa de éxito del procedimiento. Sin embargo, todavía no se ha identificado la firma microbiana específica que podría estar implicada [160]. La mayoría de los estudios se han realizado en pacientes con muchos años de progresión de la enfermedad y se han centrado en inducir la remisión, pero no en su mantenimiento. En cualquier caso, los documentos de consenso recomiendan la TMF sólo como tratamiento para la CU en el contexto de un ensayo clínico [161]. En el [capítulo IV](#) de la presente tesis doctoral se revisa en mayor profundidad la implicación de la TMF en CU. Para la enfermedad de Crohn existe menos evidencia acumulada, a través de varios estudios de cohortes y dos ensayos aleatorizados relativamente pequeños que han evaluado el uso de la TMF en adultos y niños, obteniendo resultados preliminares han sido más modestos que en CU [162]. Al igual que con la ICD, los eventos adversos de la TMF en la enfermedad inflamatoria intestinal suelen ser escasos y autolimitados, aunque algunos pacientes experimentaron un empeoramiento de su enfermedad de base, incluyendo la necesidad de corticoides intravenosos y colectomía.

7.2. Encefalopatía hepática

Aunque todavía no se refleja en las guías de tratamiento, la modulación de la microbiota intestinal mediante TMF se acepta como una alternativa válida para el tratamiento de la encefalopatía hepática cirrótica, tanto por administración nasoduodenal como por la ingestión de cápsulas fecales [163]. En la cirrosis se ha descrito un estado de disbiosis y sobrecrecimiento bacteriano intestinal combinado con hiperamonemia, que a su vez provoca la disfunción neuronal propia de la enfermedad. El tratamiento convencional se basa en la administración de lactulosa y rifaximina para reducir el metabolismo bacteriano de la microbiota intestinal, y la TMF se posiciona como una alternativa ecológica y segura para estos pacientes.

7.3. Cáncer

La composición de la microbiota intestinal ha demostrado su papel en la susceptibilidad frente a tratamientos contra el cáncer basados en inmunoterapia, como los inhibidores del punto de control inmunitario PD-1/PD-L1, y su modulación se ha propuesto como una herramienta prometedora para la potenciación de este tipo de terapias [164,165]. Sin embargo, se desconoce la fracción activa de las heces que determina la respuesta a estas terapias; aunque en este caso, la sospecha se dirige más hacia la abundancia de ciertos metabolitos que a la presencia de taxones específicos. En particular, se ha demostrado que los AGCC inducen la diferenciación de las células T y afectan al equilibrio efector/regulador [166]. También se ha propuesto el análisis de la composición y los metabolitos de la microbiota como estrategia para identificar biomarcadores de respuesta al tratamiento inmunomodulador, y poder predecir el éxito de terapias específicas, dada la relación directa entre una microbiota poco diversa y una menor respuesta al tratamiento [167]. Aunque se están llevando a cabo importantes trabajos en este campo, especialmente en experimentación animal, todavía no hay pruebas suficientes que justifiquen el uso de la TMF de forma rutinaria como coadyuvante de la inmunoterapia frente al cáncer [168]. Se necesita más información para poder seleccionar a los donantes adecuados para cada receptor, aunque algunos autores han propuesto utilizar como donantes de heces a pacientes que han respondido previamente a un tratamiento inmunomodulador [169].

7.4. Descolonización de bacterias multirresistentes

La colonización intestinal por bacterias multirresistentes a los antibióticos es un problema creciente en la medicina moderna debido a su elevada carga y a las limitaciones terapéuticas

para las enfermedades infecciosas. Además, las infecciones causadas por estas bacterias presentan mayores tasas de morbilidad y mortalidad y un aumento de los costes sanitarios debido a la prolongación de las estancias hospitalarias [170]. El mecanismo más común por el que las bacterias se hacen resistentes a los antibióticos es la adquisición de genes contenidos en elementos genéticos móviles, con capacidad de propagarse a otras bacterias. Sin embargo, la resistencia tiene un coste para la bacteria y las cepas sensibles tienen una mayor "eficiencia" o *fitness*. En ausencia de presión selectiva de antibióticos, las variantes sensibles tienden a desplazar a las resistentes por el crecimiento más eficiente de las primeras. Este es el principio en el que se basa la utilidad de la TMF para descolonizar las bacterias multirresistentes del intestino, para lo cual debe corroborarse siempre la ausencia de mecanismos genéticos de resistencia (resistoma) en las heces del donante [171,172]. La mayoría de las pruebas clínicas que apoyan el uso de la TMF en este contexto se basan en casos o series cortas, por lo general de pacientes que se sometieron a TMF para tratar la ICD recurrente [173]. Se necesitan más estudios para demostrar la utilidad de la TMF, sobre todo teniendo en cuenta que la descolonización espontánea es un evento común [174] que puede enmascarar la verdadera eficacia de este procedimiento.

7.5. Otras patologías

Por último, investigaciones recientes también han implicado a la microbiota intestinal en enfermedades no digestivas como la obesidad y el síndrome metabólico [175], la Esclerosis Múltiple [176], la infección por VIH [64], el autismo [177] y otras enfermedades neurológicas [178]. En estas enfermedades, la TMF y otros tipos de modulación también podrían representar una opción terapéutica, aunque su aplicación a corto y medio plazo parece poco probable debido a la falta de ensayos clínicos que respalden su eficacia.

8. Riesgos y efectos adversos

La modulación de la microbiota, y especialmente la TMF, no es sólo un procedimiento ecológico destinado a restaurar/reorganizar un ecosistema microbiano no funcional, sino también una perturbación del sistema que puede acarrear efectos indeseables a corto y largo plazo. Numerosas enfermedades pueden transmitirse por vía fecal y están relacionadas de algún modo con la composición y la función de la microbiota humana. Por lo tanto, la selección de los donantes es crucial para minimizar este riesgo. A pesar de un cribado exhaustivo, existe la posibilidad de que los donantes sanos puedan transmitir en sus heces la predisposición a ciertas enfermedades que todavía no han expresado, algo imposible de

detectar en el momento de la donación [179]. La exposición a estos riesgos podría estar aumentando debido a la creciente disponibilidad en la red de tutoriales *do-it-yourself* de TMF, que estarían fomentando su uso no supervisado y no indicado entre la población. Las autoridades sanitarias deben concienciar sobre los peligros de estas prácticas y monitorizar su incidencia.

Los efectos adversos de la TMF pueden dividirse en efectos a corto y a largo plazo [180–183]. Los efectos adversos inmediatos son escasos y generalmente leves, siendo los más comunes la diarrea, la flatulencia, el dolor abdominal, el estreñimiento, los vómitos, el prurito, la parestesia, la elevación de los niveles de proteína C reactiva y la cefalea. Entre las complicaciones más graves documentadas se encuentran la infección sistémica causada por microorganismos multirresistentes [131], el megacolon tóxico y los brotes de enfermedad inflamatoria intestinal. También se ha informado de efectos colaterales beneficiosos, como la erradicación de bacterias multirresistentes, la reducción de la resistencia bacteriana [173], e incluso la curación de infecciones crónicas y recurrentes del tracto urinario [184].

Uno de los hándicaps a la hora de justificar la implementación clínica de técnicas basadas en modulación de la microbiota es que sus efectos adversos a largo plazo aún no han sido bien determinados, dado que las series publicadas han sido cortas y han incluido en su mayoría a pacientes de edad avanzada [185,186]. No obstante, los estudios disponibles no han sugerido ningún riesgo a largo plazo asociado a la TMF, al menos en pacientes ancianos con ICD. El estudio con un seguimiento más largo publicado hasta ahora es el de la cohorte del primer ensayo controlado aleatorizado de TMF para la ICD [181]. Los autores realizaron un seguimiento de 10 años en 34 pacientes y concluyeron que ninguno de los pacientes desarrolló eventos adversos graves a largo plazo derivados del procedimiento. Se necesitan estudios controlados más largos que validen la seguridad a largo plazo de la TMF, específicamente en población joven. Se espera que los registros prospectivos de TMF a gran escala proporcionen datos valiosos para aclarar esta cuestión [157].

Por último, un factor que se suele pasar por alto es la interacción entre el sistema inmunitario del receptor y la microbiota inoculada. La TMF implica la administración de un preparado fecal que puede actuar como un insulto antigénico, lo que explicaría la aparición de efectos adversos relacionados. A pesar de ello, las complicaciones inmunológicas derivadas de la TMF son infrecuentes, leves y de poca importancia [187].

El estudio de cómo los estímulos inmunológicos derivados de la transferencia de microbiota pueden afectar a los receptores se aborda en el [Capítulo IV](#) de la presente tesis doctoral.

9. Rentabilidad

El coste final de la TMF depende de la metodología empleada en cada centro, de si se remunera a los donantes y del número de procedimientos realizados. En general, la parte más costosa de la TMF es el proceso analítico necesario para certificar a los donantes. Su uso en la ICD recurrente ha demostrado ser coste-efectiva respecto a la terapia antibiótica convencional [188–190]. En concreto, la TMF es el tratamiento más rentable después del tercer episodio (segunda recurrencia), independientemente de la gravedad inicial.

Por el contrario, ha habido pocos estudios que hayan evaluado la rentabilidad de la TMF para indicaciones distintas de la ICD recurrente. Un estudio reciente demostró la superioridad de la TMF secuencial para tratar la ICD fulminante [191], mientras que en enfermedad inflamatoria intestinal solamente se ha publicado un trabajo hasta la fecha que haya evaluado este aspecto, demostrando la rentabilidad económica del procedimiento [192]. Se necesitan más estudios para abordar la rentabilidad de la TMF para indicaciones no relacionadas con la ICD.

10. Regulación

Todavía no existe un consenso metodológico universal para la TMF y cada centro adapta el procedimiento a sus propias condiciones y protocolos [193]. Inicialmente, la mayoría de las intervenciones se realizaban por colonoscopia; hoy, sin embargo, muchos centros han optado por la administración de heces liofilizadas mediante cápsulas gastrorresistentes, lo que simplifica enormemente el proceso y elimina los riesgos derivados de la colonoscopia.

Por otro lado, aunque actualmente no hay una legislación común que regule el uso de la TMF, varios países han optado por otorgarle la categoría de medicamento [194]. Como consecuencia, han surgido empresas especializadas en este sector que comercializan suspensiones de heces y cápsulas con material liofilizado. Sin embargo, esta consideración ha sido fruto de gran debate, recibiendo opiniones contrarias entre los expertos [195]. En cualquier caso, el procedimiento de TMF debe realizarse siempre en un centro médico autorizado bajo la aprobación de un Comité de Ética, con profesionales sanitarios formados, y con los pacientes informados de los detalles del proceso y habiendo firmado un documento de consentimiento informado.

3.11. Otras técnicas de modulación de la microbiota

Las limitaciones de la TMF en materia de seguridad, estandarización y legislación han promovido el desarrollo de nuevos productos basados en la microbiota, pero con una composición controlada y definida; un concepto acuñado como TMF 2.0 [196]. Este enfoque pretende simplificar la TMF, aislando y administrando la fracción mínima activa de la microbiota intestinal con actividad terapéutica. En el caso de la ICD, actualmente existen dos compuestos en fase III, denominados SER-109 y RBX2660, que han obtenido resultados preliminares prometedores [197,198]. Sin embargo, ambos productos obtienen tasas de éxito significativamente más bajas que la TMF. Por otro lado, un ensayo publicado recientemente en el que se probó la eficacia de un consorcio bacteriano formado por 12 cepas demostró ser inferior a la TMF convencional [199].

En cuanto a los probióticos, representan la estrategia más simple posible de modulación de la microbiota. Sin embargo, no han demostrado su utilidad en el tratamiento coadyuvante de la ICD y ninguna guía los recomienda [119–122]. Además, se han planteado cuestiones de seguridad debido a los informes de infección por *Lactobacillus* en pacientes inmunocomprometidos tras el consumo de probióticos [200,201]. Además de los probióticos convencionales, la bacteria anaerobia *Bacteroides ovatus* se ha presentado como un candidato prometedor frente a ICD, dado que produce una hidrolasa de sales biliares con capacidad *in vitro* para inhibir el crecimiento de *C. difficile* [202]. Sin embargo, esta bacteria intestinal comensal también puede actuar como patógeno oportunista, lo que dificulta su potencial uso terapéutico. En cualquier caso, se espera que una mezcla de probióticos sea más eficaz que las opciones de una sola cepa debido a los posibles efectos sinérgicos [203].

Se necesitan más estudios que profundicen en la mecánica de la TMF y permitan identificar los factores clave que explican su efectividad terapéutica, tanto en ICD como en otras patologías, para favorecer el desarrollo de estrategias de modulación de microbiota más dirigidas y controladas.

HIPÓTESIS GENERAL

El notable desarrollo de las tecnologías ómicas en los últimos años ha abierto la posibilidad de caracterizar con una resolución sin precedentes a las comunidades microbianas que alberga nuestro cuerpo, explorando su posible implicación en distintas patologías y diseñando estrategias para su modulación. Sin embargo, tras una década de intensa investigación en microbiota humana, muchas de las preguntas planteadas no han sido resueltas de forma sólida. Esto se debe principalmente a la heterogeneidad de abordajes metodológicos, al reto que supone el análisis de ecosistemas complejos de una forma integral y a la ausencia de acuerdo para definir una microbiota normal. De forma análoga, la modulación de la microbiota con fines clínicos ha alcanzado gran popularidad para el tratamiento de la ICD recurrente, pero no ha logrado dar el salto a otras patologías, debido en gran parte a su rendimiento subóptimo, a la falta de control sobre la modulación y a la desconfianza respecto a los efectos adversos a largo plazo.

La presente Tesis Doctoral tiene como objetivo principal estudiar la microbiota en distintos procesos fisiológicos y patológicos desde un punto de vista tanto composicional como funcional, empleando distintas tecnologías ómicas e incorporando técnicas novedosas basadas en el aprendizaje automático, que están llamadas a revolucionar nuestra capacidad para integrar e interpretar los datos multiómicos. Además, en esta Tesis Doctoral también se explora la utilidad de la transferencia de microbiota fecal y se expone un método de optimización basado en el estudio de la compatibilidad inmunológica entre el donante y el receptor de heces.

CAPÍTULO I

Búsqueda de biomarcadores de caries en la microbiota oral de niños gemelos monocigóticos mediante *machine-learning*

I. ANTECEDENTES

La colonización microbiana de la cavidad bucal comienza inmediatamente después del nacimiento, diferenciándose entre colonizadores tempranos (*Streptococcus*, *Veillonella* y *Lactobacillus*), constantes (*Gemella*, *Granulicatella*, *Haemophilus* y *Rothia*) y tardíos (*Actinomyces*, *Porphyromonas*, *Abiotrophia* y *Neisseria*) [204–206]. El establecimiento de este ecosistema y su posterior composición están influenciados por numerosos factores como la modalidad de parto, la dieta o el consumo de antibióticos [207]. La salud bucodental no es sólo un concepto estomatológico local, sino también un importante indicador de la salud sistémica, pues se ha relacionado con numerosos trastornos del tracto digestivo, cardiovascular y genitourinario [208–210].

La caries es la enfermedad humana más prevalente en todo el mundo, aunque su incidencia varía según el contexto geográfico y la etnia [211], y convencionalmente se ha atribuido a la acción directa de bacterias acidógenas como *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, ya que estos microorganismos han sido aislados directamente de las lesiones. La aplicación de herramientas moleculares basadas en la secuenciación masiva del gen ADNr 16S ha revelado que la microbiota asociada a la caries constituye un ecosistema mucho más complejo de lo esperado [82].

Mientras que los estudios tradicionales clasificaban a las bacterias como patógenas o comensales según su potencial papel etiológico en las enfermedades, en los últimos años se ha prestado mayor atención a los conceptos de eubiosis/disbiosis y al desequilibrio de bacterias alcalinógenas/acidógenas en la caries [206,207]. Además, los análisis metatranscriptómicos han permitido redefinir la causa de enfermedades orales como la periodontitis desde la acción de un solo microorganismo a la actividad metabólica global de todo el ecosistema [212]. En consecuencia, el número de microorganismos relacionados con la caries ha aumentado considerablemente en la última década [213–215], incluyendo a los géneros *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Veillonella*, *Actinomyces*, *Granulicatella*, *Leptotrichia*, *Megasphaera*, *Olsenella*, *Shuttleworthia* y, más recientemente, *Scardovia*, *Atopobium* y *Selemonas* [216].

Uno de los principales retos en este sentido es identificar marcadores tempranos de caries para poder controlar y prevenir esta enfermedad durante la infancia. La exploración de biomarcadores en la saliva ya ha demostrado su utilidad en otras patologías [210,217].

II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Debido a la complejidad en la detección de marcadores de caries, en este trabajo planteamos un análisis predictivo utilizando herramientas de *machine-learning* para el estudio de la microbiota oral asociada a caries. A pesar de que la implementación de técnicas de Inteligencia Artificial (IA) está aún lejos de ser completamente común en salud bucodental, algunos estudios destacan las mejoras que su uso implicaría en diferentes áreas [218].

Los **OBJETIVOS** propuestos para este capítulo fueron:

1. Caracterizar mediante secuenciación masiva del ADNr 16S la microbiota oral de gemelos monocigóticos con y sin caries.
2. Identificar biomarcadores tempranos de caries mediante *machine-learning* a partir de los resultados obtenidos en el apartado anterior.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

1. Diseño del estudio

Se planteó un estudio observacional prospectivo de enero a mayo de 2018 en el que se reclutaron gemelos monocigóticos en edad infantil, con el objetivo de formar dos cohortes: una en la que ambos gemelos tenían buena salud bucodental (grupo “Control”), y otra en la que sólo uno de ellos presentase caries (grupo “Caries”) y el otro no (grupo “Sanos”). Los participantes fueron reclutados en cuatro clínicas dentales diferentes de Madrid en el contexto de tratamiento de ortodoncia. Cada niño aportó una única muestra de lavado oral tras 5 min de enjuague vigoroso con 10 mL de agua estéril. Las muestras se congelaron inmediatamente después de la recogida y se almacenaron a -80°C hasta su procesamiento. Los criterios de inclusión fueron: parejas de gemelos de 4 a 12 años cuyos padres y ellos mismos aceptaran participar en el estudio. En el grupo de caries se incluyeron niños con lesiones claras, así como lesiones pre-cavitarias, principalmente manchas blancas, mientras que se excluyeron otro tipo de lesiones. Todos los participantes fueron instruidos adecuadamente para que evitaran el cepillado de los dientes y la ingesta de alimentos y bebidas azucaradas durante las 2 horas anteriores a la toma de muestras. El protocolo del estudio fue aprobado por el Comité Ético de la Universidad Alfonso X El Sabio (referencia CE2017_0011), admitido el 23 de febrero de 2017. La investigación se llevó a cabo de forma ética, de acuerdo con la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial. Los niños recibieron un informe sobre su estado de salud bucodental y fueron remitidos a tratamiento dental cuando fue necesario.

2. Caracterización de la microbiota oral

Las muestras de lavado oral se descongelaron lentamente a -20°C durante 24 horas, seguido de otras 24 horas a 4°C, y se centrifugaron a 14.000 r.p.m. durante 15 minutos, descartando el sobrenadante. Se obtuvo ADN total del pellet con el kit de extracción *Speedtools tissue DNA extraction kit* (Biotools, Madrid, España) determinando su concentración y calidad mediante fluorímetro Qubit (Thermo Fisher Scientific, MA, EE.UU.). Las muestras de ADN se enviaron a la Fundación para el Fomento de la Investigación Sanitaria y Biomédica de la Comunitat Valenciana - FISABIO (Valencia, España) para realizar secuenciación masiva (2 × 300 pb) en plataforma MiSeq (Illumina, EE.UU.), siguiendo para la preparación de librerías el protocolo *16S Metagenomic Sequencing Library Preparation*

(Illumina; Cod. 15044223 Rev. A), dirigido frente a las regiones V3 y V4 del gen ADN_r 16S, que se amplificaron con los siguientes cebadores:

- Cebador directo:

5'TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTAAGACAGCCTACGGNGGCWGCAG.

- Cebador inverso:

5'GTCTCGTGGCTCGAGGTAAGAGACGACTACHVGGTATCTAATCC.

La calidad de las secuencias se midió según los siguientes parámetros: longitud mínima, 250 pb; tipo de medida de calidad de recorte, media; valor de calidad para recorte desde el extremo 3', 30; y ventana de calidad de recorte, 10 pb. Se utilizaron los índices de Shannon y Chao1 para la estimación de la diversidad alfa, excluyendo los taxones con tres o menos lecturas. Las afiliaciones taxonómicas se asignaron utilizando la base de datos SILVA 119 [80], y las lecturas con una puntuación RDP inferior a 0,8 se asignaron al rango taxonómico superior, dejando el último rango como no identificado. Las tablas de abundancia relativa y de contingencia de las unidades taxonómicas operativas (OTUs) incluyeron a los taxones de muy baja representación. Los datos cuantitativos de las lecturas se homogeneizaron utilizando su porcentaje relativo del total de lecturas de cada muestra para permitir su comparación. Los análisis PCoA de la diversidad beta se realizaron con el software Past 3.0 [219]. Por otro lado, se realizó un análisis lineal discriminante del tamaño del efecto (LEfSe) [87] para evaluar qué taxones explicaban las diferencias entre grupos.

3. Construcción de modelos predictivos de caries

En primer lugar, realizamos un análisis estadístico exploratorio para obtener una visión general de la complejidad de la microbiota oral de nuestra población a partir de los datos obtenidos en el apartado anterior, para posteriormente buscar un modelo por *machine-learning* que predijese la presencia de caries en base a la composición de dicha microbiota.

3.1. Análisis exploratorio

Para llevar a cabo este análisis, descartamos las especies bacterianas con menos de 50 recuentos con valores distintos de cero. El análisis exploratorio consistió en el diseño de una red de interacción que representase todos los taxones detectados para cada sujeto en círculos proporcionales a su frecuencia, uniendo los círculos (nodos) mediante líneas (conexiones) cuyo peso fuese proporcional a la coexistencia entre taxones, para así construir una red por muestra. Posteriormente, se superpusieron todas las redes individuales

para definir qué taxones conformaban el núcleo de microbiota de cada grupo (“Control”, “Caries” y “Sanos”). Este análisis se realizó con un *software* desarrollado en Python por los Dres. Javier Galeano y Juan Manuel Pastor (Grupo de Sistemas Complejos de la Universidad Politécnica de Madrid), adaptado de un estudio previo del grupo [18,220] y que se puede consultar en el apartado de [Anexos](#).

3.2. Modelos mediante *machine-learning*

Los modelos se desarrollaron con el *software* Orange3 v3.27 [221]. Llevamos a cabo diferentes modelos de clasificación mediante dos aproximaciones diferentes. En el primer caso, se tuvieron en cuenta los tres grupos anteriormente descritos para clasificar a nuestras muestras: “Control”, “Caries” y “Sanos”. En el segundo caso, simplificamos a dos categorías de clasificación: “Sanos” (que agrupa a los dos grupos de individuos sin caries) y “Caries”. Utilizando la validación cruzada k ($k = 10$), testamos cinco modelos de clasificación diferentes: *Random Forest*, *Neural Network*, *Support Vector Machine*, modelo KNN y regresión logística. Para evaluar el rendimiento de clasificación de los algoritmos empleados, utilizamos las siguientes definiciones:

1. Exactitud (*accuracy*): es la proporción de individuos clasificados correctamente.
2. Precisión (*precision*): es la proporción de verdaderos positivos entre las instancias clasificadas como positivas, por ejemplo, la proporción de individuos con caries correctamente identificados como “caries”.
3. Exhaustividad (*recall*): es la proporción de verdaderos positivos entre todas las instancias positivas de los datos, por ejemplo, el número de individuos con caries entre todos los clasificados como “caries”.
4. Valor F (*F-1 score*): es la media armónica ponderada de la precisión y la exhaustividad.

IV. RESULTADOS

1. Reclutamiento de pacientes y controles

Un total de 21 pares de gemelos monocigóticos fueron reclutados y divididos en 2 grupos. El primer grupo, denominado “Caries”, lo conformaron 11 pares de gemelos en los que uno de ellos tenía caries (subgrupo “Caries”) y el otro no (subgrupo “Sanos”) (22 niños, 73% mujeres, edad media de 9 años, rango de 6 a 12 años). El otro grupo, denominado “Control”, lo conformaron 10 pares de gemelos en los que ninguno de ellos tenía caries (20 niños, 70% mujeres, edad media de 6,7 años, rango de 4 a 12 años) (Tabla 3). Ambos grupos de participantes fueron comparables en términos demográficos y antropométricos, y todos fueron reclutados durante su tratamiento de ortodoncia, sin sospecha previa de caries.

Tabla 3. Datos demográficos de los 42 individuos incluidos en el estudio.

GRUPO CARIES (N=22)	SEXO	EDAD	GRUPO CONTROL (N=20)	SEXO	EDAD
1C/1S	Femenino	12	12	Femenino	12
2C/2S	Femenino	7	13	Femenino	7
3C/3S	Femenino	8	14	Masculino	4
4C/4S	Femenino	6	15	Femenino	8
5C/5S	Femenino	11	16	Femenino	9
6C/6S	Masculino	9	17	Femenino	5
7C/7S	Femenino	8	18	Femenino	9
8C/8S	Masculino	10	19	Masculino	4
9C/9S	Femenino	12	20	Femenino	4
10C/10S	Femenino	9	21	Masculino	5
11C/11S	Masculino	9	-	-	-

2. Caracterización de la microbiota oral

Todas las muestras se procesaron en una sola carrera de secuenciación. Las secuencias crudas (FASTQ) se depositaron en GenBank como Bioproject PRJNA643173. El rendimiento fue comparable en todas las muestras.

La diversidad alfa se analizó mediante los índices de Shannon y Chao1, los cuales no arrojaron diferencias significativas entre los grupos analizados, aunque cabe destacar una dispersión de valores mayor en el grupo de niños con caries (Figura 3).

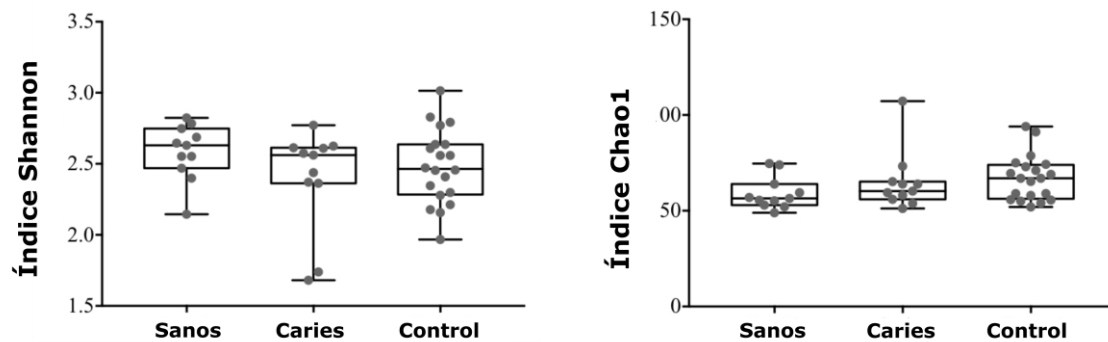


Figura 3. Índices de diversidad alfa (Shannon y Chao1) para los 3 grupos de muestras. No se detectaron diferencias significativas.

En cuanto al análisis taxonómico, se observó que los niños con caries tenían una composición a nivel de filo similar a la de sus hermanos sanos, mientras que los controles presentaban mayores proporciones de Bacillota y menores de Pseudomonadota. En general, la composición a nivel de filo mostró un patrón conservado para cada par de gemelos, independientemente del grupo analizado (Figura 4). Por otro lado, se identificaron hasta 119 géneros diferentes en la población, aunque 13 de ellos representaban el 90% de la abundancia total: *Streptococcus* (~30%), *Prevotella* (~10%), *Neisseria* (~9%), *Veillonella* (~8%), *Gemella* (~7%), *Haemophilus* (~6%), *Alloprevotella* (~5%), *Rothia* (~5%), *Porphyromonas* (~2%), *Fusobacterium* (~2%), *Leptotrichia* (~2%), *Granulicatella* (~2%) y *Actinomyces* (~2%). Los 106 géneros restantes representaron el 10% de la abundancia, con una densidad de población total inferior a 1 para cada uno de ellos (Figura 5).

En este punto, se hace notar que la nomenclatura taxonómica empleada en las figuras puede no coincidir con la referenciada en el texto, debido a la discrepancia entre la versión de la base de datos taxonómica utilizada en el momento del análisis y la denominación actual, que ha sufrido cambios recientes (sobre todo a nivel de filo).

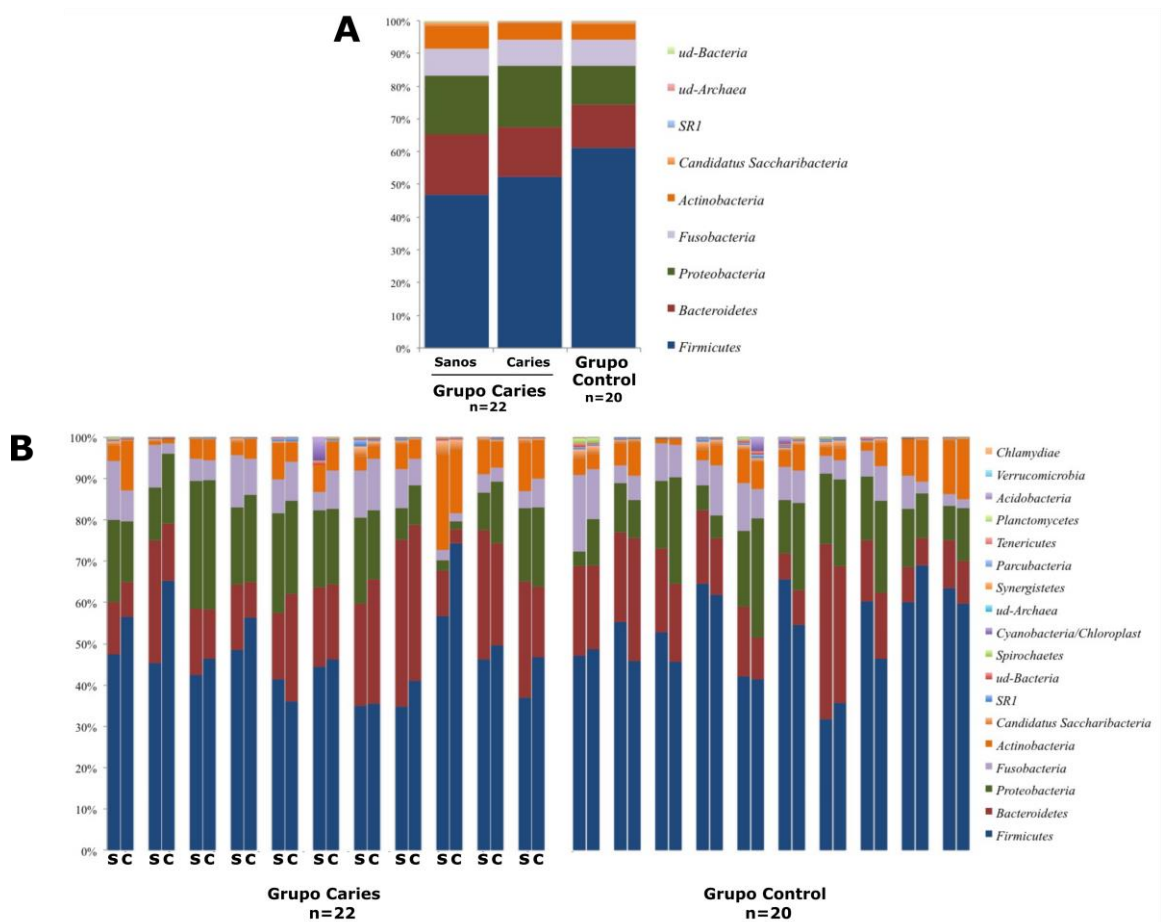


Figura 4. Composición bacteriana a nivel de filo. (A): Mediana de la abundancia relativa para cada filo y grupo. (B): Abundancia relativa de cada filo para cada individuo. S: Sanos; C: Caries.

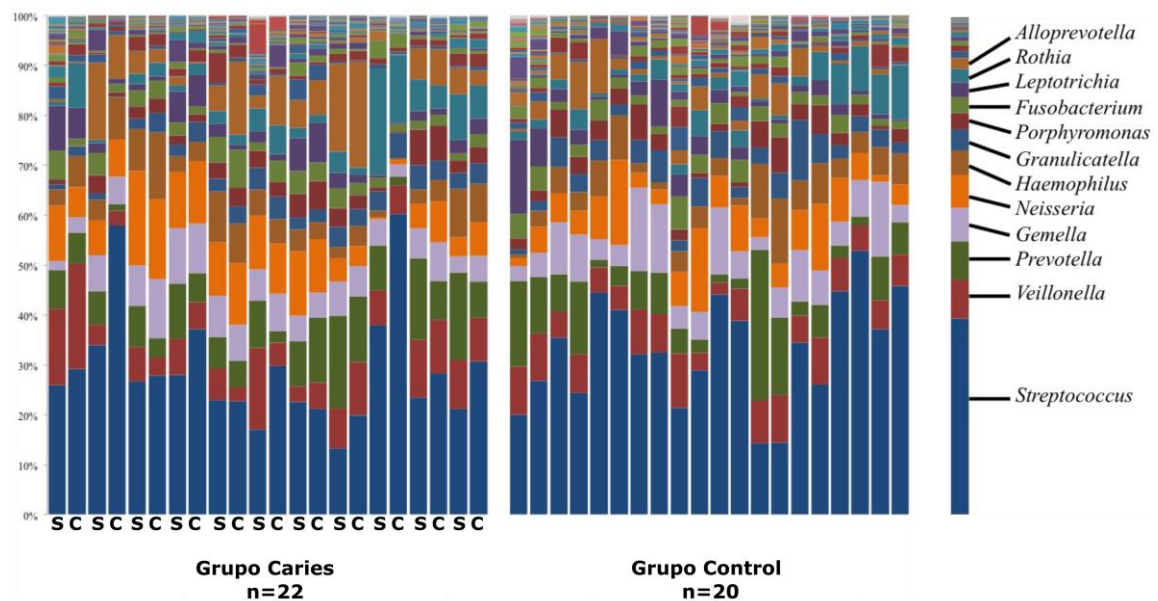


Figura 5. Abundancia relativa de los principales géneros bacterianos en cada individuo del estudio. S: Sanos; C: Caries.

El análisis de coordenadas principales (PCoA) realizado a partir de los datos de beta diversidad mostró la separación espacial de los 3 grupos analizados (Figura 6). El grupo de niños sanos se asoció a una mayor presencia de los géneros *Veillonella*, *Prevotella* y *Fusobacterium*, mientras que *Alloprevotella* y *Granulicatella* fueron los géneros más característicos en la cavidad oral de los niños con caries. El grupo control se situó en un cuadrante separado, marcado por la abundancia de los géneros *Capnocytophaga*, *Lautropia* y *Streptobacillus*. En cuanto al análisis por parejas de gemelos, se observó que la mayoría de los gemelos del grupo control se agruparon en el mismo cuadrante (8 de 10 pares): tres pares en el cuadrante 3 (dominado por *Gemella* y *Haemophilus*), tres en el cuadrante 4 (*Streptococcus* y *Rothia*) y dos en el cuadrante 1 (*Prevotella* y *Veillonella*). Los dos pares restantes de gemelos control se encontraron en coordenadas separadas (cuadrantes 1-3 y 2-3). Por el contrario, en el caso de los gemelos del grupo de caries, sólo 6 de las 11 parejas tenían a ambos niños localizados en el mismo cuadrante: uno en el cuadrante 1 (*Prevotella* y *Veillonella*), tres en el cuadrante 2 (*Neisseria*, *Alloprevotella* y *Leptotrichia*), uno en el cuadrante 3 (*Gemella* y *Haemophilus*) y uno en el cuadrante 4 (*Streptococcus* y *Rothia*). Las cinco parejas restantes se distribuyeron en cuadrantes separados, sugiriendo una mayor heterogeneidad de la microbiota oral entre hermanos: dos parejas en los cuadrantes 1-2, una pareja en los cuadrantes 2-3, una en los cuadrantes 1-4 y una en los cuadrantes 1-3. Por último, y a pesar de estos hallazgos, el análisis de abundancia diferencial por LEfSe no identificó taxones identitarios de cada uno de los grupos.

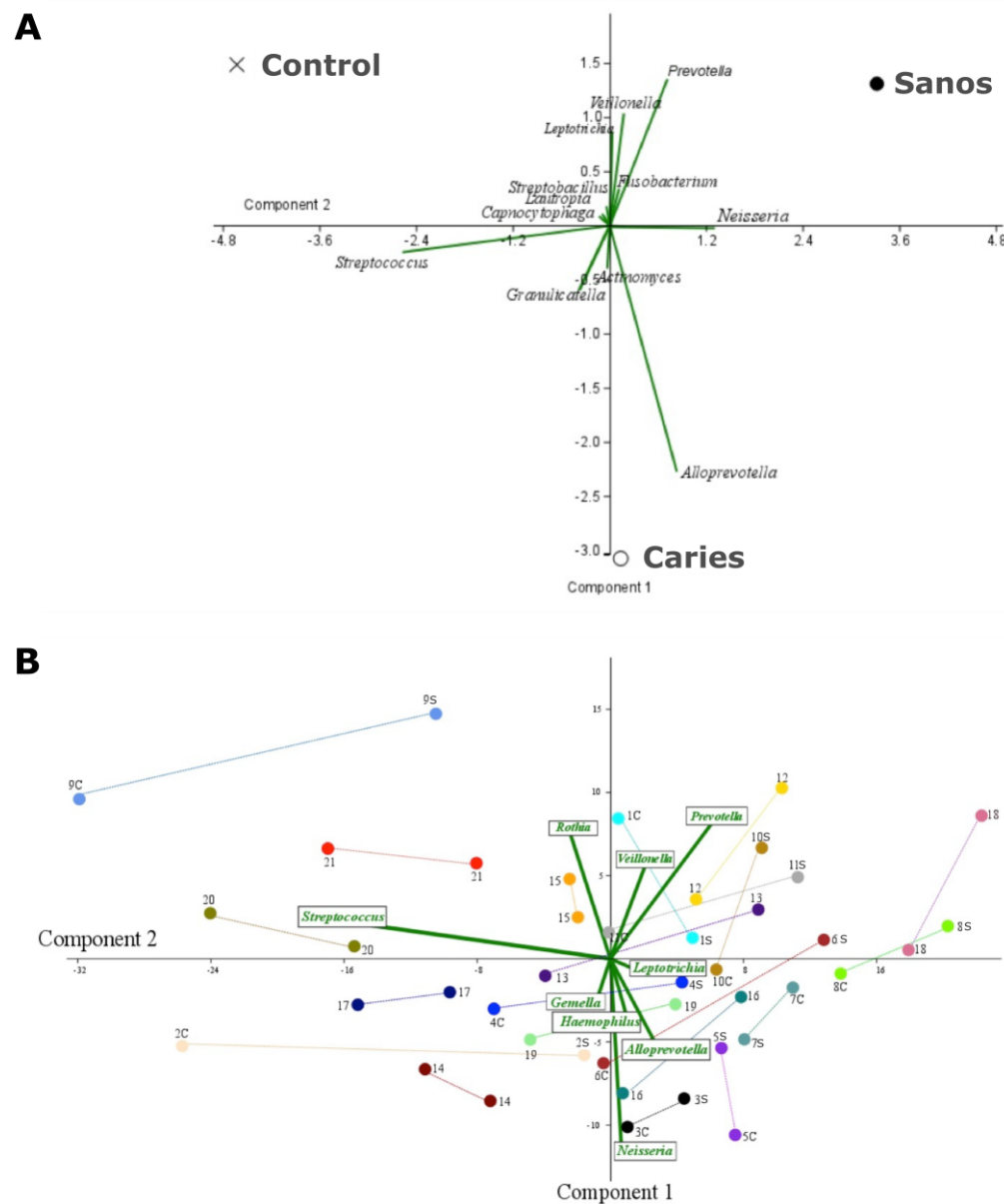


Figura 6. Análisis PCoA basado en la beta diversidad de las muestras a estudio. Las líneas verdes son vectores que representan los géneros bacterianos que caracterizan a cada cuadrante. **(A):** empleando la frecuencia mediana de cada género bacteriano en los 3 grupos (Caries, Sanos y Control); y **(B):** el mismo análisis, pero de forma individualizada para cada pareja de hermanos. Los pares de gemelos están unidos por líneas de color. Se utilizan colores aleatorios para resaltar cada pareja de gemelos. C: caries; S: sanos.

3. Construcción de modelos predictivos de caries

3.1. Microbiota núcleo

La microbiota núcleo o esencial de cada grupo de individuos fue similar, tal y como se puede observar en la Figura 7. Dicha microbiota estaba constituida por *Streptococcus* como género dominante, seguido de *Prevotella*, *Veillonella*, *Gemella*, *Neisseria* y *Haemophilus*. No se identificó ningún género bacteriano que formase parte de la microbiota esencial de uno de los grupos y estuviese ausente de los demás.

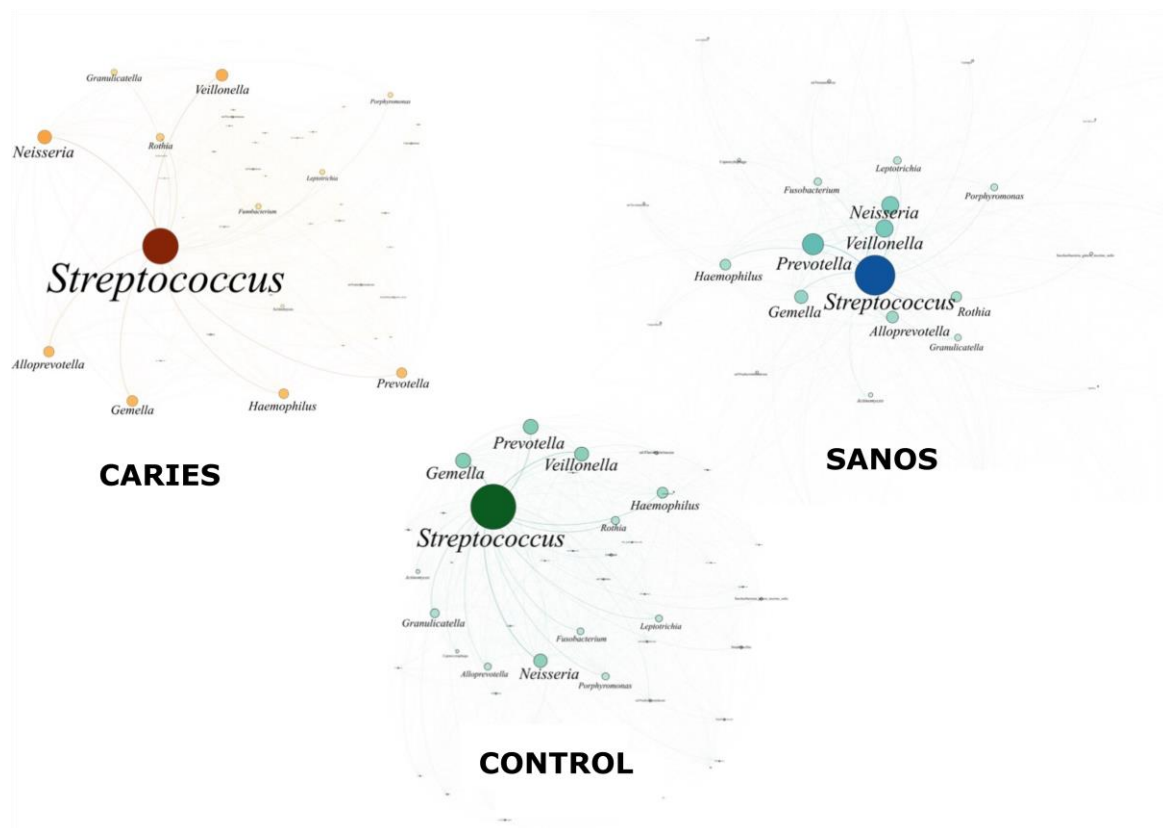


Figura 7. Análisis de interacción taxonómica que representa el núcleo de microbiota, esto es, los géneros esenciales que conforman el ecosistema oral bacteriano de cada grupo (Caries, Sanos y Control). Los taxones se representan en círculos (nodos) proporcionales a su frecuencia relativa, unidos mediante líneas cuyo grosor es proporcional al grado de interacción (coexistencia) entre ambos.

3.2. Modelos mediante *machine-learning*

Se desarrollaron 5 modelos de clasificación utilizando herramientas de aprendizaje automático (Tabla 4). El modelo que mostró la mayor exactitud de clasificación

(*classification accuracy*) fue el modelo *Random Forest*, con un valor de 0,881, seguido del *Neural Network* con 0,810. Estudiando la matriz de confusión desde el punto de vista de la caries, se observó que el modelo *Random Forest* no produjo falsos positivos, pero sí generó bastantes falsos negativos (54,5%). Por el contrario, el modelo *Neural Network* generó un 16,1% de falsos positivos pero un porcentaje menor, respecto al *Random Forest*, de falsos negativos (27,3%).

Tabla 4. Rendimiento de clasificación de los cinco modelos utilizados en este estudio. Parámetros utilizados: Exactitud (*accuracy*), valor F (F-1 *score*), precisión (*precision*) y exhaustividad (*recall*). SVM: *Support Vector Machine*.

Modelo	EXACTITUD	VALOR F	PRECISIÓN	EXHAUSTIVIDAD
kNN	0,666	0,655	0,646	0,665
SVM	0,738	0,627	0,545	0,738
<i>Random Forest</i>	0,881	0,874	0,880	0,881
<i>Neural Network</i>	0,810	0,814	0,823	0,810
Regresión logística	0,595	0,601	0,607	0,595

V. DISCUSIÓN

En los últimos años, la etiología de la caries ha evolucionado desde una perspectiva infecciosa monomicrobiana (colonización por *S. mutans* y/o *Lactobacillus*) a una enfermedad multifactorial en la que intervienen la microbiota oral, los antecedentes genéticos humanos y el entorno [206]. En consecuencia, las herramientas de investigación basadas en la culturomica han ido dando paso a las disciplinas de la metagenómica, la transcriptómica y la proteómica. La dieta sigue siendo uno de los factores más decisivos en la incidencia de la caries, explicando la susceptibilidad individual en relación con la ingesta de carbohidratos y la fermentación bacteriana [222,223], mientras que el componente genético humano parece no ser tan relevante como se esperaba [207,224]. El objetivo principal del trabajo expuesto en este capítulo fue doble: por un lado, detectar marcadores tempranos de caries basados en la presencia y/o abundancia de determinadas bacterias de la microbiota oral en un contexto genético, dietético y ambiental idéntico (gemelos monocigóticos) y, por otro lado, evaluar un modelo de clasificación para predecir la caries empleando la huella de microbiota oral de los individuos analizados. Los resultados del estudio bioinformático de la microbiota oral mostraron una composición más uniforme en el grupo de gemelos control respecto al grupo caries/sanos, pero sin alcanzar significación estadística. Además, no se logró identificar ningún taxón bacteriano exclusivo o característico de los participantes con caries incipiente. Estos hallazgos sugerirían un escaso peso contributivo de la microbiota bacteriana oral en el proceso cariogénico inicial.

A pesar de la elevada y continua contaminación de la microbiota oral con microorganismos ambientales extraños, las particularidades individuales (huella) de la microbiota salival se han postulado como un marcador forense para identificar a los sujetos, incluso en el caso de gemelos [225]. El estudio microbiológico de la caries y otros procesos patológicos relacionados se puede realizar muestreando directamente de la lesión o en la placa supragingival, o bien a través de un enjuague bucal que recoja la microbiota oral total. En este trabajo se optó por esta última, dada la facilidad de la recogida y por tanto su idoneidad con fines de vigilancia, y la ausencia de lesiones macroscópicamente visibles en el momento de la toma. Para obtener una muestra representativa de toda la microbiota oral, los niños se abstuvieron de cepillarse los dientes y evitaron la ingesta de alimentos durante al menos 2 horas antes del procedimiento. Aunque la saliva y la placa supragingival son diferentes en cuanto a su composición bacteriana [226], la saliva se ha mostrado útil en la diferenciación entre sujetos con y sin caries [227]. Además, la utilidad de la saliva en la

identificación de biomarcadores asociados tanto a la salud bucal como a la general ha sido refrendada en estudios previos [210,217]. En la literatura existen trabajos similares al aquí expuesto que, valiéndose de individuos con características genéticas y ambientales idénticas o muy similares, como son los gemelos monocigóticos y dicigóticos, buscaron estudiar la incidencia de caries y relacionarla con la microbiota oral [207,224,226,228,229]. Estos estudios reportaron resultados discordantes, lo que puede venir explicado por su heterogeneidad en cuanto a grupos de edad analizados y metodologías microbiológicas empleadas. En los últimos años, las herramientas para el análisis de datos de secuenciación masiva han evolucionado considerablemente, lo que ha permitido aplicar algunas de esas nuevas herramientas en el presente trabajo, como son el análisis de redes para caracterizar el núcleo de microbiota o el empleo de técnicas basadas en aprendizaje automático (*machine-learning*) para la evaluación de modelos predictivos de caries. En este sentido, quisiéramos expresar nuestro agradecimiento a los Dres. Galeano y Pastor, del Grupo de Sistemas Complejos de la Universidad Politécnica de Madrid, por su ayuda en la aplicación de estas técnicas al presente estudio.

El estudio de beta diversidad de la microbiota oral a través de PCoA mostró una mayor abundancia del género *Alloprevotella* en los sujetos con caries, mientras que *Prevotella* fue el marcador diferencial en sus homólogos sanos. Sorprendentemente, ambos géneros pertenecen a la misma familia y podrían tener funciones metabólicas sinónimas, aunque no se pueden descartar los efectos sinérgicos de la combinación de dichos microorganismos [230] y, sobre todo, la interacción de determinados géneros bacterianos con hongos o virus, algo que queda fuera del alcance de este estudio. También debe tenerse en cuenta que este hallazgo no se corroboró estadísticamente al aplicar un algoritmo de búsqueda de biomarcadores (LEfSe), lo que resta relevancia a dicha observación. La mayoría de los estudios publicados que analizaron la microbiota oral completa con un enfoque metagenómico no encontraron diferencias significativas entre el estado de salud y el de caries en sujetos no relacionados [4,11,24,28,29]. En este estudio, sin embargo, sí se puede observar de forma robusta una tendencia hacia la conservación estructural de la microbiota entre los gemelos en el análisis PCoA, donde las parejas control son además más homogéneas entre sí (8/10 en el mismo cuadrante) que las del grupo caries/sanos (6/11). En conjunto, esto sugiere una incipiente, aunque leve, diferenciación de la microbiota oral concomitante a la aparición del proceso cariogénico.

Como ocurre en otros ecosistemas bacterianos del cuerpo humano, la microbiota oral suele ser más o menos estable y específica en cada individuo, pero está a su vez influenciado por numerosos factores, entre los que se encuentra la etnia [231]. En este sentido, se ha descrito una mayor prevalencia de caries en un estudio realizado en individuos de origen chino, asociado a un especial enriquecimiento en *Scardovia* [227], un género con escasa presencia en nuestra población. En un estudio de Yasunaga *et al.*, los individuos sin caries tenían comunidades bacterianas más diversas, con una proporción significativamente mayor del género *Porphyromonas*, especialmente *Porphyromonasasteri* [232]. Otros estudios, como el de Belstrøm *et al.*, observaron por el contrario una mayor diversidad alfa en sujetos con caries, y un enriquecimiento de *Neisseria*, *Haemophilus* y *Fusobacterium* en comparación con individuos sin caries [233]. En cambio, en nuestro estudio, tanto la composición bacteriana como los parámetros de diversidad alfa fueron similares en los niños de ambos grupos y condiciones.

La caries se ha asociado clásicamente con altos niveles de *S. mutans* y, aunque *Streptococcus* fue el género mayoritario en nuestra población, no se pudo investigar este punto, ya que nuestro enfoque metodológico (secuenciación de V3-V4) no permite asignar taxonómicamente a nivel de especie de forma fiable en este género. A pesar de esto, sí se detectó una mayor proporción de *Streptococcus* en los individuos con caries respecto a sus hermanos, aunque esto no se reprodujo al compararlos con el grupo de gemelos control. En este sentido, estudios previos han relacionado el predominio de *Streptococcus* en la cavidad oral tanto a un status de caries como a individuos sanos [233,234]. Esto último podría explicarse por el posible efecto protector de algunas especies de estreptococos, como *Streptococcus dentisani* [235]. Por otro lado, más allá de la composición de la microbiota, cada vez se hace más hincapié en la funcionalidad del ecosistema global [68]. En este sentido, es importante señalar que la composición taxonómica de las comunidades bacterianas no refleja necesariamente su actividad metabólica [212], especialmente en el caso de los microorganismos representados en bajas proporciones, pudiendo estos tener actividades metabólicas esenciales para la comunidad [208]. En nuestro caso, el análisis de búsqueda de biomarcadores no encontró ningún taxón que permitiese la discriminación de los niños por su estado de caries, pero no podemos descartar que existan diferencias a nivel metatranscriptómico/metabolómico.

A pesar de las escasas diferencias observadas a nivel de composición bacteriana entre grupos, los modelos de clasificación basados en aprendizaje automático mostraron

una precisión relativamente buena en la predicción de caries. Los modelos de clasificación con mejor rendimiento fueron, en primer lugar, *Random Forest*, que mostró la mayor precisión de clasificación con un valor de 0,881, seguido por *Neural Networks*, con una precisión de 0,810. Uno de los puntos más interesantes del modelo *Random Forest* fue que no produjo falsos positivos. Sin embargo, el porcentaje de falsos negativos fue elevado (54,5%). Por el contrario, el modelo basado en *Neural Networks* produjo un 16,1% de falsos positivos pero un porcentaje menor, respecto al modelo *Random Forest*, de falsos negativos (27,3%). Estos resultados no justifican la utilidad del estudio de la composición de la microbiota oral como predictor del desarrollo de caries, aunque aportar un mayor volumen de datos podría ayudar a mejorar la predicción de estos modelos.

La mayor fortaleza y, al mismo tiempo, la mayor limitación de este estudio se basa en el criterio de inclusión de los niños, reclutados durante su tratamiento de ortodoncia independientemente de su estado de caries. La fortaleza radica en que todas las lesiones detectadas fueron pequeñas y superficiales, correspondiendo probablemente al inicio de la enfermedad, lo que supone el momento idóneo para estudiar la microbiota con el objetivo de encontrar biomarcadores tempranos. Por el contrario, no podemos determinar si los individuos del grupo control, en los que no se observaron signos de caries, pudiesen estar en un status pre-cariogénico. La inclusión de individuos con distintas edades también puede considerarse una limitación a la hora de comparar globalmente los grupos, ya que cada fase de desarrollo se ha relacionado con una composición diferente de la microbiota oral. Por último, nuestros resultados muestran que los modelos de aprendizaje automático podrían ayudarnos en la prevención de la caries utilizando datos de microbiota, aunque no alcanzan en nuestro caso los requisitos mínimos de precisión que justifiquen su uso. En resumen, este primer capítulo pone de manifiesto que la composición de la microbiota oral en gemelos monocigóticos está muy conservada, independientemente de su proceso cariogénico, lo que dificulta la caracterización de biomarcadores de caries por secuenciación masiva del gen 16S ADNr.

CAPÍTULO II

Impacto del tratamiento antibiótico supresor prolongado en la microbiota intestinal

I. ANTECEDENTES

El aumento de la esperanza de vida asociado a una calidad de la misma aceptable es una característica relevante de la sociedad actual. Debido a ello, el número de intervenciones quirúrgicas y tratamientos prolongados o de por vida en pacientes frágiles ha aumentado ostensiblemente en los últimos años. En concreto, la tasa de cirugías de sustitución articular se ha incrementado en España hasta las 80.000 operaciones anuales, con una incidencia asociada de infección articular protésica posterior del 3-4% [236]. La infección en este contexto aumenta no sólo las tasas de morbilidad y mortalidad (aproximadamente entre el 2 y el 7% en pacientes mayores de 80 años), sino también los costes sanitarios [237]. Los factores que contribuyen a las infecciones asociadas a implantes protésicos están relacionados con el biomaterial implantado, el procedimiento quirúrgico, el estado de los tejidos blandos y del sistema inmunológico, así como los factores relacionados con los microorganismos infecciosos implicados [237]. El manejo de esta situación, incluyendo los enfoques quirúrgicos y no quirúrgicos, es complejo. Algunos pacientes no logran alcanzar la curación completa, por lo que su única opción para controlar los síntomas y mantener la funcionalidad motriz es la administración indefinida de antibióticos, también conocida como terapia antibiótica supresora (TAS), un tratamiento aparentemente seguro y bien tolerado [238–241]. El impacto antimicrobiano del TAS no se limita al lugar de la infección, siendo uno de los efectos adversos más preocupantes y menos explorados la alteración de la microbiota intestinal comensal.

II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Aunque varios estudios han evaluado los efectos a largo y corto plazo de determinados antibióticos en la microbiota intestinal [242–246], esta característica no se ha explorado en los pacientes sometidos a TAS, que suelen ser de edad avanzada y presentan numerosas comorbilidades y, por tanto, son más susceptibles a cambios profundos en su microbiota, así como a la colonización/infección por patógenos como *C. difficile* y bacterias multirresistentes a los antibióticos.

Los **OBJETIVOS** que se plantearon en este capítulo fueron los siguientes:

1. Describir la seguridad del TAS durante períodos prolongados de tratamiento.
2. Describir el impacto ecológico del TAS en la microbiota intestinal, incluyendo:
 - 2.1. Cambios en la composición y abundancia de las bacterias intestinales.
 - 2.2. Alteraciones en la viabilidad de dichas bacterias.
 - 2.3. Adquisición de bacterias resistentes a múltiples antibióticos.
 - 2.4. Adquisición de patógenos oportunistas (*C. difficile*).
3. Evaluar diferencias en dicho impacto según la familia antibiótica utilizada.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

1. Diseño del estudio

Se realizó un estudio observacional prospectivo durante el periodo 2016-2018 en pacientes con infección protésica no resuelta que son sometidos a TAS como método de control de dicha infección. El estudio fue coordinado en el Servicio de Enfermedades Infecciosas del Hospital Universitario Ramón y Cajal de Madrid por los Dres. Javier Cobo y Rosa Escudero, siendo los criterios de inclusión: edad superior a 18 años, seguimiento regular en consulta, firma de documento de consentimiento informado por escrito y someterse a TAS durante al menos un mes completo. Los criterios de exclusión fueron: antecedentes de enfermedad inflamatoria intestinal, cáncer colorrectal, infección por *C. difficile* en los 3 meses anteriores y consumo de otros antibióticos debido a un episodio infeccioso diferente en los 30 días anteriores. Cada paciente proporcionó una muestra fecal, y sus características demográficas y clínicas se registraron a partir de sus historias clínicas en una base de datos anónima y confidencial. Este estudio fue aprobado por el Comité Ético local del centro (27 de marzo de 2017, acta 321).

2. Procesamiento de las muestras

Tras la recogida de las heces, las muestras se dividieron en dos alícuotas que fueron inmediatamente congeladas a -80°C. Una alícuota se empleó para determinar la colonización de bacterias viables resistentes a múltiples antibióticos mediante cultivos microbiológicos convencionales, mientras que la cantidad restante se reservó para determinar la composición bacteriana completa mediante extracción y amplificación del ADNr 16S y posterior secuenciación masiva. Para seleccionar las bacterias multirresistentes, las muestras se cultivaron en placas de agar M-Enterococcus con 6 mg/L de vancomicina, placas de agar manitol-sal con 4 mg/L de oxacilina y placas de agar MacConkey con 1 mg/L de cefotaxima y con 2 mg/L de imipenem. Se realizó una incubación prolongada a 37°C durante al menos 5 días para permitir el aislamiento de microorganismos de crecimiento lento o exigente. Las colonias se identificaron mediante MS MALDI-TOF (Bruker Daltonics, Leipzig, Alemania) y su sensibilidad a los antibióticos se determinó utilizando el sistema MicroScan WalkAway (Beckman Coulter, Brea CA, EE.UU.). Para determinar la composición de la microbiota completa, se solubilizaron 0,5 mg de heces en 5 mL de agua estéril, empleando 0,5 mL de esta solución para obtener ADN total utilizando el kit QIAamp (Qiagen, Hilden, Alemania),

determinando su concentración y calidad mediante un fluorímetro Qubit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.). Se amplificó la región V3-V4 del gen del ADNr 16S bacteriano mediante PCR y se prepararon las librerías siguiendo la guía de preparación de librerías de secuenciación metagenómica 16S de Illumina. Por último, se realizó la secuenciación masiva de ADNr 16S en una plataforma MiSeq (Illumina, San Diego CA, EE.UU.) en la Fundación para el Fomento de la Investigación Sanitaria y Biomédica (FISABIO) en Valencia, España.

3. Análisis bioinformático y estadístico

El análisis de los datos de secuenciación del ADNr 16S y la explotación estadística de los mismos se realizaron utilizando el paquete de software QIIME2 (versión 2018.4) [88], así como la herramienta LEfSe [87]. En los [Anexos](#) se puede consultar el *script* utilizado para realizar dichos análisis.

3.1. Procesamiento de lecturas

En primer lugar, se importaron los archivos FASTQ a la plataforma QIIME2, y se inspeccionó la calidad de las lecturas mediante el complemento “q2-demux”. En base a dicha evaluación, se ajustaron los parámetros de filtrado y se ejecutó el pipeline DADA2, que realiza un filtrado de calidad, la unión de lecturas *forward* y *reverse* (*merging*), la eliminación de quimeras y la construcción de tablas de recuento de lecturas idénticas (*amplicon sequence variants*, ASVs) por muestra. Posteriormente se realizó un agrupamiento de ASVs al 97% de homología, para así obtener unidades taxonómicas operativas (OTUs). La anotación taxonómica de las OTUs se realizó empleando el clasificador bayesiano *classify-sklearn naïve Bayes* a través del complemento “q2-feature-classifier” de QIIME2, utilizando la base de datos SILVA 132 como referencia [80]. Todas las lecturas cuya anotación no alcanzó al menos el nivel de filo bacteriano fueron eliminadas. Las tablas de abundancia relativa incluyeron a los taxones con representación única o muy baja.

3.2. Análisis de diversidad

Los parámetros de diversidad alfa y beta se calcularon utilizando el complemento “diversity” de QIIME2.

3.2.1 Diversidad alfa

La diversidad alfa de la comunidad se estimó utilizando los índices de Shannon y Chao1. El índice de Shannon tiene en cuenta la cantidad de especies presentes en la muestra (riqueza de especies), y la cantidad relativa de individuos de cada una de esas especies (abundancia), expresándose como un número positivo sin límite superior. Por el contrario, Chao1 es un estimador de riqueza basado únicamente en la abundancia, que otorga más peso a la presencia de especies raras o muy poco frecuentes en la muestra. Las diferencias significativas en estos parámetros según el tipo de antibiótico empleado se calcularon mediante test de Kruskal-Wallis pareado. Se consideraron estadísticamente significativos los valores de $p < 0,05$.

3.2.2 Diversidad beta

La composición bacteriana entre las muestras (o diversidad beta) se estudió mediante distintos abordajes. En primer lugar, se calculó el parámetro de disimilitud de Bray-Curtis [247], que está limitado entre 0 y 1, donde 0 significa que dos muestras tienen la misma composición (es decir, comparten todas las OTUs), y 1 significa que las dos muestras no comparten ninguna OTU. En base a este parámetro se construyó una matriz de disimilitud. Tras agrupar las muestras por tipo de antibioterapia, se aplicó un análisis multivariante (PERMANOVA) para comprobar si las distancias intra-grupo diferían significativamente de las distancias inter-grupo en base a dicho parámetro. También se exploró gráficamente la matriz de disimilitud mediante un análisis de coordenadas principales (PCoA), utilizando el complemento "emperor" de QIIME2 [248]. Por último, con el objetivo de analizar el impacto de la antibioterapia en la microbiota núcleo o estructural, esto es, aquella compuesta por los géneros bacterianos más abundantes en el conjunto de los pacientes incluidos, se construyó un mapa de calor incluyendo solamente los 50 taxones con mayor mediana entre todas las muestras analizadas. En base a la abundancia relativa de dichos taxones se agruparon las muestras según el índice de disimilitud de Bray-Curtis, mientras que la ordenación de los taxones se realizó por UPGMA, un método de *clustering* que agrupa los taxones en base a su tasa de coexistencia en las muestras a estudio. Con esta estrategia se buscó evidenciar la existencia de algún patrón de agrupamiento de taxones en base a la clase de antibiótico pauta. Para la construcción del mapa de calor se utilizó el complemento "heatmap" de QIIME2.

Por otro lado, se realizó un análisis lineal discriminante del tamaño del efecto (LEfSe) [87] para evaluar qué taxones explicaban las diferencias entre grupos observadas en los análisis de beta diversidad, y en qué orden de magnitud lo hacían. En primer lugar, se aplicó el test de Kruskal-Wallis para analizar todos los taxones y comprobar si los valores de abundancia estaban distribuidos de forma diferencial entre los grupos. Aquellos taxones que violaban la hipótesis nula se analizaron posteriormente mediante la prueba de Wilcoxon por pares, comprobando que todas las comparaciones intra-grupo coincidían significativamente con las inter-grupo. Finalmente, el subconjunto de vectores resultante se utilizó para construir un modelo de Análisis Discriminante Lineal (LDA), a partir del cual se utilizó la diferencia relativa entre grupos para ubicar a los taxones. Finalmente, se obtuvo una lista de taxones discriminantes con respecto a los grupos, clasificados según el tamaño del efecto con el que diferencian a los mismos. Para el presente análisis, el valor alfa para la prueba factorial de Kruskal-Wallis se estableció en 0,05, mientras que el umbral de LDA score se fijó en 2,0. Se empleó la herramienta web de LEfSe accesible desde el servidor GALAXY del Huttenhower lab (<https://huttenhower.sph.harvard.edu/galaxy>), para lo cual se exportaron desde QIIME2 las tablas de recuento de OTUs y la asignación taxonómica asociada, y se formatearon para su posterior procesamiento por LEfSe.

4. Análisis de viabilidad bacteriana

Debido a que la viabilidad de las bacterias no puede inferirse a partir de los datos de secuenciación masiva, la evaluación del impacto de la TAS en las bacterias vivas del intestino de los pacientes se realizó utilizando monoazida de propidio (PMA), un colorante de ADN fotorreactivo que no interactúa con las membranas biológicas intactas, sino que altera el ADN libre y las células muertas. Una vez que el PMA se intercala en una molécula de ADN, impide su amplificación por PCR, obteniendo sólo una amplificación positiva de las bacterias viables. En consecuencia, todas las muestras fecales se procesaron en paralelo con y sin PMA, además de un grupo de control de bacterias muertas después de hervirlas durante 15 minutos. El PMA se activó posteriormente incubando en oscuridad durante 5 min y fotoactivando durante 30 min con luz LED azul. A continuación, se extrajo el ADN total utilizando el kit QIAamp (Qiagen, Hilden, Alemania) y se realizó una amplificación bacteriana universal utilizando cebadores del 16S ADNr. Los amplicones se separaron posteriormente y se visualizaron en un gradiente de gel de acrilamida desnaturizante (DGGE) para diferenciar las especies bacterianas vivas de las muertas.

IV. RESULTADOS

1. Datos clínicos y efectos adversos

De los 20 pacientes tratados en nuestro centro que cumplían los criterios de inclusión, 17 de ellos firmaron el consentimiento informado y proporcionaron una muestra de heces. La Tabla 5 muestra los datos demográficos y clínicos de los pacientes, con una distribución homogénea de sexos (8 mujeres y 9 hombres) y una edad media de $75,9 \pm 12,5$ años. Uno de los pacientes (34 años) era considerablemente más joven que los demás, que se situaban en un rango de entre 66 y 88 años. El índice de Charlson, el cual predice la supervivencia a 10 años en pacientes con múltiples comorbilidades, presentó un valor medio de $1,24 \pm 1,48$ /IQR 1 (0-1,5), lo que se traduce en una probabilidad de supervivencia a 10 años del 96%. Las infecciones protésicas no resueltas fueron causadas principalmente por *Staphylococcus aureus* (8 pacientes, 47,1%) y *Staphylococcus epidermidis* (3 pacientes, 17,6%). En el momento de la recogida de la muestra, los pacientes habían tomado antibióticos durante una mediana de 32 meses (rango, 1-109 meses). Cada tratamiento antibiótico se escogió individualmente en función de las características de los pacientes, la tolerabilidad, el perfil de seguridad, las interacciones entre fármacos y la susceptibilidad antibiótica del microorganismo infeccioso implicado. Los antibióticos orales prescritos fueron betalactámicos (6 pacientes, 35,2%), cotrimoxazol (4 pacientes, 23,5%), fluoroquinolonas (4 pacientes, 23,5%, uno de ellos en combinación con rifampicina), tetraciclinas (2 pacientes, 11,7%) y clindamicina (1 paciente, 5,8%). El paciente restante estaba hospitalizado por un proceso canceroso, tenía un catéter central y se le administró teicoplanina intravenosa. Tres pacientes tuvieron bacteriuria asintomática, mientras que un cuarto paciente experimentó un único episodio de infección del tracto urinario causado por un microorganismo resistente al antibiótico utilizado en el régimen TAS (doxiciclina); sin embargo, no se demostró la colonización intestinal por el microorganismo infeccioso. Por último, una de las pacientes refirió candidiasis vaginal y aumento de peso, en clara asociación con la ingesta de amoxicilina (Tabla 5).

Tabla 5. Datos epidemiológicos y clínicos de los 17 pacientes con TAS.

Paciente	Sexo Edad	Enfermedad GI	Índice de Charlson	Agente infeccioso	Lugar de infección	Antibiótico (familia)	Duración (meses)	Síntomas atribuidos a TAS
1	♂ 79	No	1	SASM	Abdominal (malla)	Cefadroxilo (betalactámico)	17	Flatulencia
2	♂ 73	No	1	SASM	Rodilla (IPA)	Doxiciclina (tetraciclina)	10	Infección urinaria
3	♀ 83	No	0	<i>E. cloacae</i>	Cadera (IPA)	Ciprofloxacino (fluoroquinolona)	17	No
4	♀ 83	No	0	SASM	Cadera (IPA)	Cefalexina (betalactámico)	22	Bacteriuria asintomática
5	♂ 89	No	1	SASM	Cadera (IPA)	Cefalexina (betalactámico)	14	No
6	♀ 79	Sí	0	SERM	Rodilla (IPA)	Cotrimoxazol	109	Diarrea; bacteriuria asintomática
7	♀ 80	No	1	SASM	Rodilla (IPA)	Levofloxacino (fluoroquinolona) / Rifampicina	1	No
8	♀ 88	No	0	<i>E. coli</i>	Rodilla (IPA)	Cotrimoxazol	62	Bacteriuria asintomática
9	♂ 73	Sí	1	Sin aislamiento	Instrumentación vertebral	Cotrimoxazol	54	Estreñimiento
10	♂ 84	No	3	SASM	Cadera (IPA)	Cefalexina (betalactámico)	30	No
11	♀ 70	No	1	<i>E. faecalis</i>	Hombro (IPA)	Amoxicilina (betalactámico)	11	Aumento de peso; candidiasis
12	♂ 66	No	2	SESM	Cadera (IPA)	Doxiciclina (tetraciclina)	48	Diarrea
13	♀ 82	Sí	1	<i>C. granulosum</i>	Hombro (IPA)	Moxifloxacino (fluoroquinolona)	19	Distensión abdominal
14	♀ 74	No	0	SASM	Rodilla (IPA)	Clindamicina (lincosamida)	32	No
15	♂ 72	No	6	SERM	Material osteosíntesis (húmero)	Teicoplanina (glucopéptido)	1	No
16	♂ 34	No	1	Polimicrobiano	Instrumentación vertebral	Cotrimoxazol	102	No
17	♂ 81	No	2	SASM	Material osteosíntesis (tibia)	Cefadroxilo (betalactámico)	1	ICD

SASM: *S. aureus* sensible a meticilina; SESM: *S. epidermidis* sensible a meticilina; SERM: *S. epidermidis* resistente a meticilina; GI: Gastrointestinal; ICD: Infección por *C. difficile*. IPA: infección de prótesis articular. El índice de Charlson estima la supervivencia a 10 años: 0 = 98%, 1 = 96%, 2 = 90%, 3 = 77%, 4 = 53%, 5 = 21% y 6 = 2%.

2. Análisis culturómico de colonización intestinal

No se detectó la presencia de microorganismos multirresistentes a los antibióticos después del cultivo selectivo de las heces, con la excepción de dos aislados de *E. coli* productores de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) en los pacientes 7 y 15, que se caracterizaron además como CTX-M-15. Ambos pacientes fueron tratados con antibióticos no betalactámicos: levofloxacino/rifampicina y teicoplanina, respectivamente. Por otro lado, se identificó un caso de colonización intestinal e infección por *C. difficile* en un paciente con un mes de tratamiento con cefadroxilo.

3. Caracterización de la microbiota fecal

La secuenciación rindió un total de 1.486.103 lecturas tras el proceso de filtrado de calidad, con una frecuencia mediana por muestra de 88.511. Para el cálculo de los parámetros de diversidad, se fijó la profundidad de muestreo en 58.000 lecturas. El conjunto de datos de secuenciación metagenómica generados y analizados durante el presente estudio están disponibles en el siguiente enlace: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJNA633161>.

3.1. Alfa diversidad

Para la caracterización de la microbiota intestinal, evaluamos en primer lugar su diversidad alfa, esto es, su riqueza y distribución de especies, mediante los índices de diversidad Shannon y Chao1 (Figura 8), detectando un patrón similar para los pacientes tratados con betalactámicos y cotrimoxazol, mientras que las tetraciclinas (y en particular las fluoroquinolonas) se asociaron a una disminución considerable del índice Chao1. Destaca especialmente el paciente 7, con una pauta de levofloxacino más rifampicina durante un solo mes, y que sin embargo presentó los valores más bajos de ambos parámetros de alfa diversidad, reflejando la pobre riqueza de su ecosistema bacteriano intestinal. Por el contrario, el paciente 15 también recibió un mes de tratamiento (con teicoplanina intravenosa), pero sin embargo presentó valores de diversidad alfa elevados. Estas observaciones explican que no se encontraran diferencias significativas en la alfa diversidad respecto a la duración del TAS ($p > 0,05$).

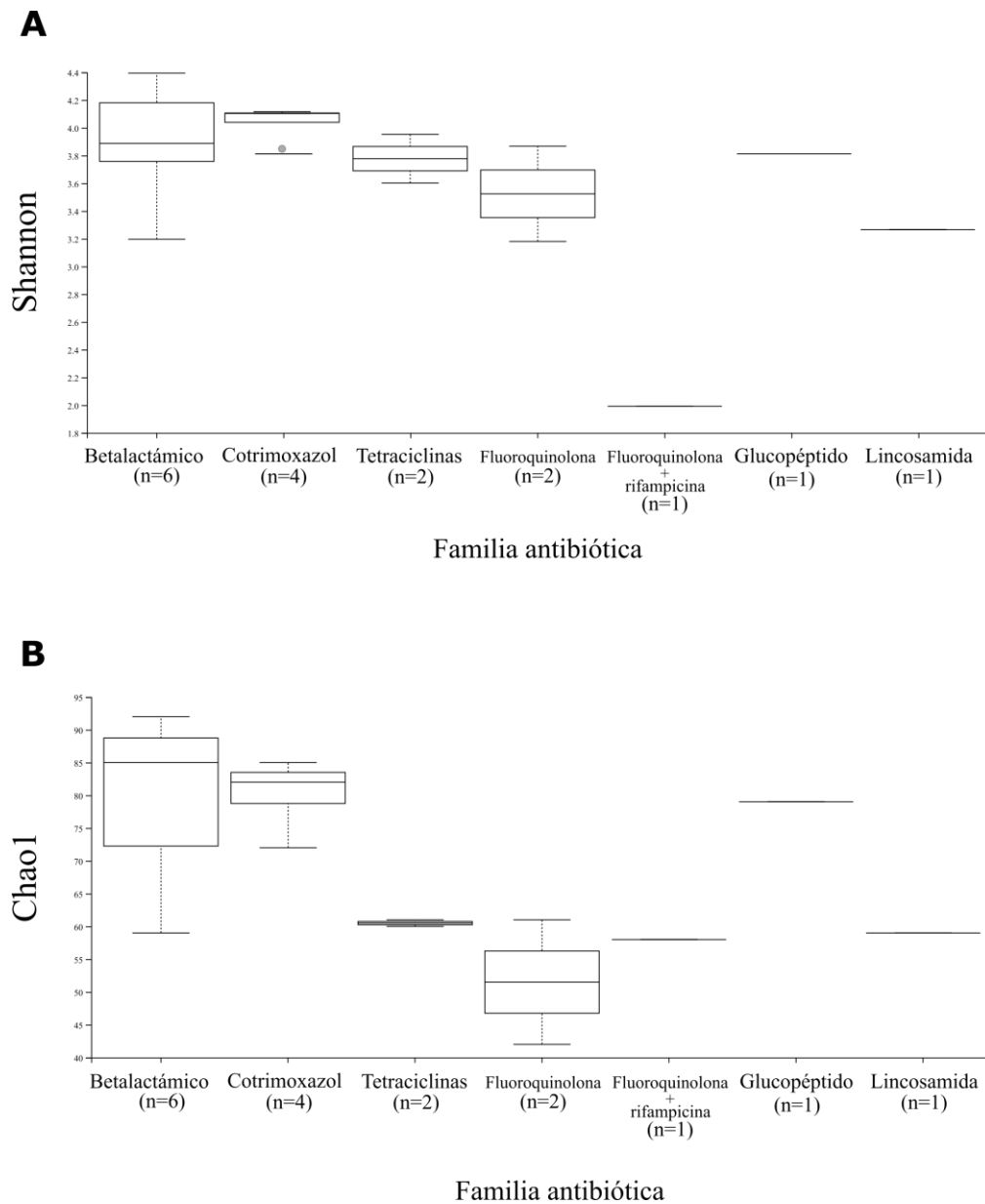


Figura 8. Diagrama de cajas que representa la diversidad alfa de las muestras agrupadas según la clase de antibiótico. (**A**) Índice de Shannon, (**B**) Índice de Chao1.

3.2. Beta diversidad

La Figura 9 muestra la distribución y abundancia relativa de los filos bacterianos en cada uno de los pacientes estudiados. Como se puede observar, hubo una gran variabilidad entre todos los pacientes y filos, en particular para Bacillota (valor medio, 76,6%; rango, 45-95%), Bacteroidota (8,7%, 0,7-45%), Pseudomonadota (2,1%, 0,006-28%),

Actinomycetota (3,1%, 0,2-22%) y Verrucomicrobiota (0,01%, 0-15%). Se comparó la abundancia de los géneros de referencia de cada filo según el antibiótico prescrito y la duración de la ingesta: *Faecalibacterium* (Bacillota), *Bacteroides* (Bacteroidota), *Escherichia/Shigella* (Pseudomonadota), *Akkermansia* (Verrucomicrobiota), y *Bifidobacterium* (Actinomycetota) (Figura 10). Como cabría esperar, el análisis mostró una gran variabilidad intra-individual; sin embargo, *Akkermansia* se vio más disminuida en los pacientes que recibían cotrimoxazol, mientras que las fluoroquinolonas se asociaron a una menor abundancia de *Bifidobacterium*. Además, se observó una baja abundancia de *Escherichia/Shigella* en todos los pacientes, excepto en el paciente 10 (tratado con cefalexina).

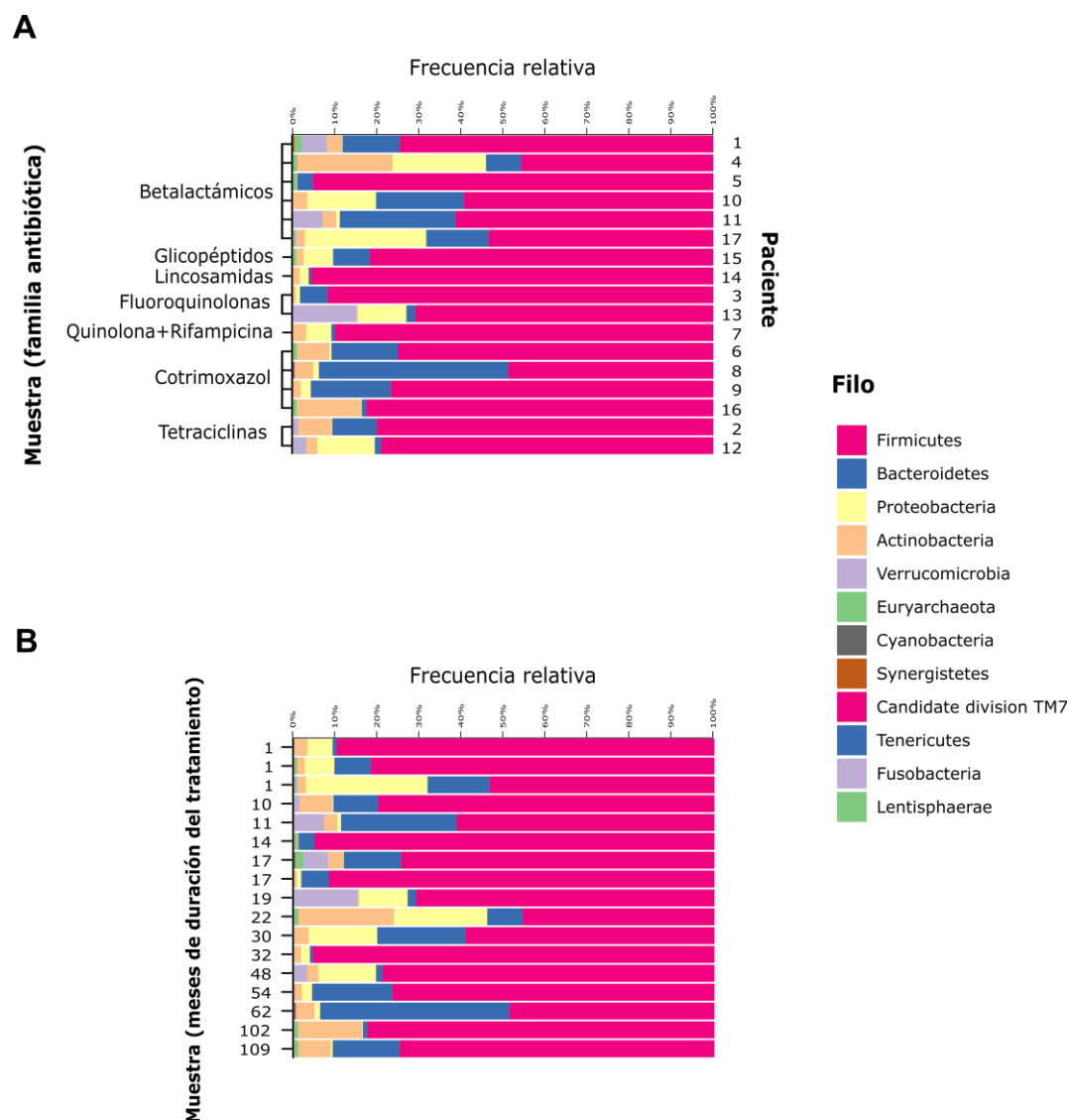


Figura 9. Visión general de la distribución de los filos bacterianos de los 17 pacientes, teniendo en cuenta la clase de antibiótico (**A**) y la duración del tratamiento (**B**).

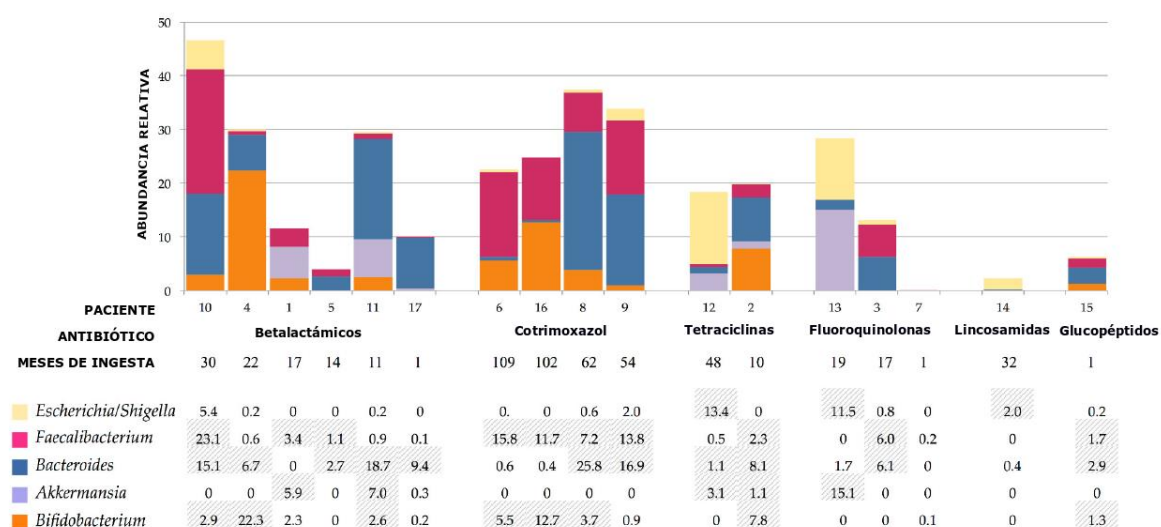


Figura 10. Abundancia relativa de los géneros de referencia de los filos mayoritarios para cada paciente: en las columnas se representa la adición de cada proporción de géneros respecto a los porcentajes totales de la microbiota, arriba detallados. Las celdas sombreadas corresponden a las de mayor abundancia.

Por otra parte, el análisis multivariante permutado (PERMANOVA) basado en los valores del índice de disimilitud de Bray-Curtis no detectó patrones de agrupación significativos según la clase de antibiótico o la duración de la TAS. La representación gráfica de la matriz de disimilitud mediante PCoA corroboró esta observación (Figura 11).

Acorde a dichos resultados, el análisis mediante LEfSe no halló taxones con abundancia diferencial según el tipo de tratamiento antibiótico utilizando la configuración por defecto. Sin embargo, para identificar qué microorganismos se pudieron ver sensiblemente afectados por cada antibiótico, analizamos los datos de nuevo realizando una comparación multi-grupo mediante el test de Wilcoxon en configuración menos restrictiva (Figura 12). El análisis reveló que el tratamiento con betalactámicos se asoció a una menor proporción de los géneros *Escherichia/Shigella*, *Dorea*, *Solobacterium*, *Actinomyces* y de la familia *Acidaminococcaceae*, mientras que se correlacionaron con la expansión de los géneros *Flavonifractor*, *Sutterella*, *Christensenella*, *Anaerofustis*, *Haemophilus* y *Gelria*. Por otro lado, el potencial impacto del tratamiento con cotrimoxazol fue considerablemente menor, pues solo se asoció al aumento de los géneros *Faecalibacterium*, *Prevotella*, *Pseudobutyrvibrio*, *Dorea*, *Collinsella*, *Mogibacterium*, *Alloprevotella*, *Olsenella* y *Howardella*.

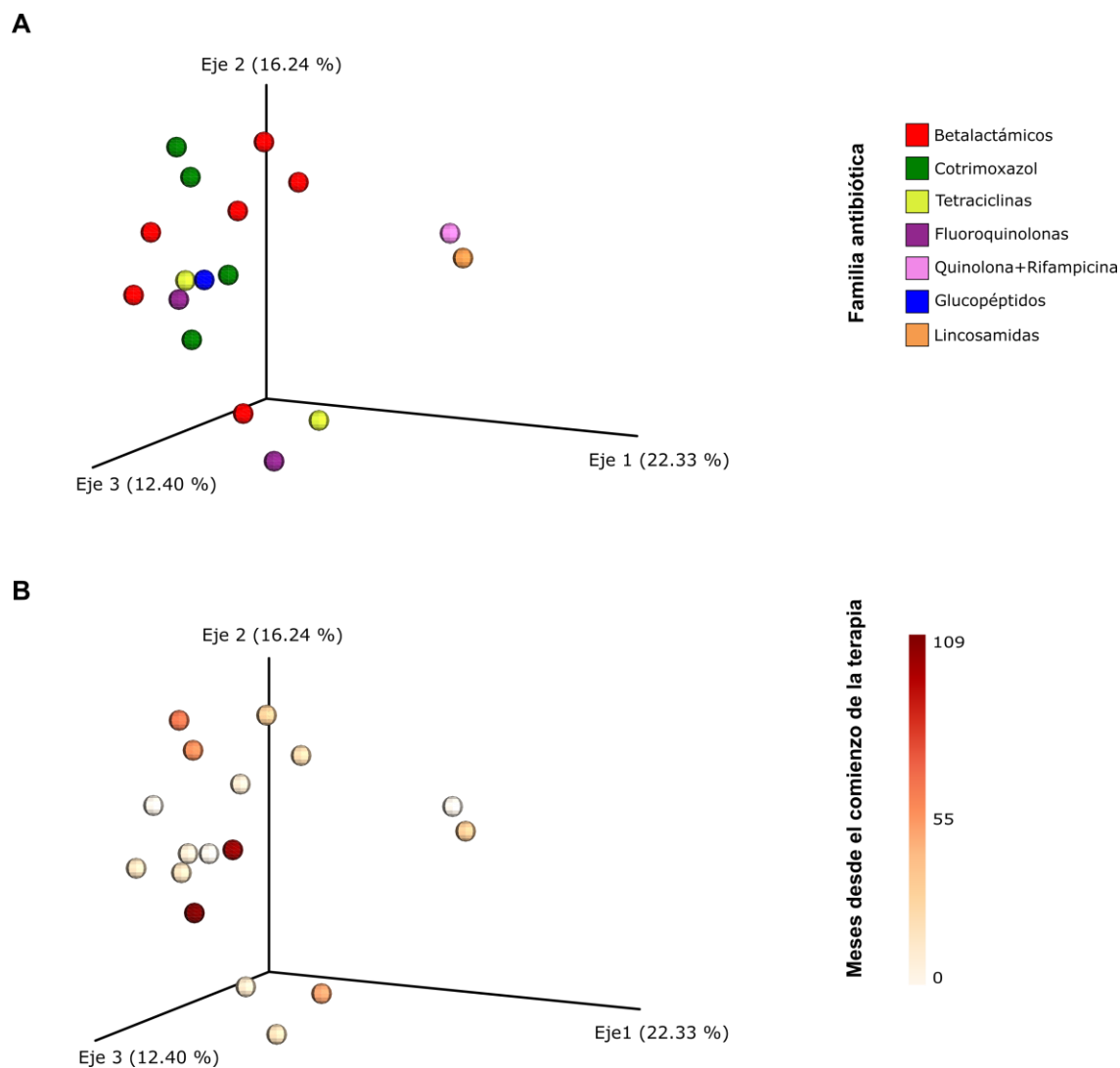


Figura 11. Análisis de coordenadas principales (PCoA) basado en la matriz de disimilitud de Bray-Curtis, que muestra la ordenación espacial de la diversidad beta entre las muestras, teniendo en cuenta la clase de antibiótico (**A**) y el periodo de ingesta (**B**).

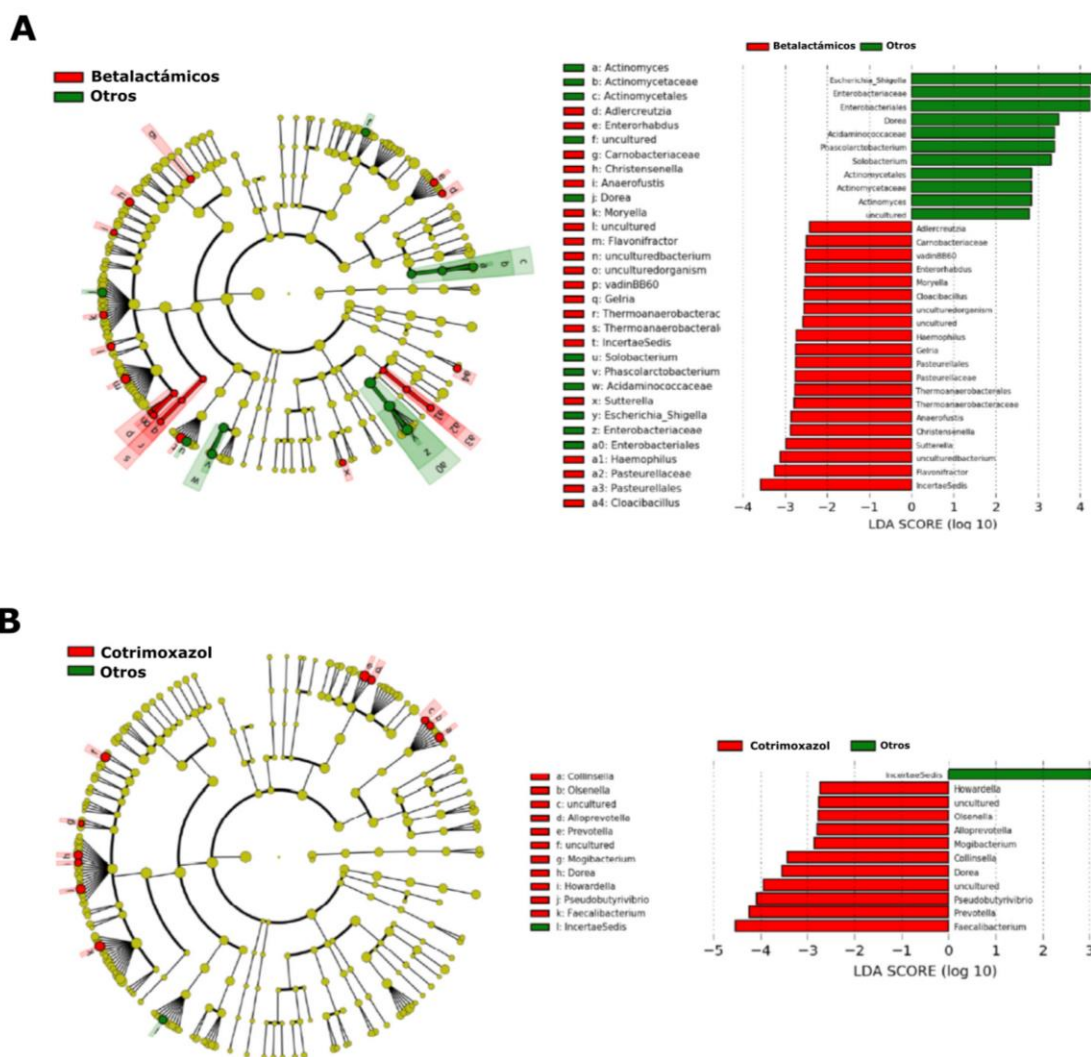


Figura 12. Taxones bacterianos con abundancia diferencial según el análisis lineal discriminante de tamaño de efecto (LEfSe). El lado izquierdo de cada gráfico muestra un cladograma, en el que los círculos amarillos representan taxones bacterianos que no muestran diferencias significativas entre los grupos analizados, mientras que los círculos verdes y rojos representan a aquellos taxones que sí son significativamente más o menos abundantes en los grupos analizados. En el otro lado de cada gráfico se muestran los taxones significativos ordenados según la magnitud de las diferencias (LDA score). **(A)** Comparación entre los pacientes que recibían antibióticos betalactámicos y los demás. **(B)** Comparación entre los pacientes que recibían cotrimoxazol y los demás.

Por último, el mapa de calor construido a partir de la abundancia relativa de los géneros más frecuentes en el conjunto de la población a estudio se muestra en la Figura 13. Finalmente se incluyeron 37 de los 50 taxones analizados, debido a que durante la

asignación taxonómica no se logró nombrar a 14 de ellos a nivel de género, agrupándolos como *uncultured bacterium* en el mapa de calor. Los resultados demostraron que 3 de los 6 pacientes que recibieron betalactámicos se agruparon juntos en el árbol UPGMA, mientras que en los 4 pacientes que recibieron cotrimoxazol la agrupación se produjo por parejas. Estos resultados descartan que el tipo de antibioterapia produzca alteraciones significativas en la composición de la microbiota núcleo o estructural.

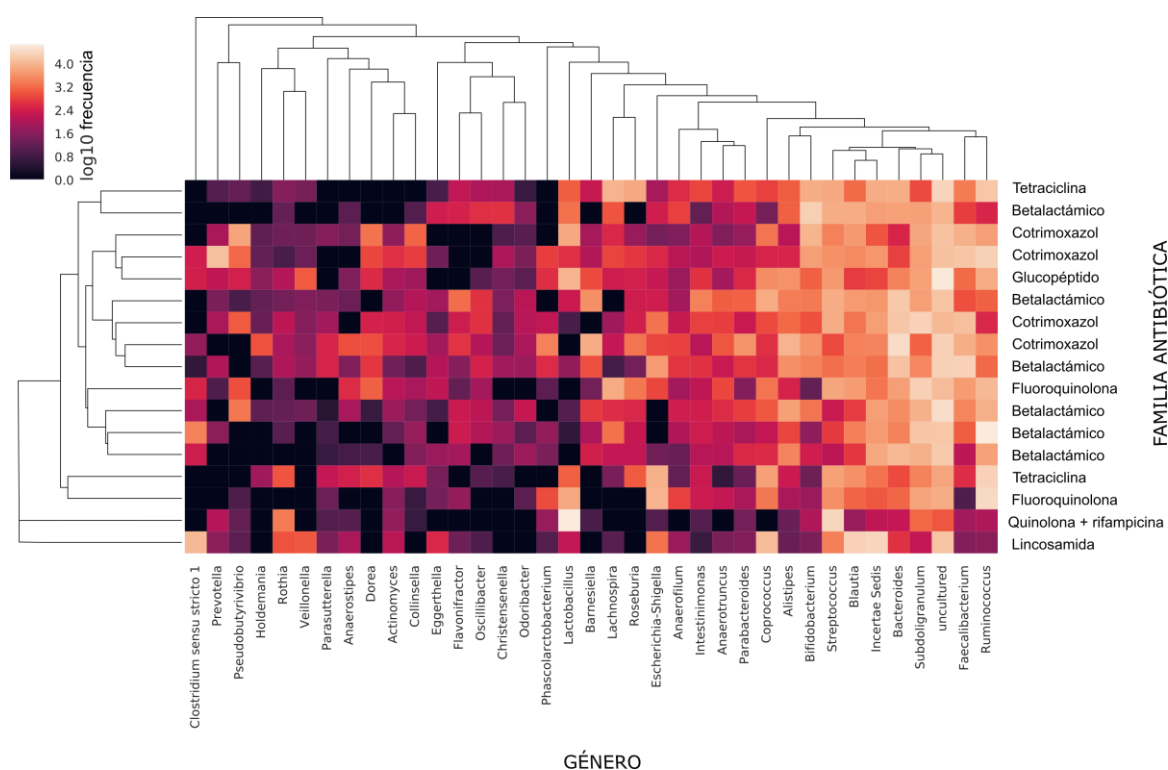


Figura 13. Mapa de calor que representa la abundancia relativa y la distribución de los 37 géneros más abundantes en el conjunto de muestras. El eje Y dispone cada muestra de forma individual, etiquetada según la clase de antibiótico utilizado y ordenadas siguiendo un dendrograma (lado izquierdo del gráfico) construido mediante un análisis de agrupación en base a los índices de disimilitud de Bray-Curtis entre las muestras. El eje X representa los 37 géneros más abundantes en términos de mediana de frecuencias relativas. El dendrograma de los géneros se construyó siguiendo el análisis de agrupación por el método de grupos de pares no ponderados (UPGMA), que ordena los géneros según su coocurrencia en las distintas muestras.

4. Análisis de viabilidad bacteriana

Por último, se evaluó la viabilidad de las bacterias de la microbiota fecal mediante PCR-DGGE con y sin PMA, para inhibir la amplificación de células no viables (Figura 14). Se seleccionaron 5 muestras que representaron las clases de tratamiento antibiótico más comunes en nuestra población de estudio. Se observó una intensidad de bandas similar en los experimentos con y sin PMA, lo que sugiere una preservación equivalente de la viabilidad bacteriana en las muestras de heces para las distintas clases de antibióticos empleados.

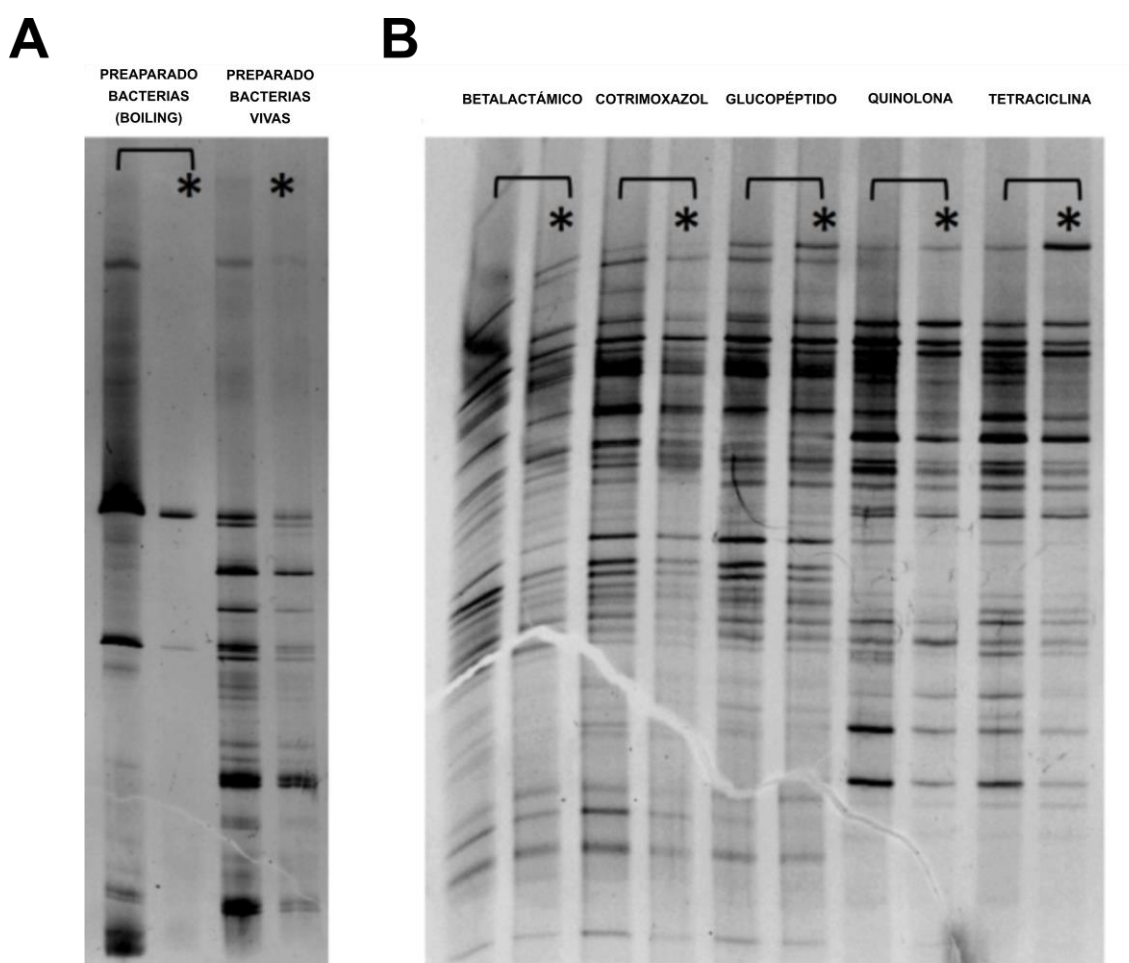


Figura 14. Experimentos PCR-DGGE con (*) y sin PMA, para evaluar la viabilidad bacteriana. (A): Controles de bacterias vivas (derecha) respecto a la misma preparación, pero hervida para destruir las células bacterianas (izquierda). (B): Muestras fecales de nuestros pacientes con (*) y sin PMA.

V. DISCUSIÓN

El impacto a corto y largo plazo de los antibióticos en la microbiota intestinal mediante técnicas no basadas en cultivo ha sido ampliamente documentado [249–254], demostrando una gran variabilidad intra-individual e inter-individual, incluso para compuestos antimicrobianos similares. La mayoría de estos estudios indicaron una respuesta individual a los antibióticos fuertemente influenciada por la diversidad y robustez inicial del ecosistema intestinal [255]. En el presente estudio, se explora por primera vez el impacto del TAS en la microbiota intestinal de una población envejecida (salvo un paciente) con comorbilidades (índice de Charlson medio de 1,24) e infecciones bacterianas no resueltas. Los resultados esperables incluían la colonización fecal por bacterias multirresistentes, no sólo por la presión evolutiva ejercida por la administración sostenida de antibióticos sino también como consecuencia de las frecuentes visitas al hospital, así como la alteración del ecosistema intestinal. Sorprendentemente, ninguna de estas dos expectativas se cumplió de forma patente en nuestro estudio.

El TAS no es sólo una opción terapéutica, sino que es, de hecho, la única alternativa para el tratamiento de las infecciones asociadas a implantes cuando la curación por vía quirúrgica no es factible. El primer objetivo de este estudio fue evaluar la seguridad del TAS, que resultó adecuada si tenemos en cuenta que no se observaron complicaciones graves en nuestra cohorte, a excepción de los pacientes 11 y 17. La paciente 11 refirió candidiasis vaginal y aumento de peso tras la toma de amoxicilina durante 11 meses. La propiedad promotora del crecimiento de los antibióticos es bien conocida, aplicándose de forma generalizada en el sector de la ganadería, pero a dosis bajas. Aunque otros pacientes recibieron también betalactámicos, la paciente 11 fue la única que tomaba amoxicilina, con lo que no podemos descartar que un aumento del índice de masa corporal fuera una consecuencia directa del TAS, algo ya descrito por otros autores [256–258]. Por otro lado, una de las consecuencias más frecuentes y relevantes de la terapia antibiótica es la ICD, debido a la alteración de la microbiota comensal. En nuestra cohorte solo se reportó un caso de ICD (paciente 17), en un paciente de 81 años sometido a un mes de tratamiento con cefadroxilo, que además resultó ser el paciente cuya microbiota presentó la mayor proporción del filo *Pseudomonadota* (28,9%). Esta baja prevalencia entre nuestros pacientes puede venir explicada por la elevada abundancia del género *Barnesiella* ($0,7 \pm 1,8\%$; rango, 0-6,9%) y la familia *Lachnospiraceae* ($19,3 \pm 15\%$; rango 3,6-72%), ambos relacionados con un papel protector frente a la ICD [259], y que en el paciente 17 estaban

en baja proporción (*Barnesiella* 0,2%, *Lachnospiraceae* 3,6%). Por último, los efectos adversos intestinales leves como la diarrea y la flatulencia observados en nuestro estudio tuvieron carácter autolimitado o fueron controlados.

En el presente estudio, solo 2 de los 17 pacientes incluidos presentaron colonización intestinal por microorganismos multirresistentes a los antibióticos, en concreto por dos aislados de *E. coli* productores de BLEE. Cabe destacar que dichos pacientes no fueron tratados con betalactámicos, sino con la asociación de levofloxacino y rifampicina en el caso del paciente 7, y teicoplanina en el paciente 15. En relación al efecto de los antibióticos orales en el resistoma intestinal, hay que señalar que la mayor parte de la dosis de antibiótico se absorbe en los primeros tramos del intestino delgado, y sólo pequeñas cantidades del antibiótico llegan al colon. Sin embargo, las moléculas de antibióticos no modificadas también pueden reintroducirse en el lumen a través de la excreción biliar, especialmente los antibióticos lipofílicos como las tetraciclinas y las fluoroquinolonas. Los datos disponibles sobre el proceso de selección de bacterias resistentes a los antibióticos se infieren a partir de experimentos *in vitro*, pudiendo producirse algunas discrepancias *in vivo* [259]. En cualquier caso, la prevalencia global de colonización por bacterias multirresistentes reportada en esta serie (11,7%) es baja al compararla, por ejemplo, con el 15,3% de colonización por *E. coli* BLEE observado en centros de larga estancia de Europa [260]. Por lo tanto, este hallazgo refuerza el uso del TAS como terapia segura para los pacientes.

Uno de los principales objetivos de este trabajo fue evaluar el impacto de cada familia antibiótica en la composición de la microbiota intestinal. Numerosos estudios han tratado de abordar este tema en distintos contextos, arrojando resultados dispares. Por ejemplo, los aminoglucósidos parecen seleccionar positivamente a los filos Bacteroidota y Bacillota, mientras que la actividad de las quinolonas variaría en gran medida en función de cada individuo [261]. En concreto, algunos autores encontraron que las fluoroquinolonas tendrían un impacto más profundo en el ecosistema intestinal [252,254], mientras que otros contradicen esta afirmación y rebajan también la influencia de la vancomicina (intravenosa) y del trimetoprim-sulfametoxazol [262].

Los pacientes reclutados en este trabajo se caracterizaban por su avanzada edad y su frágil estado clínico basal (índice de Charlson=1,24 ± 1,48/IQR 1 (0-1,5)). A pesar de la falta de muestra de referencia para todos los pacientes antes de iniciar el TAS, observamos una notable conservación de la diversidad alfa de las comunidades bacterianas tras la

exposición prolongada a los antibióticos. Por otro lado, aunque los análisis de beta diversidad no encontraron diferencias significativas entre los grupos de tratamiento, ni tampoco en relación a la duración del TAS, sí se observó cierta tendencia a la agrupación de los pacientes que recibían betalactámicos, con empobrecimiento en enterobacterias y Actinomycetales, y también de los que recibían cotrimoxazol, con enriquecimiento significativo de los géneros *Faecalibacterium* y *Prevotella*, entre otros. A pesar de esto, los resultados de este trabajo dejan patente la elevada heterogeneidad del efecto de la antibioterapia en la composición bacteriana intestinal de los distintos pacientes. Esto coincide con lo descrito en estudios previos, donde el impacto de la terapia antibiótica es altamente dependiente de la composición inicial y particular de la microbiota de cada individuo [252,263]. Además, aunque el efecto a largo plazo de la antibioterapia no ha sido suficientemente explorado, Bacteroidota, *Bifidobacterium*, anaerobios estrictos y poblaciones minoritarias parecen ser las poblaciones bacterianas más frágiles a su acción [250,264–267], y nuestros resultados demuestran una elevada disparidad en la abundancia de dichas poblaciones en los distintos pacientes.

Además de los efectos propios de la antibioterapia, otro aspecto a considerar es la posible actividad antibacteriana de otros fármacos prescritos a los pacientes o incluso de ciertos alimentos [268], cuyo control y evaluación quedaron fuera del alcance de este trabajo. En este sentido, existen compuestos capaces de secuestrar a nivel del lumen intestinal los restos de antibiótico [269,270], lo que podría tener interés en terapias prolongadas como el TAS para reducir los posibles efectos deletéreos del mismo sobre la microbiota.

Por otro lado, el estudio de viabilidad de las comunidades bacterianas mediante la adición de PMA demostró la conservación de la misma en las muestras estudiadas. Este novedoso abordaje, llevado a cabo con la inestimable colaboración del Dr. Hugo Barragán, del Servicio de Microbiología del Hospital Ramón y Cajal, nos permitió responder a la pregunta de si un tratamiento antibiótico prolongado puede comprometer no ya la funcionalidad, sino la capacidad de supervivencia de las especies que componen el ecosistema expuesto. Este resultado refuerza el buen perfil de seguridad que ha demostrado el TAS en este estudio.

Las principales limitaciones de este estudio son el reducido número de pacientes reclutados para cada grupo de antimicrobianos, las características clínicas específicas de cada individuo, que impiden una comparación homogénea, y la falta de muestras de

referencia (previas al inicio del tratamiento) para determinar mejor el impacto a largo plazo de los antibióticos. Por el contrario, el punto fuerte del estudio fue la caracterización por primera vez de la composición de la microbiota intestinal en el contexto de un uso indefinido y controlado de antibióticos, tanto desde un punto de vista metataxonómico como de viabilidad bacteriana.

En resumen, en este capítulo se demuestra la seguridad general del TAS, la baja tasa de selección de bacterias multirresistentes a los antibióticos y el predominio de la especificidad individual en el impacto sobre la composición de la microbiota intestinal. Nuestros datos sugieren que el TAS es seguro en un contexto clínico de seguimiento clínico especializado que vigile los efectos adversos, las interacciones y la toxicidad del tratamiento, introduciendo las modificaciones necesarias en cada caso.

CAPÍTULO III

Impacto de la cirugía bariátrica en la microbiota intestinal y el metaboloma en obesidad mórbida

I. ANTECEDENTES

La cirugía bariátrica es la terapia más eficaz para reducir el índice de masa corporal (IMC) en obesidad mórbida (IMC >40 o >35 combinado con comorbilidades) y también es adecuada para restaurar las disfunciones endocrinas relacionadas con la obesidad, como la diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) [271,272]. Los abordajes quirúrgicos laparoscópicos más utilizados son el bypass gástrico en Y de Roux (RYGB) y la gastrectomía vertical en manga (*Sleeve Gastrectomy*; SG), siendo la SG un método restrictivo basado en la reducción del estómago, mientras que la RYGB combina aproximaciones tanto restrictivas como malabsortivas, a través de la reducción del estómago y la reorganización anatómica de los tractos biliar y digestivo (Figura 15). La decisión de emplear una u otra aproximación quirúrgica suele recaer en un consenso entre pacientes y cirujanos, apoyándose en el IMC, los hábitos dietéticos y las comorbilidades, siendo la RYGB generalmente la escogida cuando el IMC es superior a 50 o en comedores compulsivos [273]. Tras la cirugía, los pacientes se ven obligados a realizar cambios dietéticos drásticos debido a la reducción del volumen del estómago, lo que conlleva a una pérdida de peso cuyo grado es variable.

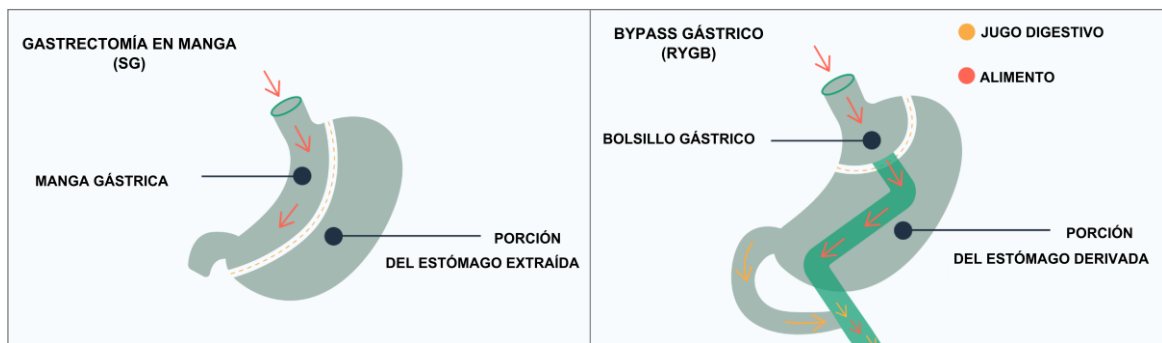


Figura 15 (modificada de Cale Li). Infografía que representa los dos principales tipos de cirugía bariátrica. En el caso de SG, se extrae un 75% del estómago, permaneciendo el 25% restante en forma de manga o tubo (*sleeve*). En RYGB, sin embargo, se remodela el estómago en una bolsa más pequeña, que se conecta directamente al yeyuno. La parte restante del estómago se mantiene como una bolsa separada y unida al duodeno, que vierte finalmente al yeyuno.

El papel de la microbiota intestinal en el estado de obesidad ha sido discutido ampliamente en los últimos años sin llegar a conclusiones sólidas [274], como se ha comentado previamente en la [Introducción](#). Sin embargo, este papel ha sido mucho menos explorado en obesidad mórbida. Se ha demostrado que la cirugía bariátrica provoca cambios en la composición bacteriana del ecosistema intestinal [275,276], que son de mayor magnitud en el caso de la RYGB [271,277]. Más allá de la composición bacteriana, el foco de interés científico se dirige actualmente hacia el estudio del metabolismo microbiano intestinal, centrándose en los mecanismos específicos implicados en la remisión de la DMT2, así como en la dinámica de producción de AGCC y otros metabolitos en relación con el proceso de pérdida de peso post-quirúrgico [273].

II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

La microbiota intestinal tiene una importancia sustancial en la fisiopatología de la obesidad; sin embargo, muy pocos trabajos han profundizado en su estudio en pacientes con obesidad mórbida, especialmente desde un punto de vista funcional y en el contexto de la cirugía bariátrica. Además, existe un gran interés en identificar biomarcadores basados en la microbiota o en sus metabolitos que permitan predecir el éxito terapéutico de la cirugía y estratificar a los pacientes a someterse a un tipo u otro de intervención.

En el presente trabajo se estudiaron tanto los cambios en la composición como en la funcionalidad de la microbiota intestinal de pacientes con obesidad mórbida durante el proceso bariátrico, incluyendo también análisis basados en aprendizaje automático para la predicción del éxito terapéutico de la intervención quirúrgica (pérdida de peso).

Los **OBJETIVOS** propuestos para este capítulo fueron:

1. Monitorizar mediante secuenciación masiva del ADNr 16S los cambios en la composición de la microbiota intestinal de pacientes con obesidad mórbida sometidos a dieta pre-quirúrgica y cirugía bariátrica.
2. Monitorizar, asimismo, los cambios producidos a nivel funcional en estos pacientes mediante el estudio del metaboloma intestinal, incluyendo:
 - 2.1. Ácidos grasos de cadena corta.
 - 2.2. Aminoácidos y otros compuestos nitrogenados.
3. Comparar los resultados obtenidos según el tipo de cirugía realizada (SG o RYGB), y correlacionarlos con la pérdida de peso observada tras la intervención.
4. Identificar biomarcadores predictores de pérdida de peso en los pacientes mediante un análisis predictivo Lasso.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

1. Diseño del estudio

Se llevó a cabo un estudio prospectivo con 40 pacientes (22 mujeres y 18 hombres) que fueron reclutados durante el periodo 2015-2017 por los Dres. María Garriga García, Belén Vega Piñero y José Ignacio Botella Carretero en la Unidad de Cirugía Bariátrica del Hospital Universitario Ramón y Cajal. Se incluyeron pacientes mayores de 18 años sin antecedentes de trastornos infecciosos o gastrointestinales que fueran a someterse a cirugía bariátrica y que no hubiesen consumido antibióticos en los últimos 3 meses. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética de dicho centro, bajo el número de acceso 379/14, y todos los voluntarios firmaron un consentimiento informado para participar en el mismo. La participación en el estudio no interfirió en la indicación ni en la metodología del proceso quirúrgico bariátrico.

Cada participante aportó 4 muestras fecales de la siguiente manera 1)- basal: visita inicial a la Unidad de Cirugía Bariátrica, 2)- dieta: tras un mes de dieta de choque, 3)- 1 mes: un mes después de la cirugía, y 4)- 3 meses: tres meses después de la cirugía. Tras la recogida, las heces se alicuotaron inmediatamente en tubos separados y se congelaron a -80°C hasta su procesamiento.

La visita basal se planificó un mes antes de cada cirugía con el objetivo de dar instrucciones nutricionales a los pacientes, que siguieron una dieta de choque baja en calorías y alta en proteínas para reducir el tamaño del hígado y facilitar el acceso laparoscópico (1.400 calorías para las mujeres y 1.700 para los hombres, con un 38% de proteínas, un 36% de carbohidratos y un 26% de grasas). Independientemente del abordaje quirúrgico, la dieta postoperatoria incluyó sólo líquidos durante los dos primeros días, seguidos de purés/alimentos blandos durante el primer mes, y después sólo consejos nutricionales generales sin restricciones concretas, recomendando un alto consumo de proteínas para evitar la pérdida de masa muscular y la ingesta de complejos multivitamínicos y minerales. Por último, todos los pacientes recibieron profilaxis antibiótica (amoxicilina/clavulánico, 2 g por vía intravenosa) durante la cirugía.

2. Caracterización de la microbiota intestinal

Las muestras de heces se descongelaron lentamente a -20°C durante 24 h, seguido de otras 24 h a 4°C. Se solubilizaron 0,5 g de heces en 5 ml de agua estéril, se centrifugaron y se extrajeron con el kit de extracción *Speedtools tissue DNA extraction kit* (Biotools, Madrid, España). El ADN total resultante se empleó para la secuenciación (2 × 300 pb) de las regiones V3 y V4 del gen ADNr 16S en una plataforma MiSeq (Illumina, EE.UU.). Para la preparación de librerías, se siguió el protocolo *16S Metagenomic Sequencing Library Preparation* (Illumina; Cod. 15044223 Rev. A), y los siguientes cebadores para el amplicón diana:

- Cebador directo:

5'TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTAAGACAGCCTACGGNGGCWGCAG.

- Cebador inverso:

5'GTCTCGTGGCTCGAGGTAAGAGACGACTACHVGGTATCTAATCC.

La calidad de las secuencias crudas se midió según los siguientes parámetros: longitud mínima, 250 pb; tipo de medida de calidad de recorte, media; valor de calidad para recorte desde el extremo 3', 30; y ventana de calidad de recorte, 10 pb. Las afiliaciones taxonómicas se asignaron utilizando la base de datos SILVA 119 [80], y las lecturas con una puntuación RDP inferior a 0,8 se asignaron al rango taxonómico superior, dejando el último rango como no identificado. Las tablas de abundancia relativa y de contingencia de las unidades taxonómicas operativas (OTUs) incluyeron a los taxones de muy baja representación. Se eliminaron las secuencias no asignadas a ningún taxón o clasificadas como no bacterianas. Los estudios de diversidad alfa y beta se realizaron mediante el complemento q2-diversity de QIIME2 [88], después de normalizar las muestras mediante rarefacción (submuestreo sin reemplazo), y se pueden consultar en los [Anexos](#). Además, se realizó un análisis lineal discriminante del tamaño del efecto (LEfSe) [87] para evaluar qué taxones explicaban las diferencias entre grupos. Los datos de las secuencias se depositaron en GenBank (BioProject PRJNA639545, accesible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/?term=PRJNA639545>).

3. Caracterización del metaboloma fecal

Los análisis de metaboloma fecal se realizaron en el Instituto de Productos Lácteos de Asturias (IPLA-CSIC), con la colaboración de las Dras. Clara González de los Reyes-Gavilán y Nuria Salazar, a las que agradecemos su participación en este estudio.

3.1. Ácidos grasos de cadena corta

El análisis de los AGCC se realizó mediante cromatografía de gases (CG) y MS para determinar las concentraciones de acetato, propionato, butirato, isobutirato, ácido valérico, ácido isovalérico y ácido caproico.

En primer lugar, se prepararon sobrenadantes de heces libres de células mediante centrifugación (10.000 g, 30 min, 4°C) y filtración (0,20 μ m). Estos sobrenadantes (0,250 mL) se mezclaron con 0,3 mL de metanol, 0,05 mL de solución estándar interna (2-etilbutírico 1,05 mg/mL) y 0,05 mL de ácido fórmico al 20%. La mezcla se centrifugó y el sobrenadante obtenido se utilizó para la cuantificación de AGCC en un sistema compuesto por un módulo de inyección 6890NGC (Agilent Technologies, EE.UU.) conectado a un detector de ionización de llama y a un espectrómetro de masas 5973N (Agilent), como se ha descrito previamente [278]. Brevemente, los sobrenadantes se inyectaron en el cromatógrafo de gases equipado con una columna capilar HP-Innowax (60 mm de longitud por 0,25 mm de diámetro interno con un espesor de película de 0,25 μ m; Agilent) utilizando Helio como gas portador, con un flujo constante de 1,5 ml/minuto. La temperatura del inyector se mantuvo en 220°C, y la relación de división fue de 50:1. Las condiciones cromatográficas fueron las siguientes: una temperatura inicial de 120°C, 5°C/min hasta 180°C, 1 min a 180°C, y 20°C/min hasta 220°C para la limpieza de la columna. La columna se conectó directamente al detector y la energía de impacto de los electrones se fijó en 70 eV. Los datos se recogieron en el rango de 25 a 250 unidades de masa atómica (a 3,25 barridos/segundo).

Los AGCC se identificaron enfrentando sus espectros contra una base de datos de MS (Wiley, Agilent) y comparando sus tiempos de retención con los de los estándares correspondientes. Los picos se cuantificaron como la abundancia relativa del recuento iónico total con respecto al estándar interno. La concentración (mM) de cada AGCC se calculó mediante ecuaciones de regresión lineal ($R^2 \geq 0,99$) a partir de las curvas correspondientes de los estándares obtenidos con 6 concentraciones diferentes. Las muestras se analizaron por triplicado y se consideró su valor medio.

3.2. Aminoácidos y otros compuestos nitrogenados

La cuantificación de aminoácidos, aminas, amonio y ácido gamma-aminobutírico (GABA) se realizó en un Cromatógrafo de Líquidos de Ultra Alta Resolución (UHPLC) a partir de sobrenadantes fecales libres de células tras derivatización, siguiendo un protocolo descrito previamente [279]. En primer lugar, los sobrenadantes fecales se filtraron mediante filtros centrífugos de 3KDa (Amicon Ultra-0.5; Merck KGaA, Alemania). Posteriormente, se realizó una mezcla de 100 µl de sobrenadante fecal, 175 µl de tampón de borato 1 M (ácido bórico 1 M neutralizado con NaOH hasta pH 9,0), 75 µl de metanol, 2 µl de estándar interno estándar interno (2 g/L) y 3 µl de etoximetilenemalonato de dietilo (DEEMM; Sigma-Aldrich, EE.UU.). La mezcla se incubó a 30°C en un baño de ultrasonidos durante 45 minutos. A continuación, las muestras se calentaron a 70°C durante 2 h para permitir la completa degradación del exceso de DEEMM y subproductos del reactivo. Después, se filtraron a través de membranas de politetrafluoroetileno de 0,22 µm de diámetro de poro acopladas a una aguja de jeringa (VWR International, EE.UU.) en viales cónicos (VWR). Las muestras se derivatizaron por triplicado antes de inyectarlas en el sistema cromatográfico,

El sistema UHPLC empleado fue un H-Class Acquity UPLC (Waters, EE.UU.) acoplado a un detector de matriz de fotodiodos a 280 nm para separar las moléculas derivatizadas. La separación se realizó a 35°C en una columna Waters Acquity UPLC BEH C18 de 1,7 µm (2,1 x 100 mm). Los datos se adquirieron y analizaron con el software Empower (Waters). Las muestras se mantuvieron a 16°C en el automuestreador hasta la inyección. La fase móvil consistió en un tampón de acetato 25 mM de pH 6,7 más 0,02% de azida sódica (eluyente A), metanol (eluyente B) y acetonitrilo (eluyente C). Las muestras (1 µl) se aplicaron a la columna y se eluyeron a un caudal de 0,45 mL/minuto. La columna se devolvió a las condiciones iniciales en 0,5 minutos y se equilibró durante 3 minutos antes de la siguiente inyección. Los compuestos diana se identificaron por sus tiempos de retención y sus características espectrales a 280 nm, y se cuantificaron utilizando el método de patrón interno.

4. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los resultados de diversidad bacteriana se usó el complemento q2-diversity de QIIME2. En aquellos grupos/variables con diferencias significativas se exploró además qué taxones explicaban dichas diferencias, mediante el análisis

discriminante lineal del tamaño del efecto (LEfSe), que emplea la prueba de Kruskal-Wallis y la prueba de Wilcoxon por pares. El valor alfa para la prueba factorial de Kruskal-Wallis se estableció en 0,05, mientras que el umbral de LDA score se fijó en 2,0.

Por otro lado, la correlación entre las abundancias bacterianas y los distintos metabolitos estudiados se exploró utilizando una estrategia *Big Data*, mediante el cálculo del coeficiente de Spearman en el *software* Orange 3 [221] y del test de Wilcoxon en GrapPad Prism 9 (GraphPad Software, EE.UU., www.graphpad.com).

5. Análisis predictivo de pérdida de peso

Se realizó un análisis Lasso basado en *machine-learning* a partir de los datos analíticos obtenidos en la muestra basal, con regresiones lineales múltiples para predecir pérdida de peso 3 meses después de la cirugía. La variable independiente fue el % de pérdida de exceso de peso (3 meses después de la cirugía/muestra basal), mientras que como variables dependientes se utilizaron los mismos valores a tiempo 2 (dieta) y tiempo 3 (1 mes tras la cirugía). Dado que se analizaron muchas variables dependientes y para evitar el sobreajuste, se determinaron las más importantes utilizando la correlación entre la variable principal y el conjunto de datos de composición bacteriana, AGCC, aminoácidos y aminos biógenas. El *dataset* resultante se dividió en un *test dataset* (25%) y un *training dataset* (75%) para generar el modelo Lasso. La ventaja de utilizar este modelo es que permite realizar una nueva selección de funciones para obtener mejor relación entre el *test score* y el *training score*. Para medir la bondad del método, se calculó la raíz del error cuadrático medio. Los cálculos se realizaron mediante *scripts* en Python desarrollados por el Dr. Javier Galeano, expuestos en el apartado de [Anexos](#) y accesibles en https://github.com/galeanojav/Severe_Obesity/.

IV. RESULTADOS

1. Reclutamiento de pacientes y evolución clínica

De los 40 pacientes reclutados, 26 fueron intervenidos mediante RYGB y 14 por SG. Los datos clínicos y demográficos se resumen en la Tabla 6, mientras que la evolución en el % de pérdida del exceso de peso se ilustra en la Figura 16. Los pacientes sometidos a RYGB presentaban un exceso de peso significativamente mayor en la muestra basal (64,3 vs 47,2, $p=0,006$), y después de la dieta de choque (56,1 vs 49,9, $p=0,02$). Tres meses después de la cirugía, el % de pérdida del exceso de peso fue similar en ambos procedimientos (47% para RYGB y 45% para SG), pero en RYGB tanto la dieta como la cirugía fueron efectivas, mientras que en los pacientes sometidos a SG la pérdida de peso sólo comenzó después de la cirugía.

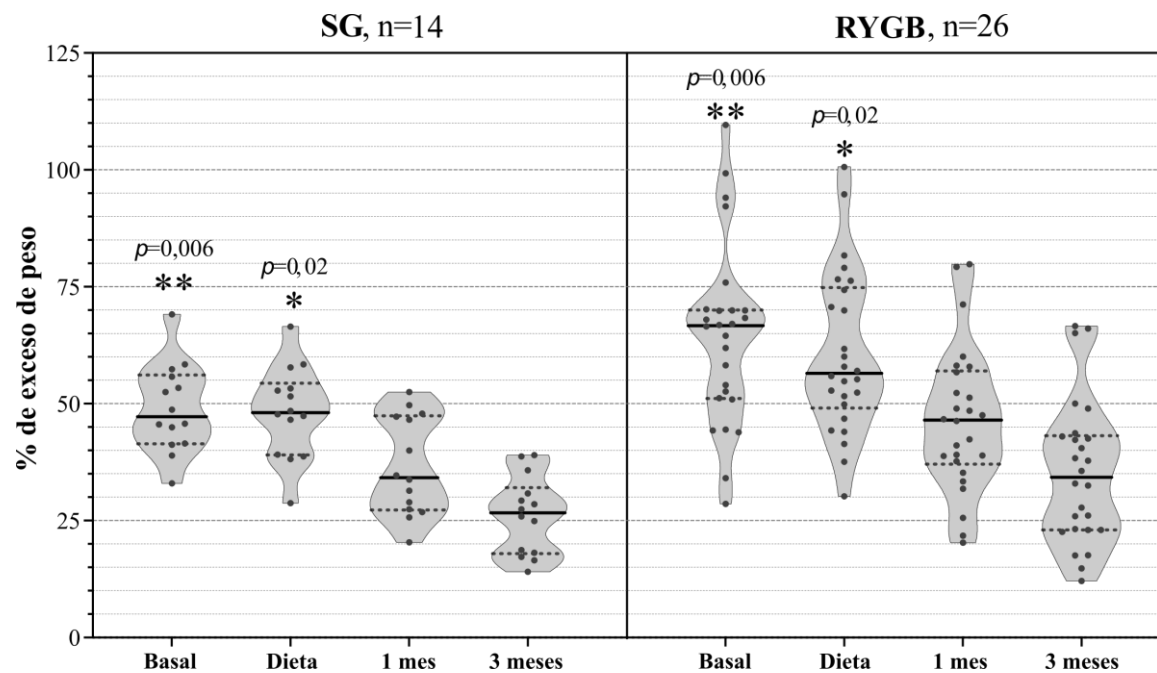


Figura 16. Pérdida del exceso de peso en los 40 pacientes, según tipo de cirugía. Se encontraron diferencias significativas (*) entre ambos grupos para los muestreos basales y de dieta.

Tabla 6. Características clínicas y demográficas de los pacientes. Se muestra la presencia de DMT2 y su resolución tras la cirugía, el IMC basal, así como el exceso de peso (en kg) en cada tiempo y el % de pérdida de exceso de peso al final del periodo de estudio (3 meses post cirugía). F: sexo femenino; M: sexo masculino.

Sexo/Edad	DMT2/ Resolución	IMC basal	Exceso de peso (kg)				% Pérdida de peso
			1	2	3	4	
SG							
F/58		50,4	55,7	53,2	47,2	38,7	69,4
M/58		40,4	45,7	48,4	34,6	27,4	59,9
F/34		42,8	41,2	38,7	27,4	17,2	41,7
F/66		47,8	48,7	97,7	25,7	16,5	33,8
M/64	SÍ/NO	36,4	32,9	28,7	20,4	14,1	38,7
F/37		39,1	38,9	39,1	26,8	18,7	48,0
M/65	SÍ/SÍ	40,8	41,4	47,3	31,4	24,9	60,1
F/48		46,3	57,3	57,7	46,6	35,8	62,4
F/45		45,0	53,3	51,5	40,0	29,3	54,9
M/39		44,3	69,1	66,5	52,5	39,0	56,4
M/59		41,5	52,4	52,7	49,7	28,5	54,3
F/68		42,1	45,5	46,5	33,8	25,9	56,9
F/49		47,2	58,3	58,3	47,9	30,8	52,8
F/40		43,7	44,9	38,1	28,9	18,1	40,3
RYGB							
M/57		44,5	61,9	52,8	39,1	27,8	44,9
F/56	SÍ/SÍ	47,5	58,2	55,2	46,7	40,5	69,5
M/50		45,5	68,0	54,8	38,8	32,5	47,7
M/59	SÍ/SÍ	40,7	50,9	44,0	31,8	23,0	45,1
M/48		63,4	109,6	100,6	79,8	66,6	60,7
F/49		59,3	99,3	94,8	79,3	66,1	66,5
F/62		43,5	44,4	60,1	38,9	25,9	58,3
F/43	SÍ/SÍ	50,1	69,9	76,3	52,3	42,3	60,5
F/53		50,7	69,9	69,9	48,9	48,9	69,9
F/63	SÍ/SÍ	44,3	51,2	52,4	42,4	26,1	50,9
M/56	SÍ/NO	56,8	94,0	79,0	60,0	50,0	53,1
F/62	SÍ/SÍ	38,0	34,1	30,2	21,8	14,8	43,4
F/62	SÍ/SÍ	36,5	28,6	37,6	25,6	12,1	42,3
M/62		47,6	68,3	61,7	51,3	32,9	48,1
F/58		46,1	52,6	51,6	41,1	22,6	42,9
M/53		47,7	67,0	49,8	35,2	17,5	26,1
M/51		48,4	70,2	70,7	54,3	43,0	61,2
M/47		47,9	75,9	76,6	57,9	43,7	57,5
M/37		48,7	66,8	57,0	47,5	38,3	57,3
M/50	SÍ/NO	38,2	44,3	44,3	20,3	17,6	39,7
F/42		50,7	69,9	74,3	58,1	42,5	60,8
M/36	SÍ/SÍ	60,5	115,0	107,0	89,5	78,4	68,1
F/50		45,2	54,9	47,2	37,5	25,7	46,8
F/63		39,9	38,1	40,0	28,4	20,0	52,4
M/60	SÍ/SÍ	44,0	54,2	57,6	29,6	14,8	27,3
F/36		41,7	43,9	41,4	33,4	23,2	52,8

2. Caracterización de la microbiota intestinal

Las 160 muestras obtenidas rindieron un total de 11.889.557 lecturas correspondientes a 250 OTUs, una vez aplicados los distintos filtros de calidad. Para el análisis de diversidad, se normalizaron los datos estableciendo una profundidad de muestreo de 24.758 lecturas.

2.1. Análisis de diversidad

Los valores de diversidad alfa obtenidos (Figura 17A) no mostraron diferencias significativas al compararse los distintos tiempos para cada tipo de cirugía. El índice de Shannon se mantuvo estable durante el muestreo, mientras que el índice Chao1 experimentó tendencias opuestas para los grupos de pacientes SG (ligero descenso) y RYGB (ligero aumento), sin alcanzar significación estadística. Además, estos parámetros no mostraron ninguna correlación significativa con el IMC.

El análisis de diversidad beta basado en el índice de disimilitud de Bray-Curtis mostró que la microbiota de los pacientes en el momento basal era similar en ambos grupos. Sin embargo, la evolución a lo largo del tiempo fue diferente según el tipo de cirugía (Figura 17B). En SG, no se observaron diferencias significativas en la composición bacteriana intestinal a lo largo de los 4 tiempos, pero sí ligeramente al comparar las muestras pre-quirúrgicas (basal + dieta) vs. las post-quirúrgicas (1 mes + 3 meses) ($p=0,03$). Por el contrario, en RYGB se observaron diferencias más profundas, destacando aquellas entre los tiempos basal y 1 mes y basal y 3 meses ($p=0,0015$). Al agrupar las muestras en pre- y post-quirúrgicas, estas diferencias se hicieron todavía más patentes ($p<0,001$). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre los tiempos basal y dieta.

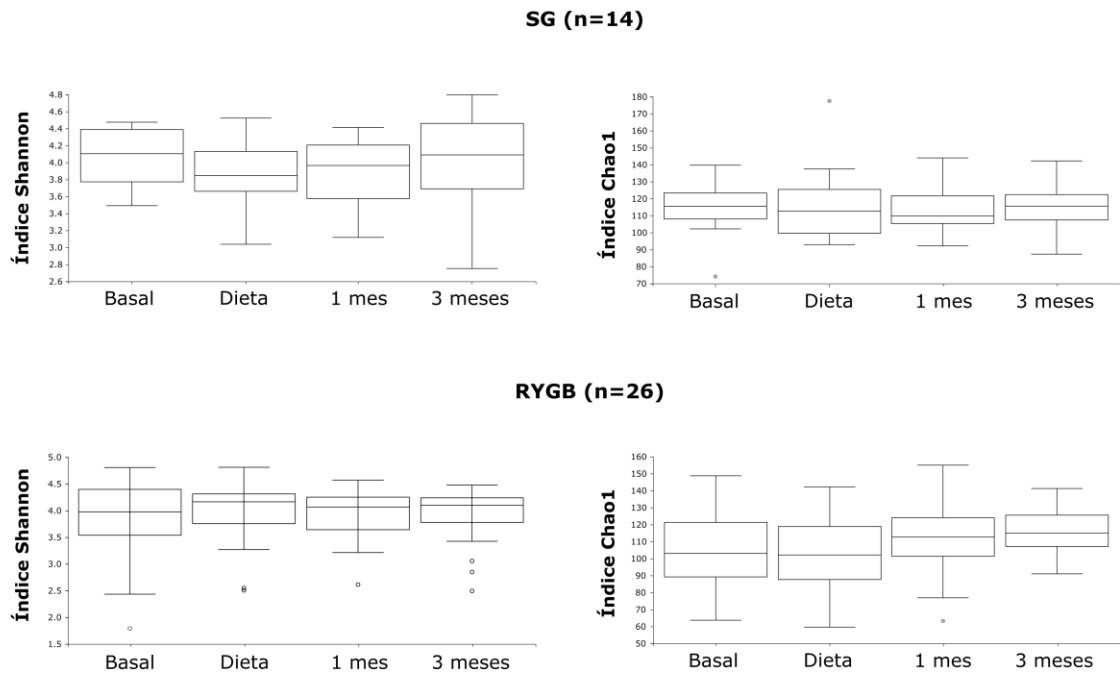
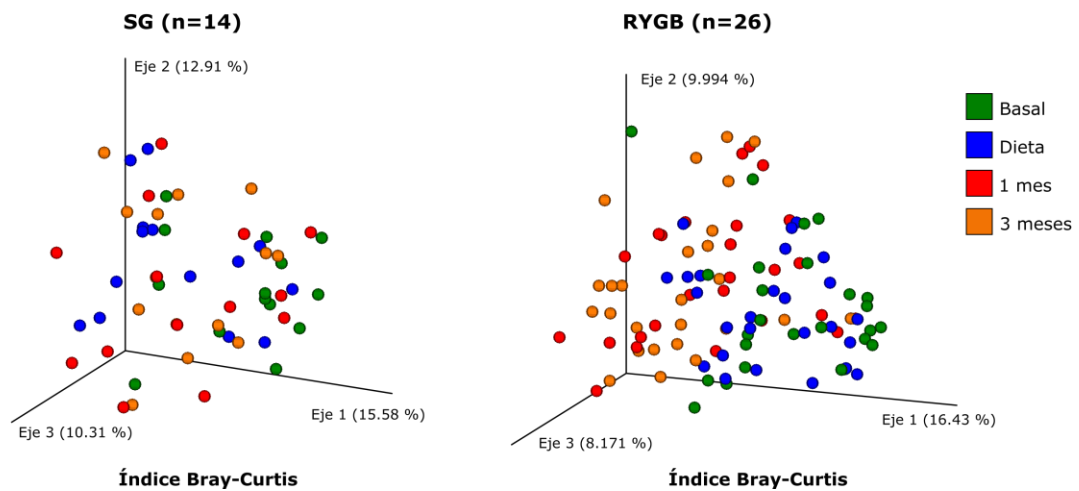
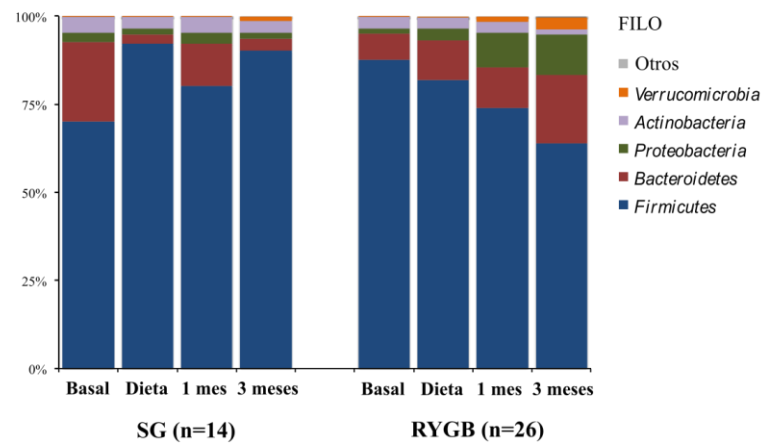
A**B**

Figura 17. Análisis de diversidad bacteriana en los dos grupos de pacientes a lo largo de los 4 tiempos de estudio. **(A):** valores de alfa diversidad (índices de Shannon y Chao1). **(B):** PCoA basado en valores de beta diversidad (índice de Bray-Curtis), calculados a partir de los perfiles microbiológicos de las muestras de heces. Cada punto representa una muestra y el color hace referencia a su momento de recogida.

2.2. Análisis taxonómico

La microbiota fecal de las muestras analizadas mostró una predominancia del filo Bacillota en ambos grupos de pacientes (Figura 18A), con un total de 167 géneros bacterianos identificados, 14 de los cuales representaban más del 80% de la abundancia total entre las 160 muestras (Figura 18B).

A



B

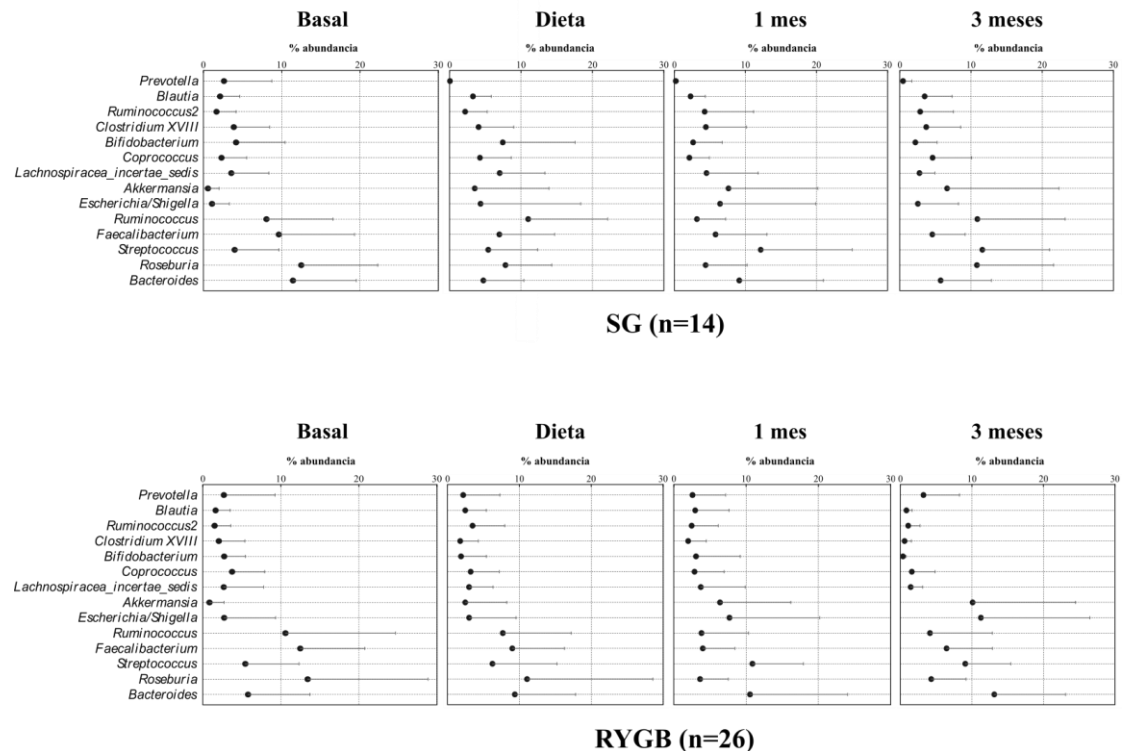


Figura 18. Composición de la microbiota fecal de los pacientes estudiados, según el tipo de cirugía y el momento de recogida. **(A):** a nivel de filo. **(B):** a nivel de género, mostrando solo los mayoritarios (80% de la abundancia total).

El análisis de abundancia diferencial demostró que, a nivel basal, las diferencias entre ambos grupos de pacientes eran muy ligeras, acorde a lo obtenido en el análisis de diversidad. En concreto, se observó a nivel de filo una mayor abundancia en el grupo SG de Bacteroidota, en detrimento de Bacillota, y una mayor presencia de los géneros *Butyricoccus*, *Eggerthella*, *Gordonibacter* e *Intestinibacter* en comparación a RYGB.

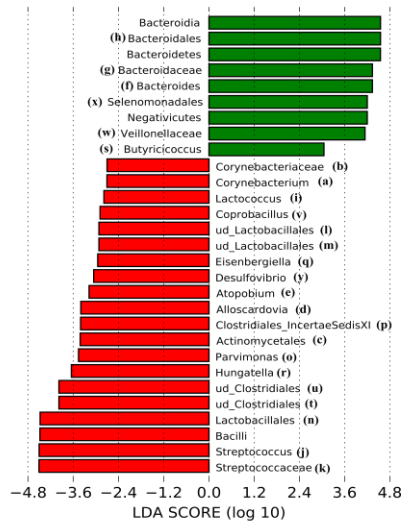
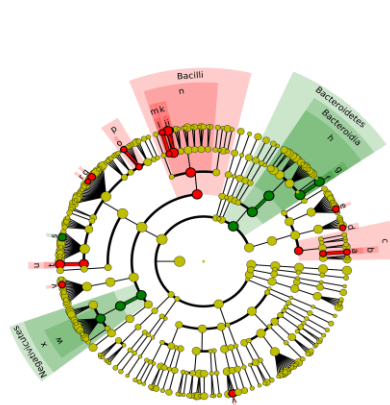
Del mismo modo, aunque el análisis de diversidad evidenció un escaso impacto de la implantación de la dieta pre-quirúrgica en la microbiota, el estudio de abundancia diferencial identificó en el grupo SG un aumento significativo de géneros del filo Bacillota (*Hungatella*, *Dorea* y *Eisenbergiella*) a expensas de una disminución en la abundancia de Bacteroidota. Por el contrario, en RYGB se produjo un ligero aumento de los géneros *Ruminococcus* y *Anaerococcus* y una disminución de las familias Lactobacillaceae y Bifidobacteriaceae.

Respecto al impacto del proceso quirúrgico, las diferencias fueron mucho más patentes. En conjunto, la cirugía implicó la disminución de los géneros *Roseburia*, *Faecalibacterium*, *Ruminococcus* y *Bifidobacterium*, y la disminución de *Escherichia/Shigella* y *Akkermansia*. Al estratificar según tipo de cirugía, las diferencias entre el momento basal y el final del seguimiento fueron mucho más profundas en el grupo RYGB (Figura 19A), acorde a lo obtenido en el análisis de diversidad. Así, los filos Pseudomonadota, Bacteroidota, Verrucomicrobiota y Fusobacteriota experimentaron un importante aumento a los 3 meses tras la cirugía RYGB, al contrario que lo observado para Bacillota y Actinomycetota. En el grupo SG, sin embargo, los cambios fueron mucho menos marcados (Figura 19B), con un ligero enriquecimiento de algunos Bacillota como *Streptococcus*, *Parvimonas*, *Hungatella*, *Lactobacillus* y *Desulfovibrio*, en combinación a un descenso de Bacteroidota y Negativicutes.

Especialmente llamativa fue la dinámica del filo Bacillota. Así, mientras que los pacientes sometidos a SG mantuvieron altas proporciones de Bacillota combinadas con una reducción de Bacteroidota, la abundancia de Bacillota disminuyó drásticamente en RYGB a lo largo del seguimiento. Al estudiar la abundancia de este filo en relación al exceso de peso (Figura 20), se observó que en los pacientes RYGB la pérdida de peso entre el momento basal y los 3 meses después de la cirugía fue inversamente proporcional a la abundancia de este filo ($r=0,31$). Además, se observó que los pacientes con mayor exceso de peso del grupo SG en el momento basal presentaban también mayor % de Bacillota ($r=0,29$).

A**SG - BASAL vs. 3 MESES**

■ 3 meses ■ Basal

**B****RYGB - BASAL vs. 3 MESES**

■ 3 meses ■ Basal

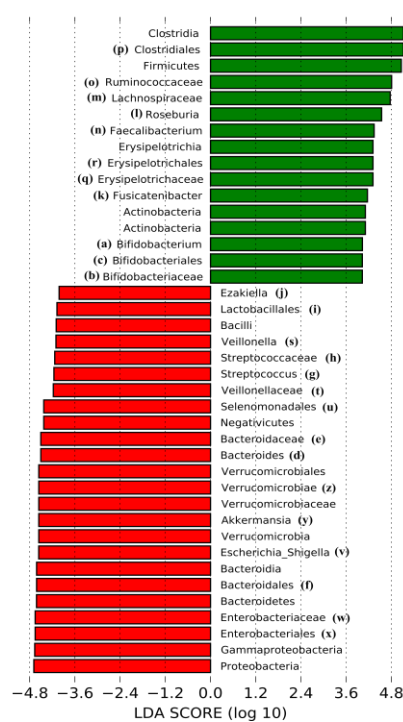
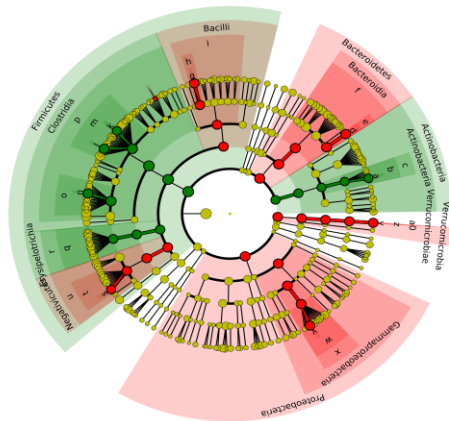


Figura 19. Taxones bacterianos con abundancia diferencial según el análisis lineal discriminante de tamaño de efecto (LEfSe). El lado izquierdo de cada gráfico muestra un cladograma, en el que los círculos amarillos representan taxones bacterianos que no muestran diferencias significativas entre los grupos analizados, mientras que los círculos verdes y rojos representan taxones cuya abundancia es significativamente diferencial entre los grupos analizados. En el otro lado de cada gráfico se muestran los taxones significativos ordenados según la magnitud de las diferencias (LDA score). **(A):** Comparación entre el tiempo basal y 3 meses tras cirugía en pacientes SG. **(B):** Comparación entre el tiempo basal y 3 meses tras cirugía en pacientes RYGB (se muestran solo taxones con LDA>4, para simplificar la figura).

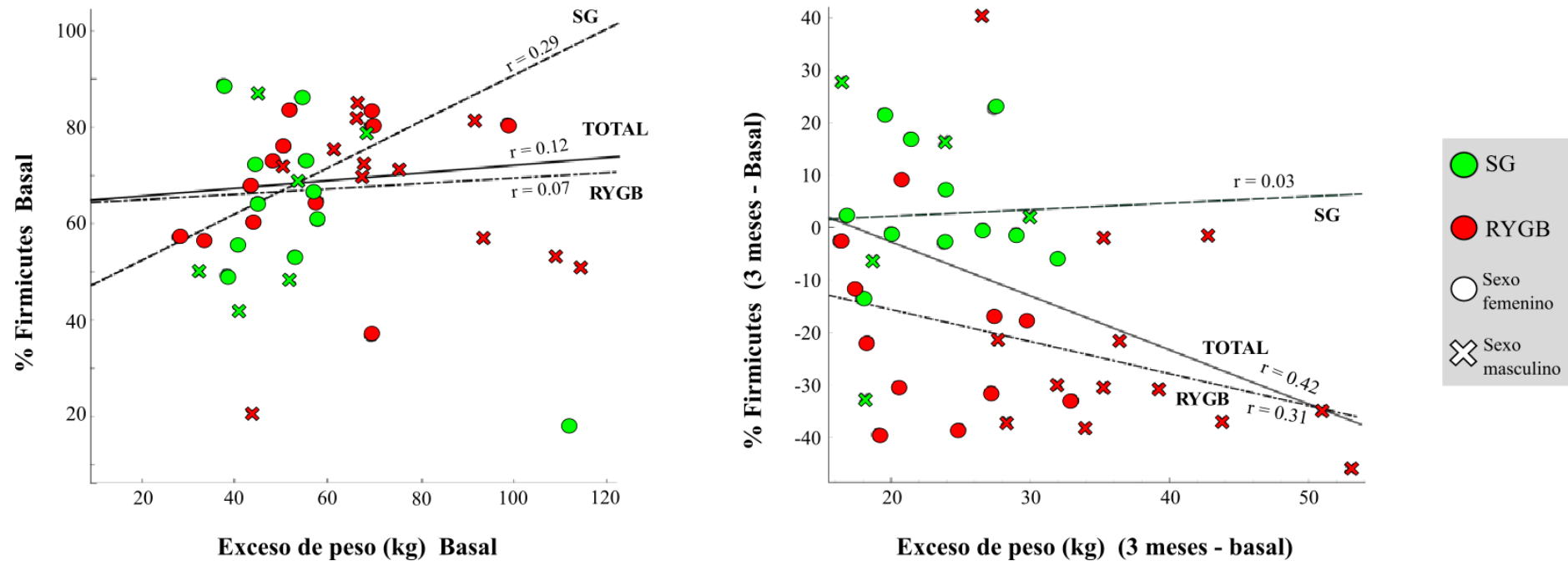


Figura 20. Estudio de correlación entre la abundancia del filo Bacillota y el exceso de peso, distinguiendo a los individuos según el tipo de cirugía (SG:verde; RYGB:rojo) y el sexo. **(Izquierda):** Estado basal. **(Derecha):** Diferencia entre 3 meses después de la cirugía y estado basal.

3. Caracterización del metaboloma intestinal

3.1. Ácidos grasos de cadena corta

Las abundancias relativas y las concentraciones absolutas de los AGCC se muestran en la Tabla 7 y en la Figura 21, separadas por tipo de cirugía a lo largo de los cuatro puntos de muestreo. A tiempo basal, la abundancia relativa de los principales AGCC fue equiparables en ambos grupos, como acetato (>50%), propionato (~20%) y butirato (15-20%), aunque en general se encontraron mayores concentraciones absolutas en las heces de los pacientes del grupo SG, alcanzando significación estadística para el ácido valérico ($p=0,04$). Por otro lado, no se encontraron diferencias en su abundancia por sexo, edad o exceso de peso en el momento basal.

Al comparar la evolución de la abundancia relativa de AGCC entre ambos grupos, se detectó un impacto diferencial de la dieta pre-quirúrgica. Así, en el grupo SG la dieta promovió un aumento significativo del ácido acético y de los ácidos grasos ramificados (ácidos isobutírico e isovalérico) respecto al estado basal, con una reducción significativa del ácido butírico, mientras que en los pacientes del grupo RYBG no se observaron cambios estadísticamente significativos.

Respecto al estudio de los niveles absolutos de AGCC, ambos grupos mostraron tendencias similares a lo largo de los cuatro puntos de muestreo para los ácidos acético e isobutírico. En concreto, se observó un descenso significativo en la concentración fecal de ácido acético 3 meses después de la cirugía respecto a las etapas pre-quirúrgicas, mientras que los niveles de ácido isobutírico aumentaron significativamente tras la dieta pre-quirúrgica en ambos grupos, y también tras la cirugía (solo en RYGB). Por el contrario, solo en el grupo SG se produjo un descenso significativo de ácido propiónico tras la dieta pre-quirúrgica, mientras que solamente en el grupo RYGB se observó un aumento sostenido del ácido isovalérico desde el momento basal hasta los 3 meses después de la cirugía.

Tabla 7. Mediana, desviación estándar y rango de los valores de AGCC (mM) medidos en los 4 tiempos para ambos grupos de pacientes. Análisis estadístico mediante la prueba de Wilcoxon. *a: diferencia estadísticamente significativa entre basal y dieta; b: basal y 1 mes; c: basal y 3 meses; d: dieta y 1 mes; e: dieta y 3 meses; y f: 1 mes y 3 meses. Sólo se consideraron los valores de $p \leq 0,05$.

SG	Basal	Dieta	1 mes	3 meses	Dif.*
Acetato	83,1±28,8. 43,6-132,4	92,1±37,8. 37,9-178,6	61,8±42,2. 10,4-168,5	62,6±24,9. 19,8-123,9	e
Propionato	29,9±10,5. 6,9-44,2	31,6±17,9. 8,3-82,8	25±30,1. 2,6-111,9	25,3±9,6. 3,9-40,7	e
Butirato	26,7±18,5. 7,0-65,1	24,9±16,0. 5,1-70,5	12±15,6. 1,5-50,8	17,8±8,5. 2,3-36,8	
Isobutirato	2,3±1,1. 0,5-4,7	3,1±1,0. 0,7-4,5	2,5±1,6. 0,4-6,5	2,9±1,3. 1,0-5,7	a
Valérico	3,8±2,3. 0,7-10,3	4,0±2,2. 0,8-8,6	3±2,6. 0,4-10,4	3,6±1,4. 0,8-5,6	
Isovalérico	2,8±2,1. 0,7-8,3	4,3±1,5. 1,4-6,2	3,9±2,5. 0,6-9,2	3,9±2,3. 1,5-8,6	
Caproico	0,5±0,9. 0,08-3,4	0,5±0,4. 0,04-1,5	0,1±0,3. 0,0-0,8	0,3±0,5. 0,06-1,7	b
RYGB	Basal	Dieta	1 mes	3 meses	Dif.*
Acetato	69,1±31,7. 19,7-126,1	69,9±33,0. 22,8-158,2	53,6±25,1. 14,2-114,9	52,9±22,9. 16,0-91,1	b,c,e
Propionato	24,8±12,3. 9,7-52,3	23,5±17,2. 3,8-73,4	21,7±13,1. 3,1-51,2	26,5±15,8. 3,6-55,7	
Butirato	17,2±15,5. 0,6-58,3	18,3±14,8. 0,0-66,7	10,5±10,2. 0,0-35,2	16,1±14,9. 0,9-56,4	
Isobutirato	2,1±1,0. 0,2-4,3	2,1±1,5. 0,9-6,7	2,4±1,1. 0,5-5,7	3±1,5. 0,9-8,7	c
Valérico	3,2±2,0. 0,0-9,3	3,4±2,8. 0,4-14,2	3,3±2,4. 0,0-11,7	2,9±2,1. 0,6-7,8	
Isovalérico	2,9±1,5. 0,9-6,8	2,8±2,3. 1,0-10,6	3,6±1,7. 1,6-9,0	4,7±2,8. 1,4-15,7	c,e
Caproico	0,7±0,7. 0,0-3,3	0,7±0,6. 0,0-2,4	0,5±0,4. 0,0-1,6	0,4±0,6. 0,0-3,1	

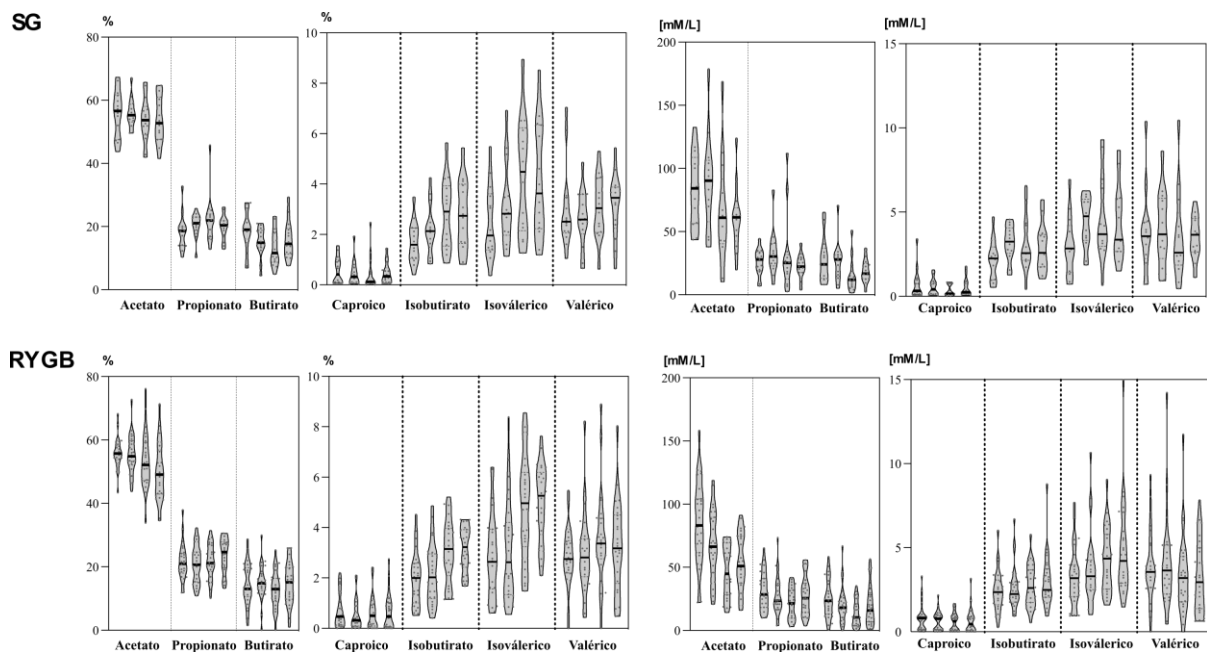


Figura 21. Evolución de la proporción (**Izquierda**) y concentración absoluta (**Derecha**, expresada en mM) de los AGCC mayoritarios (acetato, propionato y butirato) y minoritarios (caproico, isobutirato, isovalérico y valérico) medidos en los 4 tiempos (de izquierda a derecha: basal, dieta, 1 mes tras cirugía, 3 meses tras cirugía) para ambos grupos. La línea horizontal representa la media de cada distribución.

3.2. Aminoácidos, aminas biógenas y GABA

Los datos de concentración en heces de aminoácidos y aminas biógenas se detallan en las Tablas 8 y 9, respectivamente. Se observaron diferencias significativas tanto al comparar entre los grupos a mismos tiempos, como tendencias diferentes a lo largo del periodo de estudio.

Al comparar SG y RYGB, se observaron en líneas generales mayores concentraciones de aminoácidos en el grupo SG, mientras que las aminas biógenas cadaverina, histamina y tiramina presentaron concentraciones significativamente mayores en las muestras de los pacientes RYGB.

En cuanto a la evolución a lo largo del periodo de estudio, en los pacientes SG se produjo un aumento significativo para los aminoácidos alanina, glutamina, glutámico y fenilalanina después de la dieta pre-quirúrgica, así como de la amina biógena triptamina y el neurotransmisor GABA. En cuanto al impacto del proceso quirúrgico, se objetivó un aumento significativo de alanina y de aminoácidos ramificados y una disminución de fenilalanina, prolina y glutamina entre la muestra basal y 3 meses después de la cirugía.

Por el contrario, en los pacientes del grupo RYGB la dieta pre-quirúrgica provocó un aumento de la concentración de los aminoácidos tirosina y serina y una disminución de la arginina, la glutamina y el glutámico. Además, la cirugía se asoció a una disminución significativa para el glutámico pero un aumento significativo para la amina biógena tiramina y el GABA.

Tabla 8. Mediana, desviación estándar y rango de los valores de aminoácidos (mM). Análisis estadístico mediante la prueba de Wilcoxon. ***a:** diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0,05$) entre basal y dieta; **b:** basal y 1 mes; **c:** basal y 3 meses; **d:** dieta y 1 mes; **e:** dieta y 3 meses; y **f:** 1 mes y 3 meses.

SG	Basal	Dieta	1 mes	3 meses	Dif.*
Glicina	1,2±1,5. 0,2-6,5	1,8±1,9. 0,4-7,1	1,9±2,3. 0,4-10,5	2,4±1,9. 0,6-6,8	
Alanina	4,2±3,8. 0,8-15,5	8,2±5,2. 1,6-20,5	6,5±5,2. 1,6-24,4	8,3±5,3. 2,7-19,8	a,c
Metionina	0,2±0,3. 0,02-1,0	0,6±0,4. 0,01-1,5	0,3±0,4. 0,03-1,8	0,4±0,3. 0,02-1,3	
Leucina	1,5±1,5. 0,05-5,3	3,2±1,7. 0,5-6,7	3,2±1,9. 0,4-8,8	3,1±1,8. 1,1-7,3	c
Isoleucina	0,9±1,0. 0,05-3,6	1,4±1,3. 0,2-5,1	1,8±1,1. 0,3-4,6	2,2±1,2. 0,5-4,6	c
Valina	1,2±1,0. 0,1-4,0	1,9±1,2. 0,3-4,8	2±1,4. 0,3-6,3	2,2±1,3. 0,6-4,7	c
Ramificados	3,5±3,4. 0,4-13,1	6,5±4,3. 1,2-16,7	6,7±4,5. 1,1-19,7	7,7±4,3. 2,5-15,9	c
Fenilalanina	0,7±0,5. 0,05-2,0	1,4±0,6. 0,3-2,4	1,1±0,6. 0,1-2,9	1,3±0,5. 0,5-2,6	c
Tirosina	0,9±0,7. 0,1-2,7	1,8±0,8. 0,4-3,5	1,4±0,8. 0,2-3,6	1,2±0,6. 0,6-3,0	
Triptófano	0,1±0,1. 0,05-0,6	0,1±0,1. 0,05-0,4	0,2±0,1. 0,03-0,7	0,2±0,08. 0,08-0,4	
Serina	1±1,0. 0-3,7	1,5±1,1. 0-3,9	1,8±0,8. 0,3-3,5	1,6±0,8. 0,7-3,5	
Treonina	1,4±1,9. 0,1-8,5	1,6±2,8. 0,3-11,4	1,5±3,0. 0,3-10,5	1,7±0,9. 0,5-3,7	
Prolina	0,09±0,5. 0-1,9	0,1±0,2. 0-0,6	0,03±0,2. 0,002-0,9	0,04±0,1. 0-0,5	c,e
Asparragina	0,03±0,2. 0-1,1	0,02±0,1. 0-0,7	0,02±0,04. 0-0,1	0,03±0,04. 0-0,1	
Glutamina	0,1±0,2. 0-0,9	0,2±0,1. 0,01-0,4	0,1±0,2. 0,08-1,1	0,1±0,1. 0-0,5	a,c
Lisina	2±1,3. 0,05-5,0	2,6±1,5. 0,8-5,8	2,2±1,3. 0,1-5,5	2,6±1,2. 0,7-4,7	
Arginina	0,3±0,3. 0,06-1,3	0,4±0,3. 0,08-1,2	0,2±0,2. 0,02-0,7	0,2±0,2. 0,03-0,8	a
Histidina	0,1±0,1. 0,04-0,5	0,2±0,2. 0,03-0,8	0,1±0,1. 0,03-0,6	0,2±0,1. 0,01-0,6	
Aspártico	1,3±0,9. 0,4-3,7	1,0±0,6. 0,6-2,9	1,1±1,0. 0,2-3,8	1,1±0,6. 0,4-3,1	
Glutámico	3,5±3,6. 1,0-14,9	7,3±3,0. 0,2-12,1	4,9±3,6. 1,3-16,7	4,7±2,4. 2,2-10,2	a
Ornitina	0,2±0,3. 0,05-1,5	0,3±0,3. 0,1-1,2	0,3±0,2. 0,08-0,9	0,4±0,2. 0,2-1,0	
RYGB	Basal	Dieta	1 mes	3 meses	Dif.*
Glicina	1,2±2,3. 0,2-10,9	1,7±1,3. 0,1-5,7	1,2±0,9. 0,2-3,2	0,7±1,1. 0,2-5,5	
Alanina	4,3±2,9. 1,5-14,0	5,2±4,1. 0,8-17,9	4,1±3,8. 0,9-15,6	3±4,1. 1,0-18,6	
Metionina	0,2±0,2. 0-1,2	0,3±0,2. 0,03-1,0	0,2±0,7. 0,02-3,7	0,2±0,3. 1,0-18,6	
Leucina	1,5±1,2. 0,8-6,7	2,3±1,4. 0,2-6,1	1,8±2,3. 0,3-12,2	1,3±1,7. 0,4-7,3	
Isoleucina	0,9±0,7. 0,3-3,5	1,3±0,9. 0,1-4,0	0,9±1,4. 0,1-7,4	0,6±1,0. 0,1-3,9	
Valina	0,9±0,9. 0,4-4,5	1,5±1,3. 0,1-6,0	1±2,1. 0,2-10,8	0,7±1,3. 0,2-5,5	
Ramificados	3,5±2,9. 1,6-14,7	5,5±3,8. 0,4-14,7	3,8±5,9. 0,7-30,5	2,6±4,0. 0,8-16,5	
Fenilalanina	0,6±0,5. 0,3-3,1	0,9±0,4. 0,1-1,9	0,6±0,8. 0,1-4,3	0,7±1,4. 0,2-6,0	
Tirosina	0,7±0,2. 0,4-1,7	0,8±0,5. 0,1-1,9	0,6±0,4. 0,2-2,0	0,6±0,5. 0,2-2,5	a
Triptófano	0,1±0,2. 0,05-1,0	0,1±0,1. 0,01-0,5	0,1±0,3. 0,02-1,5	0,1±0,1. 0,02-0,5	
Serina	0,9±0,4. 0,3-2,6	1,3±0,9. 0,1-3,1	1±0,7. 0-3,0	0,8±0,7. 0,2-3,0	a
Treonina	1,1±0,6. 0,4-3,0	1,2±0,8. 0,1-2,6	0,8±2,0. 0,2-10,5	0,7±0,7. 0,2-2,9	
Prolina	0,05±0,1. 0-0,8	0,04±0,1. 0-0,6	0,1±0,3. 0-1,1	0,07±0,4. 0-1,8	
Asparragina	0,02±0,04. 0-0,1	0±0,03. 0-0,1	0,01±0,2. 0-1,2	0±0,02. 0-0,07	
Glutamina	0,1±0,1. 0,03-0,5	0,1±0,1. 0-0,7	0,1±0,2. 0,01-1,1	0,1±0,08. 0,01-0,2	a,f
Lisina	1,8±0,7. 0,4-3,6	1,8±1,0. 0,4-4,8	1,4±1,0. 0,5-4,1	1,2±1,0. 0,5-4,6	
Arginina	0,5±0,2. 0,09-0,9	0,3±0,2. 0,02-0,9	0,2±0,1. 0,02-0,6	0,5±0,4. 0,04-2,1	a,f
Histidina	0,1±0,4. 0,03-1,9	0,1±0,1. 0,03-0,4	0,1±0,1. 0,03-0,8	0,1±0,09. 0,01-0,4	
Aspártico	1,1±0,6. 0,3-2,6	1,3±0,7. 0,2-2,9	0,8±0,6. 0,2-3,1	0,9±0,7. 0,1-3,5	
Glutámico	5,2±2,5. 1,3-11,9	4,8±3,0. 0,6-12,2	3,7±2,5. 0-9,2	2,2±2,1. 0,5-8,6	a,e,f
Ornitina	0,2±0,6. 0,08-3,3	0,2±0,2. 0,04-0,7	0,3±1,5. 0,09-7,6	0,2±0,3. 0,08-1,3	

Tabla 9. Mediana, desviación estándar y rango de los valores de aminas biógenas, feniletilamina (B-FEA) y Ácido γ -aminobutírico (GABA) (mM). Análisis estadístico mediante la prueba de Wilcoxon. *a: diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0,05$) entre basal y dieta; b: basal y 1 mes; c: basal y 3 meses; d: dieta y 1 mes; e: dieta y 3 meses; y f: 1 mes y 3 meses.

SG	Basal	Dieta	1 mes	3 meses	Dif.*
Agmatina	0,03±0,09. 0-0,4	0,02±0,1. 0-0,6	0,01±0,03. 0-0,1	0,02±0,04. 0-0,1	
Histamina	0,07±0,09. 0-0,3	0,05±0,1. 0-0,5	0,02±0,3. 0-1,3	0,02±0,1. 0-0,5	
Tiramina	0,01±0,02. 0-0,1	0,01±0,04. 0-0,1	0±0,1. 0-0,5	0,01±0,02. 0-0,1	
Putrescina	0,3±0,5. 0,03-1,7	0,1±0,3. 0,02-1,3	0,06±0,9. 0-3,9	0,01±0,4. 0,01-1,6	
Triptamina	0±0,03. 0-0,1	0±0,01. 0-0,04	0±0. 0-0,03	0±0,02. 0-0,1	a
Cadaverina	0,5±1,6. 0,01-6,2	0,6±1,4. 0-4,0	0,5±2,0. 0-7,1	0,4±1,8. 0-6,3	
B-FEA	0±0,01. 0-0,05	0±0. 0-0,002	0±0. 0-0,004	0±0. 0-0,01	
GABA	0,2±1,9. 0,02-6,6	0,3±1,2. 0,03-3,5	0,5±0,7. 0,03-2,3	0,4±1,4. 0,04-5,0	a
RYGB	Basal	Dieta	1 mes	3 meses	Dif.*
Agmatina	0,02±0,07. 0-0,3	0,02±0,02. 0-0,07	0,02±0,04. 0-0,1	0,01±0,05. 0-0,2	
Histamina	0,07±0,2. 0-1,1	0,08±0,1. 0-0,5	0,04±0,1. 0-0,5	0,1±0,1. 0-0,8	
Tiramina	0,03±0,3. 0-1,5	0,02±0,1. 0-0,5	0,05±0,4. 0-2,1	0,1±0,5. 0-0,2	e
Putrescina	0,2±0,7. 0,02-2,0	0,1±0,9. 0-4,7	0,4±0,8. 0-3,1	0,6±0,7. 0-2,3	
Triptamina	0±0. 0-0,004	0±0. 0-0,01	0±0. 0-0,03	0±0. 0-0,01	f
Cadaverina	3±2,3. 0-7,7	1,4±2,0. 0,1-6,7	2,9±3,7. 0,01-12,8	3,1±3,0. 0-11,4	
B-FEA	0±0. 0-0,02	0±0. 0-0,01	0±0,04. 0-0,2	0±0. 0-0,02	
GABA	0,2±1,5. 0,02-7,2	0,1±1,7. 0-6,8	0,2±0,2. 0,03-0,7	0,7±1,8. 0,0-8,0	e,f

3.3. Amonio

La SG y la RGYB ejercieron un impacto opuesto en la concentración de amonio fecal, con una disminución significativa de este compuesto en las muestras fecales a lo largo de los cuatro tiempos para los pacientes intervenidos mediante SG, y un aumento significativo para los pacientes sometidos a RYGB (Figura 22A). Como el rango normal de concentración de amonio fecal todavía no se ha definido, se establecieron tres categorías basadas en la distribución global de los terciles: baja (0-19 mM), media (20-39 mM) y alta concentración (>40 mM) (Figura 22B). Mientras que el 50% de las muestras de los individuos sometidos a SG estaban en el tercil bajo tres meses después de la cirugía, sólo el 15,4% estaban en este tercil entre los individuos sometidos a RYGB. Se realizó un análisis de la abundancia diferencial bacteriana a tiempo basal según el perfil de amonio fecal, demostrando el predominio de *Paraprevotella* en detrimento de los miembros del orden Bacteroidales (*Parabacteroides*, *Barnesiella* y *Odoribacter*) y *Lentisphaerae* en aquellos pacientes con niveles de amonio más altos.

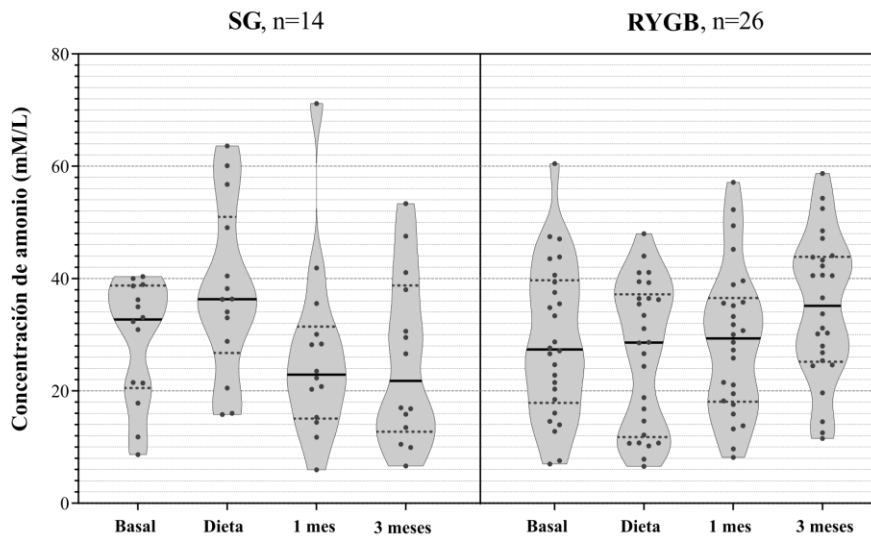
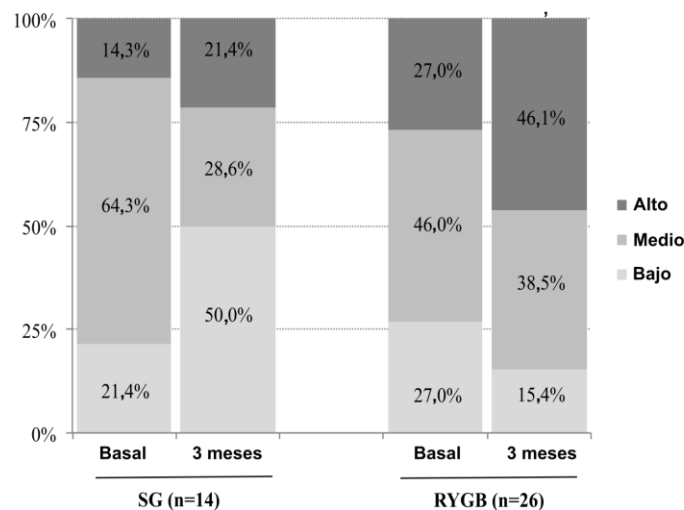
A**B**

Figura 22. Resultados de las mediciones de amonio fecal. (A): concentración de amonio (mM) en los 4 tiempos de estudio, para cada grupo de pacientes. (B): Distribución porcentual de los individuos según sus niveles de amonio fecal al principio (basal) y al final (3 meses) del seguimiento, para cada tipo de cirugía.

4. Resolución de la diabetes

En el momento de reclutamiento, 12 individuos (7 varones; 10 sometidos a RYGB) estaban diagnosticados de DMT2 insulín dependiente. Después de la cirugía, se certificó la remisión clínica completa sin tratamiento farmacológico en el 75% de ellos (9 pacientes; 8

de ellos sometidos a RYGB), mientras que otros dos pacientes continuaron con metformina oral, y el paciente restante mantuvo el estado de diabetes controlado con insulina.

Se realizó un análisis de la abundancia diferencial bacteriana en los ocho pacientes RYGB con resolución completa de la diabetes, mostrando que los filos Verrucomicrobiota (*Akkermansia*) y Fusobacteriota (*Fusobacterium*) aumentaron significativamente después de la cirugía, mientras que la abundancia relativa de los filos Bacillota (*Faecalibacterium*, *Erysipelotrichia*, *Gemmiger* y *Lactobacillus*) y Actinomycetota (*Bifidobacterium*) disminuyó. Al comparar a tiempo basal estos 8 pacientes con los 18 pacientes RGYB restantes, se evidenció una abundancia claramente inferior de la clase Clostridia asociada a la DMT2, aunque para ambos grupos de individuos la cirugía promovió una clara disminución de este taxón.

5. Modelo predictivo Lasso

Los análisis con el modelo Lasso no identificaron ningún metabolito predictor de pérdida de peso tras 100 repeticiones, pero sí 8 géneros bacterianos cuya abundancia en la muestra basal se asoció en mayor o menor medida con la pérdida de peso tres meses después de la cirugía (Tabla 10). Los valores del error cuadrático medio fueron siempre bajos (aproximadamente 0,05). El modelo señaló a *Anaerofustis* y *Acetanaerobacterium* como los géneros más significativos, sin diferencias según el tipo de cirugía.

Tabla 10. Valores medianos de los 100 valores de regresión Lasso obtenidos para los géneros bacterianos significativos, y su abundancia a tiempo basal en cada grupo de pacientes.

Género	REGRESIÓN LASSO	% ABUNDANCIA (BASAL)	
		SG	RYGB
<i>Anaerofustis</i>	4,910	0,001	0,001
<i>Acetanaerobacterium</i>	3,234	0,002	0,01
<i>Coproacter</i>	0,182	0,02	0,03
<i>Anaerofilum</i>	0,088	0,002	0,002
<i>Slackia</i>	0,024	0,07	0,05
<i>Gemmiger</i>	0,003	1,7	2,5
<i>Romboutsia</i>	0,002	0,3	0,1
<i>Bifidobacterium</i>	0,001	3,3	2,4

V. DISCUSIÓN

La obesidad es una enfermedad compleja y multifactorial que probablemente requiere de un estudio individual de cada sujeto, sobre todo en la obesidad mórbida, donde el IMC puede oscilar entre 35 y más de 60. Cada vez es más evidente la contribución de la microbiota intestinal en la obesidad, a pesar de la ausencia de criterios de normalidad tanto para su composición como para su funcionalidad. La mayoría de los estudios publicados han sido diseñados para identificar diferencias significativas en la microbiota intestinal bacteriana entre obesos e individuos sanos, o para evaluar el impacto en la composición bacteriana de la cirugía bariátrica, empleando una amplia gama de metodologías y estrategias analíticas. En el presente capítulo nos propusimos monitorizar las fluctuaciones de la microbiota de obesos mórbidos durante el proceso bariátrico, tanto a nivel de composición como metabólico, incluyendo un robusto análisis estadístico con estrategias predictivas basadas en aprendizaje automático. Las principales aportaciones de este trabajo incluyen la caracterización fecal de AGCC, aminoácidos, aminas biógenas y amonio, destacando los altos niveles de este último compuesto detectados tras la cirugía RYGB, así como el estudio metataxonómico, que reveló la existencia de una relación directa entre la abundancia del filo Bacillota y el índice de masa corporal. Además, demostramos que ambos tipos de cirugía producen una disminución de peso similar pero un efecto opuesto en la composición de la microbiota, con cambios más profundos en cirugía RYGB, y un impacto muy poco significativo de la dieta a nivel composicional y funcional.

Hallazgos previos en obesidad mórbida han enfatizado una baja riqueza genética microbiana a nivel intestinal, con valores disminuidos de diversidad alfa y mayor abundancia de Bacillota [277,280,281]. La utilidad de la ratio Bacillota/Bacteroidota es contradictoria y ha sido refutada en varias ocasiones, en especial debido al problema de “composicionalidad” de los estudios basados en secuenciación del ADN_r 16S en los que se apoya esta observación [282,283]. La característica más relevante a nivel composicional de nuestras muestras fue precisamente la dominancia de Bacillota a nivel intestinal, en correlación directa con el IMC basal en el grupo SG y en relación inversa al porcentaje de pérdida de peso tras la cirugía en RYGB. Sorprendentemente, sin embargo, en el grupo SG la abundancia de este filo aumentó ligeramente tras la cirugía, sin correlación con la pérdida de peso. Este fenómeno nos sugiere que el grado de obesidad que expresa cada individuo podría estar relacionado con su huella bacteriana intestinal, como se ha sugerido previamente [284].

El impacto diferencial de las distintas modalidades de cirugía bariátrica en la microbiota intestinal ha sido revisado exhaustivamente, con resultados consistentes [285–287] y acordes a nuestros hallazgos. La dinámica de la diversidad alfa parece no ser universal, pero sí los cambios en diversidad beta. Estos son más patentes para RYGB, destacando la expansión de *Pseudomonadota* [288–291]. La causa más probable de este fenómeno recae en la redistribución del circuito de ácidos biliares, cuya actividad antibacteriana limita la expansión de las gamma-*Pseudomonadota* en el intestino delgado. Un hallazgo relevante en nuestro estudio fue que el porcentaje de pérdida de peso fue uniforme en ambos grupos, desligado de la evolución composicional bacteriana. Esto sugiere un mayor peso del proceso quirúrgico que de los procesos fisiológicos derivados de la pérdida de peso, algo que se ve apoyado por los escasos cambios metabólicos observados a lo largo del periodo de seguimiento, como se comenta seguidamente.

El acetato, el propionato y el butirato, en proporción 60:20:20, son los AGCC más abundantes a nivel intestinal. Los AGCC son esencialmente metabolitos bacterianos procedentes de la fermentación de los carbohidratos, aunque también pueden derivarse directamente de los aminoácidos (la valina, la leucina y la isoleucina pueden metabolizarse en isobutirato, isovalérico y 2-metilbutirato, respectivamente) [287]. En concreto, el isobutirato y el ácido valérico se conocen como ácidos grasos de cadena ramificada, al derivar de aminoácidos de cadena ramificada. Los AGCC representan hasta el 10% de la ingesta total de energía humana y se ha postulado una sobreproducción significativa en la obesidad [280], particularmente para el propionato [292]. En nuestra serie observamos variaciones modestas en la concentración de AGCC, destacando la disminución de acetato en ambos grupos, así como el aumento de AGCC ramificados en el grupo RYGB, de forma similar a lo observado en estudios previos [293]. De forma acorde, los aminoácidos ramificados precursores experimentaron una disminución en dicho grupo.

Por otro lado, existen muy pocos trabajos que hayan estudiado la correspondencia particular entre los microorganismos y la producción de AGCC [294]. En nuestro trabajo, incluimos un análisis exhaustivo para relacionar todos los niveles taxonómicos bacterianos con las diferentes concentraciones de AGCC, sin obtener resultados relevantes. En este sentido, no se debe descartar el posible intercambio de rutas metabólicas para la síntesis de AGCC entre especies bacterianas no relacionadas. Muchos autores han intentado inferir la producción de AGCC a través de la caracterización de las rutas metabólicas mediante metagenómica *Shotgun*. Es importante tener en cuenta que la presencia de genes necesarios

para las rutas metabólicas no siempre conduce a su expresión, y que el control final de encendido/apagado se modula en buena parte según las densidades de las poblaciones bacterianas. Esto añade valor a estudios como el nuestro, capaces de monitorizar directamente la concentración de los metabolitos. Nuestra limitación más importante en relación al estudio de AGCC es la falta de puntos de corte de normalidad, tanto en las heces como en el suero, así como la estandarización del momento de medición, en particular relacionada con la ingesta de alimentos.

Las proteínas son una importante fuente de carbono y energía que generalmente se absorben por completo en el intestino delgado, llegando al colon sólo los restos de las células apoptóticas lumbales o de los microorganismos. De forma análoga a los AGCC, no existe un acuerdo en relación a las concentraciones normales de aminoácidos a nivel fecal, más aún en el contexto de la cirugía bariátrica. Se han reportado aumentos significativos del glutamato [295], pero en nuestra experiencia las variaciones fueron discretas. Después de la cirugía bariátrica, particularmente en la estrategia RYGB (que conlleva malabsorción), pueden acumularse gran cantidad de proteínas en el lumen colónico, con probable producción de metabolitos potencialmente tóxicos tras su procesamiento por bacterias anaerobias. En ese sentido, exploramos la producción de aminas biógenas y, aunque las bajas concentraciones detectadas impiden hipotetizar un proceso de intoxicación endógena, no podemos descartar una absorción previa que arrojaría mayores niveles séricos de estos compuestos. Esta posibilidad debería considerarse no solo en estos individuos, sino en otras patologías que implican principalmente dismotilidad intestinal, donde las bacterias tienen tiempo suficiente para convertir las proteínas en aminas biógenas [296].

Uno de los resultados más llamativos de este estudio fue la dinámica en la concentración de amonio fecal, opuesta en ambas cirugías. Así, mientras que la RYGB provocó un aumento significativo de este compuesto (casi duplicando los valores basales), la SG se tradujo en un descenso notable. En un trabajo anterior, la concentración de amonio fecal mostró una alta variabilidad en voluntarios sanos [297] y un aumento significativo en obesidad severa [280]. De nuevo, faltan puntos de corte que definan normalidad y metodologías que correlacionen las concentraciones séricas y fecales y su producción temporal tras la ingesta de alimentos, lo que dificulta la interpretación de estos resultados. El amonio es un metabolito normal de la digestión de los aminoácidos, pero también uno de los tóxicos más importantes para las células humanas. La hiperamonemia por una

deficiente desintoxicación del amonio en urea se produce típicamente en la encefalopatía hepática [298], que habitualmente se maneja con antibióticos para reducir la carga bacteriana en el intestino delgado. La contribución de la microbiota intestinal a la producción de amonio está probablemente infravalorada, y en la mayoría de los casos el hígado neutraliza el desajuste inmediatamente, pero la capacidad de las bacterias para producir amonio en exceso debería considerarse en futuros estudios. En nuestro trabajo, los individuos con mayores concentraciones de amonio presentaron una densidad de *Paraprevotella* significativamente mayor en sus heces, sin que se haya podido encontrar una explicación para esta relación. Además, los niveles de amonio se relacionaron inversamente con los de aminoácidos de cadena ramificada (leucina, isoleucina y valina). De nuevo, esto solo se observó en los individuos RYGB, que también tenían las concentraciones de amonio más altas.

Otro de nuestros objetivos fue dimensionar el impacto de la dieta de choque preoperatoria a nivel composicional y funcional, ya que los cambios dietéticos después de la cirugía no pueden evaluarse adecuadamente sin el efecto intrínseco de la misma. Los obesos mórbidos suelen estar desnutridos, especialmente en lo que respecta a los micronutrientes esenciales, y la sospecha de que la microbiota intestinal puede contribuir a ello ha ido aumentando progresivamente [299]. En Al Assal *et al.* [300] se informó durante este cambio dietético de una disminución significativa de la familia *Ruminococcaceae*, a la que pertenece *F. prausnitzii*. En nuestro caso, *F. prausnitzii* disminuyó sólo en el grupo SG. A nivel global, la dieta produjo pocos cambios significativos tanto a nivel composicional como en las variables funcionales, y solo una pérdida de peso inmediata en los sujetos RYGB, sugiriendo la alta resiliencia de la microbiota de estos individuos frente a cambios dietéticos.

La resolución inmediata de la DMT2 tras la cirugía bariátrica es uno de los principales objetivos del procedimiento, independientemente de la pérdida de peso [301]. Informes previos la relacionan con perfiles de microbiota particulares [300,302], aunque su contribución directa es controvertida y se da más peso al papel de las sales biliares [291]. En nuestro trabajo, el 75% de los pacientes (9/12) resolvieron su DMT2 tras la cirugía. No se identificaron correlaciones significativas entre la resolución y los diferentes géneros bacterianos y/o los metabolitos disponibles, en probable relación con la baja “n” de los grupos estudiados. Por otro lado, el status basal de diabetes se relacionó a una abundancia

claramente inferior de la clase Clostridia, aunque para ambos grupos de individuos la cirugía promovió una clara disminución de este taxón.

Uno de los puntos fuertes de este estudio fue la incorporación de un robusto análisis estadístico de integración de datos composicionales y funcionales, así como la construcción de un modelo de aprendizaje automático para predecir la pérdida de peso a tiempo basal. Sin embargo, los análisis de integración no ofrecieron ningún resultado significativo, mientras que el modelo predictivo identificó 8 géneros bacterianos cuya abundancia basal predecía la pérdida de peso, aunque su escasa contribución relativa al ecosistema dificulta su uso. Entre estos géneros, destaca el posicionamiento de *Bifidobacterium* como posible marcador para predecir la pérdida de peso, ya que este género disminuye en ambos grupos en relación directa con dicha pérdida. Además, se ha sugerido que la suplementación con *Bifidobacterium* podría atenuar los efectos nocivos de la obesidad y el síndrome metabólico [303].

Las principales limitaciones del trabajo expuesto en este capítulo fueron la falta de medición de otros metabolitos de interés, como el cresol, el indol, el óxido de trimetilamina (TMAO) o las sales biliares, y la ya mencionada ausencia de puntos de corte de normalidad que permitan establecer comparaciones robustas. Además, nuestro muestreo finalizó 3 meses después de la cirugía, por lo que no se pudieron determinar los efectos a largo plazo. Algunos autores realizaron un seguimiento de un año, aunque los cambios más drásticos en la microbiota intestinal parecen producirse durante los tres primeros meses [288].

En resumen, este trabajo evidencia que la cirugía bariátrica en obesidad mórbida produce cambios mayores que la dieta pre-quirúrgica, que afectan principalmente a la composición de la microbiota (de forma más marcada en RYGB) y que se traducen débilmente a nivel funcional, destacando concentraciones de amonio significativamente más altas tras la cirugía RYGB. Se necesitan determinaciones estandarizadas de los metabolitos de la microbiota en heces y suero, así como puntos de corte de normalidad, para comprender el verdadero potencial de este ecosistema y su papel en la obesidad.

CAPÍTULO IV

Optimización de la selección de donante para la transferencia de microbiota fecal en Colitis Ulcerosa mediante un test *in vitro* de respuesta inmunológica

I. ANTECEDENTES

La interacción entre la microbiota intestinal y el sistema inmunitario desempeña un papel relevante en la etiopatogenia de la enfermedad inflamatoria intestinal, como la Colitis Ulcerosa (CU) [304,305]. En esta enfermedad se produce una pérdida de tolerancia inmunitaria a los antígenos lumenales bacterianos, lo que desencadena una respuesta local (activación de las células dendríticas), que se extiende regionalmente y da lugar a una diferenciación de las células T hacia fenotipos T helper (TH)-1, TH-2, TH-17 o T reguladores (Treg), confluendo en una "tormenta" de citoquinas y quimiocinas proinflamatorias que genera y perpetúa el daño tisular [306]. De hecho, en la CU se han descrito diferencias relevantes en la composición de la microbiota entre la mucosa intestinal inflamada y la no inflamada, según el estado de actividad de la enfermedad [305,307]. La base genética de la CU no está completamente caracterizada, pero parece radicar en el papel protector de diversos polimorfismos humanos en el gen de la interleucina IL-27 [308], así como la participación predominante de una respuesta TH-17, en estrecha relación con la microbiota intestinal [309,310].

El enfoque terapéutico de la CU se basa actualmente en el manejo y control de la inflamación propia de la enfermedad. La transferencia de microbiota fecal (TMF) ha surgido como una opción terapéutica para la CU, con el objetivo de modular la composición de la microbiota intestinal y, por tanto, el estado inflamatorio crónico [311,312], aunque su eficacia clínica no se ha demostrado comparable a la alcanzada para la ICD [123,313]. En los últimos años se han realizado importantes esfuerzos para determinar las razones que subyacen a este rendimiento subóptimo de la TMF en CU, y varios autores han sugerido la importancia de la composición microbiana fecal del donante como factor determinante de su éxito en esta patología [115,142], especialmente en relación con la diversidad o riqueza del ecosistema [314] y el denominado fenómeno del "superdonante", esto es, aquel cuya microbiota particular garantiza una mejor implantación de la misma y un mayor éxito terapéutico en distintos pacientes [138]. En este sentido, un reciente ensayo controlado y aleatorizado logró identificar taxones bacterianos específicos de las heces asociados a una mayor tasa de respuesta clínica en pacientes con CU que se sometieron a TMF [315]. Además, se ha probado la mezcla de las heces de varios donantes con el fin de garantizar la administración de aquella microbiota que pueda ser más beneficiosa, con el fin de optimizar el éxito de la TMF [316–318]. Existen en la actualidad ensayos en proceso para validar este aspecto (clinicaltrials.gov, NCT03843385).

A pesar de todo lo expuesto, la selección de donante para la TMF en CU no es específica, lo que da lugar al emparejamiento aleatorio de donante y receptor, sin que se controlen aspectos de compatibilidad entre la microbiota donada y la receptora, o la respuesta inmunitaria intestinal del receptor frente a dicha microbiota. Esto último es especialmente relevante, dada la doble función del sistema inmunitario de la mucosa intestinal, que protege contra la entrada de posibles patógenos y, al mismo tiempo, presenta tolerancia hacia la propia microbiota [319]. Los mecanismos que subyacen a este papel dual no son bien conocidos, y la distinción entre bacterias comensales y patógenas suele ser difícil de establecer, pues a menudo depende de factores de virulencia concretos, específicos de cada cepa, y por tanto independientes de la especie.

El principal objetivo de la TMF en la CU es modular el diálogo entre la microbiota intestinal y el sistema inmunitario de la mucosa del paciente con el fin de atenuar el ciclo indefinido de inflamación. El estudio de dicha interacción, y el impacto que esta pueda tener en el éxito terapéutico de la TMF suponen, por tanto, un punto de partida para tratar de optimizar este procedimiento en patologías inmunomediadas como la CU.

II. JUSTIFICACION Y OBJETIVOS

A pesar del interés en incorporar la TMF al arsenal terapéutico en enfermedades como la CU, los resultados obtenidos hasta ahora no han logrado reproducir el éxito obtenido en el tratamiento de la ICD, y por tanto su uso en esta patología no está justificado. Una de las aproximaciones para aumentar la efectividad de la TMF en CU pasa por optimizar la selección del donante de microbiota. En este capítulo se expone el diseño y puesta a punto de una prueba de compatibilidad *in vitro* basada en la respuesta inmunitaria de la mucosa del receptor frente a la microbiota fecal de distintos posibles donantes, con el fin de escoger la que genere una mayor tolerancia inmunológica.

Los **OBJETIVOS** que se plantearon en este capítulo fueron los siguientes:

1. Evaluar y optimizar el rendimiento del test de compatibilidad enfrentando células inmunocompetentes de cadáveres y extractos de microbiota de diferentes donantes.
 - 1.1. Ajustar distintos parámetros del test.
 - 1.2. Ensayar el test empleando células intestinales (yeyuno).
 - 1.3. Ensayar el test empleando células de sangre periférica.
 - 1.4. Evaluar la reproducibilidad entre ambas aproximaciones.
2. Validar la utilidad clínica de la técnica en pacientes con CU candidatos a TMF.
 - 2.1. Aplicar el test empleando células inmunocompetentes obtenidas de biopsias rectales.
 - 2.2. Realizar la TMF empleando los resultados del test para la selección de donantes.
 - 2.3. Evaluar el impacto microbiológico de la TMF.
 - 2.3.1. En relación a la composición microbiológica de las heces de los donantes.
 - 2.3.2. En relación a pacientes con ICD que fueron sometidos a TMF empleando los mismos donantes de heces.
 - 2.4. Evaluar el impacto clínico de la TMF.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

1. Fundamento del test

El test, resumido en la Figura 23, consiste en la exposición de células inmunocompetentes del receptor a extractos de microbiota de los diferentes posibles donantes, seguido de la determinación de la producción de citoquinas en dicho cocultivo, en base a la cual se realiza la selección del donante cuya microbiota haya generado la menor reacción proinflamatoria. El cocultivo se realiza en placas de cultivo celular de 24 pocillos (Thermo Fisher Scientific, EE.UU.), incubadas a 37°C en una atmósfera enriquecida con un 5% de dióxido de carbono. La respuesta inmunológica de las células del receptor se determina midiendo por citometría de flujo la concentración de una selección de interleucinas (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 e IL-12p70) y del factor de necrosis tumoral alfa (FNT α), mediante el kit *Human Inflammatory Cytokine Cytometric Bead Array* (Becton Dickinson, EE.UU.).

Quisiéramos aprovechar para agradecer a las Dras. Garbiñe Roy y Carlota García Hoz, del Servicio de Inmunología del Hospital Ramón y Cajal, su labor tanto en el diseño como en la ejecución de este procedimiento.

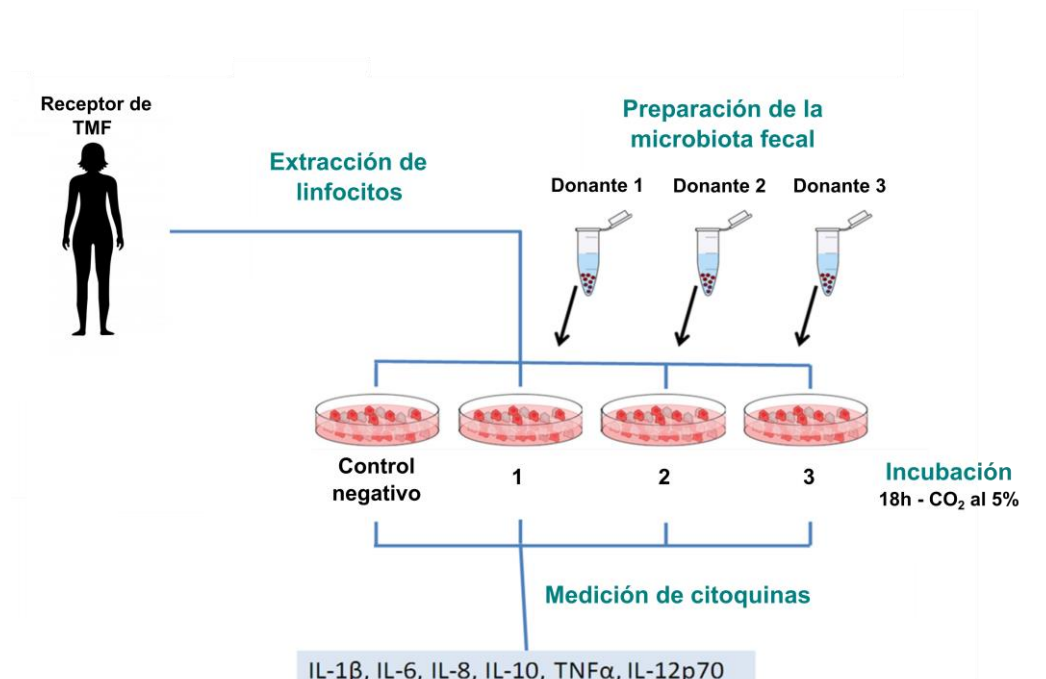


Figura 23. Infografía que resume el fundamento del test de compatibilidad receptor-donante para TMF.

2. Optimización del test

La optimización y evaluación de la reproducibilidad de la prueba se realizó empleando células inmunocompetentes recuperadas de segmentos yeyunales y células mononucleares de sangre periférica extraídas de 7 cadáveres de donantes de órganos. Los órganos se mantuvieron viables mediante perfusión hasta la obtención de las muestras. El Comité Ético del Hospital Universitario Ramón y Cajal de Madrid aprobó el uso de los cadáveres (Referencia 253/17), siendo los criterios de inclusión la aceptación de la familia del donante y la completa integridad del sistema digestivo del mismo, mientras que como criterio de exclusión se consideró la presencia de tumores intestinales o enfermedades infecciosas sistémicas en el momento del fallecimiento. Durante la cirugía, se recogió una alícuota de contenido de la luz intestinal como muestra representativa de la microbiota del cadáver, que también se incluyó en los análisis (como se explica más adelante). En este punto, quisiéramos agradecer al Servicio de Cirugía General y Digestivo del Hospital Ramón y Cajal su colaboración en la extracción de dichas muestras.

2.1. Extracción de células inmunocompetentes

Se recuperaron las células inmunocompetentes de la mucosa de un segmento yeyunal de 3 cm extirpado durante la cirugía de donación de órganos. Tras la resección, el segmento de yeyuno se sumergió en medio completo (MC) RPMI 1640 del Roswell Park Memorial Institute (Life Technologies/Gibco, 11875-085), complementado con suero bovino fetal al 10% (Life Technologies/Gibco 16140-063), imipenem, gentamicina, vancomicina y fluconazol, todos ellos a una concentración de 100 mg/l para inhibir el crecimiento de la microbiota autóctona. Se seleccionó manualmente la capa de mucosa, se fragmentó y se incubó en 50 ml de CM RPMI 1640 suplementado con 10% de suero bovino fetal (Life Technologies/Gibco 16140-063), 50 U/ml de colagenasa (Sigma-Aldrich GE17-1440-02) y 100 U/ml de DNAsa I recombinante de grado I (Sigma-Aldrich 0436282001) durante 120 min a 37°C, con agitación continua. La suspensión celular liberada (linfocitos intraepiteliales, leucocitos de la lámina propia y células epiteliales) se pasó por una aguja 18G y se filtró a través de un colador celular para eliminar restos de tejido. Las células se concentraron, se contaron y se suspendieron en MC RPMI ajustando a una concentración de 200.000 células/ml. Para ello, se marcaron 100 µl de la suspensión celular con anticuerpos monoclonales anti-CD45 (Becton Dickinson) y se introdujeron en citómetro de flujo (FACSCanto II, Becton Dickinson), haciendo recuento de las células que cumplieron los parámetros establecidos (*gated*).

Por otro lado, para obtener una muestra representativa de células inmunocompetentes periféricas se extrajeron 5 ml de sangre periférica antes de la muerte del donante, y se purificó la fracción de células mononucleares mediante gradiente de densidad de Ficoll (Sigma-Aldrich, GE17-14440-02).

2.2. Obtención de extractos de microbiota fecal

Se emplearon heces de 19 donantes sanos no relacionados provenientes de nuestro programa de TMF para el tratamiento de la ICD. Además, se recogió una alícuota fecal proveniente de la luz intestinal de cada uno de los cadáveres incluidos en el estudio. Las heces se mantuvieron a -80°C hasta su uso. Para obtener la fracción antigénica de las mismas, que contiene los patrones moleculares asociado a microorganismos (MAMPs, del inglés *microbe associated molecular patterns*), se solubilizaron completamente 0,5 g de heces en 5 ml de agua, se hirvió la mezcla durante 15 minutos y se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante obtenido constituyó el extracto de microbiota fecal utilizado en los ensayos del test.

2.3. Optimización de parámetros del test

Se ensayaron varias opciones de ajuste para la dilución de los extractos de microbiota (sin diluir, 1/100 y 1/1000) y el periodo de incubación del cocultivo (6, 18 y 24 h), con el fin de definir las condiciones óptimas para preservar la viabilidad celular durante el cultivo y asegurasen la máxima recuperación de la señal de citoquinas. Para ello, se emplearon células extraídas del segmento yeyunal del primer donante de órganos reclutado y su propio extracto de microbiota como estímulo antigénico. Además, se comprobó si el método de extracción celular preservaba la integridad de la capacidad de respuesta de las células inmunocompetentes yeyunales. Para esto último, se midió mediante marcaje específico y posterior citometría de flujo la producción intracelular de IFN γ y FNT α de las células intestinales inmunocompetentes CD45 $^{+}$ bajo un estímulo con PMA-ionomicina y 3 extractos de microbiota fecal diferentes.

2.4. Reproducibilidad en mucosa vs. sangre periférica

Tras establecer las condiciones óptimas del ensayo, examinamos si la respuesta inflamatoria de las células de la mucosa intestinal frente a los MAMPs fecales era comparable a la de las células periféricas, con el fin de validar la prueba de compatibilidad utilizando una muestra no invasiva (sangre periférica). Para ello, se extrajeron y cultivaron las células inmunocompetentes de yeyuno y sangre periférica recuperadas de los 7

cadáveres de donantes de órganos con extractos fecales de su propia microbiota intestinal y de muestras de heces de 19 donantes putativos cuya obtención se resume en el apartado 2.2 de este capítulo. En cada experimento se incluyó además un control negativo sin estímulo antigénico.

3. Validación del test en Colitis Ulcerosa

En este apartado se evaluó la utilidad clínica del test de compatibilidad en pacientes con CU, ajustando los parámetros del procedimiento en base a los resultados del apartado 2. La elección de cada donante de heces se realizó en función del resultado del test aplicado sobre las células inmunocompetentes de cada paciente. Se realizó una evaluación tanto clínica como microbiológica de los pacientes, monitorizando los cambios en la microbiota intestinal y la evolución de la enfermedad tras la TMF.

3.1. Pacientes

En la consulta monográfica de enfermedad inflamatoria intestinal del Dr. Antonio López-San Román (Hospital U. Ramón y Cajal), se reclutaron 4 pacientes con CU bajo los siguientes criterios de inclusión: CU extensa, moderada/grave y refractaria a la terapia farmacológica convencional. Además, se requirió el consentimiento firmado por los pacientes para ser incluidos en el estudio y para someterse a TMF.

3.2. Extracción de células inmunocompetentes

Se obtuvieron, mediante rectoscopia, biopsias rectales que incluyeran tejido linfoide asociado a la mucosa de los pacientes reclutados. Las células inmunocompetentes de la mucosa se liberaron por digestión enzimática tras introducir las biopsias en 5 ml de MC RPMI 1640 suplementado con collagenasa (50 U/ml) y ADN-asa (100 U/ml), incubado bajo agitación vigorosa durante al menos 2 horas a 37°C, con homogeneización ocasional por aspiración repetida con aguja. La mezcla se centrifugó a 1.800 rpm durante 7 minutos, y el pellet resultante (que contenía linfocitos intraepiteliales, leucocitos de la lámina propia y células epiteliales) se suspendió en 1 ml de MC fresco suplementado con imipenem, gentamicina, vancomicina y fluconazol (100 mg/l cada uno). Se estimó la concentración celular mediante el marcaje anti-CD45 y se ajustó a 200.000 leucocitos CD45+/ml de MC.

3.3. Aplicación del test y selección de donante

Se procesó la microbiota fecal de 3 donantes no emparentados, previamente reclutados para nuestro programa de TMF en ICD, obteniendo la fracción antigénica (MAMPs) propia de

cada muestra. Para cada paciente con CU, se realizaron cocultivos de dichos extractos de microbiota fecal (100 µl) con las células inmunocompetentes de la mucosa rectal del paciente (1 ml), como se ha descrito anteriormente, reservando un cultivo celular sin estímulo por MAMPs como control negativo para estimar la producción basal de citoquinas. Tras la incubación, todo el contenido de los pocillos se transfirió a tubos Eppendorf y se centrifugó a 14.000 rpm, recogiendo los sobrenadantes, que se almacenaron a -80°C hasta la determinación de citoquinas. Por último, la determinación de citoquinas se realizó en un citómetro de flujo, como se ha explicado anteriormente. Se seleccionó como donante fecal al candidato cuyos MAMPs fecales desencadenaron la respuesta menos proinflamatoria en cada paciente.

3.4. Transferencia de microbiota fecal

Se transfirió por colonoscopia la microbiota de cada donante seleccionado a cada paciente con CU, utilizando 100 g de heces frescas del donante (obtenidas menos de 6 horas antes y conservadas en anaerobiosis) previamente suspendidas en 500 ml de agua destilada y filtradas para eliminar la fibra y otros residuos sólidos. Adicionalmente, los pacientes fueron provistos de 4 jeringas individuales congeladas de 50 ml cada una con una solución fecal similar, que conservaron en su domicilio a -20°C hasta su autoadministración por enema (una por semana, en total 4 instilaciones post colonoscopia obtenidas de otros 100 g de heces).

3.5. Evaluación de la implantación de microbiota

Se evaluó la composición bacteriana de las heces de los pacientes antes de la colonoscopia, así como a las 2, 4 y 8 semanas posteriores a la misma. También se analizó la microbiota de los donantes seleccionados y la de 4 muestras fecales de 2 pacientes con ICD que se sometieron a TMF por colonoscopia y que compartían los mismos donantes que los seleccionados para los pacientes con CU. Esto permitió comparar el fenómeno de implantación microbiológica post-TMF en ambas patologías.

3.5.1. Procesamiento de muestras y secuenciación

Para determinar la composición de la microbiota fecal, se solubilizaron porciones de 0,5 mg de heces en 5 mL de agua estéril, empleando 0,5 mL de esta solución para obtener ADN total utilizando el kit QIAamp (Qiagen, Hilden, Alemania), determinando su concentración y calidad mediante un fluorímetro Qubit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.). A partir del ADN obtenido se realizó amplificación por PCR de la región V3-V4

del ADNr 16S, y posterior secuenciación masiva (2 x 300 pb) de las librerías obtenidas en una plataforma MiSeq (Illumina, San Diego, CA, EE.UU.). La preparación de librerías y posterior secuenciación se llevó a cabo en la Fundación para el Fomento de la Investigación Sanitaria y Biomédica (FISABIO), en Valencia (España), en colaboración con la Dra. Pilar Francino.

3.5.2. Análisis bioinformático

Los datos crudos de secuenciación (FASTQ) se procesaron y analizaron utilizando la plataforma bioinformática QIIME 2 [88], versión 2020.8, y se depositaron en el repositorio GenBank (Bioproject: PRJNA702025; accesible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/?term=prjna702025>). El *script* utilizado puede consultarse en [Anexos](#). En primer lugar, se importaron los archivos FASTQ y se evaluó el rendimiento de la carrera y la calidad de las lecturas, utilizando para ello el complemento “q2-demux”. A continuación, se ejecutó el *pipeline* DADA2 (a través del complemento “q2-dada2”), que realiza un filtrado de calidad de las lecturas, la eliminación de ruido y de quimeras (lecturas que corresponden a errores de amplificación durante la generación de las librerías), así como la unión de pares de lecturas *forward* y *reverse*. Posteriormente, DADA2 resume todas las secuencias retenidas, identificando así las lecturas con idéntica secuencia nucleotídica (*amplicon sequence variants*; ASVs) y su abundancia relativa en cada muestra. Para minimizar el número de ASVs espurias, se eliminaron aquellas secuencias únicas con una abundancia total inferior a 7 en todas las muestras. Las ASVs restantes fueron clasificadas taxonómicamente utilizando el clasificador bayesiano *classify-sklearn naïve Bayes* (a través del complemento “q2-feature-classifier”), entrenado contra la base de datos SILVA 138 [80].

El análisis de diversidad se realizó mediante el complemento “q2-diversity”, después de la normalización de los datos mediante rarefacción (submuestreo sin reemplazo). El análisis de la diversidad incluyó métricas de diversidad alfa (Chao1, Shannon y Faith-PD, que miden el grado de diversidad o riqueza del ecosistema bacteriano) y métricas de diversidad beta (UniFrac, que mide las diferencias en la composición de la microbiota entre grupos de muestras). Los análisis estadísticos realizados para comparar los citados parámetros se llevaron a cabo igualmente con QIIME2, mediante el complemento “q2-diversity”. Las diferencias en los parámetros de alfa diversidad se calcularon mediante test de Kruskal-Wallis pareado, mientras que se realizó un análisis

multivariante (PERMANOVA) para buscar diferencias significativas en la composición de la microbiota de los distintos grupos.

3.6. Evaluación y seguimiento clínico

Se realizó un seguimiento de los pacientes con CU durante 16 semanas después de la TMF, que incluyó examen físico y cuestionarios, así como la medición de niveles de calprotectina fecal y un examen colonoscópico al final del seguimiento. La actividad clínica de la enfermedad se evaluó mediante el índice SCCAI (*Simple Clinical Colitis Activity Index*) y el Mayo Score o DAI (*Disease Activity Index*). El SCCAI es un cuestionario empleado para evaluar la gravedad de los síntomas en personas que padecen CU. La puntuación calculada va de 0 a 19, donde la enfermedad activa es una puntuación de 5 o superior [320]. El DAI o Mayo Score incorpora, además, hallazgos endoscópicos para establecer la gravedad de la CU, dando una puntuación de 0 a 12 [321]. La respuesta clínica a la TMF se definió como una disminución en el DAI de 3 o más puntos. Por último, se registró cualquier efecto adverso notificado durante las 16 semanas de seguimiento.

IV. RESULTADOS

1. Optimización del test

1.1. Viabilidad celular y optimización de parámetros

Las condiciones que maximizaron la preservación de la señal citoquímica correspondieron a la incubación durante 18 h empleando extractos de MAMPs no diluidos (Figura 24). Estas condiciones se establecieron como estándar para los siguientes experimentos. Además, la técnica de extracción celular a partir de biopsia intestinal demostró ser adecuada para la preservación de la integridad de la respuesta inmunitaria intracelular de las células intestinales, como muestra la Figura 25. Las mediciones por citometría de flujo demostraron que el porcentaje de células inmunocompetentes (CD45+) capaces de expresar en su interior IFN γ o FNT α ante un estímulo antigénico (PMA-ionomicina y MAMPs de 3 muestras distintas de heces) fue de entre el 37% y 73%, en comparación al 0,6% para IFN γ y 1,6% para FNT α observados en ausencia de estímulo.

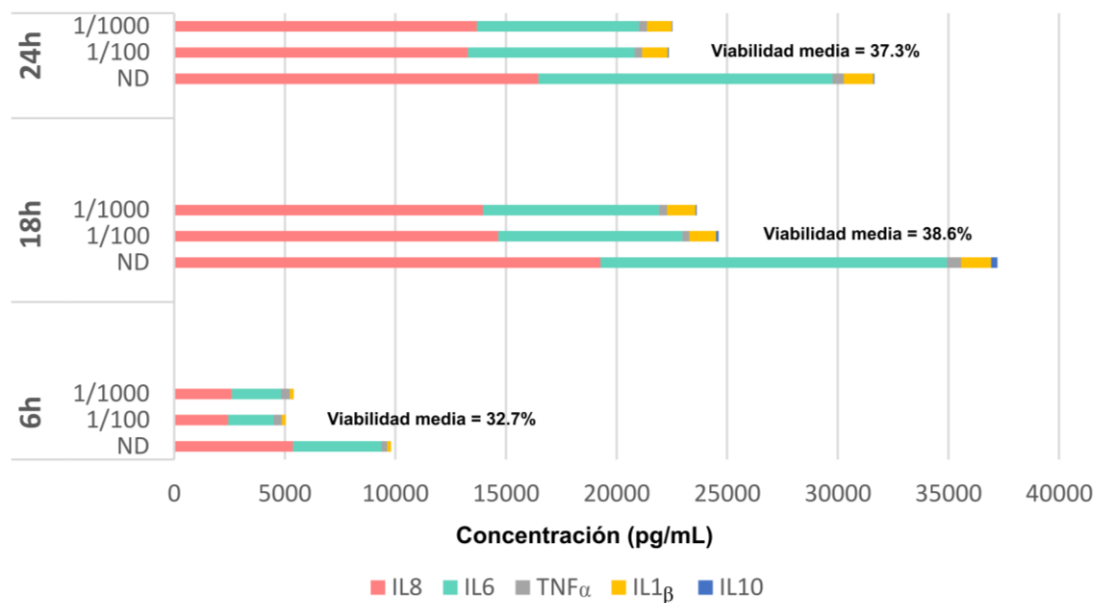


Figura 24. Producción de citoquinas de células inmunocompetentes obtenidas de mucosa de yeyuno bajo diferentes tiempos de incubación (6, 18 y 24 h) y diferentes diluciones de extracto de microbiota fecal [sin diluir (ND), 1/100 y 1/1000]. También se muestra la viabilidad celular media medida en cada momento.

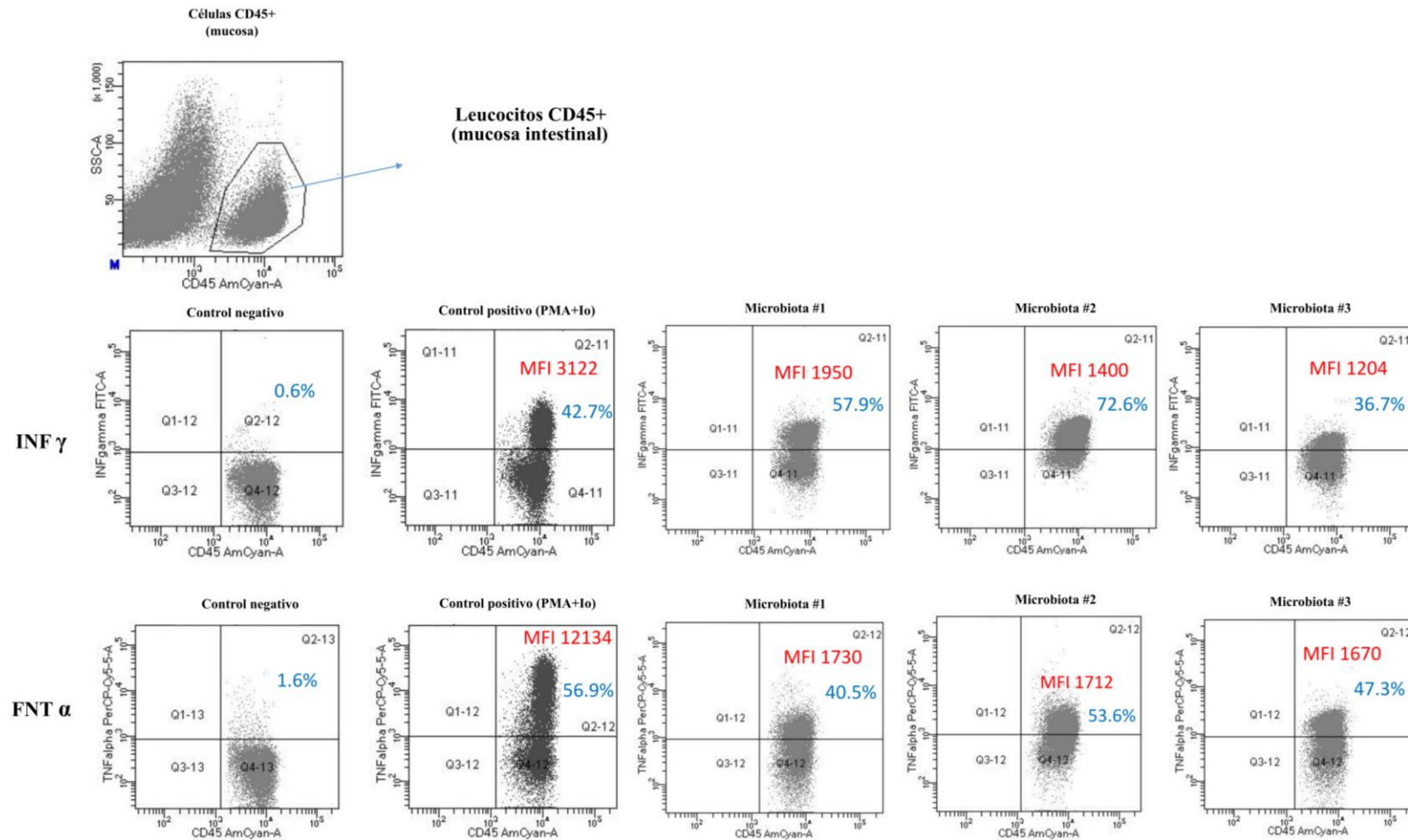


Figura 25. Producción intracelular de IFN γ y FNT α por células inmunocompetentes intestinales (CD45+) estimuladas con PMA+ionomicina (estimulación específica de linfocitos T) y 3 extractos de microbiota intestinal de individuos diferentes. El control negativo representa la producción citoquímica espontánea en cultivo. En rojo se muestra la MFI: intensidad de fluorescencia media. En azul se señala el % de células CD45+ que expresan la citoquina estudiada.

1.2. Rendimiento y reproducibilidad del test

Las Figuras 26 y 27 ilustran la respuesta inmunológica de las células inmunocompetentes obtenidas de los 7 cadáveres frente a los 20 extractos de microbiota fecal ensayados (19 de donantes de nuestro biobanco y uno del propio cadáver). El patrón de producción de citoquinas de las células de la mucosa yeyunal no fue comparable al de las células obtenidas de sangre periférica (Figura 26), lo que descartó la posibilidad de utilizar una aproximación no invasiva como alternativa a la biopsia intestinal para la determinación del test. Las células de la mucosa mostraron una gran variabilidad en la producción de IL-8, IL-6 e IL-1 β (Figura 27), mientras que la concentración de FNT α , IL-10 e IL-12 fue mayoritariamente indetectable en todos los experimentos. Los cadáveres 4 y 7 mostraron la gama más amplia de respuesta citoquímica en la mucosa, mientras que el cadáver 6 generó la respuesta más homogénea contra todos los extractos de microbiota probados.

Aunque se constató una variabilidad considerable en los perfiles de respuesta inmunológica, es importante señalar que los niveles de producción de citoquinas fueron sistemáticamente más bajos en células de mucosa que en células obtenidas de sangre periférica. Curiosamente, los determinantes antigénicos fecales del donante 18 generaron la menor respuesta inmunitaria de la mucosa en 4 de los 7 cadáveres (números 3, 5, 6 y 7); en cambio, los MAMPs de dicho donante provocaron la tercera mayor producción de citoquinas en el cadáver 4. De forma interesante, la menor respuesta proinflamatoria de las células de mucosa de los dos cadáveres restantes (1 y 2) fue generada por sus propios extractos de microbiota. Ninguno de los 19 donantes generó la mayor respuesta inflamatoria en más de un receptor, lo que indica una escasa especificidad en la reacción inflamatoria de la mucosa yeyunal.

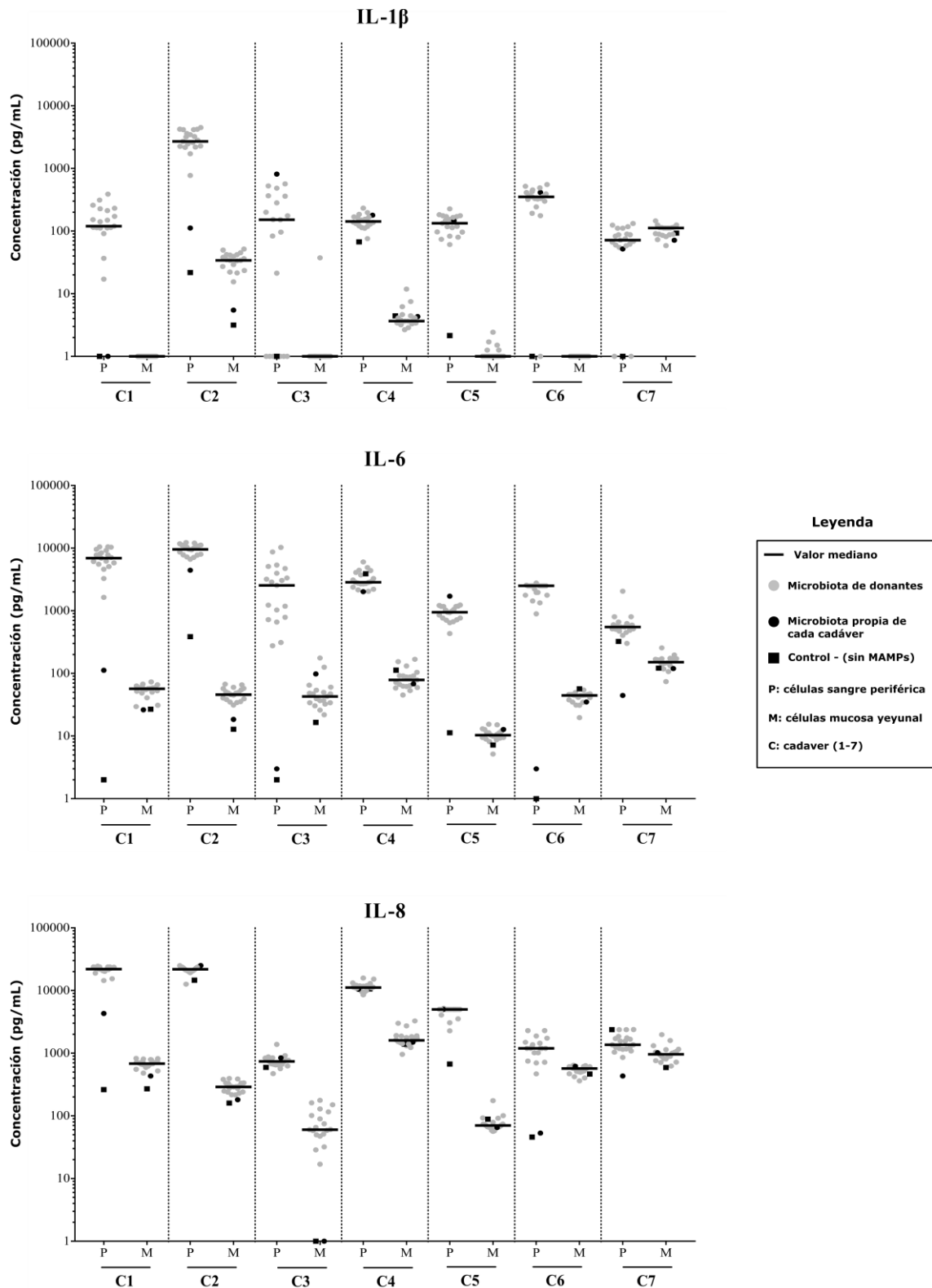


Figura 26. Comparación de la respuesta inmunológica periférica (P) y de la mucosa (M) de los 7 cadáveres frente a la microbiota de 19 donantes sanos, su propia microbiota y un control negativo sin estímulo antigénico. Se muestran solo los marcadores con mayor variabilidad entre muestras (IL-1 β , IL-6 e IL-8). La concentración de las citoquinas (eje Y) se muestra en escala logarítmica.

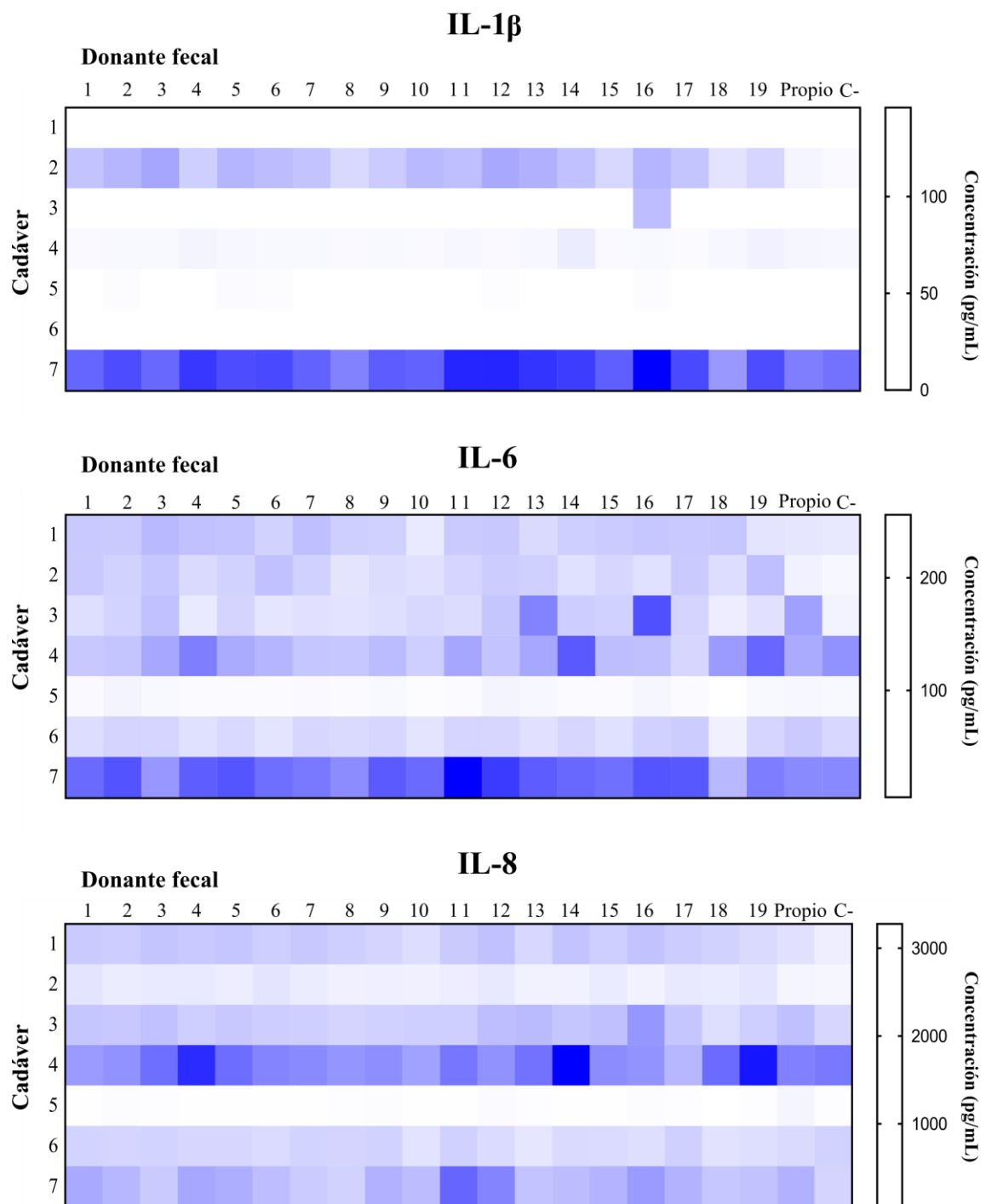


Figura 27. Mapa de calor que representa la variabilidad intra-cadáver de la respuesta inmunológica de las células de mucosa yeyunal frente a la microbiota de 19 donantes sanos, la propia microbiota de cada cadáver y un control negativo sin MAMPs. Se muestran solo los marcadores con mayor variabilidad entre muestras (IL-1 β , IL-6 e IL-8).

2. Validación clínica en Colitis Ulcerosa

2.1. Pacientes

Se reclutaron 4 pacientes (3 hombres; mediana de edad = 54 años) con CU moderada, extensa (pancolitis, con afección que se extiende más allá del ángulo esplénico) y refractaria a varias líneas de terapias inmunosupresoras y biológicas. La enfermedad de los pacientes presentaba una duración mediana de 6,5 años (rango, 4-27 años). La Tabla 11 resume las características basales de los 4 pacientes seleccionados.

Tabla 11. Características clínicas de los cuatro pacientes con CU incluidos en el estudio.

PACIENTE	Edad, sexo	Extensión ¹	Años desde diagnóstico	Historial terapéutico ²	Dosis de esteroides ³
CU1	42, ♂	E3	27	AZA, MCP, IFX, ADA, GOL, VDZ, TACRO	15 mg
CU2	41, ♂	E3	5	AZA, IFX, ADA, VDZ	Ninguna
CU3	71, ♀	E3	4	IFX, MTX, VDZ, ADA, TACRO	4 mg
CU4	66, ♂	E3	8	AZA, MCP, ADA, IFX, MTX, GOL, VDZ	10 mg

1: Siguiendo la clasificación de Montreal [322].

2: AZA (azatioprina), MCP (mercaptopurina), IFX (infliximab), ADA (adalimumab), GOL (golimumab), VDZ (vedolizumab), TACRO (tacrolimus), MTX (metotrexato).

3: En el momento previo a la realización del procedimiento de transferencia de microbiota fecal.

2.2. Selección de donantes guiada por test y transferencia de microbiota

Las biopsias rectales de los pacientes seleccionados rindieron un número de células que limitó la prueba de compatibilidad a 3 posibles donantes. La Figura 28 muestra los resultados del test para cada paciente. El candidato a donante fecal 1 fue seleccionado para los pacientes 1 y 2, ya que este individuo generó la respuesta inmunitaria menos proinflamatoria en ambos casos, mientras que el candidato a donante 2 fue elegido como donante fecal para los pacientes 3 y 4. Cabe destacar que los niveles basales de expresión de citoquinas fueron mucho mayores a los observados en los ensayos con cadáveres, lo que puede deberse al estado de inflamación crónica de los pacientes debido a su colitis. De

nuevo, el FNT α , la IL- 10 y la IL-12 no fueron marcadores con resolución suficiente para la selección de donantes, ya que mostraron niveles de expresión residuales o nulos (no mostrados en la figura).

La TMF se llevó a cabo sin incidencias en los cuatro pacientes, sin apreciar ningún efecto adverso derivado de la misma. Como se ha descrito en el apartado de métodos, se realizó en primer lugar una infusión fecal con 100 g de heces mediante colonoscopia, seguida de 4 enemas rectales obtenidos de otros 100 g de heces y autoadministrados, uno por semana, con una jeringa que contenía 50 ml, que se mantuvo congelada a -20°C hasta su uso.

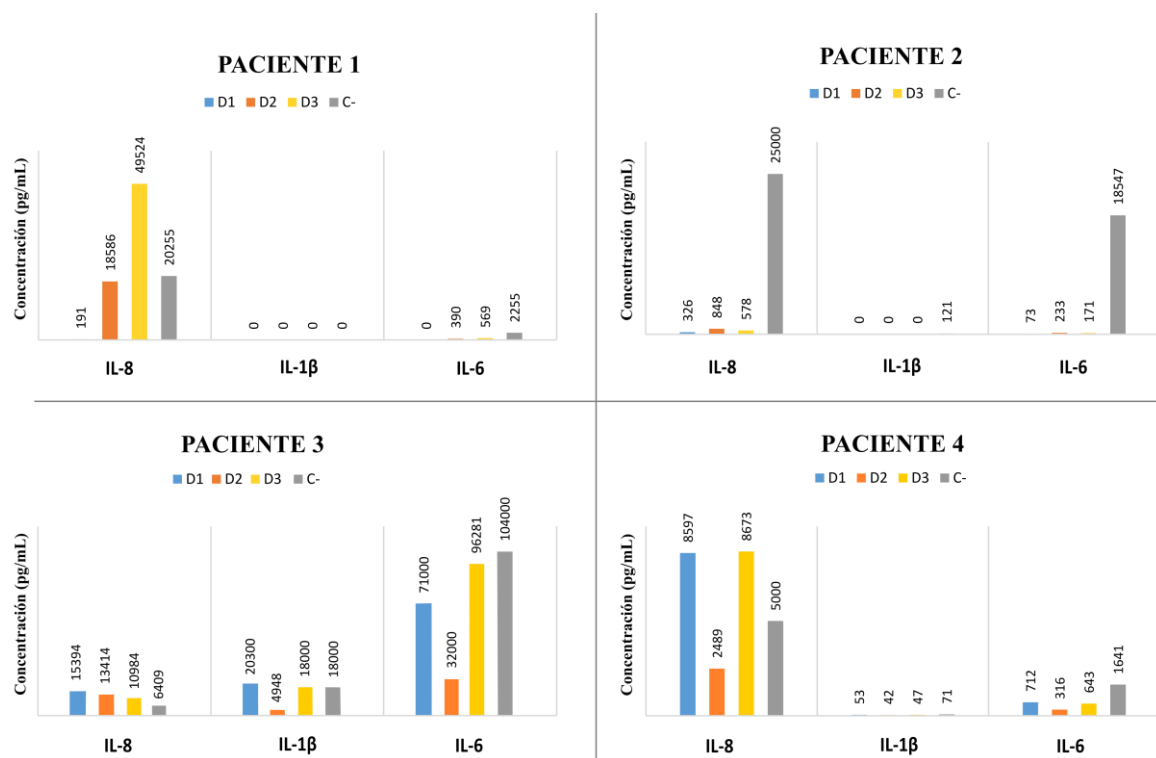


Figura 28. Resultados del test de compatibilidad sobre los 4 pacientes con CU, empleando células inmunocompetentes obtenidas de biopsia rectal. Cada cuadrante muestra la producción de citoquinas de uno de los pacientes frente a los extractos de microbiota de 3 candidatos a donante (D1, D2 y D3). También se representa la producción basal de citoquinas (sin ningún estímulo antigénico) de las células inmunocompetentes (C-, control negativo). Se muestran solo las citoquinas con mayor variabilidad entre muestras (IL-8, IL-1 β e IL-6).

2.3. Evaluación microbiológica de la transferencia de microbiota

2.3.1. Muestras y rendimiento de la secuenciación

La secuenciación del gen ADNr 16S se realizó sobre 22 muestras fecales de los 4 pacientes con CU, una muestra de cada uno de los 2 donantes seleccionados y 4 muestras de 2 pacientes con ICD que recibieron heces de esos mismos donantes para tratar su patología (Tabla 12).

Tabla 12. Muestras fecales que fueron recogidas y sometidas a secuenciación masiva del 16S ADNr. Los datos de secuenciación brutos (FASTQ) están disponibles públicamente en NCBI a través de los números de acceso que se recogen en la tabla.

Nº DE ACCESO NCBI	MUESTRA	INDIVIDUO ¹	MOMENTO DE RECOGIDA ²
SAMN17922164	UC1-pre	CU1	Antes de la TMF
SAMN17922165	UC1-15d	CU1	15 días después de la TMF
SAMN17922166	UC1-30d	CU1	30 días después de la TMF
SAMN17922167	UC1-60d	CU1	60 días después de la TMF
SAMN17922168	UC2-pre	CU2	Antes de la TMF
SAMN17922169	UC2-15d	CU2	15 días después de la TMF
SAMN17922170	UC2-30d	CU2	30 días después de la TMF
SAMN17922171	UC2-60d	CU2	60 días después de la TMF
SAMN17922172	UC3-pre	CU3	Antes de la TMF
SAMN17922173	UC3-15d	CU3	15 días después de la TMF
SAMN17922174	UC3-30d	CU3	30 días después de la TMF
SAMN17922175	UC3-60d	CU3	60 días después de la TMF
SAMN17922176	UC4-pre	CU4	Antes de la TMF
SAMN17922177	UC4-15d	CU4	15 días después de la TMF
SAMN17922178	UC4-30d	CU4	30 días después de la TMF
SAMN17922179	UC4-60d	CU4	60 días después de la TMF
SAMN17922180	ICD1-pre	ICD1	Antes de la TMF
SAMN17922181	ICD1-60d	ICD1	60 días después de la TMF
SAMN17922182	ICD2-pre	ICD2	Antes de la TMF
SAMN17922183	ICD2-30d	ICD2	30 días después de la TMF
SAMN17922184	D1	Donante 1	-
SAMN17922185	D2	Donante 2	-

1: CU (Colitis Ulcerosa), ICD (infección por *Clostridioides difficile*).

2: TMF (transferencia de microbiota fecal).

El rendimiento total crudo de la carrera de secuenciación fue de 3.644.526 lecturas. Se añadió un control negativo que rindió 123 lecturas, descartando eventos de

contaminación durante los procesos de extracción, preparación de librerías y secuenciación. Tras el filtrado de calidad, la eliminación de quimeras, la unión de pares *forward* y *reverse* y el descarte de las secuencias con muy baja frecuencia, se retuvieron un total de 1.739.846 lecturas. Tras la asignación taxonómica, se eliminaron las secuencias no bacterianas, y se conservaron finalmente 1.737.688 lecturas pertenecientes a 1.402 ASVs.

2.3.2. Diversidad alfa

Para los análisis de diversidad, tanto alfa como beta, todas las muestras se normalizaron mediante rarefacción, fijando la profundidad de muestreo en 23.405 lecturas. La diversidad alfa mide el grado de riqueza del ecosistema, es decir, el número de especies diferentes y su abundancia relativa. En el caso del parámetro de Faith-PD, además, se tiene en cuenta la distancia filogenética entre las ASVs para ponderar la diversidad intrínseca de cada muestra. Los valores de diversidad alfa más bajos se observaron en los pacientes con ICD ($3,8 \pm 1,1$ Shannon, $87,0 \pm 28,2$ Chao1 y $6,8 \pm 0,1$ Faith-PD), seguidos por los pacientes con CU ($5,0 \pm 0,5$ Shannon, $154,7 \pm 46,4$ Chao1, y $10,4 \pm 2,0$ Faith-PD) y los donantes de heces ($5,6 \pm 0,6$ Shannon, $286,0 \pm 82,0$ Chao1, y $16,4 \pm 2,9$ Faith-PD). Las métricas de diversidad alfa de los pacientes con CU aumentaron significativamente ($p=0,007$) tras la TMF ($287,7 \pm 69,0$ Chao1 y $15,9 \pm 1,9$ Faith-PD), lo que sugiere la incorporación de nuevas especies bacterianas tras el procedimiento. Por el contrario, la diversidad alfa de los pacientes con ICD mostró un aumento leve pero no estadísticamente significativo ($p>0,05$) después de la TMF ($4,3 \pm 0,7$ Shannon, $120,5 \pm 37,5$ Chao1 y $10,1 \pm 2$ Faith-PD).

2.3.3. Diversidad beta

La composición de la microbiota fecal se detalla en la Figura 29. Se detectaron hasta 227 géneros bacterianos en toda la población; las muestras de pacientes con ICD antes de la TMF tuvieron el menor recuento ($n=63$), mientras que las muestras post-TMF de pacientes con CU albergaron el mayor número de géneros diferentes ($n=206$).

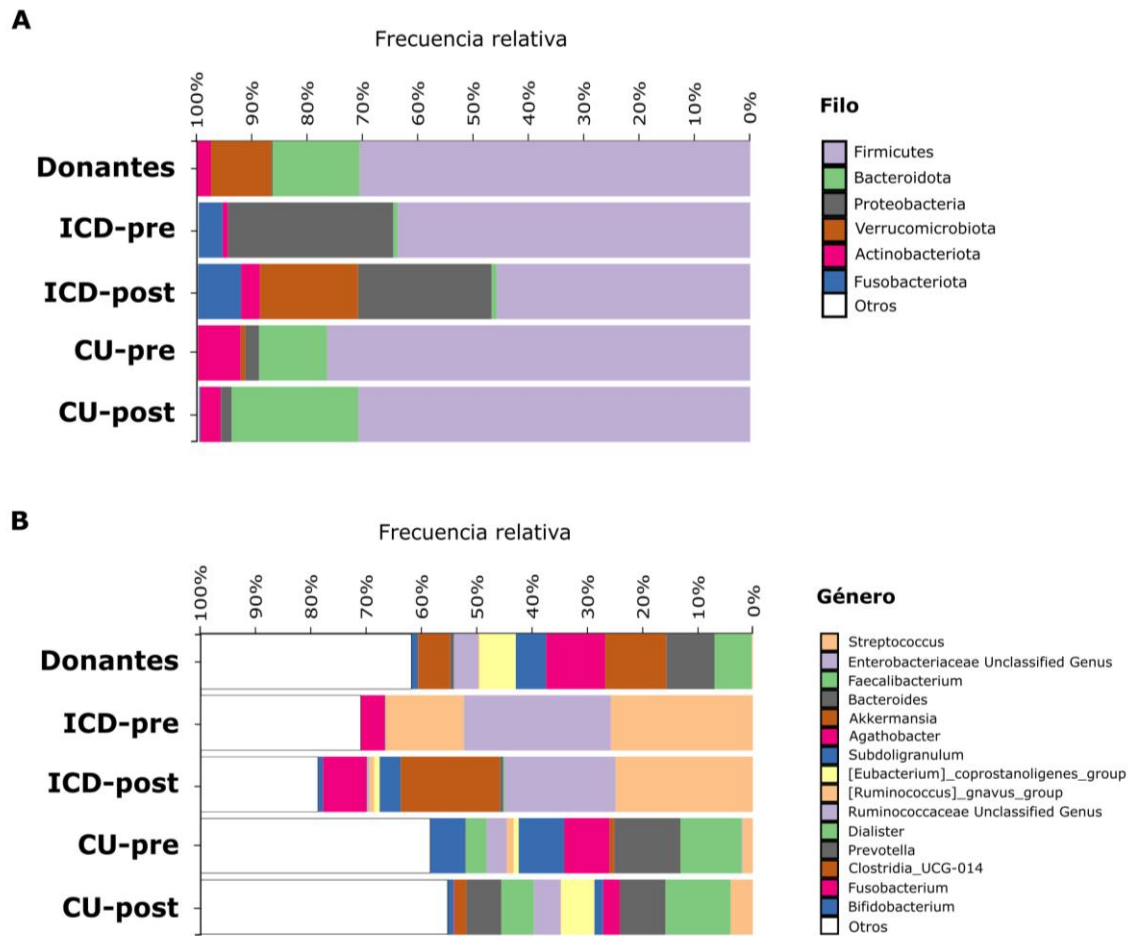


Figura 29. Composición de la microbiota en los cinco grupos de muestras (donantes, pacientes con ICD antes y después de la TMF, y pacientes con CU antes y después de la TMF) expresada como abundancia relativa (%). **A:** representa la composición microbiana a nivel de filo, **B:** representa la composición microbiana a nivel de género, identificando solo los 15 géneros más abundantes para facilitar la interpretación; el resto se agrupa en la categoría "Otros".

La microbiota de los pacientes con ICD presentó diferencias considerables con respecto al resto de las muestras, destacando la abundancia del filo Pseudomonadota (29,8%), y de los géneros *Streptococcus* (25,4%), *Ruminococcus* (14%), y *Weissella* (8,4%). Por el contrario, las diferencias en la composición microbiana de las heces de los donantes y de los pacientes con CU antes de la TMF fueron menos marcadas, destacando las mayor abundancia en los donantes de los filos Verrucomicrobiota (10,9/0,8%) y Bacteroidota (15,7/12,3%), y los géneros *Akkermansia* (10,9/ 0,5%) y *Agathobacter* (10,6/8,1%), y la menor proporción de los filos Bacillota (70,6/76,5%) y Actinomycetota

(2,5/7,7%) y los géneros *Faecalibacterium* (6,7/ 10,9%) y *Bacteroides* (8,6/11,8%) respecto a los pacientes con CU.

El impacto de la TMF en los pacientes con CU se tradujo en el enriquecimiento del filo Bacteroidota (12,3/22,9%) y del género *Prevotella* (0,8/6,2%) y en la disminución del filo Actinomycetota (7,7/3,7%) y del género *Agathobacter* (8,1/3,0%). Cabe destacar la deficiente implantación de *Akkermansia* en estos pacientes (0,8%), a pesar de ser el género más abundante en los donantes (10,9%). Por el contrario, la TMF en los pacientes con ICD produjo un notable enriquecimiento del género *Akkermansia* (0,1/17,7%) y una disminución del filo Bacillota (63,7/ 45,8%) y del género *Ruminococcus* (14,0/0,9%).

Por otro lado, también se estudió la beta diversidad mediante el cálculo de distancias UniFrac no ponderadas, que dan más peso a la adquisición de taxones, independientemente de su abundancia relativa. La matriz resultante se empleó para representar gráficamente las diferencias entre muestras, mediante PCoA (Figura 30). Aunque el análisis multivariante no detectó agrupaciones estadísticamente significativas, probablemente relacionadas con el pequeño tamaño muestral, la inspección visual del PCoA sí mostró tendencias relevantes. En primer lugar, los donantes, los pacientes con ICD y los pacientes con CU se separaron claramente en base a su microbiota, conformando los pacientes con CU el grupo más heterogéneo. En segundo lugar, el TMF tuvo poco impacto en la adquisición de nuevos taxones bacterianos en los pacientes con ICD, a tenor de la agrupación observada entre sus muestras pre y post TMF. Por el contrario, los pacientes con CU se vieron más afectados por la TMF, a través de la adquisición de nuevos taxones desde los donantes a los receptores. Esto concuerda con el ya mencionado aumento de los valores de diversidad alfa en estos pacientes tras la intervención. Como excepción, esta situación que no se produjo en el paciente 3, cuya microbiota apenas se vio modificada tras la intervención.

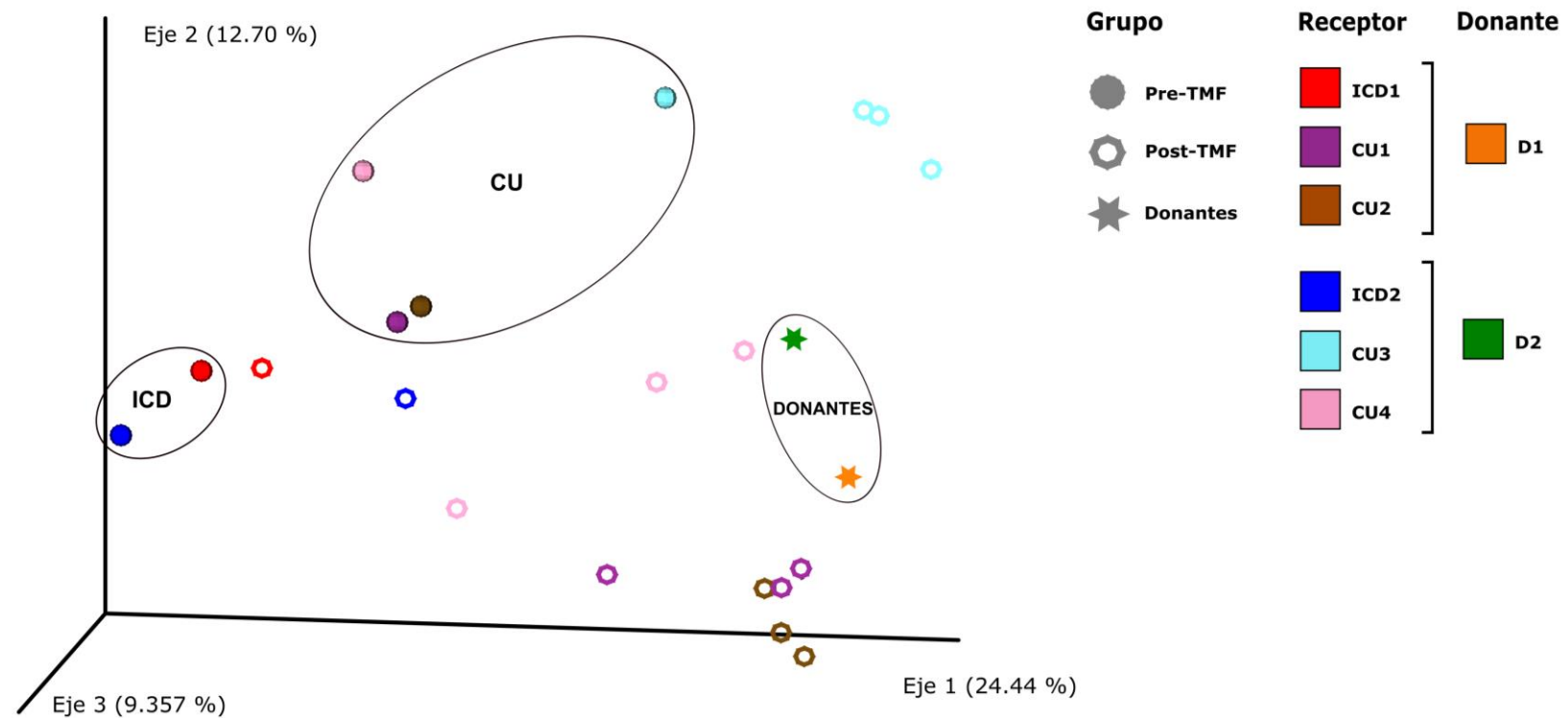


Figura 30. PCoA basado en las distancias UniFrac no ponderadas, calculadas a partir de los perfiles microbiológicos de las muestras de heces. Cada punto representa una muestra, el color hace referencia a cada sujeto y la forma del punto indica si la muestra se obtuvo antes o después de la transferencia de microbiota fecal (TMF), o si procede de un donante. Además, los corchetes indican qué donante se seleccionó para cada paciente.

2.4. Evaluación clínica de la transferencia de microbiota

La Figura 31 resume los resultados del seguimiento clínico de los pacientes con CU. La colonoscopia realizada a las 16 semanas no evidenció una mejoría significativa de la actividad de la enfermedad en ninguno de los pacientes. Dos pacientes (CU2 y CU3) mostraron un ligero descenso del SCCAI con el paso del tiempo, mientras que el paciente CU1 tuvo un aumento de este valor tras la TMF. Por último, los niveles de calprotectina fecal fueron comparables en los distintos puntos temporales o incluso más altos después del procedimiento (excepto en el paciente CU4).

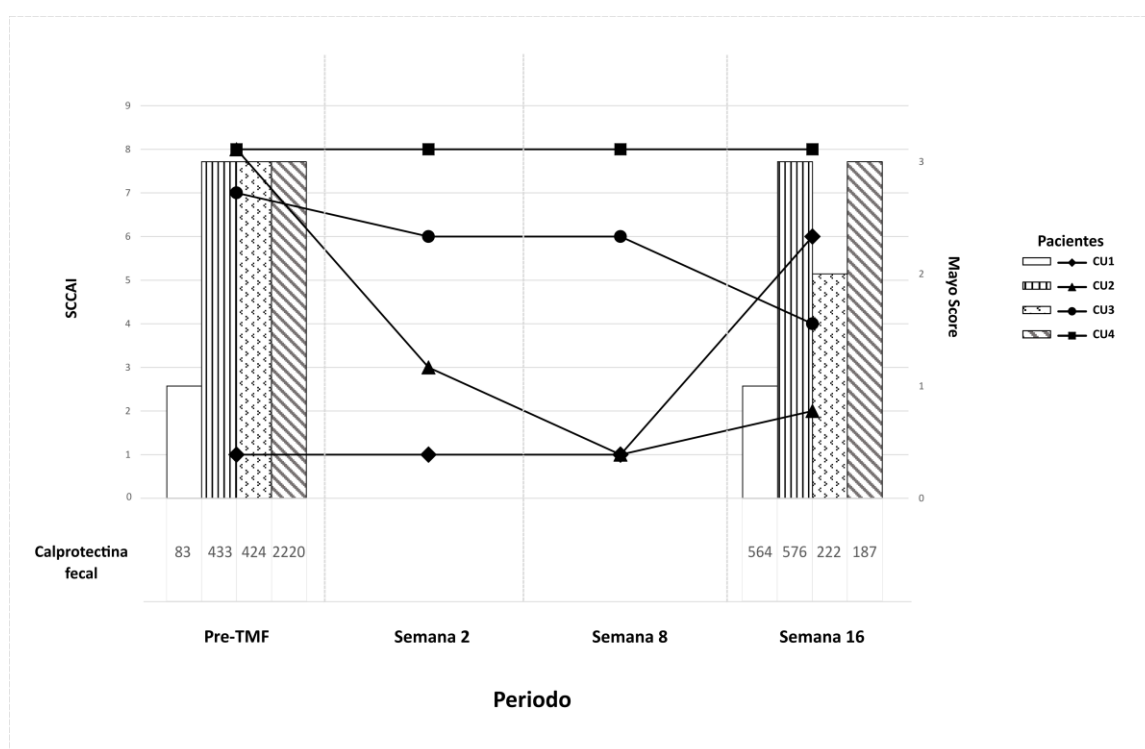


Figura 31. Evolución clínica de los cuatro pacientes con Colitis Ulcerosa a lo largo del tiempo, desde el momento anterior a la transferencia de microbiota fecal (izquierda) hasta el final del seguimiento en la semana 16 (derecha). Las líneas continuas representan el valor del índice SCCAI en cada momento, mientras que las barras (sólo registradas antes de la TMF y en la semana 16 después de la misma) muestran el Mayo Score. Por último, se muestran los niveles de calprotectina fecal ($\mu\text{g/g}$ de heces) de cada paciente medidos antes de la TMF y en la semana 16 post transferencia.

V. DISCUSIÓN

La Colitis Ulcerosa (CU) es una enfermedad inflamatoria en la que el diálogo inmunológico entre la microbiota y la mucosa intestinal se encuentra alterado [305,323,324]. La TMF se ha propuesto como una herramienta útil para modificar el ecosistema microbiano intestinal en estos pacientes, y así interrumpir o atenuar el ciclo perpetuo de inflamación. Aunque la TMF tiene una eficacia clínica en ICD del 80-90%, rara vez se han reportado tasas de remisión de más del 40-50% en CU [313,325]. Dado que el factor inmunológico es clave en estos pacientes, en el presente capítulo se buscó explorar el desarrollo de un test que midiese el grado de compatibilidad inmunológica de pacientes con CU frente a la microbiota de distintos posibles donantes, con el fin de realizar una selección dirigida de donante y así optimizar la efectividad de la TMF.

La optimización *in vitro* del test empleando donantes cadáveres de órganos tuvo un triple objetivo: ajustar y optimizar los parámetros del mismo, establecer si el test tenía la suficiente resolución para identificar y dimensionar diferencias en la respuesta inmunológica frente a distintas microbiotas y, por último, validar el uso de sangre periférica como alternativa menos invasiva. El empleo de cadáveres donantes de órganos, y en particular el uso de especímenes quirúrgicos yeyunales para obtener células inmunocompetentes de la mucosa estuvo motivado por: 1) la posibilidad de recuperar un mayor número de células, y 2) la oportunidad de reproducir el modelo más funcional posible. Obviamente, el colon es el objetivo natural de la TMF, especialmente cuando se emplea la colonoscopia como vía de implantación; sin embargo, las células inmunitarias se concentran principalmente en el intestino delgado. Este abordaje nos permitió obtener suficientes células para comparar la reacción del receptor frente a 19 ecosistemas microbianos diferentes y, aunque el estado inflamatorio de estos cadáveres no era el más adecuado, los resultados mostraron una variabilidad considerable, demostrando la utilidad del test en identificar respuestas inmunológicas diferenciales. Además, los ensayos demostraron la imposibilidad de reproducir los resultados en sangre periférica, poniendo de manifiesto la relevancia del origen de las células: mientras que la respuesta inflamatoria de las células de sangre periférica fue abrumadora (como probablemente ocurre durante un proceso de bacteriemia), las células de la mucosa yeyunal mostraron una reacción considerablemente menor, cercana a la tolerancia. De hecho, existió una reacción inflamatoria notablemente baja contra la mayoría de los extractos de microbiota ensayados,

lo que también se reprodujo en los ensayos posteriores con células rectales obtenidas de pacientes con CU. Este fenómeno de tolerancia local puede explicarse por la frecuente exposición de las células intestinales a microorganismos extraños que se introducen con los alimentos o a otros tipos de exposición ambiental.

A pesar de los prometedores resultados obtenidos en la validación *in vitro* del test, la prueba de concepto *in vivo* no demostró su utilidad en CU, dado que ninguno de nuestros 4 pacientes mostró una mejora clínica relevante tras la TMF. Nuestros resultados contrastan con otros trabajos que sí reportaron tasas de éxito considerables [326–328]; sin embargo, los efectos beneficiosos comunicados en esos estudios no fueron duraderos. Además, revisiones recientes [313,325] comunicaron una mayor tasa de remisión cuando se utilizaba una dosis fecal elevada, independientemente del donante, y la administración previa de antibióticos. Sin embargo, también se ha postulado la participación de otras variables, como la duración y la gravedad de la enfermedad [313,329]. En este sentido, es importante señalar que nuestros pacientes eran refractarios a múltiples terapias inmunosupresoras y biológicas, lo que podría afectar negativamente a la eficacia clínica de la transferencia de microbiota. Se han comunicado mayores tasas de éxito de TMF en pacientes jóvenes con CU y actividad moderada, en comparación con pacientes de mayor edad o con presentaciones clínicas más agresivas [330], lo que probablemente esté relacionado con una mayor resiliencia al cambio del diálogo bacteriano con el sistema inmune de la mucosa de estos últimos. Más allá de las características del donante, la alta variabilidad genética y microbiológica del receptor también podría tener un papel en el éxito de la TMF [313], algo que no se ha considerado en el presente trabajo.

Nuestros resultados demostraron cambios relevantes en la composición de la microbiota fecal tras la TMF, con un mayor impacto en la CU que en la ICD e incluyendo la adquisición de taxones bacterianos previamente no detectados, aunque esto no se asoció con la mejora clínica. Los cambios más relevantes tras la TMF en los pacientes con CU fueron la mayor proporción del filo Bacteroidota y del género *Prevotella*, en detrimento del filo Actinomycetota y del género *Agathobacter*. Un estudio reciente [331] ha aportado pruebas de la eficacia a largo plazo de la TMF en pacientes con CU en relación con el aumento de las Pseudomonadota y la disminución del filo Bacteroidota, siendo esto último opuesto a lo observado en nuestros pacientes, pudiendo explicar en parte la falta de respuesta clínica. Otros autores han sugerido el papel de la abundancia de *Eggerthella*, *Lactobacillus* y *Ruminococcus* antes de la TMF o en los días inmediatamente posteriores

al procedimiento como marcador predictivo del mantenimiento de la remisión clínica [332], algo que no hemos visto al inspeccionar la composición de la microbiota fecal de nuestros pacientes antes de la TMF. Finalmente, el resultado más llamativo en relación al análisis metataxonómico fue la ausencia de implantación intestinal de *Akkermansia* en los pacientes con CU, mientras que la abundancia de este género en los pacientes con ICD tras la TMF fue comparable a la observada en los donantes. Estas observaciones ejemplifican cómo el lumen del tracto intestinal, que estrictamente no debe considerarse parte de nuestro cuerpo, alberga una microbiota residente que compite con el ecosistema transferido en el procedimiento de TMF, limitando la colonización. Nuestros resultados sugieren que esta lucha por la ocupación del nicho ecológico parece depender más de la aptitud bacteriana que de la reacción inmunitaria, dada la respuesta tolerante observada en la mayoría de las pruebas. En consecuencia, el principal hallazgo de este trabajo es que la compatibilidad inmunológica no parece ser un factor esencial que condicione la implantación de un ecosistema microbiano, y por tanto no debe guiar la selección de donantes de heces en CU. Esto, además, abre la puerta al desarrollo de estudios de interacción microbiota-microbiota, con el fin de seleccionar el donante con mayor probabilidad de desplazar la microbiota residente del receptor.

Las principales limitaciones de este estudio son el bajo número de pacientes con CU reclutados para la TMF y su larga historia de enfermedad refractaria a múltiples terapias. Además, el uso de marcadores inmunológicos más selectivos y específicos de CU, como los relacionados con el eje inflamatorio TH-17/TH-1 [333] o las vías Treg [334] podría aportar una visión más discriminadora, aunque también complicaría la ejecución del test. Por otro lado, para obtener células inmunitarias asociadas a la mucosa en los pacientes con CU se emplearon biopsias rectales; sin embargo, el número de células recuperadas de estas muestras fue limitado, y condicionó el ensayo a solo 3 posibles donantes. Esto, irremediablemente, reduce la probabilidad de encontrar al donante más adecuado para cada paciente. Por último, la preparación de extractos de microbiota mediante inactivación por calor para retener los MAMPs podría no ser la aproximación que mejor simula la interacción *in vivo*, pero se escogió esta opción tras objetivar la apoptosis masiva de las células inmunitarias en presencia de alícuotas fecales íntegras.

En resumen, en este capítulo se ha presentado el diseño, optimización y evaluación clínica y microbiológica de una prueba de compatibilidad para la selección de donantes de TMF basada en la reacción inflamatoria de las células inmunitarias de la mucosa de los

pacientes frente a la microbiota fecal. Nuestros experimentos tanto con células inmunocompetentes obtenidas de la mucosa yeyunal de donantes de órganos como con las obtenidas de biopsias rectales de pacientes con CU mostraron una respuesta de tolerancia generalizada, aunque objetivando diferencias entre las distintas microbiotas que permitieron la selección de donantes de entre el *pool* ensayado. La sustitución microbiana por TMF se demostró tanto en los modelos de ICD como de CU utilizando donantes compartidos, pero sin correlacionarse con la eficacia clínica en estos últimos. Aunque no podemos descartar otras vías de respuesta inmunitaria no exploradas en nuestro trabajo y que podrían ser críticas en la compatibilidad donante-receptor, nuestros resultados sugieren que el éxito clínico en la CU podría depender más de las interacciones microbianas que de la influencia inmunológica, y que la mayor eficacia para la ICD podría ser consecuencia de otros factores no explorados.

CONCLUSIONES

Primera. Con los modelos de clasificación utilizados, no se ha identificado ningún taxón bacteriano válido para predecir la aparición de caries. Esto sugiere una escasa contribución bacteriana en el proceso cariogénico inicial, al menos desde el punto de vista de la composición taxonómica de la microbiota oral.

Segunda. El tratamiento antibiótico supresor crónico es seguro, tiene baja tasa de efectos adversos graves y una reducida tasa de selección de bacterias resistentes a múltiples antibióticos. Su impacto en la composición bacteriana intestinal es heterogéneo, más dependiente del propio individuo que de la familia antibiótica empleada o de la duración de tratamiento.

Tercera. En los individuos con obesidad mórbida hay una relación directa entre la abundancia del filo Bacillota y el índice de masa corporal, sugiriendo la existencia de diferentes grados de obesidad en relación con la huella bacteriana intestinal.

Cuarta. La dieta de choque del proceso bariátrico provoca un escaso impacto en la composición y funcionalidad de la microbiota intestinal, lo que indica un alto grado de resiliencia de las comunidades bacterianas intestinales de estos individuos.

Quinta. La proporción de pérdida de peso es similar para los dos tipos de cirugía bariátrica. El impacto en la composición bacteriana del ecosistema intestinal es significativamente más drástico en la cirugía *bypass*, como posible respuesta a la redistribución del flujo biliar. Los efectos metabólicos, sin embargo, son más tenues, destacando el aumento progresivo de la concentración de amonio fecal en dicha cirugía.

Sexta. Se han identificado taxones bacterianos de la microbiota fecal presentes en el momento basal que predicen la pérdida del exceso de peso tras la cirugía bariátrica, aunque su escasa contribución a la abundancia total del ecosistema dificulta su empleo como biomarcador.

Séptima. La reacción inmunológica de un mismo individuo frente a una microbiota exógena es dual y está condicionada por la localización celular: mientras que en la pared intestinal se produce una respuesta tolerogénica, en sangre periférica la respuesta es proinflamatoria.

Octava. Dentro del proceso de transferencia de microbiota fecal para pacientes con Colitis Ulcerosa, no está justificada la realización de un test de compatibilidad inmunológica para optimizar la selección del donante de heces, ya que no condiciona el éxito terapéutico.

Novena. La transferencia de microbiota fecal de donante sano tiene un mayor impacto ecológico en la Colitis Ulcerosa que en la infección recurrente por *Clostridioides difficile*, que sin embargo no se correlaciona con la eficacia clínica.

Décima. Las técnicas ómicas permiten una mejor caracterización de los ecosistemas microbianos que alberga nuestro cuerpo, principalmente en relación a procesos patológicos. Sin embargo, se necesita definir criterios de normalidad, así como una visión dinámica con determinaciones seriadas en el tiempo. Aunque la transferencia de microbiota fecal es la herramienta más eficaz para modificar la microbiota intestinal, se necesitan estudios individuales que ayuden a comprender el verdadero efecto de esta técnica en las distintas patologías.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] del Campo-Moreno R, Alarcón-Cavero T, D'Auria G, Delgado-Palacio S, Ferrer-Martínez M. Microbiota and Human Health: characterization techniques and transference. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2018;36:241–5. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2017.02.007>.
- [2] Chikina A, Matic Vignjevic D. At the right time in the right place: How do luminal gradients position the microbiota along the gut? *Cells Dev* 2021. <https://doi.org/10.1016/j.cdev.2021.203712>.
- [3] Zhu B, Wang X, Li L. Human gut microbiome: The second genome of human body. *Protein Cell* 2010;1:718–25. <https://doi.org/10.1007/s13238-010-0093-z>.
- [4] Almeida A, Mitchell AL, Boland M, Forster SC, Gloor GB, Tarkowska A, et al. A new genomic blueprint of the human gut microbiota. *Nature* 2019;568:499–504. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-0965-1>.
- [5] Faith JJ, Guruge JL, Charbonneau M, Subramanian S, Seedorf H, Goodman AL, et al. The long-term stability of the human gut microbiota. *Science* (80-) 2013;341. <https://doi.org/10.1126/science.1237439>.
- [6] Falony G, Joossens M, Vieira-Silva S, Wang J, Darzi Y, Faust K, et al. Population-level analysis of gut microbiome variation. *Science* (80-) 2016;352:560–4. <https://doi.org/10.1126/science.aad3503>.
- [7] Fassarella M, Blaak EE, Penders J, Nauta A, Smidt H, Zoetendal EG. Gut microbiome stability and resilience: Elucidating the response to perturbations in order to modulate gut health. *Gut* 2021;70:595–605. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2020-321747>.
- [8] Kilian M, Chapple ILC, Hannig M, Marsh PD, Meuric V, Pedersen AML, et al. The oral microbiome - An update for oral healthcare professionals. *Br Dent J* 2016;221:657–66. <https://doi.org/10.1038/sj.bdj.2016.865>.
- [9] Hillman ET, Lu H, Yao T, Nakatsu CH. Microbial ecology along the gastrointestinal tract. *Microbes Environ* 2017;32:300–13. <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME17017>.
- [10] Miller BM, Liou MJ, Lee JY, Bäumlér AJ. The longitudinal and cross-sectional heterogeneity of the intestinal microbiota. *Curr Opin Microbiol* 2021;63:221–30. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2021.08.004>.
- [11] Costea PI, Hildebrand F, Manimozhiyan A, Bäckhed F, Blaser MJ, Bushman FD, et al. Enterotypes in the landscape of gut microbial community composition. *Nat Microbiol* 2017;3:8–16. <https://doi.org/10.1038/s41564-017-0072-8>.
- [12] Cheng M, Ning K. Stereotypes About Enterotype: the Old and New Ideas. *Genomics, Proteomics Bioinforma* 2019;17:4–12. <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2018.02.004>.
- [13] Degruittola AK, Low D, Mizoguchi A, Mizoguchi E. Current understanding of dysbiosis in disease in human and animal models. *Inflamm Bowel Dis* 2016;22:1137–50. <https://doi.org/10.1097/MIB.0000000000000750>.
- [14] Latorre-Pérez A, Hernández M, Iglesias JR, Morán J, Pascual J, Porcar M, et al. The Spanish gut microbiome reveals links between microorganisms and Mediterranean diet. *Sci Rep* 2021;11:1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-01002-1>.
- [15] Ghannoum MA, Jurevic RJ, Mukherjee PK, Cui F, Sikaroodi M, Naqvi A, et al. Characterization of the oral fungal microbiome (mycobiome) in healthy individuals. *PLoS Pathog* 2010;6. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000713>.
- [16] Cui L, Morris A, Ghedin E. The human mycobiome in health and disease. *Genome Med* 2013;5. <https://doi.org/10.1186/gm467>.
- [17] Nash AK, Auchtung TA, Wong MC, Smith DP, Gesell JR, Ross MC, et al. The gut mycobiome of the Human Microbiome Project healthy cohort. *Microbiome* 2017;5:153. <https://doi.org/10.1186/s40168-017-0373-4>.
- [18] Bello S, Vengoechea JJ, Ponce-Alonso M, Figueredo AL, Mincholé E, Rezusta A, et al. Core Microbiota in Central Lung Cancer With Streptococcal Enrichment as a Possible Diagnostic Marker. *Arch Bronconeumol* 2020. <https://doi.org/10.1016/j.arbres.2020.05.034>.
- [19] Cuthbertson L, Felton I, James P, Cox MJ, Bilton D, Schelenz S, et al. The fungal airway microbiome in cystic fibrosis and non-cystic fibrosis bronchiectasis. *J Cyst Fibros* 2021;20:295–302. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2020.05.013>.
- [20] Soret P, Vandenberghe LE, Francis F, Coron N, Enaud R, Avalos M, et al. Respiratory mycobiome and suggestion of inter-kingdom network during acute pulmonary exacerbation in cystic fibrosis. *Sci Rep* 2020;10. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-60015-4>.
- [21] Shkoporov AN, Hill C. Bacteriophages of the Human Gut: The “Known Unknown” of the Microbiome. *Cell Host Microbe* 2019;25:195–209. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.01.017>.
- [22] Rascovan N, Duraisamy R, Desnues C. Metagenomics and the Human Virome in Asymptomatic Individuals. *Annu Rev Microbiol* 2016;70:125–41. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-102215-095431>.
- [23] Liang G, Bushman FD. The human virome: assembly, composition and host interactions. *Nat Rev Microbiol* 2021;19:514–27. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00536-5>.
- [24] Edwards RA, Vega AA, Norman HM, Ohaeri M, Levi K, Dinsdale EA, et al. Global phylogeography and ancient evolution of the widespread human gut virus crAssphage. *Nat Microbiol* 2019;4:1727–36. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0494-6>.
- [25] Paone P, Cani PD. Mucus barrier, mucins and gut microbiota: The expected slimy partners? *Gut* 2020;69:2232–43. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2020-322260>.
- [26] Ahern PP, Maloy KJ. Understanding immune–microbiota interactions in the intestine. *Immunology* 2020;159:4–14. <https://doi.org/10.1111/imm.13150>.
- [27] Naik S, Bouladoux N, Wilhelm C, Molloy MJ, Salcedo R, Kastenmuller W, et al. Compartmentalized control of skin immunity by resident commensals. *Science* (80-) 2012;337:1115–9. <https://doi.org/10.1126/science.1225152>.
- [28] Bishai JD, Palm NW. Small Molecule Metabolites at the Host–Microbiota Interface. *J Immunol* 2021;207:1725–33. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.2100528>.
- [29] Cummings JH, Pomare EW, Branch HWJ, Naylor CPE, MacFarlane GT. Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood. *Gut* 1987;28:1221–7. <https://doi.org/10.1136/gut.28.10.1221>.

- [30] Macia L, Tan J, Vieira AT, Leach K, Stanley D, Luong S, et al. Metabolite-sensing receptors GPR43 and GPR109A facilitate dietary fibre-induced gut homeostasis through regulation of the inflammasome. *Nat Commun* 2015;6. <https://doi.org/10.1038/ncomms7734>.
- [31] Shi N, Li N, Duan X, Niu H. Interaction between the gut microbiome and mucosal immune system. *Mil Med Res* 2017;4. <https://doi.org/10.1186/s40779-017-0122-9>.
- [32] Johnson KVA, Foster KR. Why does the microbiome affect behaviour? *Nat Rev Microbiol* 2018;16:647–55. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0014-3>.
- [33] Lynch S V., Pedersen O. The Human Intestinal Microbiome in Health and Disease. *N Engl J Med* 2016;375:2369–79. <https://doi.org/10.1056/nejmra1600266>.
- [34] Lessa FC, Mu Y, Bamberg WM, Beldavs ZG, Dumyati GK, Dunn JR, et al. Burden of *Clostridium difficile* Infection in the United States. *N Engl J Med* 2015;372:825–34. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1408913>.
- [35] van Nood E, Vrieze A, Nieuwdorp M, Fuentes S, Zoetendal EG, de Vos WM, et al. Duodenal Infusion of Donor Feces for Recurrent *Clostridium difficile*. *N Engl J Med* 2013;368:407–15. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1205037>.
- [36] Beinortas T, Burr NE, Wilcox MH, Subramanian V. Comparative efficacy of treatments for *Clostridium difficile* infection: a systematic review and network meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 2018;18:1035–44. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30285-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30285-8).
- [37] Rapozo DCM, Bernardazzi C, De Souza HSP. Diet and microbiota in inflammatory bowel disease: The gut in disharmony. *World J Gastroenterol* 2017;23:2124–40. <https://doi.org/10.3748/wjg.v23.i12.2124>.
- [38] Caruso R, Lo BC, Núñez G. Host–microbiota interactions in inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol* 2020;20:411–26. <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0268-7>.
- [39] Ussar S, Griffin NW, Bezy O, Fujisaka S, Vienberg S, Softic S, et al. Interactions between gut microbiota, host genetics and diet modulate the predisposition to obesity and metabolic syndrome. *Cell Metab* 2015;22:516–30. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.07.007>.
- [40] Bliss ES, Whiteside E. The gut-brain axis, the human gut microbiota and their integration in the development of obesity. *Front Physiol* 2018;9. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00900>.
- [41] Zhao L. The gut microbiota and obesity: From correlation to causality. *Nat Rev Microbiol* 2013;11:639–47. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3089>.
- [42] Maruvada P, Leone V, Kaplan LM, Chang EB. The Human Microbiome and Obesity: Moving beyond Associations. *Cell Host Microbe* 2017;22:589–99. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.10.005>.
- [43] Sanchez-Carrillo S, Ciordia S, Rojo D, Zubeldia-Varela E, Méndez-García C, Martínez-Martínez M, et al. A body weight loss- and health-promoting gut microbiota is established after bariatric surgery in individuals with severe obesity. *J Pharm Biomed Anal* 2021;193. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113747>.
- [44] Leiva-Gea I, Sánchez-Alcoholado L, Martín-Tejedor B, Castellano-Castillo D, Moreno-Indias I, Urda-Cardona A, et al. Gut microbiota differs in composition and functionality between children with type 1 diabetes and MODY2 and healthy control subjects: A case-control study. *Diabetes Care* 2018;41:2385–95. <https://doi.org/10.2337/dc18-0253>.
- [45] Gurung M, Li Z, You H, Rodrigues R, Jump DB, Morgun A, et al. Role of gut microbiota in type 2 diabetes pathophysiology. *EBioMedicine* 2020;51. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.11.051>.
- [46] Wang J, Qin J, Li Y, Cai Z, Li S, Zhu J, et al. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature* 2012;490:55–60. <https://doi.org/10.1038/nature11450>.
- [47] Forslund K, Hildebrand F, Nielsen T, Falony G, Le Chatelier E, Sunagawa S, et al. Disentangling type 2 diabetes and metformin treatment signatures in the human gut microbiota. *Nature* 2015;528:262–6. <https://doi.org/10.1038/nature15766>.
- [48] An L, Wirth U, Koch D, Schirren M, Drefs M, Koliogiannis D, et al. The Role of Gut-Derived Lipopolysaccharides and the Intestinal Barrier in Fatty Liver Diseases. *J Gastrointest Surg* 2021. <https://doi.org/10.1007/s11605-021-05188-7>.
- [49] Bloom PP, Tapper EB, Young VB, Lok AS. Microbiome therapeutics for hepatic encephalopathy. *J Hepatol* 2021. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2021.08.004>.
- [50] Zong Y, Zhou Y, Liao B, Liao M, Shi Y, Wei Y, et al. The Interaction Between the Microbiome and Tumors. *Front Cell Infect Microbiol* 2021;11. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.673724>.
- [51] Park JB, Koo JS. *Helicobacter pylori* infection in gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *World J Gastroenterol* 2014;20:2751–9. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i11.2751>.
- [52] Boleij A, Van Gelder MMHJ, Swinkels DW, Tjalsma H. Clinical importance of streptococcus gallolyticus infection among colorectal cancer patients: Systematic review and meta-analysis. *Clin Infect Dis* 2011;53:870–8. <https://doi.org/10.1093/cid/cir609>.
- [53] Zhang W, An Y, Qin X, Wu X, Wang X, Hou H, et al. Gut Microbiota-Derived Metabolites in Colorectal Cancer: The Bad and the Challenges. *Front Oncol* 2021;11. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.739648>.
- [54] O’Leary K. Hormone-producing bacteria drive prostate cancer. *Nat Med* 2021. <https://doi.org/10.1038/d41591-021-00065-x>.
- [55] Liu X, Cheng Y, Zang D, Zhang M, Li X, Liu D, et al. The Role of Gut Microbiota in Lung Cancer: From Carcinogenesis to Immunotherapy. *Front Oncol* 2021;11. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.720842>.
- [56] Stasiewicz M, Karpiński TM. The Oral Microbiota and its Role in Carcinogenesis. *Semin Cancer Biol* 2021. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2021.11.002>.
- [57] Mao AW, Barck H, Young J, Paley A, Mao J-H, Chang H. Identification of a novel cancer microbiome signature for predicting prognosis of human breast cancer patients. *Clin Transl Oncol* 2021. <https://doi.org/10.1007/s12094-021-02725-3>.
- [58] Gopalakrishnan V, Spencer CN, Nezi L, Reuben A, Andrews MC, Karpins T V., et al. Gut microbiome modulates response to anti-PD-1 immunotherapy in

- melanoma patients. *Science* 2018;359:97–103. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAN4236>.
- [59] Andrews MC, Duong CPM, Gopalakrishnan V, Iebba V, Chen WS, Derosa L, et al. Gut microbiota signatures are associated with toxicity to combined CTLA-4 and PD-1 blockade. *Nat Med* 2021;27:1432–41. <https://doi.org/10.1038/s41591-021-01406-6>.
- [60] Li B, Gong T, Hao Y, Zhou X, Cheng L. Mining the Gut Microbiota for Microbial-Based Therapeutic Strategies in Cancer Immunotherapy. *Front Oncol* 2021;11. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.721249>.
- [61] Banerjee A, Pradhan LK, Sahoo PK, Jena KK, Chauhan NR, Chauhan S, et al. Unravelling the potential of gut microbiota in sustaining brain health and their current prospective towards development of neurotherapeutics. *Arch Microbiol* 2021;203:2895–910. <https://doi.org/10.1007/s00203-021-02276-9>.
- [62] Sharon G, Cruz NJ, Kang DW, Gandal MJ, Wang B, Kim YM, et al. Human Gut Microbiota from Autism Spectrum Disorder Promote Behavioral Symptoms in Mice. *Cell* 2019;177:1600–1618.e17. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.05.004>.
- [63] Kang DW, Adams JB, Coleman DM, Pollard EL, Maldonado J, McDonough-Means S, et al. Long-term benefit of Microbiota Transfer Therapy on autism symptoms and gut microbiota. *Sci Rep* 2019;9. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42183-0>.
- [64] Serrano-Villar S, Talavera-Rodríguez A, Gosalbes MJ, Madrid N, Pérez-Molina JA, Elliott RJ, et al. Fecal microbiota transplantation in HIV: A pilot placebo-controlled study. *Nat Commun* 2021;12. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21472-1>.
- [65] Zanza C, Romenskaya T, Thangathurai D, Ojetti V, Saviano A, Abenavoli L, et al. Microbiome in Critical illness: An Unconventional and Unknown Ally. *Curr Med Chem* 2021;28. <https://doi.org/10.2174/0929867328666210915115056>.
- [66] Polkowska-Pruszyńska B, Gerkowicz A, Krasowska D. The gut microbiome alterations in allergic and inflammatory skin diseases – an update. *J Eur Acad Dermatology Venereol* 2020;34:455–64. <https://doi.org/10.1111/jdv.15951>.
- [67] Lin D, Hu B, Li P, Zhao Y, Xu Y, Wu D. Roles of the intestinal microbiota and microbial metabolites in acute GVHD. *Exp Hematol Oncol* 2021;10:49. <https://doi.org/10.1186/s40164-021-00240-3>.
- [68] Kim BS, Han DH, Lee H, Oh B. Association of salivary microbiota with dental caries incidence with dentine involvement after 4 years. *J Microbiol Biotechnol* 2018;28:454–64. <https://doi.org/10.4014/jmb.1710.10028>.
- [69] Mirzayi C, Renson A, Furlanello C, Sansone S-A, Zohra F, Elsafoury S, et al. Reporting guidelines for human microbiome research: the STORMS checklist. *Nat Med* 2021;27:1885–92. <https://doi.org/10.1038/s41591-021-01552-x>.
- [70] Bokulich NA, Ziemski M, Robeson MS, Kaehler BD. Measuring the microbiome: Best practices for developing and benchmarking microbiomics methods. *Comput Struct Biotechnol J* 2020;18:4048–62. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2020.11.049>.
- [71] Khan Mirzaei M, Xue J, Costa R, Ru J, Schulz S, Taranu ZE, et al. Challenges of Studying the Human Virome – Relevant Emerging Technologies. *Trends Microbiol* 2021;29:171–81. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2020.05.021>.
- [72] Genome.gov. A Brief Guide to Genomics 2011. <https://www.genome.gov/about-genomics/fact-sheets/A-Brief-Guide-to-Genomics> (accessed November 14, 2021).
- [73] Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977;74:5463–7. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>.
- [74] Rogers YH, Venter JC. Genomics: Massively parallel sequencing. *Nature* 2005;437:326–7. <https://doi.org/10.1038/437326a>.
- [75] Besser J, Carleton HA, Gerner-Smidt P, Lindsey RL, Trees E. Next-generation sequencing technologies and their application to the study and control of bacterial infections. *Clin Microbiol Infect* 2018;24:335–41. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.10.013>.
- [76] Tedersoo L, Albertsen M, Anslan S, Callahan B. Perspectives and Benefits of High-Throughput Long-Read Sequencing in Microbial Ecology. *Appl Environ Microbiol* 2021;87:1–19. <https://doi.org/10.1128/AEM.00626-21>.
- [77] Park C, Kim SB, Choi SH, Kim S. Comparison of 16S rRNA Gene Based Microbial Profiling Using Five Next-Generation Sequencers and Various Primers. *Front Microbiol* 2021;12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.715500>.
- [78] Fouhy F, Clooney AG, Stanton C, Claesson MJ, Cotter PD. 16S rRNA gene sequencing of mock microbial populations-impact of DNA extraction method, primer choice and sequencing platform. *BMC Microbiol* 2016;16. <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0738-z>.
- [79] McDonald D, Price MN, Goodrich J, Nawrocki EP, Desantis TZ, Probst A, et al. An improved Greengenes taxonomy with explicit ranks for ecological and evolutionary analyses of bacteria and archaea. *ISME J* 2012;6:610–8. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.139>.
- [80] Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res* 2013;41. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1219>.
- [81] Cole JR, Wang Q, Fish JA, Chai B, McGarrell DM, Sun Y, et al. Ribosomal Database Project: Data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Res* 2014;42:633–42. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1244>.
- [82] Escapa IF, Chen T, Huang Y, Gajare P, Dewhirst FE, Lemon KP. New Insights into Human Nostril Microbiome from the Expanded Human Oral Microbiome Database (eHOMD): a Resource for the Microbiome of the Human Aerodigestive Tract. *MSystems* 2018;3. <https://doi.org/10.1128/msystems.00187-18>.
- [83] Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, Robert V, Spouge JL, Levesque CA, et al. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109:6241–6. <https://doi.org/10.1073/pnas.1117018109>.
- [84] Frau A, Kenny JG, Lenzi L, Campbell BJ, Ijaz UZ, Duckworth CA, et al. DNA extraction and amplicon production strategies deeply influence the outcome

- of gut mycobiome studies. *Sci Rep* 2019;9. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-44974-x>.
- [85] Nilsson RH, Larsson KH, Taylor AFS, Bengtsson-Palme J, Jeppesen TS, Schigel D, et al. The UNITE database for molecular identification of fungi: Handling dark taxa and parallel taxonomic classifications. *Nucleic Acids Res* 2019;47:D259–64. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1022>.
- [86] Džunková M, D'Auria G, Moya A. Direct sequencing of human gut virome fractions obtained by flow cytometry. *Front Microbiol* 2015;6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00955>.
- [87] Segata N, Izard J, Waldron L, Gevers D, Miropolsky L, Garrett WS, et al. Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biol* 2011;12. <https://doi.org/10.1186/GB-2011-12-6-R60>.
- [88] Bolyen E, Rideout JR, Dillon MR, Bokulich NA, Abnet CC, Al-Ghalith GA, et al. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nat Biotechnol* 2019;37:852–7. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0209-9>.
- [89] Schloss PD. Reintroducing mothur: 10 years later. *Appl Environ Microbiol* 2020;86. <https://doi.org/10.1128/AEM.02343-19>.
- [90] McMurdie PJ, Holmes S. Phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS One* 2013;8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>.
- [91] Abellan-Schneyder I, Matchado MS, Reitmeier S, Sommer A, Sewald Z, Baumbach J, et al. Primer, Pipelines, Parameters: Issues in 16S rRNA Gene Sequencing. *MSphere* 2021;6. <https://doi.org/10.1128/msphere.01202-20>.
- [92] Vandeputte D, Kathagen G, D'Hoe K, Vieira-Silva S, Valles-Colomer M, Sabino J, et al. Quantitative microbiome profiling links gut community variation to microbial load. *Nature* 2017;551:507–11. <https://doi.org/10.1038/nature24460>.
- [93] Wilmes P, Bond PL. The application of two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and downstream analyses to a mixed community of prokaryotic microorganisms. *Environ Microbiol* 2004;6:911–20. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2004.00687.x>.
- [94] Peters DL, Wang W, Zhang X, Ning Z, Mayne J, Figeys D. Metaproteomic and Metabolomic Approaches for Characterizing the Gut Microbiome. *Proteomics* 2019;19:1–40. <https://doi.org/10.1002/pmic.201800363>.
- [95] Zhang X, Deeke SA, Ning Z, Starr AE, Butcher J, Li J, et al. Metaproteomics reveals associations between microbiome and intestinal extracellular vesicle proteins in pediatric inflammatory bowel disease. *Nat Commun* 2018;9. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05357-4>.
- [96] Wei X, Jiang S, Chen Y, Zhao X, Li H, Lin W, et al. Cirrhosis related functionality characteristic of the fecal microbiota as revealed by a metaproteomic approach. *BMC Gastroenterol* 2016;16. <https://doi.org/10.1186/s12876-016-0534-0>.
- [97] García-Durán C, Martínez-López R, Zapico I, Pérez E, Romeu E, Arroyo J, et al. Distinct Human Gut Microbial Taxonomic Signatures Uncovered With Different Sample Processing and Microbial Cell Disruption Methods for Metaproteomic Analysis. *Front Microbiol* 2021;12:1–18. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.618566>.
- [98] Heintz-Buschart A, Wilmes P. Human Gut Microbiome: Function Matters. *Trends Microbiol* 2018;26:563–74. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.11.002>.
- [99] Beyter D, Lin MS, Yu Y, Pieper R, Bafna V. ProteoStorm: An Ultrafast Metaproteomics Database Search Framework. *Cell Syst* 2018;7:463–467.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cels.2018.08.009>.
- [100] Cheng K, Ning Z, Zhang X, Li L, Liao B, Mayne J, et al. MetaLab: an automated pipeline for metaproteomic data analysis. *Microbiome* 2017;5:157. <https://doi.org/10.1186/s40168-017-0375-2>.
- [101] Muth T, Behne A, Heyer R, Kohrs F, Benndorf D, Hoffmann M, et al. The MetaProteomeAnalyzer: A powerful open-source software suite for metaproteomics data analysis and interpretation. *J Proteome Res* 2015;14:1557–65. <https://doi.org/10.1021/pr501246w>.
- [102] Liu CW, Chi L, Tu P, Xue J, Ru H, Lu K. Isobaric Labeling Quantitative Metaproteomics for the Study of Gut Microbiome Response to Arsenic. *J Proteome Res* 2019;18:970–81. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.8b00666>.
- [103] Sun F, Ding Y, Ji Q, Liang Z, Deng X, Wong CCL, et al. Protein cysteine phosphorylation of SarA/MgrA family transcriptional regulators mediates bacterial virulence and antibiotic resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109:15461–6. <https://doi.org/10.1073/pnas.1205952109>.
- [104] Zhang X, Li L, Butcher J, Stintzi A, Figeys D. Advancing functional and translational microbiome research using meta-omics approaches. *Microbiome* 2019;7:1–12. <https://doi.org/10.1186/s40168-019-0767-6>.
- [105] Emwas AHM. The strengths and weaknesses of NMR spectroscopy and mass spectrometry with particular focus on metabolomics research. *Methods Mol Biol* 2015;1277:161–93. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2377-9_13.
- [106] Nicholson JK, Holmes E, Kinross J, Burcelin R, Gibson G, Jia W, et al. Host-gut microbiota metabolic interactions. *Science* (80-) 2012;336:1262–7. <https://doi.org/10.1126/science.1223813>.
- [107] Maier T V., Lucio M, Lee LH, Verberkmoes NC, Brislawn CJ, Bernhardt J, et al. Impact of dietary resistant starch on the human gut Microbiome, Metaproteome, and Metabolome. *MBio* 2017;8. <https://doi.org/10.1128/mBio.01343-17>.
- [108] Jehmlich N, Schmidt F, Taubert M, Seifert J, Bastida F, Von Bergen M, et al. Protein-based stable isotope probing. *Nat Protoc* 2010;5:1957–66. <https://doi.org/10.1038/nprot.2010.166>.
- [109] Li Z, Lu Y, Guo Y, Cao H, Wang Q, Shui W. Comprehensive evaluation of untargeted metabolomics data processing software in feature detection, quantification and discriminating marker selection. *Anal Chim Acta* 2018;1029:50–7. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.05.001>.
- [110] Chong J, Soufan O, Li C, Caraus I, Li S, Bourque G, et al. MetaboAnalyst 4.0: Towards more transparent and integrative metabolomics analysis. *Nucleic Acids Res* 2018;46:W486–94. <https://doi.org/10.1093/nar/gky310>.
- [111] Karu N, Deng L, Slae M, Guo AC, Sajed T, Huynh H, et al. A review on human fecal metabolomics:

- Methods, applications and the human fecal metabolome database. *Anal Chim Acta* 2018;1030:1–24. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.05.031>.
- [112] Valles-Colomer M, Darzi Y, Vieira-Silva S, Falony G, Raes J, Joossens M. Meta-omics in inflammatory bowel disease research: Applications, challenges, and guidelines. *J Crohn's Colitis* 2016;10:735–46. <https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjw024>.
- [113] Franzosa EA, Hsu T, Sirota-Madi A, Shafquat A, Abu-Ali G, Morgan XC, et al. Sequencing and beyond: Integrating molecular “omics” for microbial community profiling. *Nat Rev Microbiol* 2015;13:360–72. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3451>.
- [114] Chaudhary K, Poirion OB, Lu L, Garmire LX. Deep learning-based multi-omics integration robustly predicts survival in liver cancer. *Clin Cancer Res* 2018;24:1248–59. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-0853>.
- [115] Choi HH, Cho YS. Fecal microbiota transplantation: Current applications, effectiveness, and future perspectives. *Clin Endosc* 2016;49:257–65. <https://doi.org/10.5946/ce.2015.117>.
- [116] Stripling J, Rodriguez M. Current Evidence in Delivery and Therapeutic Uses of Fecal Microbiota Transplantation in Human Diseases—Clostridium difficile Disease and Beyond. *Am J Med Sci* 2018;356:424–32. <https://doi.org/10.1016/j.amjms.2018.08.010>.
- [117] EISEMAN B, SILEN W, BASCOM GS, KAUVAR AJ. Fecal enema as an adjunct in the treatment of pseudomembranous. *Surgery* 1958;44:854–9.
- [118] Lawson PA, Citron DM, Tyrrell KL, Finegold SM. Reclassification of Clostridium difficile as Clostridioides difficile (Hall and O'Toole 1935) Prévot 1938. *Anaerobe* 2016;40:95–9. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2016.06.008>.
- [119] Cammarota G, Ianiro G, Tilg H, Rajilić-Stojanović M, Kump P, Satokari R, et al. European consensus conference on faecal microbiota transplantation in clinical practice. *Gut*, vol. 66, Gut; 2017, p. 569–80. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2016-313017>.
- [120] Johnson S, Laverne V, Skinner AM, Gonzales-Luna AJ, Garey KW, Kelly CP, et al. Clinical Practice Guideline by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA): 2021 Focused Update Guidelines on Management of Clostridioides difficile Infection in Adults. *Clin Infect Dis* 2021;73:e1029–44. <https://doi.org/10.1093/cid/ciab549>.
- [121] Kelly CR, Fischer M, Allegretti JR, LaPlante K, Stewart DB, Limketkai BN, et al. ACG Clinical Guidelines: Prevention, Diagnosis, and Treatment of Clostridioides difficile Infections. *Am J Gastroenterol* 2021;116:1124–47. <https://doi.org/10.14309/ajg.0000000000001278>.
- [122] van Prehn J, Reigadas E, Vogelzang EH, Bouza E, Hristea A, Guery B, et al. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: 2021 update on the treatment guidance document for Clostridioides difficile infection in adults. *Clin Microbiol Infect* 2021. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2021.09.038>.
- [123] Allegretti JR, Mullish BH, Kelly C, Fischer M. The evolution of the use of faecal microbiota transplantation and emerging therapeutic indications. *Lancet* 2019;394:420–31. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)31266-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)31266-8).
- [124] Ooijselaar RE, Terveer EM, Verspaget HW, Kuijper EJ, Keller JJ. Clinical application and potential of fecal microbiota transplantation. *Annu Rev Med* 2019;70:335–51. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-111717-122956>.
- [125] Ianiro G, Porcari S, Bibbò S, Giambò F, Quaranta G, Masucci L, et al. Donor program for fecal microbiota transplantation: A 3-year experience of a large-volume Italian stool bank. *Dig Liver Dis* 2021. <https://doi.org/10.1016/j.dld.2021.04.009>.
- [126] Aràjol C, Aira Gómez A, González-Suárez B, Casals-Pascual C, Martí Martí S, Domínguez Luzón MÁ, et al. Donor selection for faecal microbiota transplantation. Consensus document of the Catalan Society of Gastroenterology and the Catalan Society of Infectious Diseases and Clinical Microbiology. *Gastroenterol Hepatol* 2021;44:175–80. <https://doi.org/10.1016/j.gastrohep.2020.07.027>.
- [127] Chen J, Zaman A, Ramakrishna B, Olesen SW. Stool Banking for Fecal Microbiota Transplantation: Methods and Operations at a Large Stool Bank. *Front Cell Infect Microbiol* 2021;11:281. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.622949>.
- [128] Terveer EM, Vendrik KEW, Ooijselaar RE, Lingen E van, Boeije-Koppenol E, Nood E van, et al. Faecal microbiota transplantation for Clostridioides difficile infection: Four years' experience of the Netherlands Donor Feces Bank. *United Eur Gastroenterol J* 2020;8:1236–47. <https://doi.org/10.1177/2050640620957765>.
- [129] Tariq R, Weatherly R, Kammer P, Pardi DS, Khanna S. Donor Screening Experience for Fecal Microbiota Transplantation in Patients with Recurrent C. difficile Infection. *J Clin Gastroenterol* 2018;52:146–50. <https://doi.org/10.1097/MCG.0000000000000768>.
- [130] Kassam Z, Dubois N, Ramakrishna B, Ling K, Qazi T, Smith M, et al. Donor Screening for Fecal Microbiota Transplantation. *N Engl J Med* 2019;381:2070–2. <https://doi.org/10.1056/nejmc1913670>.
- [131] DeFilipp Z, Bloom PP, Torres Soto M, Mansour MK, Sater MRA, Huntley MH, et al. Drug-Resistant E. coli Bacteremia Transmitted by Fecal Microbiota Transplant. *N Engl J Med* 2019;381:2043–50. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1910437>.
- [132] Ianiro G, Mullish BH, Kelly CR, Kassam Z, Kuijper EJ, Ng SC, et al. Reorganisation of faecal microbiota transplant services during the COVID-19 pandemic. *Gut* 2020;69:1555–63. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2020-321829>.
- [133] Xiao F, Tang M, Zheng X, Liu Y, Li X, Shan H. Evidence for Gastrointestinal Infection of SARS-CoV-2. *Gastroenterology* 2020;158:1831–1833.e3. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.02.055>.
- [134] Wang W, Xu Y, Gao R, Lu R, Han K, Wu G, et al. Detection of SARS-CoV-2 in Different Types of Clinical Specimens. *JAMA - J Am Med Assoc* 2020;323:1843–4. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.3786>.
- [135] Woodworth MH, Carpentieri C, Sitchenko KL, Kraft CS. Challenges in fecal donor selection and screening for fecal microbiota transplantation: A review. *Gut Microbes* 2017;8:225–37. <https://doi.org/10.1080/19490976.2017.1286006>.
- [136] Duvallet C, Zellmer C, Panchal P, Budree S, Osman M, Alm EJ. Framework for rational donor selection

- in fecal microbiota transplant clinical trials. *PLoS One* 2019;14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222881>.
- [137] Cammarota G, Ianiro G, Kelly CR, Mullish BH, Allegretti JR, Kassam Z, et al. International consensus conference on stool banking for faecal microbiota transplantation in clinical practice. *Gut* 2019;68:2111–21. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2019-319548>.
- [138] Wilson BC, Vatanen T, Cutfield WS, O'Sullivan JM. The super-donor phenomenon in fecal microbiota transplantation. *Front Cell Infect Microbiol* 2019;9. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00002>.
- [139] Danne C, Rolhion N, Sokol H. Recipient factors in faecal microbiota transplantation: one stool does not fit all. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2021;18:503–13. <https://doi.org/10.1038/s41575-021-00441-5>.
- [140] Tkach SM, Dorofeev AE, Kuzenko YG. The concept of superdonor and other possible factors for the effectiveness of fecal microbiota transplantation. *Gastroenterology* 2020;54:202–9. <https://doi.org/10.22141/2308-2097.54.3.2020.211740>.
- [141] Ponce-Alonso M, García-Hoz C, Halperin A, Nuño J, Nicolás P, Martínez-Pérez A, et al. An Immunologic Compatibility Testing Was Not Useful for Donor Selection in Fecal Microbiota Transplantation for Ulcerative Colitis. *Front Immunol* 2021;12:1. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.683387>.
- [142] Bibbò S, Settanni CR, Porcari S, Bocchino E, Ianiro G, Cammarota G, et al. Fecal Microbiota Transplantation: Screening and Selection to Choose the Optimal Donor. *J Clin Med* 2020;9:1757. <https://doi.org/10.3390/jcm9061757>.
- [143] Okahara K, Ishikawa D, Nomura K, Ito S, Haga K, Takahashi M, et al. Matching between donors and ulcerative colitis patients is important for long-term maintenance after fecal microbiota transplantation. *J Clin Med* 2020;9. <https://doi.org/10.3390/jcm9061650>.
- [144] Allegretti JR, Elliott RJ, Ladha A, Njenga M, Warren K, O'Brien K, et al. Stool processing speed and storage duration do not impact the clinical effectiveness of fecal microbiota transplantation. *Gut Microbes* 2020;11:1806–8. <https://doi.org/10.1080/19490976.2020.1768777>.
- [145] Bhutiani N, Schucht JE, Miller KR, McClave SA. Technical Aspects of Fecal Microbial Transplantation (FMT). *Curr Gastroenterol Rep* 2018;20. <https://doi.org/10.1007/s11894-018-0636-7>.
- [146] Smirnova D V., Zalomova L V., Zagainova A V., Makarov V V., Mezhevikina LM, Fesenko EE, et al. Cryopreservation of the human gut microbiota: Current state and perspectives. *Int J Med Microbiol* 2019;309:259–69. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2019.06.001>.
- [147] Mullish BH, Quraishi MN, Segal JP, McCune VL, Baxter M, Marsden GL, et al. The use of faecal microbiota transplant as treatment for recurrent or refractory *Clostridium difficile* infection and other potential indications: Joint British Society of Gastroenterology (BSG) and Healthcare Infection Society (HIS) guidelines. *Gut* 2018;67:1920–41. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2018-316818>.
- [148] Rupawala AH, Gachette D, Bakhit M, Jimoh L, Kelly CR. Management of Severe and Severe/Complicated *Clostridioides difficile* Infection Using Sequential Fecal Microbiota Transplant by Retention Enema. *Clin Infect Dis* 2021;73:716–9. <https://doi.org/10.1093/cid/ciab041>.
- [149] Staley C, Kelly CR, Brandt LJ, Khoruts A, Sadowsky MJ. Complete microbiota engraftment is not essential for recovery from recurrent *Clostridium difficile* infection following fecal microbiota transplantation. *MBio* 2016;7. <https://doi.org/10.1128/mBio.01965-16>.
- [150] Meighani A, Hart BR, Mittal C, Miller N, John A, Ramesh M. Predictors of fecal transplant failure. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2016;28:826–30. <https://doi.org/10.1097/MEG.0000000000000614>.
- [151] Tariq R, Saha S, Solanky Di, Pardi DS, Khanna S. Predictors and Management of Failed Fecal Microbiota Transplantation for Recurrent *Clostridioides difficile* Infection. *J Clin Gastroenterol* 2021;55:542–7. <https://doi.org/10.1097/MCG.0000000000001398>.
- [152] Seekatz AM, Aas J, Gessert CE, Rubin TA, Saman DM, Bakken JS, et al. Recovery of the gut microbiome following fecal microbiota transplantation. *MBio* 2014;5. <https://doi.org/10.1128/mBio.00893-14>.
- [153] Li SS, Zhu A, Benes V, Costea PI, Hercog R, Hildebrand F, et al. Durable coexistence of donor and recipient strains after fecal microbiota transplantation. *Science* (80-) 2016;352:586–9. <https://doi.org/10.1126/science.aad8852>.
- [154] Aggarwala V, Mogno I, Li Z, Yang C, Britton GJ, Chen-Liaw A, et al. Precise quantification of bacterial strains after fecal microbiota transplantation delineates long-term engraftment and explains outcomes. *Nat Microbiol* 2021;6:1309–18. <https://doi.org/10.1038/s41564-021-00966-0>.
- [155] Tang G, Yin W, Liu W. Is frozen fecal microbiota transplantation as effective as fresh fecal microbiota transplantation in patients with recurrent or refractory *Clostridium difficile* infection: A meta-analysis? *Diagn Microbiol Infect Dis* 2017;88:322–9. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2017.05.007>.
- [156] Rupnik M, Wilcox MH, Gerding DN. *Clostridium difficile* infection: New developments in epidemiology and pathogenesis. *Nat Rev Microbiol* 2009;7:526–36. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2164>.
- [157] Kelly CR, Yen EF, Grinspan AM, Kahn SA, Atreja A, Lewis JD, et al. Fecal Microbiota Transplantation Is Highly Effective in Real-World Practice: Initial Results From the FMT National Registry. *Gastroenterology* 2021;160:183–192.e3. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.09.038>.
- [158] Singh T, Bedi P, Bumrah K, Gandhi D, Arora T, Verma N, et al. Fecal Microbiota Transplantation and Medical Therapy for *Clostridium difficile* Infection. *J Clin Gastroenterol* 2021; Publish Ah. <https://doi.org/10.1097/mcg.0000000000001610>.
- [159] Costello SP, Hughes PA, Waters O, Bryant R V., Vincent AD, Blatchford P, et al. Effect of Fecal Microbiota Transplantation on 8-Week Remission in Patients with Ulcerative Colitis: A Randomized Clinical Trial. *JAMA - J. Am. Med. Assoc.*, vol. 321, JAMA; 2019, p. 156–64. <https://doi.org/10.1001/jama.2018.20046>.
- [160] Liu X, Li Y, Wu K, Shi Y, Chen M. Fecal Microbiota Transplantation as Therapy for Treatment of Active Ulcerative Colitis: A Systematic Review and Meta-

- Analysis. *Gastroenterol Res Pract* 2021;2021. <https://doi.org/10.1155/2021/6612970>.
- [161] Zatorski H, Nakov R. Faecal Microbiota Transplantation in Inflammatory Bowel Disease: Current Concepts and Future Challenges. *Curr Drug Targets* 2020;21:1440–7. <https://doi.org/10.2174/1389450121666200602125507>.
- [162] Fehily SR, Basnayake C, Wright EK, Kamm MA. Fecal microbiota transplantation therapy in Crohn's disease: Systematic review. *J Gastroenterol Hepatol* 2021;36:2672–86. <https://doi.org/10.1111/jgh.15598>.
- [163] Bajaj JS, Kassam Z, Fagan A, Gavis EA, Liu E, Cox JJ, et al. Fecal microbiota transplant from a rational stool donor improves hepatic encephalopathy: A randomized clinical trial. *Hepatology* 2017;66:1727–38. <https://doi.org/10.1002/hep.29306>.
- [164] Davar D, Dzutsev AK, McCulloch JA, Rodrigues RR, Chauvin JM, Morrison RM, et al. Fecal microbiota transplant overcomes resistance to anti-PD-1 therapy in melanoma patients. *Science* (80-) 2021;371:595–602. <https://doi.org/10.1126/science.abf3363>.
- [165] Baruch EN, Youngster I, Ben-Betzalel G, Ortenberg R, Lahat A, Katz L, et al. Fecal microbiota transplant promotes response in immunotherapy-refractory melanoma patients. *Science* (80-) 2021;371:602–9. <https://doi.org/10.1126/science.abb5920>.
- [166] Bruno G, Gagliardi A, Oliva A, Trancassini M, Macone A, Cicerone C, et al. Fecal Microbial Transplantation impact on gut microbiota composition and metabolome, microbial translocation and T-lymphocyte immune activation in recurrent *Clostridium difficile* infection patients. *New Microbiol* 2019;42:221–4.
- [167] Vétizou M, Pitt JM, Daillère R, Lepage P, Waldschmitt N, Flament C, et al. Anticancer immunotherapy by CTLA-4 blockade relies on the gut microbiota. *Science* (80-) 2015;350:1079–84. <https://doi.org/10.1126/science.aad1329>.
- [168] Lau HCH, Sung JY, Yu J. Gut microbiota: impacts on gastrointestinal cancer immunotherapy. *Gut Microbes* 2021;13:1–21. <https://doi.org/10.1080/19490976.2020.1869504>.
- [169] Routy B, Le Chatelier E, Derosa L, Duong CPM, Alou MT, Daillère R, et al. Gut microbiome influences efficacy of PD-1-based immunotherapy against epithelial tumors. *Science* (80-) 2018;359:91–7. <https://doi.org/10.1126/science.aan3706>.
- [170] Organización Mundial de la Salud. Resistencia a los antimicrobianos: informe mundial sobre la vigilancia 2014. 2014. <https://www.who.int/antimicrobial-resistance/publications/surveillancereport/en/> (accessed August 6, 2021).
- [171] Bar-Yoseph H, Carasso S, Shklar S, Korytny A, Even Dar R, Daoud H, et al. Oral Capsulized Fecal Microbiota Transplantation for Eradication of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae Colonization With a Metagenomic Perspective. *Clin Infect Dis* 2021;73:e166–75. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa737>.
- [172] Seong H, Lee SK, Cheon JH, Yong DE, Koh H, Kang YK, et al. Fecal Microbiota Transplantation for multidrug-resistant organism: Efficacy and Response prediction. *J Infect* 2020;81:719–25. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2020.09.003>.
- [173] García-Fernández S, Morosini MI, Cobo M, Foruny JR, López-Sanromán A, Cobo J, et al. Gut eradication of VIM-1 producing ST9 *Klebsiella oxytoca* after fecal microbiota transplantation for diarrhea caused by a *Clostridium difficile* hypervirulent R027 strain. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2016;86:470–1. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2016.09.004>.
- [174] Bar-Yoseph H, Hussein K, Braun E, Paul M. Natural history and decolonization strategies for ESBL/carbapenem-resistant Enterobacteriaceae carriage: Systematic review and meta-analysis. *J Antimicrob Chemother* 2016;71:2729–39. <https://doi.org/10.1093/jac/dkw221>.
- [175] Bianchi F, Duque ALRF, Saad SMI, Sivieri K. Gut microbiome approaches to treat obesity in humans. *Appl Microbiol Biotechnol* 2019;103:1081–94. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9570-8>.
- [176] Engen PA, Zaferiou A, Rasmussen H, Naqib A, Green SJ, Fogg LF, et al. Single-Arm, Non-randomized, Time Series, Single-Subject Study of Fecal Microbiota Transplantation in Multiple Sclerosis. *Front Neurol* 2020;11. <https://doi.org/10.3389/fneur.2020.00978>.
- [177] Kang D-W, Adams JB, Vargason T, Santiago M, Hahn J, Krajmalnik-Brown R. Distinct Fecal and Plasma Metabolites in Children with Autism Spectrum Disorders and Their Modulation after Microbiota Transfer Therapy. *MSphere* 2020;5. <https://doi.org/10.1128/msphere.00314-20>.
- [178] Vendrik KEW, Ooijsaar RE, de Jong PRC, Laman JD, van Oosten BW, van Hilten JJ, et al. Fecal Microbiota Transplantation in Neurological Disorders. *Front Cell Infect Microbiol* 2020;10. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00098>.
- [179] Panchal P, Budree S, Scheeler A, Medina G, Seng M, Wong WF, et al. Scaling Safe Access to Fecal Microbiota Transplantation: Past, Present, and Future. *Curr Gastroenterol Rep* 2018;20. <https://doi.org/10.1007/s11894-018-0619-8>.
- [180] Jalanka J, Hillamaa A, Satokari R, Mattila E, Anttila VJ, Arkkila P. The long-term effects of faecal microbiota transplantation for gastrointestinal symptoms and general health in patients with recurrent *Clostridium difficile* infection. *Aliment Pharmacol Ther* 2018;47:371–9. <https://doi.org/10.1111/apt.14443>.
- [181] Ooijsaar RE, van Nood E, Goorhuis A, Terveer EM, van Prehn J, Verspaget HW, et al. Ten-year follow-up of patients treated with fecal microbiota transplantation for recurrent clostridioides difficile infection from a randomized controlled trial and review of the literature. *Microorganisms* 2021;9:1–13. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9030548>.
- [182] Perler BK, Chen B, Phelps E, Allegretti JR, Fischer M, Ganapini V, et al. Long-term efficacy and safety of fecal microbiota transplantation for treatment of recurrent clostridioides difficile infection. *J Clin Gastroenterol* 2020;54:701–6. <https://doi.org/10.1097/MCG.0000000000001281>.
- [183] Saha S, Mara K, Pardi DS, Khanna S. Long-term Safety of Fecal Microbiota Transplantation for Recurrent Clostridioides difficile Infection. *Gastroenterology* 2021;160:1961-1969.e3. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2021.01.010>.
- [184] Aira A, Rubio E, Vergara Gómez A, Fehér C, Casals-Pascual C, González B, et al. rUTI

- Resolution After FMT for *Clostridioides difficile* Infection: A Case Report. *Infect Dis Ther* 2021;10:1065–71. <https://doi.org/10.1007/s40121-020-00365-8>.
- [185] Girotra M, Garg S, Anand R, Song Y, Dutta SK. Fecal Microbiota Transplantation for Recurrent *Clostridium difficile* Infection in the Elderly: Long-Term Outcomes and Microbiota Changes. *Dig Dis Sci* 2016;61:3007–15. <https://doi.org/10.1007/s10620-016-4229-8>.
- [186] Mamo Y, Woodworth MH, Wang T, Dhare T, Kraft CS. Durability and Long-term Clinical Outcomes of Fecal Microbiota Transplant Treatment in Patients with Recurrent *Clostridium difficile* Infection. *Clin Infect Dis* 2018;66:1705–11. <https://doi.org/10.1093/cid/cix1097>.
- [187] Frisbee AL, Saleh MM, Young MK, Leslie JL, Simpson ME, Abhyankar MM, et al. IL-33 drives group 2 innate lymphoid cell-mediated protection during *Clostridium difficile* infection. *Nat Commun* 2019;10. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10733-9>.
- [188] Stalder T, Kapel N, Diaz S, Grenouillet F, Koch S, Limat S, et al. A systematic review of economic evaluation in fecal microbiota transplantation. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2020;41:458–66. <https://doi.org/10.1017/ice.2019.371>.
- [189] Rajasingham R, Enns EA, Khoruts A, Vaughn BP. Cost-effectiveness of treatment regimens for *clostridioides difficile* infection: An evaluation of the 2018 infectious diseases Society of America guidelines. *Clin Infect Dis* 2020;70:754–62. <https://doi.org/10.1093/cid/ciz318>.
- [190] You JHS, Jiang X, Lee WH, Chan PKS, Ng SC. Cost-effectiveness analysis of fecal microbiota transplantation for recurrent *Clostridium difficile* infection in patients with inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol Hepatol* 2020;35:1515–23. <https://doi.org/10.1111/jgh.15002>.
- [191] Gupta S, Zhu J, McCarty TR, Pruce J, Kassam Z, Kelly C, et al. Cost-effectiveness analysis of sequential fecal microbiota transplantation for fulminant *Clostridioides difficile* infection. *J Gastroenterol Hepatol* 2021;36:2432–40. <https://doi.org/10.1111/jgh.15483>.
- [192] Zhang T, Xiang J, Cui B, He Z, Li P, Chen H, et al. Cost-effectiveness analysis of fecal microbiota transplantation for inflammatory bowel disease. *Oncotarget* 2017;8:88894–903. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.21491>.
- [193] Verbeke F, Janssens Y, Wynendaele E, De Spiegeleer B. Faecal microbiota transplantation: A regulatory hurdle? *BMC Gastroenterol* 2017;17. <https://doi.org/10.1186/s12876-017-0687-5>.
- [194] Hvas CL, Baunwall SMD, Erikstrup C. Faecal microbiota transplantation: A life-saving therapy challenged by commercial claims for exclusivity. *EclinicalMedicine* 2020;24. <https://doi.org/10.1016/j.eclinm.2020.100436>.
- [195] Keller JJ, Vehreschild MJ, Hvas CL, Jørgensen SM, Kupciskas J, Link A, et al. Stool for fecal microbiota transplantation should be classified as a transplant product and not as a drug. *United Eur Gastroenterol J* 2019;7:1408–10. <https://doi.org/10.1177/2050640619887579>.
- [196] Vehreschild MJGT, Cornely OA. Fecal Microbiota Transfer 2.0. *J Infect Dis* 2016;214:169–70. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiv768>.
- [197] Korman L, Lashner B, Kraft C, Sims M, Wang EE, Brady K, et al. Fr572 24-WEEK EFFICACY AND SAFETY DATA FROM ECOSPOR-III, A PHASE 3 DOUBLE-BLIND, PLACEBO-CONTROLLED RANDOMIZED TRIAL OF SER-109, AN INVESTIGATIONAL MICROBIOME THERAPEUTIC FOR TREATMENT OF RECURRENT *CLOSTRIDIoidES* DIFFICILE INFECTION. *Gastroenterology* 2021;160:S-368-S-369. [https://doi.org/10.1016/s0016-5085\(21\)01593-6](https://doi.org/10.1016/s0016-5085(21)01593-6).
- [198] Kraft C, Khanna S, Assi M, Feuerstadt P, Harvey A, Bancke L. Sa611 INTERIM ANALYSIS OF A PHASE 3 OPEN-LABEL STUDY INDICATES SAFETY AND EFFICACY OF RBX2660, AN INVESTIGATIONAL LIVE BIOTHERAPEUTIC, IN A “REAL-WORLD” POPULATION OF PATIENTS WITH RECURRENT *CLOSTRIDIoidES* DIFFICILE INFECTION. *Gastroenterology* 2021;160:S-573. [https://doi.org/10.1016/s0016-5085\(21\)02067-9](https://doi.org/10.1016/s0016-5085(21)02067-9).
- [199] Rode AA, Chehri M, Krogsgaard LR, Heno KK, Svendsen AT, Ribberholt I, et al. Randomised clinical trial: a 12-strain bacterial mixture versus faecal microbiota transplantation versus vancomycin for recurrent *Clostridioides difficile* infections. *Aliment Pharmacol Ther* 2021;53:999–1009. <https://doi.org/10.1111/apt.16309>.
- [200] Chiang MC, Chen CL, Feng Y, Chen CC, Lien R, Chiu CH. *Lactobacillus rhamnosus* sepsis associated with probiotic therapy in an extremely preterm infant: Pathogenesis and a review for clinicians. *J Microbiol Immunol Infect* 2021;54:575–80. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2020.03.029>.
- [201] Sendil S, Shrimanker I, Mansoor Q, Goldman J, Nookala VK. *Lactobacillus rhamnosus* Bacteremia in an Immunocompromised Renal Transplant Patient. *Cureus* 2020;12. <https://doi.org/10.7759/cureus.6887>.
- [202] Yoon S, Yu J, McDowell A, Kim SH, You HJ, Ko GP. Bile salt hydrolase-mediated inhibitory effect of *Bacteroides ovatus* on growth of *Clostridium difficile*. *J Microbiol* 2017;55:892–9. <https://doi.org/10.1007/s12275-017-7340-4>.
- [203] Nagamine T, Matsumoto Y, Nakamura M. Combination probiotics may prevent *Clostridium difficile* infection among elderly patients undergoing an orthopedic surgery. *Biosci Microbiota, Food Heal* 2019;38:31–3. <https://doi.org/10.12938/bmfh.18-009>.
- [204] Fakhruddin KS, Ngo HC, Samaranayake LP. Cariogenic microbiome and microbiota of the early primary dentition: A contemporary overview. *Oral Dis* 2019;25:982–95. <https://doi.org/10.1111/odi.12932>.
- [205] Dzidic M, Collado MC, Abrahamsson T, Artacho A, Stensson M, Jenmalm MC, et al. Oral microbiome development during childhood: an ecological succession influenced by postnatal factors and associated with tooth decay. *ISME J* 2018;12:2292–306. <https://doi.org/10.1038/s41396-018-0204-z>.
- [206] Lamont RJ, Koo H, Hajishengallis G. The oral microbiota: dynamic communities and host interactions. *Nat Rev Microbiol* 2018;16:745–59. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0089-x>.
- [207] Gomez A, Nelson KE. The Oral Microbiome of Children: Development, Disease, and Implications Beyond Oral Health. *Microb Ecol* 2017;73:492–503. <https://doi.org/10.1007/s00248-016-0854-1>.

- [208] Hajishengallis G, Darveau RP, Curtis MA. The keystone-pathogen hypothesis. *Nat Rev Microbiol* 2012;10:717–25. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2873>.
- [209] Peres MA, Macpherson LMD, Weyant RJ, Daly B, Venturelli R, Mathur MR, et al. Oral diseases: a global public health challenge. *Lancet* 2019;394:249–60. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)31146-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)31146-8).
- [210] Isola G, Lo Giudice A, Polizzi A, Alibrandi A, Murabito P, Indelicato F. Identification of the different salivary Interleukin-6 profiles in patients with periodontitis: A cross-sectional study. *Arch Oral Biol* 2021;122. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2020.104997>.
- [211] Chen T, Shi Y, Wang X, Wang X, Meng F, Yang S, et al. High-throughput sequencing analyses of oral microbial diversity in healthy people and patients with dental caries and periodontal disease. *Mol Med Rep* 2017;16:127–32. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.6593>.
- [212] Solbiati J, Frias-Lopez J. Metatranscriptome of the Oral Microbiome in Health and Disease. *J Dent Res* 2018;97:492–500. <https://doi.org/10.1177/0022034518761644>.
- [213] Jiang W, Ling Z, Lin X, Chen Y, Zhang J, Yu J, et al. Pyrosequencing Analysis of Oral Microbiota Shifting in Various Caries States in Childhood. *Microb Ecol* 2014;67:962–9. <https://doi.org/10.1007/s00248-014-0372-y>.
- [214] Xu H, Tian J, Hao W, Zhang Q, Zhou Q, Shi W, et al. Oral microbiome shifts from caries-free to caries-affected status in 3-year-old Chinese children: A longitudinal study. *Front Microbiol* 2018;9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02009>.
- [215] Xu L, Chen X, Wang Y, Jiang W, Wang S, Ling Z, et al. Dynamic alterations in salivary microbiota related to dental caries and age in preschool children with deciduous dentition: A 2-year follow-up study. *Front Physiol* 2018;9. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00342>.
- [216] Kressirer CA, Smith DJ, King WF, Dobeck JM, Starr JR, Tanner ACR. *Scardovia wiggsiae* and its potential role as a caries pathogen. *J Oral Biosci* 2017;59:135–41. <https://doi.org/10.1016/j.job.2017.05.002>.
- [217] Isola G, Polizzi A, Alibrandi A, Williams RC, Leonardi R. Independent impact of periodontitis and cardiovascular disease on elevated soluble urokinase-type plasminogen activator receptor (suPAR) levels. *J Periodontol* 2021;92:896–906. <https://doi.org/10.1002/JPER.20-0242>.
- [218] Schwendicke F, Samek W, Krois J. Artificial Intelligence in Dentistry: Chances and Challenges. *J Dent Res* 2020;99:769–74. <https://doi.org/10.1177/0022034520915714>.
- [219] Hammer DAT, Ryan PD, Hammer Ø, Harper DAT. Past: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontol Electron* 2001;4:178.
- [220] Galeano J. JJ-Lab/Cancer_Lung_Microbiota: First release of Cancer Lung Repository 2020. <https://doi.org/10.5281/ZENODO.3605599>.
- [221] Demšar J, Curk T, Erjavec A, Gorup Č, Hočevcar T, Milutinović M, et al. Orange: Data Mining Toolbox in Python. *J Mach Learn Res* 2013;14:2349–53.
- [222] Ribeiro AA, Azcarate-Peril MA, Cadenas MB, Butz N, Paster BJ, Chen T, et al. The oral bacterial microbiome of occlusal surfaces in children and its association with diet and caries. *PLoS One* 2017;12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180621>.
- [223] Ledder RG, Kampoo K, Teanpaisan R, McBain AJ. Oral Microbiota in Severe Early Childhood Caries in Thai Children and Their Families: A Pilot Study. *Front Microbiol* 2018;9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02420>.
- [224] Silva MJ, Kilpatrick NM, Craig JM, Manton DJ, Leong P, Burgner DP, et al. Genetic and early-life environmental influences on dental caries risk: A twin study. *Pediatrics* 2019;143. <https://doi.org/10.1542/peds.2018-3499>.
- [225] Stahringer SS, Clemente JC, Corley RP, Hewitt J, Knights D, Walters WA, et al. Nurture trumps nature in a longitudinal survey of salivary bacterial communities in twins from early adolescence to early adulthood. *Genome Res* 2012;22:2146–52. <https://doi.org/10.1101/gr.140608.112>.
- [226] Wu H, Zeng B, Li B, Ren B, Zhao J, Li M, et al. Research on oral microbiota of monozygotic twins with discordant caries experience - In vitro and in vivo study. *Sci Rep* 2018;8. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25636-w>.
- [227] Zhou J, Jiang N, Wang S, Hu X, Jiao K, He X, et al. Exploration of human salivary microbiomes-insights into the novel characteristics of microbial community structure in caries and caries-free subjects. *PLoS One* 2016;11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147039>.
- [228] Lovelina FD, Shastri SM, Kumar PDM. Assessment of the oral health status of monozygotic and dizygotic twins - a comparative study. *Oral Health Prev Dent* 2012;10:135–9. <https://doi.org/10.3290/j.ohpd.a28000>.
- [229] Zheng Y, Zhang M, Li J, Li Y, Teng F, Jiang H, et al. Comparative Analysis of the Microbial Profiles in Supragingival Plaque Samples Obtained From Twins With Discordant Caries Phenotypes and Their Mothers. *Front Cell Infect Microbiol* 2018;8. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00361>.
- [230] Simón-Soro A, Mira A. Solving the etiology of dental caries. *Trends Microbiol* 2015;23:76–82. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.10.010>.
- [231] Richards VP, Alvarez AJ, Luce AR, Bedenbaugh M, Mitchell ML, Burne RA, et al. Microbiomes of sitespecific dental plaques from children with different caries status. *Infect Immun* 2017;85. <https://doi.org/10.1128/IAI.00106-17>.
- [232] Yasunaga H, Takeshita T, Shibata Y, Furuta M, Shimazaki Y, Akifusa S, et al. Exploration of bacterial species associated with the salivary microbiome of individuals with a low susceptibility to dental caries. *Clin Oral Investig* 2017;21:2399–406. <https://doi.org/10.1007/S00784-016-2035-5>.
- [233] Belstrøm D, Constancias F, Liu Y, Yang L, Drautz-Moses DI, Schuster SC, et al. Metagenomic and metatranscriptomic analysis of saliva reveals disease-associated microbiota in patients with periodontitis and dental caries. *Npj Biofilms Microbiomes* 2017;3. <https://doi.org/10.1038/S41522-017-0031-4>.
- [234] Wang Y, Zhang J, Chen X, Jiang W, Wang S, Xu L, et al. Profiling of oral microbiota in early childhood caries using single-molecule real-time sequencing. *Front Microbiol* 2017;8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02244>.
- [235] López-López A, Camelo-Castillo A, Ferrer MD,

- Simon-Soro Á, Mira A. Health-associated niche inhabitants as oral probiotics: The case of *Streptococcus dentisani*. *Front Microbiol* 2017;8. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2017.00379>.
- [236] Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social. Subdirección General de Información Sanitaria e Innovación. Registro de Atención Especializada/Conjunto Mínimo Básico de Datos (RAE-CMBD) de los hospitales del Sistema Nacional de Salud. Available online: 2020.
- [237] Kapadia BH, Berg RA, Daley JA, Fritz J, Bhawe A, Mont MA. Periprosthetic joint infection. *Lancet* 2016;387:386–94. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)61798-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61798-0).
- [238] Escudero-Sanchez R, Senneville E, Digumber M, Soriano A, del Toro MD, Bahamonde A, et al. Suppressive antibiotic therapy in prosthetic joint infections: a multicentre cohort study. *Clin Microbiol Infect* 2020;26:499–505. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2019.09.007>.
- [239] Leijtens B, Weerwag L, Schreurs BW, Kullberg B-J, Rijnen W. Clinical Outcome of Antibiotic Suppressive Therapy in Patients with a Prosthetic Joint Infection after Hip Replacement. *J Bone Jt Infect* 2019;4:268–76. <https://doi.org/10.7150/JBIL.37262>.
- [240] Prendki V, Ferry T, Sergeant P, Oziol E, Forestier E, Fraisse T, et al. Prolonged suppressive antibiotic therapy for prosthetic joint infection in the elderly: a national multicentre cohort study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2017;36:1577–85. <https://doi.org/10.1007/s10096-017-2971-2>.
- [241] Wouthuyzen-Bakker M, Nijman JM, Kampinga GA, Assen S van, Jutte PC. Efficacy of Antibiotic Suppressive Therapy in Patients with a Prosthetic Joint Infection. *J Bone Jt Infect* 2017;2:77–83. <https://doi.org/10.7150/JBIL.17353>.
- [242] Jernberg C, Löfmark S, Edlund C, Jansson JK. Long-term ecological impacts of antibiotic administration on the human intestinal microbiota. *ISME J* 2007;1:56–66. <https://doi.org/10.1038/ISMEJ.2007.3>.
- [243] Jakobsson HE, Jernberg C, Andersson AF, Sjölund-Karlsson M, Jansson JK, Engstrand L. Short-term antibiotic treatment has differing long-term impacts on the human throat and gut microbiome. *PLoS One* 2010;5. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009836>.
- [244] Burdet C, Nguyen TT, Duval X, Ferreira S, Andremon A, Guedj J, et al. Impact of antibiotic gut exposure on the temporal changes in microbiome diversity. *Antimicrob Agents Chemother* 2019;63. <https://doi.org/10.1128/AAC.00820-19>.
- [245] Becattini S, Taur Y, Pamer EG. Antibiotic-Induced Changes in the Intestinal Microbiota and Disease. *Trends Mol Med* 2016;22:458–78. <https://doi.org/10.1016/J.MOLMED.2016.04.003>.
- [246] Lange K, Buerger M, Stallmach A, Bruns T. Effects of Antibiotics on Gut Microbiota. *Dig Dis* 2016;34:260–8. <https://doi.org/10.1159/000443360>.
- [247] Bray JR, Curtis JT. An Ordination of the Upland Forest Communities of Southern Wisconsin. *Ecol Monogr* 1957;27:325–49. <https://doi.org/10.2307/1942268>.
- [248] Vázquez-Baeza Y, Pirrung M, Gonzalez A, Knight R. EMPeror: A tool for visualizing high-throughput microbial community data. *Gigascience* 2013;2. <https://doi.org/10.1186/2047-217X-2-16>.
- [249] Jernberg C, Löfmark S, Edlund C, Jansson JK. Long-term impacts of antibiotic exposure on the human intestinal microbiota. *Microbiology* 2010;156:3216–23. <https://doi.org/10.1099/MIC.0.040618-0>.
- [250] Pallega A, Mikkelsen KH, Forslund SK, Kashani A, Allin KH, Nielsen T, et al. Recovery of gut microbiota of healthy adults following antibiotic exposure. *Nat Microbiol* 2018;3:1255–65. <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0257-9>.
- [251] Fouhy F, Guinane CM, Hussey S, Wall R, Ryan CA, Dempsey EM, et al. High-throughput sequencing reveals the incomplete, short-term recovery of infant gut microbiota following parenteral antibiotic treatment with ampicillin and gentamicin. *Antimicrob Agents Chemother* 2012;56:5811–20. <https://doi.org/10.1128/AAC.00789-12>.
- [252] Dethlefsen L, Relman DA. Incomplete recovery and individualized responses of the human distal gut microbiota to repeated antibiotic perturbation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108:4554–61. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1000087107>.
- [253] Pérez-Cobas AE, Gosalbes MJ, Friedrichs A, Knecht H, Artacho A, Eismann K, et al. Gut microbiota disturbance during antibiotic therapy: A multi-omic approach. *Gut* 2013;62:1591–601. <https://doi.org/10.1136/GUTJNL-2012-303184>.
- [254] Panda S, El Khader I, Casellas F, López Vivancos J, García Cors M, Santiago A, et al. Short-term effect of antibiotics on human gut microbiota. *PLoS One* 2014;9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095476>.
- [255] Raymond F, Ouameur AA, Déraspe M, Iqbal N, Gingras H, Dridi B, et al. The initial state of the human gut microbiome determines its reshaping by antibiotics. *ISME J* 2016;10:707–20. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.148>.
- [256] Li R, Wang H, Shi Q, Wang N, Zhang Z, Xiong C, et al. Effects of oral florfenicol and azithromycin on gut microbiota and adipogenesis in mice. *PLoS One* 2017;12. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0181690>.
- [257] Thuny F, Richet H, Casalta JP, Angelakis E, Habib G, Raoult D. Vancomycin treatment of infective endocarditis is linked with recently acquired obesity. *PLoS One* 2010;5. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009074>.
- [258] Angelakis E, Million M, Kankoe S, Lagier JC, Armougom F, Giorgi R, et al. Abnormal weight gain and gut microbiota modifications are side effects of long-term doxycycline and hydroxychloroquine treatment. *Antimicrob Agents Chemother* 2014;58:3342–7. <https://doi.org/10.1128/AAC.02437-14>.
- [259] Schubert AM, Sinani H, Schloss PD. Antibiotic-induced alterations of the murine gut microbiota and subsequent effects on colonization resistance against *Clostridium difficile*. *MBio* 2015;6. <https://doi.org/10.1128/MBIO.00974-15>.
- [260] Rodríguez-Villodres Á, Martín-Gandul C, Peñalva G, Guisado-Gil AB, Crespo-Rivas JC, Pachón-Ibáñez ME, et al. Prevalence and risk factors for multidrug-resistant organisms colonization in long-term care facilities around the world: A review. *Antibiotics* 2021;10. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10060680>.
- [261] Ng KM, Aranda-Díaz A, Tropini C, Frankel MR, Van Treuren W, O’Laughlin CT, et al. Recovery of the Gut Microbiota after Antibiotics Depends on

- Host Diet, Community Context, and Environmental Reservoirs. *Cell Host Microbe* 2019;26:650-665.e4. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.10.011>.
- [262] Morjaria S, Schluter J, Taylor BP, Littmann ER, Carter RA, Fontana E, et al. Antibiotic-induced shifts in fecal microbiota density and composition during hematopoietic stem cell transplantation. *Infect Immun* 2019;87. <https://doi.org/10.1128/IAI.00206-19>.
- [263] Leong KSW, Derriak JGB, Hofman PL, Cutfield WS. Antibiotics, gut microbiome and obesity. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2018;88:185-200. <https://doi.org/10.1111/cen.13495>.
- [264] Yi H, Kim HS. Antibiotic Scars Left on the Gut Microbiota from the Stringent Response. *Trends Microbiol* 2018;26:735-7. <https://doi.org/10.1016/J.TIM.2018.06.003>.
- [265] Wei S, Mortensen MS, Stokholm J, Brejnrod AD, Thorsen J, Rasmussen MA, et al. Short- and long-term impacts of azithromycin treatment on the gut microbiota in children: A double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *EBioMedicine* 2018;38:265-72. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2018.11.035>.
- [266] Kim S, Covington A, Pamer EG. The intestinal microbiota: Antibiotics, colonization resistance, and enteric pathogens. *Immunol Rev* 2017;279:90-105. <https://doi.org/10.1111/imr.12563>.
- [267] Fujisaka S, Ussar S, Clish C, Devkota S, Dreyfuss JM, Sakaguchi M, et al. Antibiotic effects on gut microbiota and metabolism are host dependent. *J Clin Invest* 2016;126:4430-43. <https://doi.org/10.1172/JCI86674>.
- [268] Maier L, Pruteanu M, Kuhn M, Zeller G, Telzerow A, Anderson EE, et al. Extensive impact of non-antibiotic drugs on human gut bacteria. *Nature* 2018;555:623-8. <https://doi.org/10.1038/nature25979>.
- [269] Burdet C, Sayah-Jeanne S, Nguyen TT, Miossec C, Saint-Lu N, Pulse M, et al. Protection of hamsters from mortality by reducing fecal moxifloxacin concentration with DAV131A in a model of moxifloxacin-induced *Clostridium difficile* colitis. *Antimicrob Agents Chemother* 2017;61. <https://doi.org/10.1128/AAC.00543-17>.
- [270] Guk J, Guedj J, Burdet C, Andreumont A, de Gunzburg J, Ducher A, et al. Modeling the Effect of DAV132, a Novel Colon-Targeted Adsorbent, on Fecal Concentrations of Moxifloxacin and Gut Microbiota Diversity in Healthy Volunteers. *Clin Pharmacol Ther* 2021;109:1045-54. <https://doi.org/10.1002/cpt.1977>.
- [271] Alsumali A, Al-Hawag A, Samnaliev M, Egualé T. Systematic assessment of decision analytic models for the cost-effectiveness of bariatric surgery for morbid obesity. *Surg Obes Relat Dis* 2018;14:1041-59. <https://doi.org/10.1016/j.soard.2018.03.005>.
- [272] Castellana M, Procino F, Biacchi E, Zupo R, Lampignano L, Castellana F, et al. Roux-en-Y Gastric Bypass vs Sleeve Gastrectomy for Remission of Type 2 Diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2021;106:922-33. <https://doi.org/10.1210/clinem/dgaa737>.
- [273] Arakawa R, Febres G, Cheng B, Krikhely A, Bessler M, Korner J. Prospective study of gut hormone and metabolic changes after laparoscopic sleeve gastrectomy and Roux-en-Y gastric bypass. *PLoS One* 2020;15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0236133>.
- [274] Duranti S, Ferrario C, van Sinderen D, Ventura M, Turrone F. Obesity and microbiota: An example of an intricate relationship. *Genes Nutr* 2017;12. <https://doi.org/10.1186/s12263-017-0566-2>.
- [275] Luijten JCHBM, Vugt G, Nieuwenhuijzen GAP, Luyer MDP. The Importance of the Microbiome in Bariatric Surgery: a Systematic Review. *Obes Surg* 2019;29:2338-49. <https://doi.org/10.1007/s11695-019-03863-y>.
- [276] Gutiérrez-Repiso C, Moreno-Indias I, Hollanda A de, Martín-Núñez GM, Vidal J, Tinahones FJ. Gut microbiota specific signatures are related to the successful rate of bariatric surgery. *Am J Transl Res* 2019;11:942-52.
- [277] Sánchez-Alcoholado L, Gutiérrez-Repiso C, Gómez-Pérez AM, García-Fuentes E, Tinahones FJ, Moreno-Indias I. Gut microbiota adaptation after weight loss by Roux-en-Y gastric bypass or sleeve gastrectomy bariatric surgeries. *Surg Obes Relat Dis* 2019;15:1888-95. <https://doi.org/10.1016/j.soard.2019.08.551>.
- [278] Nogacka AM, Salazar N, Arboleya S, Ruas-Madiedo P, Mancabelli L, Suarez A, et al. In vitro evaluation of different prebiotics on the modulation of gut microbiota composition and function in morbid obese and normal-weight subjects. *Int J Mol Sci* 2020;21. <https://doi.org/10.3390/ijms21030906>.
- [279] Redruello B, Ladero V, Cuesta I, Álvarez-Buylla JR, Martín MC, Fernández M, et al. A fast, reliable, ultra high performance liquid chromatography method for the simultaneous determination of amino acids, biogenic amines and ammonium ions in cheese, using diethyl ethoxymethylenemalonate as a derivatising agent. *Food Chem* 2013;139:1029-35. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.01.071>.
- [280] Martínez-Cuesta MC, del Campo R, Garriga-García M, Peláez C, Requena T. Taxonomic Characterization and Short-Chain Fatty Acids Production of the Obese Microbiota. *Front Cell Infect Microbiol* 2021;11. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.598093>.
- [281] Crovesy L, Masterson D, Rosado EL. Profile of the gut microbiota of adults with obesity: a systematic review. *Eur J Clin Nutr* 2020;74:1251-62. <https://doi.org/10.1038/s41430-020-0607-6>.
- [282] Palmisano S, Campisciano G, Silvestri M, Guerra M, Giuricin M, Casagrande B, et al. Changes in Gut Microbiota Composition after Bariatric Surgery: a New Balance to Decode. *J Gastrointest Surg* 2020;24:1736-46. <https://doi.org/10.1007/s11605-019-04321-x>.
- [283] Magne F, Gotteland M, Gauthier L, Zazueta A, Pesoa S, Navarrete P, et al. The Bacillota/bacteroidetes ratio: A relevant marker of gut dysbiosis in obese patients? *Nutrients* 2020;12. <https://doi.org/10.3390/nu12051474>.
- [284] Aron-Wisniewsky J, Prifti E, Belda E, Ichou F, Kayser BD, Dao MC, et al. Major microbiota dysbiosis in severe obesity: Fate after bariatric surgery. *Gut* 2019;68:70-82. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2018-316103>.
- [285] Koulas SG, Stefanou CK, Stefanou SK, Tepelenis K, Zikos N, Tepetes K, et al. Gut Microbiota in Patients with Morbid Obesity Before and After Bariatric Surgery: a Ten-Year Review Study (2009-2019). *Obes Surg* 2021;31:317-26. <https://doi.org/10.1007/s11695-020-05074-2>.
- [286] Morales-Marroquín E, Hanson B, Greathouse L, de la Cruz-Munoz N, Messiah SE. Comparison of

- methodological approaches to human gut microbiota changes in response to metabolic and bariatric surgery: A systematic review. *Obes Rev* 2020;21. <https://doi.org/10.1111/obr.13025>.
- [287] Gutiérrez-Repiso C, Moreno-Indias I, Tinahones FJ. Shifts in gut microbiota and their metabolites induced by bariatric surgery. Impact of factors shaping gut microbiota on bariatric surgery outcomes. *Rev Endocr Metab Disord* 2021. <https://doi.org/10.1007/s11154-021-09676-8>.
- [288] Palleja A, Kashani A, Allin KH, Nielsen T, Zhang C, Li Y, et al. Roux-en-Y gastric bypass surgery of morbidly obese patients induces swift and persistent changes of the individual gut microbiota. *Genome Med* 2016;8. <https://doi.org/10.1186/s13073-016-0312-1>.
- [289] Kong LC, Tap J, Aron-Wisniewsky J, Pelloux V, Basdevant A, Bouillot JL, et al. Gut microbiota after gastric bypass in human obesity: Increased richness and associations of bacterial genera with adipose tissue genes. *Am J Clin Nutr* 2013;98:16–24. <https://doi.org/10.3945/ajcn.113.058743>.
- [290] Graessler J, Qin Y, Zhong H, Zhang J, Licinio J, Wong ML, et al. Metagenomic sequencing of the human gut microbiome before and after bariatric surgery in obese patients with type 2 diabetes: Correlation with inflammatory and metabolic parameters. *Pharmacogenomics J* 2013;13:514–22. <https://doi.org/10.1038/tpj.2012.43>.
- [291] Murphy R, Tsai P, Jülig M, Liu A, Plank L, Booth M. Differential Changes in Gut Microbiota After Gastric Bypass and Sleeve Gastrectomy Bariatric Surgery Vary According to Diabetes Remission. *Obes Surg* 2017;27:917–25. <https://doi.org/10.1007/s11695-016-2399-2>.
- [292] Schwartz A, Taras D, Schäfer K, Beijer S, Bos NA, Donus C, et al. Microbiota and SCFA in lean and overweight healthy subjects. *Obesity* 2010;18:190–5. <https://doi.org/10.1038/oby.2009.167>.
- [293] Farup PG, Maseng MG. Are faecal microbiota analyses on species-level suitable clinical biomarkers? A pilot study in subjects with morbid obesity. *Microorganisms* 2021;9. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9030664>.
- [294] Amaretti A, Gozzoli C, Simone M, Raimondi S, Righini L, Pérez-Brocal V, et al. Profiling of Protein Degradation in Cultures of Human Gut Microbiota. *Front Microbiol* 2019;10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02614>.
- [295] Haange SB, Jehmlich N, Krügel U, Hintschich C, Wehrmann D, Hankir M, et al. Gastric bypass surgery in a rat model alters the community structure and functional composition of the intestinal microbiota independently of weight loss. *Microbiome* 2020;8. <https://doi.org/10.1186/s40168-020-0788-1>.
- [296] Li J V., Ashrafian H, Bueter M, Kinross J, Sands C, Le Roux CW, et al. Metabolic surgery profoundly influences gut microbial - Host metabolic cross-talk. *Gut* 2011;60:1214–23. <https://doi.org/10.1136/gut.2010.234708>.
- [297] Delgado S, Ruas-Madiedo P, Suárez A, Mayo B. Interindividual differences in microbial counts and biochemical-associated variables in the feces of healthy Spanish adults. *Dig Dis Sci* 2006;51:737–43. <https://doi.org/10.1007/s10620-006-3200-5>.
- [298] Holeček M. Branched-chain amino acids and branched-chain keto acids in hyperammonemic states: Metabolism and as supplements. *Metabolites* 2020;10:1–13. <https://doi.org/10.3390/metabo10080324>.
- [299] Ciobărcă D, Cătoi AF, Copăescu C, Miere D, Crișan G. Bariatric surgery in obesity: Effects on gut microbiota and micronutrient status. *Nutrients* 2020;12. <https://doi.org/10.3390/nu12010235>.
- [300] Assal K Al, Prifti E, Belda E, Sala P, Clément K, Dao MC, et al. Gut microbiota profile of obese diabetic women submitted to Roux-en-Y gastric bypass and its association with food intake and postoperative diabetes remission. *Nutrients* 2020;12. <https://doi.org/10.3390/nu12020278>.
- [301] Pucci A, Batterham RL. Mechanisms underlying the weight loss effects of RYGB and SG: similar, yet different. *J Endocrinol Invest* 2019;42:117–28. <https://doi.org/10.1007/s40618-018-0892-2>.
- [302] Wang C, Zhang H, Liu H, Zhang H, Bao Y, Di J, et al. The genus *Sutterella* is a potential contributor to glucose metabolism improvement after Roux-en-Y gastric bypass surgery in T2D. *Diabetes Res Clin Pract* 2020;162. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2020.108116>.
- [303] Sanchis-Chordà J, del Pulgar EMG, Carrasco-Luna J, Benítez-Páez A, Sanz Y, Codoñer-Franch P. *Bifidobacterium pseudocatenulatum* CECT 7765 supplementation improves inflammatory status in insulin-resistant obese children. *Eur J Nutr* 2019;58:2789–800. <https://doi.org/10.1007/s00394-018-1828-5>.
- [304] Zhang M, Sun K, Wu Y, Yang Y, Tso P, Wu Z. Interactions between Intestinal microbiota and host immune response in inflammatory bowel disease. *Front Immunol* 2017;8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00942>.
- [305] Kellermayer R, Zilbauer M. The Gut Microbiome and the Triple Environmental Hit Concept of Inflammatory Bowel Disease Pathogenesis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2020;71:589–95. <https://doi.org/10.1097/MPG.0000000000002908>.
- [306] Zou J, Liu C, Jiang S, Qian D, Duan J. Cross talk between gut microbiota and intestinal mucosal immunity in the development of ulcerative colitis. *Infect Immun* 2021;89. <https://doi.org/10.1128/IAI.00014-21>.
- [307] Forbes JD, Van Domselaar G, Bernstein CN. Microbiome survey of the inflamed and noninflamed gut at different compartments within the gastrointestinal tract of inflammatory bowel disease patients. *Inflamm Bowel Dis* 2016;22:817–25. <https://doi.org/10.1097/MIB.0000000000000684>.
- [308] Yamamoto-Furusho JK, Posadas-Sánchez R, Alvarez-León E, Vargas-Alarcón G. Protective role of Interleukin 27 (IL-27) gene polymorphisms in patients with ulcerative colitis. *Immunol Lett* 2016;172:79–83. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2016.02.010>.
- [309] Atarashi K, Tanoue T, Ando M, Kamada N, Nagano Y, Narushima S, et al. Th17 Cell Induction by Adhesion of Microbes to Intestinal Epithelial Cells. *Cell* 2015;163:367–80. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.08.058>.
- [310] Ueno A, Ghosh A, Hung D, Li J, Jijon H. Th17 plasticity and its changes associated with inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2015;21:12283–95. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i43.12283>.
- [311] Paramsothy S, Paramsothy R, Rubin DT, Kamm MA, Kaakoush NO, Mitchell HM, et al. Faecal

- microbiota transplantation for inflammatory bowel disease: A systematic review and meta-analysis. *J Crohn's Colitis* 2017;11:1180–99. <https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjx063>.
- [312] Green JE, Davis JA, Berk M, Hair C, Loughman A, Castle D, et al. Efficacy and safety of fecal microbiota transplantation for the treatment of diseases other than *Clostridium difficile* infection: a systematic review and meta-analysis. *Gut Microbes* 2020;12:1–25. <https://doi.org/10.1080/19490976.2020.1854640>.
- [313] Kellermayer R. Fecal microbiota transplantation: Great potential with many challenges. *Transl Gastroenterol Hepatol* 2019;4. <https://doi.org/10.21037/tgh.2019.05.10>.
- [314] Sokol H. Toward rational donor selection in faecal microbiota transplantation for IBD. *J Crohn's Colitis* 2016;10:375–6. <https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjw005>.
- [315] Paramsothy S, Nielsen S, Kamm MA, Deshpande NP, Faith JJ, Clemente JC, et al. Specific Bacteria and Metabolites Associated With Response to Fecal Microbiota Transplantation in Patients With Ulcerative Colitis. *Gastroenterology* 2019;156:1440–1454.e2. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2018.12.001>.
- [316] Paramsothy S, Kamm MA, Kaakoush NO, Walsh AJ, van den Bogaerde J, Samuel D, et al. Multidonor intensive faecal microbiota transplantation for active ulcerative colitis: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2017;389:1218–28. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)30182-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)30182-4).
- [317] Cold F, Browne PD, Günther S, Halkjaer SI, Petersen AM, Al-Gibouri Z, et al. Multidonor FMT capsules improve symptoms and decrease fecal calprotectin in ulcerative colitis patients while treated—an open-label pilot study. *Scand J Gastroenterol* 2019;54:289–96. <https://doi.org/10.1080/00365521.2019.1585939>.
- [318] Steube A, Vital M, Grunert P, Pieper DH, Stallmach A. Long-term multidonor faecal microbiota transfer by oral capsules for active ulcerative colitis. *J Crohn's Colitis* 2019;13:1480–1. <https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjz073>.
- [319] Weström B, Arévalo Sureda E, Pierzynowska K, Pierzynowski SG, Pérez-Cano FJ. The Immature Gut Barrier and Its Importance in Establishing Immunity in Newborn Mammals. *Front Immunol* 2020;11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01153>.
- [320] Walmsley RS, Ayres RCS, Pounder RE, Allan RN. A simple clinical colitis activity index. *Gut* 1998;43:29–32. <https://doi.org/10.1136/gut.43.1.29>.
- [321] Schroeder KW, Tremaine WJ, Ilstrup DM. Coated Oral 5-Aminosalicylic Acid Therapy for Mildly to Moderately Active Ulcerative Colitis. *N Engl J Med* 1987;317:1625–9. <https://doi.org/10.1056/nejm198712243172603>.
- [322] Silverberg MS, Satsangi J, Ahmad T, Arnott IDR, Bernstein CN, Brant SR, et al. Toward an integrated clinical, molecular and serological classification of inflammatory bowel disease: report of a Working Party of the 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology. *Can J Gastroenterol* 2005;19 Suppl A:5A–36A. <https://doi.org/10.1155/2005/269076>.
- [323] Byndloss MX, Litvak Y, Bäumlér AJ. Microbiota-nourishing Immunity and Its Relevance for Ulcerative Colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2019;25:811–5. <https://doi.org/10.1093/ibd/izz004>.
- [324] Ahlawat S, Kumar P, Mohan H, Goyal S, Sharma KK. Inflammatory bowel disease: tri-directional relationship between microbiota, immune system and intestinal epithelium. *Crit Rev Microbiol* 2021;47:254–73. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2021.1876631>.
- [325] Zhao HL, Chen SZ, Xu HM, Zhou YL, He J, Huang HL, et al. Efficacy and safety of fecal microbiota transplantation for treating patients with ulcerative colitis: A systematic review and meta-analysis. *J Dig Dis* 2020;21:534–48. <https://doi.org/10.1111/1751-2980.12933>.
- [326] Dang XF, Qing-Xi Wang, Yin Z, Sun L, Yang WH. Recurrence of moderate to severe ulcerative colitis after fecal microbiota transplantation treatment and the efficacy of re-FMT: a case series. *BMC Gastroenterol* 2020;20. <https://doi.org/10.1186/s12876-020-01548-w>.
- [327] Haifer C, Saikal A, Paramsothy R, Kaakoush NO, Leong RW, Borody TJ, et al. Response to faecal microbiota transplantation in ulcerative colitis is not sustained long term following induction therapy. *Gut* 2020. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2020-323581>.
- [328] Schierová D, Březina J, Mrázek J, Fliegerová KO, Kvasnová S, Bajer L, et al. Gut Microbiome Changes in Patients with Active Left-Sided Ulcerative Colitis after Fecal Microbiome Transplantation and Topical 5-aminosalicylic Acid Therapy. *Cells* 2020;9. <https://doi.org/10.3390/cells9102283>.
- [329] Ng SC, Kamm MA, Yeoh YK, Chan PKS, Zuo T, Tang W, et al. Scientific frontiers in faecal microbiota transplantation: joint document of Asia-Pacific Association of Gastroenterology (APAGE) and Asia-Pacific Society for Digestive Endoscopy (APSDE). *Gut* 2020;69:83–91. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2019-319407>.
- [330] Sood A, Singh A, Mahajan R, Midha V, Kaur K, Singh D, et al. Clinical Predictors of Response to Faecal Microbiota Transplantation in Patients with Active Ulcerative Colitis. *J Crohn's Colitis* 2021;15:238–43. <https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjaa163>.
- [331] Fang H, Fu L, Li X, Lu C, Su Y, Xiong K, et al. Long-term efficacy and safety of monotherapy with a single fresh fecal microbiota transplant for recurrent active ulcerative colitis: a prospective randomized pilot study. *Microb Cell Fact* 2021;20. <https://doi.org/10.1186/s12934-021-01513-6>.
- [332] Li Q, Ding X, Liu K, Marcella C, Liu X, Zhang T, et al. Fecal Microbiota Transplantation for Ulcerative Colitis: The Optimum Timing and Gut Microbiota as Predictors for Long-Term Clinical Outcomes. *Clin Transl Gastroenterol* 2020;11:e00224. <https://doi.org/10.14309/ctg.0000000000000224>.
- [333] Lin X, Sun Q, Zhou L, He M, Dong X, Lai M, et al. Colonic epithelial mTORC1 promotes ulcerative colitis through COX-2-mediated Th17 responses. *Mucosal Immunol* 2018;11:1663–73. <https://doi.org/10.1038/s41385-018-0018-3>.
- [334] Brown EM, Kenny DJ, Xavier RJ. Gut Microbiota Regulation of T Cells During Inflammation and Autoimmunity. *Annu Rev Immunol* 2019;37:599–624. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-042718-041841>.

ANEXOS

I. Scripts Capítulo I

Aquí se recoge el *script* empleado para la construcción de las redes de taxones bacterianos generadas en el Capítulo I. Este *software* ha sido desarrollado por los doctores Juan Manuel Pastor y Javier Galeano, del Grupo de Sistemas Complejos de la Universidad Politécnica de Madrid, y es accesible en GITHUB (https://github.com/JJ-Lab/Cancer_Lung_Microbiota).

```
#!/usr/bin/env python
# coding: utf-8

import pandas as pd
import networkx as nx
import numpy as np

# Leer tabla de recuento taxonómico y metadatos.

df_data = pd.read_excel('Data/tabla.xlsx', header=1)
df_meta = pd.read_excel('Data/metadata.xlsx', header=0)

# Dividir los datos en “Sanos”, “Caries” y “Controles”.

df_h=df_meta[df_meta.loc[:,'Clinical']=='healthy']
df_s=df_meta[df_meta.loc[:,'Clinical']=='caries']
df_s=df_meta[df_meta.loc[:,'Clinical']=='control']
# df_s.head()

# Usar los taxones como columnas.

#taxa=df_data.loc[:,['#TAXA ID']]
#taxa0=taxa.squeeze()
#taxa2=[]
#for i in range(len(taxa0)):
#    family = taxa0[i].split('|')
#    taxa2.append(family[-1])
#
#len(taxa2)

# Añadir un numero control para las asignaciones taxonómicas incompletas como
"uncultured", "Ambiguous", "__", etc.

taxa=df_data.loc[:,['#TAXA ID']]
taxa0=taxa.squeeze()
```

```

taxa1=[]
for i in range(len(taxa0)):
    family = taxa0[i].split('|')
    if (family[-1]=='__' ) or ( 'uncultured' in family[-1]) or ('Ambiguous' in family[-1]) or ('metagenome' in family[-1]) or ('unidentified' in family[-1]):
        #taxa1.append('?')
        taxa1.append(family[-2]+str(i))
    else:
        taxa1.append(family[-1])

```

Dividir los datos en las categorías ya mencionadas.

```

df_s2_caries=df_s2[df_s2['Location-longit']=='caries']
df_s2_healthy=df_s2[df_s2['Location-longit']=='healthy']
df_s2_control=df_s2[df_s2['Location']=='control']

```

```

data_s_caries=df_data[df_s2_caries['sample']]
data_s_healthy=df_data[df_s2_healthy['sample']]
data_s_control=df_data[df_s2_control['sample']]

```

```

df_caries
=pd.DataFrame(data=data_s_caries.values,index=taxa1,columns=data_s_caries.columns)
df_healthy
=pd.DataFrame(data=data_s_healthy.values,index=taxa1,columns=data_s_healthy.columns)
df_control
=pd.DataFrame(data=data_s_control.values,index=taxa1,columns=data_s_control.columns)

```

Guardar los datos en formato csv.

```

df_caries.to_csv('caries_s.csv',index =True, header=True)
df_healthy.to_csv('healthy_s.csv',index =True, header=True)
df_control.to_csv('control_s.csv',index =True, header=True)

```

Construcción de la red de interacción de taxones. Se define una función para establecer las conexiones de la red.

```

def make_graph_median(graph):
    ma_graph=nx.Graph()
    Dic={}

    for patien in graph.columns:
        print(patien)
        graph_0 = graph[graph[patien]!=0][patien]

```

```

suma = np.sum(graph_0)
s16S_norm=graph_0/suma

g_m = nx.complete_graph(len(graph_0))

labels={}
for i, tax_i in zip(range(len(graph_0)),graph_0.index):
    labels[i]=tax_i
    g_m=nx.relabel_nodes(g_m,labels)

for u,v,d in g_m.edges(data=True):
    w_uv = s16S_norm[u]*s16S_norm[v]

    if (u,v) not in ma_graph.edges():
        ma_graph.add_edge(u,v,weight=[w_uv])
        Dic.setdefault((u,v),[])
        Dic[(u,v)].append(w_uv)

    else:
        Dic[(u,v)].append(w_uv)
        ma_graph[u][v].update(weight=Dic[(u,v)])
for u,v,d in ma_graph.edges(data=True):
    dato=d['weight']
    ma_graph[u][v].update(weight=np.median(dato))

return ma_graph

def make_graph(graph):

    ma_graph=nx.Graph()

    for patien in graph.columns:
        graph_0 = graph[graph[patien]!=0][patien]
        suma = np.sum(graph_0)
        s16S_norm=graph_0/suma

        g_m = nx.complete_graph(len(graph_0))

        labels={}
        for i, tax_i in zip(range(len(graph_0)),graph_0.index):
            labels[i]=tax_i
            g_m=nx.relabel_nodes(g_m,labels)

        for u,v,d in g_m.edges(data=True):

```

```

w_uv = s16S_norm[u]*s16S_norm[v]

if (u,v) not in ma_graph.edges():
    ma_graph.add_edge(u,v,weight=w_uv)
else:
    weight_h_old=ma_graph[u][v]['weight']
    ma_graph[u][v].update(weight = weight_h_old + w_uv )

#nx.write_gexf(ma_graph,'g_total.gexf')

return ma_graph

# Exportar la red a Gephi.

# df_caries, df_healthy, df_control

ma_graph = make_graph_median(df_total)
nx.write_gexf(ma_graph,'g_total_median.gexf')

```

II. Scripts Capítulo II

Aquí se recogen los comandos empleados para el estudio bioinformático de las lecturas de secuenciación del ADNr 16S del Capítulo II.

Importar FASTQ a QIIME2. Se construye un archivo manifest que indique la ubicación de los archivos FASTQ de cada una de las muestras para su importación en formato qza.

```
mkdir TAS/UPSTREAM
```

```
qiime tools import --type 'SampleData[PairedEndSequencesWithQuality]' --input-path
TAS/manifest.csv --output-path TAS/UPSTREAM/paired-end-demux.qza --input-format
PairedEndFastqManifestPhred33
```

Resumen de datos crudos. Se realiza la inspección visual de la distribución de la calidad de las lecturas para cada muestra. En base a dicha observación se establecerán los parámetros de corte de lecturas del pipeline DADA2.

```
qiime demux summarize --i-data TAS/UPSTREAM/paired-end-demux.qza --o-visualization
TAS/UPSTREAM/demux-paired-summary.qzv
qiime tools view TAS/UPSTREAM/demux-paired-summary.qzv
```

DADA2. Se ejecuta el pipeline DADA2, que realiza un filtrado de calidad y el recorte de las lecturas. El recorte debe eliminar las zonas de las lecturas de menor calidad sin comprometer la unión de lecturas forward y reverse a través de su zona solapante (unos 30 pares de bases). Además, identifica y hace recuento de ASVs y su secuencia nucleotídica. Posteriormente se analiza el porcentaje de lecturas que permanecen.

```
cd TAS
```

```
mkdir UPSTREAM/resultados-dada2
qiime dada2 denoise-paired --i-demultiplexed-seqs UPSTREAM/paired-end-demux.qza --p-
trunc-len-f 263 --p-trunc-len-r 209 --p-trim-left-f 19 --p-trim-left-r 22 --p-n-threads
0 --o-table UPSTREAM/resultados-dada2/table.qza --o-representative-sequences
UPSTREAM/resultados-dada2/rep-seqs.qza --o-denoising-stats UPSTREAM/resultados-
dada2/stats-dada2.qza
```

```
qiime feature-table summarize --i-table UPSTREAM/resultados-dada2/table.qza --o-
visualization UPSTREAM/resultados-dada2/table.qzv --m-sample-metadata-file
$PWD/metadata.tsv
```

```
qiime feature-table tabulate-seqs --i-data UPSTREAM/resultados-dada2/rep-seqs.qza --o-
visualization UPSTREAM/resultados-dada2/rep-seqs.qzv
```

```
qiime metadata tabulate --m-input-file UPSTREAM/resultados-dada2/stats-dada2.qza --o-  
visualization UPSTREAM/resultados-dada2/stats-dada2.qzv
```

Filtrado de lecturas de muy baja frecuencia. Se realiza un filtrado de aquellas lecturas con frecuencia total <7 entre todas las muestras. Esto reduce en gran medida la presencia de lecturas espurias, que realmente no se corresponden con un amplificado de origen bacteriano.

```
qiime feature-table filter-features --i-table UPSTREAM/resultados-dada2/table.qza --p-  
min-frequency 7 --o-filtered-table UPSTREAM/resultados-dada2/table-filtered.qza
```

```
cd UPSTREAM
```

```
qiime feature-table summarize --i-table resultados-dada2/table-filtered.qza --o-  
visualization resultados-dada2/table-filtered.qzv --m-sample-metadata-file  
/home/qiime2/TAS/metadata.tsv
```

```
qiime feature-table filter-seqs --i-data resultados-dada2/rep-seqs.qza --i-table  
resultados-dada2/table-filtered.qza --o-filtered-data resultados-dada2/rep-seqs-  
filtered.qza
```

Clustering. Se agrupan las ASVs al 97% de similitud nucleotídica, para así obtener OTUs.

```
mkdir clustering
```

```
qiime vsearch cluster-features-de-novo --i-sequences resultados-dada2/rep-seqs-  
filtered.qza --i-table resultados-dada2/table-filtered.qza --p-threads 0 --o-clustered-  
table clustering/table-cluster-97.qza --o-clustered-sequences clustering/rep-clustered-  
seqs.qza --p-perc-identity 0.97
```

```
qiime feature-table summarize --i-table clustering/table-cluster-97.qza --o-  
visualization clustering/table-cluster-97.qzv --m-sample-metadata-file  
/home/qiime2/TAS/metadata.tsv
```

Asignación taxonómica. Se empleó un clasificador bayesiano entrenado frente a la base de datos SILVA 132.

```
qiime feature-classifier classify-sklearn --i-classifier taxonomy/trained-  
classifier/silva-132-99-515-806-nb-classifier.qza --i-reads clustering/rep-clustered-  
seqs.qza --p-n-jobs 1 --o-classification taxonomy/taxonomy-silva.qza -verbose
```

Filtrado de lecturas de origen no bacteriano.

```
mkdir filter-and-cluster-finished-data/
```

```
qiime taxa filter-table --i-table clustering/table-cluster-97.qza --i-taxonomy
taxonomy/taxonomy-silva.qza --p-exclude mitochondria,chloroplast,Eukaryota --o-
filtered-table filter-and-cluster-finished-data/table-cluster-only-bacteria.qza
```

```
qiime feature-table filter-seqs --i-data clustering/rep-clustered-seqs.qza --i-table
filter-and-cluster-finished-data/table-cluster-only-bacteria.qza --o-filtered-data
filter-and-cluster-finished-data/rep-clustered-only-bacteria-seqs.qza
```

```
qiime feature-table summarize --i-table filter-and-cluster-finished-data/table-cluster-
only-bacteria.qza --o-visualization filter-and-cluster-finished-data/table-cluster-
only-bacteria.qzv --m-sample-metadata-file /home/qiime2/TAS/metadata.tsv
```

```
qiime feature-table tabulate-seqs --i-data filter-and-cluster-finished-data/rep-
clustered-only-bacteria-seqs.qza --o-visualization filter-and-cluster-finished-
data/rep-clustered-only-bacteria-seqs.qzv
```

Análisis de diversidad.

```
qiime diversity core-metrics --i-table feature-table-1.qza --p-sampling-depth 58000 --
m-metadata-file metadata.tsv --output-dir core-metrics-results
```

Alfa.

```
qiime diversity alpha-group-significance --i-alpha-diversity core-metrics-
results/shannon_vector.qza --m-metadata-file metadata.tsv --o-visualization
shannon_vector.qzv
```

```
qiime tools view shannon_vector.qzv
```

```
qiime diversity alpha-group-significance --i-alpha-diversity core-metrics-
results/observed_otus_vector.qza --m-metadata-file metadata.tsv --o-visualization
diversity/observed-otus/observed_otus_vector.qzv
```

```
qiime tools view diversity/observed-otus/observed_otus_vector.qzv
```

```
qiime diversity alpha --i-table feature-table-1.qza --p-metric chao1 --o-alpha-
diversity chao1_vector.qza
```

```
qiime diversity alpha-group-significance --i-alpha-diversity chao1_vector.qza --m-
metadata-file metadata.tsv --o-visualization chao1.qzv
```

Beta.

```
qiime emperor plot --i-pcoa core-metrics-results/bray_curtis_pcoa_results.qza --m-
metadata-file metadata.tsv --o-visualization diversity/pcoa-bray-
curtis/bray_curtis_pcoa_emperor.qzv
```

```
qiime tools view diversity/pcoa-bray-curtis/bray_curtis_pcoa_emperor.qzv
```

```
qiime diversity beta-group-significance --i-distance-matrix core-metrics-
results/bray_curtis_distance_matrix.qza --m-metadata-file metadata.tsv --m-metadata-
column atb-family --p-pairwise --o-visualization diversity/bray-curtis-betalactam-
significance.qzv
```

```
qiime tools view diversity/bray-curtis-betalactam-significance.qzv
```

Exportar y formatear tablas para LEfSe.

```
qiime taxa collapse --i-table feature-table-1.qza --o-collapsed-table
collapse1.table.qza --p-level 1 --i-taxonomy taxonomy.qza
qiime tools export collapse1.table.qza --output-dir collapse1/
biom convert -i collapse1/feature-table.biom -o collapse1.table.txt --header-key
"taxonomy" --to-tsv
```

```
qiime taxa collapse --i-table feature-table-1.qza --o-collapsed-table
collapse2.table.qza --p-level 2 --i-taxonomy taxonomy.qza
qiime tools export collapse2.table.qza --output-dir collapse2/
biom convert -i collapse2/feature-table.biom -o collapse2.table.txt --header-key
"taxonomy" --to-tsv
```

```
qiime taxa collapse --i-table feature-table-1.qza --o-collapsed-table
collapse3.table.qza --p-level 3 --i-taxonomy taxonomy.qza
qiime tools export collapse3.table.qza --output-dir collapse3/
biom convert -i collapse3/feature-table.biom -o collapse3.table.txt --header-key
"taxonomy" --to-tsv
```

```
qiime taxa collapse --i-table feature-table-1.qza --o-collapsed-table
collapse4.table.qza --p-level 4 --i-taxonomy taxonomy.qza
qiime tools export collapse4.table.qza --output-dir collapse4/
biom convert -i collapse4/feature-table.biom -o collapse4.table.txt --header-key
"taxonomy" --to-tsv
```

```
qiime taxa collapse --i-table feature-table-1.qza --o-collapsed-table
collapse5.table.qza --p-level 5 --i-taxonomy taxonomy.qza
qiime tools export collapse5.table.qza --output-dir collapse5/
biom convert -i collapse5/feature-table.biom -o collapse5.table.txt --header-key
"taxonomy" --to-tsv
```

```
qiime taxa collapse --i-table feature-table-1.qza --o-collapsed-table
collapse6.table.qza --p-level 6 --i-taxonomy taxonomy.qza
```

```
qiime tools export collapse6.table.qza --output-dir collapse6/
biom convert -i collapse6/feature-table.biom -o collapse6.table.txt --header-key
"taxonomy" --to-tsv
```

Generación de diagrama de barras de composición taxonómica.

```
qiime taxa barplot --i-table feature-table-1.qza --i-taxonomy taxonomy.qza --m-
metadata-file metadata.tsv --o-visualization taxa-bar-plots.qzv
qiime tools view taxa-bar-plots.qzv
```

Mapa de calor top 50 géneros más abundantes. Primero se identifican las 50 OTUs con mayor mediana de proporción. Después se construye una tabla de metadatos de dos columnas, la primera "OTU_ID" y la segunda "Subject", identificando como "FALSE" las 50 OTUs seleccionadas. Filtrar la tabla original para que solamente se retengan las 50 OTUs seleccionadas. Una vez obtenida la tabla, se ejecuta la construcción del mapa de calor.

```
qiime taxa collapse --i-table feature-table-1.qza --i-taxonomy taxonomy.qza --p-level 6
--o-collapsed-table heatmap/genero.qza
```

```
qiime feature-table relative-frequency --i-table heatmap/genero.qza --o-relative-
frequency-table heatmap/relative.genero.qza
```

```
qiime tools export heatmap/relative.genero.qza --output-dir heatmap/
```

```
biom convert -i heatmap/feature-table.biom -o heatmap/relative-genera-feature-table.txt
--header-key "taxonomy" --to-tsv
```

```
qiime feature-table filter-features --i-table feature-table-1.qza --m-metadata-file
metadata.tsv --p-where "Subject='FALSE'" --o-filtered-table 50filtered.qza
```

```
qiime taxa collapse --i-table 50filtered.qza --i-taxonomy taxonomy.qza --p-level 6 --o-
collapsed-table table-filtered-top50-abundant-genera.qza
```

```
qiime feature-table heatmap --i-table heatmap/table-filtered-top50-abundant-genera.qza
--m-metadata-file metadata.tsv --m-metadata-column atb-family --p-metric braycurtis --
output-dir heatmap/heatmap50
```

```
qiime tools view heatmap/heatmap50/visualization.qzv
```

III. Scripts Capítulo III

1. Análisis metataxonómico

Aquí se recoge el *script* empleado para el análisis metataxonómico bacteriano del Capítulo III. En este caso, los análisis bioinformáticos primario y secundario se llevaron a cabo en el Área Genómica y Salud de la Fundación para el Fomento de la Investigación Sanitaria y Biomédica de la Comunitat Valenciana (FISABIO), por lo que solamente se exponen los métodos referentes al análisis terciario (estudio de diversidad).

Importar las tablas de recuento de OTUs y su asignación taxonómica a QIIME2.

```
qiime tools import --input-path taxonomy.tsv --output-path taxonomy.qza --type
'FeatureData[Taxonomy]'
```

```
biom convert -i otu-table.tsv -o table.from_txt_json.biom --table-type="OTU table" --
to-json
```

```
qiime tools import --input-path table.from_txt_json.biom --type
'FeatureTable[Frequency]' --input-format BIOMV100Format --output-path filtered-
table.qza
```

Inspección de datos. El número total de lecturas filtradas que rindieron las 160 muestras secuenciadas fue de 11,889,557 (asignadas a 250 OTUs).

```
qiime feature-table summarize --i-table filtered-table.qza --o-visualization filtered-
table.qzv --m-sample-metadata-file /home/qiime2/OBESITY/metadata.tsv
```

Inspección del *rarefaction plot*. Se emplea para elegir el umbral de muestreo de lecturas necesario para normalizar los datos y así poder calcular los parámetros de diversidad. En este caso, se decide fijar la profundidad de muestreo en 24758 lecturas, conservando así todas las muestras y garantizando una estimación fiable de la diversidad de las mismas.

```
mkdir diversity
```

```
qiime diversity alpha-rarefaction --i-table filtered-table.qza --p-max-depth 100000 --
m-metadata-file metadata.tsv --o-visualization diversity/alpha-rarefaction.qzv
```

```
qiime tools view diversity/alpha-rarefaction.qzv
```

Análisis de diversidad.

```
qiime diversity core-metrics --i-table filtered-table.qza --p-sampling-depth 24758 --m-
metadata-file metadata.tsv --output-dir diversity/core-metrics-results
```

Diversidad alfa.

```
qiime diversity alpha --i-table filtered-table.qza --p-metric chao1 --output-dir
diversity/core-metrics-results/chao1.qza
```

```
qiime diversity alpha-group-significance --i-alpha-diversity diversity/core-metrics-
results/shannon_vector.qza --o-visualization diversity/core-metrics-
results/shannon_vector.qzv --m-metadata-file metadata.tsv
```

```
qiime diversity alpha-group-significance --i-alpha-diversity diversity/core-metrics-
results/chao1.qza --o-visualization diversity/core-metrics-results/chao1.qzv --m-
metadata-file metadata.tsv
```

Diversidad beta.

Comparación a mismos tiempos según grupo de cirugía.

```
qiime diversity beta-group-significance --i-distance-matrix diversity/core-metrics-
results/bray_curtis_distance_matrix.qza --m-metadata-file metadata.tsv --m-metadata-
column baseline --o-visualization diversity/core-metrics-results/bray_curtis-
baseline_bysurgery-significance.qzv --p-pairwise
```

```
qiime diversity beta-group-significance --i-distance-matrix diversity/core-metrics-
results/bray_curtis_distance_matrix.qza --m-metadata-file metadata.tsv --m-metadata-
column pre-surgery --o-visualization diversity/core-metrics-results/bray_curtis-
presurgery_bysurgery-significance.qzv --p-pairwise
```

```
qiime diversity beta-group-significance --i-distance-matrix diversity/core-metrics-
results/bray_curtis_distance_matrix.qza --m-metadata-file metadata.tsv --m-metadata-
column 1-month --o-visualization diversity/core-metrics-results/bray_curtis-
1month_bysurgery-significance.qzv --p-pairwise
```

```
qiime diversity beta-group-significance --i-distance-matrix diversity/core-metrics-
results/bray_curtis_distance_matrix.qza --m-metadata-file metadata.tsv --m-metadata-
column 3-month --o-visualization diversity/core-metrics-results/bray_curtis-
3month_bysurgery-significance.qzv --p-pairwise
```

Comparación evolutiva a lo largo de los 4 tiempos en cada grupo.

```
qiime diversity beta-group-significance --i-distance-matrix diversity/core-metrics-
results/bray_curtis_distance_matrix.qza --m-metadata-file metadata.tsv --m-metadata-
column status-sleeve --o-visualization diversity/core-metrics-results/bray_curtis-
status_sleeve-significance.qzv --p-pairwise
```

```
qiime diversity beta-group-significance --i-distance-matrix diversity/core-metrics-
results/bray_curtis_distance_matrix.qza --m-metadata-file metadata.tsv --m-metadata-
column status-bypass --o-visualization diversity/core-metrics-results/bray_curtis-
status_bypass-significance.qzv --p-pairwise
```

Comparación de tendencia evolutiva en dos tiempos (pre y post-quirúrgico).

```
qiime diversity beta-group-significance --i-distance-matrix diversity/core-metrics-
results/bray_curtis_distance_matrix.qza --m-metadata-file metadata.tsv --m-metadata-
column status-bypass-2groups --o-visualization diversity/core-metrics-
results/bray_curtis-status-bypass-2groups_bysurgery-significance.qzv --p-pairwise
```

```
qiime diversity beta-group-significance --i-distance-matrix diversity/core-metrics-
results/bray_curtis_distance_matrix.qza --m-metadata-file metadata.tsv --m-metadata-
column status-sleeve-2groups --o-visualization diversity/core-metrics-
results/bray_curtis-status-sleeve-2groups_bysurgery-significance.qzv --p-pairwise
```

Estudio cohorte diabetes

```
qiime diversity beta-group-significance --i-distance-matrix diversity/core-metrics-
results/bray_curtis_distance_matrix.qza --m-metadata-file metadata.tsv --m-metadata-
column status-diabetes --o-visualization diversity/core-metrics-results/bray_curtis-
status-diabetes-significance.qzv --p-pairwise
```

Estudio en relación a niveles de amonio

```
qiime diversity beta-group-significance --i-distance-matrix diversity/core-metrics-
results/bray_curtis_distance_matrix.qza --m-metadata-file metadata.tsv --m-metadata-
column status-amonio --o-visualization diversity/core-metrics-results/bray_curtis-
status-amonio-significance.qzv --p-pairwise
```

Generación de PCoA para cada grupo de pacientes.

```
qiime diversity filter-distance-matrix --i-distance-matrix diversity/core-metrics-
results/bray_curtis_distance_matrix.qza --m-metadata-file metadata.tsv --p-where "[3-
month] IN ('Sleeve', 'Bypass')" --o-filtered-distance-matrix diversity/core-metrics-
results/3_month_bray_curtis_distance_matrix.qza
```

```
qiime diversity pcoa --i-distance-matrix diversity/core-metrics-
results/3_month_bray_curtis_distance_matrix.qza --o-pcoa 3_month_bray_curtis_pcoa.qza
```

```
qiime emperor plot --i-pcoa 3_month_bray_curtis_pcoa.qza --m-metadata-file metadata.tsv
--o-visualization 3-month_bray_curtis_emperor.qzv --verbose
```

2. Modelo Lasso

Aquí se recoge el *script* empleado para la construcción de un modelo predictivo de pérdida de peso a partir de todas las variables composicionales y funcionales recogidas. Este *script* ha sido desarrollado por el doctor Javier Galeano, del Grupo de Sistemas Complejos de la Universidad Politécnica de Madrid, y es accesible en GITHUB (https://github.com/galeanojav/Severe_Obesity/).

```
#!/usr/bin/env python
# coding: utf-8

import numpy as np
import pandas as pd

import warnings
warnings.filterwarnings("ignore")

from sklearn.model_selection import train_test_split
from sklearn.linear_model import Lasso, LassoCV
from sklearn.metrics import mean_squared_error

ob_df=pd.read_excel('metada_microbiota.xlsx')

tc_df=ob_df.replace(['By-pass gastrico '], 'By-pass gastrico')

EXC_Peso=ob_df[['EXC. PESO-1', 'EXC. PESO-2', 'EXC. PESO-3', 'EXC. PESO-4']]
EXC_Peso['EXC. PESO-2'].loc[10]=60.0625
EXC_Peso['EXC. PESO-4'].loc[29]=58
EXC_Peso['EXC. PESO1-4']=EXC_Peso['EXC. PESO-4']/EXC_Peso['EXC. PESO-1']

bac14=tc_df.iloc[:,19:351]
bac14['EXC_Peso14']=EXC_Peso['EXC. PESO1-4']

df_numerical_corr14=bac14.corr()['EXC_Peso14']
df_numerical_most_corr14 = df_numerical_corr14[df_numerical_corr14 >
0.2].sort_values(ascending=False)

imp_features14=df_numerical_most_corr14.index.to_list()
imp_features14.pop(0)

X14 = bac14[imp_features14]
y=EXC_Peso['EXC. PESO1-4']

lasso = Lasso(max_iter = 10000, normalize = True)
```

```

features_n=pd.DataFrame()
for n in range(100):
    X14_train, X14_test, y14_train, y14_test = train_test_split(X14, y)

    lassocv = LassoCV(alphas = None, cv = 10, max_iter = 100000, normalize = True)
    lassocv.fit(X14_train, y14_train)

    lasso.set_params(alpha=lassocv.alpha_)
    lasso.fit(X14_train, y14_train)

    #print("MSE to Lasso model = {}".format(mean_squared_error(y14_test,
    lasso.predict(X14_test))))

    #print("Number of features used: {}".format(np.sum(lasso.coef_ != 0)))

    if np.sum(lasso.coef_ != 0)!=0:
        #ImFea=pd.Series(lasso.coef_, index=X14.columns)
        features=pd.DataFrame(lasso.coef_, index=imp_features14)
        features_n=pd.concat([features_n,features],axis=1)
        mselist.append(mean_squared_error(y14_test, lasso.predict(X14_test)))

print("MSE mean = {}".format(np.mean(mselist)))

print(features_n.mean(axis=1).sort_values(ascending=False))

print(features_n.median(axis=1).sort_values(ascending=False))

```

IV. Scripts Capítulo IV

Aquí se recogen los comandos empleados para el estudio bioinformático de las lecturas de secuenciación del ADNr 16S del Capítulo IV.

Importar FASTQ a QIIME2. Se construye un archivo manifest que indique la ubicación de los archivos FASTQ de cada una de las muestras para su importación en formato qza.

```
find /home/qiime2/TMF-CU-2021/raw-data/ -type f \( -iname "*.fastq.gz" \) >>
/home/qiime2/TMF-CU-2021/manifest_prelim.txt
```

```
sed -i '/_R1_001.fastq.gz/ s/$/,forward/' /home/qiime2/TMF-CU-2021/manifest_prelim.txt
```

```
sed -i '/_R2_001.fastq.gz/ s/$/,reverse/' /home/qiime2/TMF-CU-2021/manifest_prelim.txt
```

```
sed -i 's&\/\/&&g' /home/qiime2/TMF-CU-2021/manifest_prelim.txt
```

Se edita a mano el txt y se pasa a formato csv. Se emplea el archivo generado para realizar la importación de los FASTQ.

```
mkdir TMF_CU/UPSTREAM
```

```
qiime tools import --type 'SampleData[PairedEndSequencesWithQuality]' --input-path
TMF_CU/manifest.csv --output-path TMF_CU/UPSTREAM/paired-end-demux.qza --input-format
PairedEndFastqManifestPhred33
```

Resumen de datos crudos. Se realiza la inspección visual de la distribución de la calidad de las lecturas para cada muestra. En base a dicho análisis se establecerán los parámetros de corte de lecturas del pipeline DADA2. El número total de lecturas que rindieron las 22 muestras secuenciadas fue de 3,644,526 (123 pertenecientes al control negativo).

```
qiime demux summarize --i-data TMF_CU/UPSTREAM/paired-end-demux.qza --o-visualization
TMF_CU/UPSTREAM/demux-paired-summary.qzv
qiime tools view TMF_CU/UPSTREAM/demux-paired-summary.qzv
```

DADA2. Se ejecuta el pipeline DADA2 por duplicado, con dos ajustes diferentes de *trimming* (285f-202r y 270f-220r) en base a la inspección de la distribución de calidad de las lecturas. Este *pipeline* realiza un filtrado de calidad y el recorte de las lecturas. El recorte debe eliminar las zonas de las lecturas de menor calidad sin comprometer la unión de lecturas *forward* y *reverse* a través de su zona solapante (unos 30 pares de bases). Además, identifica y hace recuento de ASVs y su secuencia nucleotídica, generando dos tablas: *table.qza* (de recuento de ASVs) y *seqs.qza* (que contiene sus secuencias nucleotídicas).

```
cd TMF_CU
```

```
mkdir UPSTREAM/resultados-dada2-285-202
```

```
qiime dada2 denoise-paired --i-demultiplexed-seqs UPSTREAM/paired-end-demux.qza --p-trunc-len-f 285 --p-trunc-len-r 202 --p-trim-left-f 19 --p-trim-left-r 22 --p-n-threads 0 --o-table UPSTREAM/resultados-dada2-285-202/table.qza --o-representative-sequences UPSTREAM/resultados-dada2-285-202/rep-seqs.qza --o-denoising-stats UPSTREAM/resultados-dada2-285-202/stats-dada2.qza
```

```
mkdir UPSTREAM/resultados-dada2-270-220
```

```
qiime dada2 denoise-paired --i-demultiplexed-seqs UPSTREAM/paired-end-demux.qza --p-trunc-len-f 285 --p-trunc-len-r 202 --p-trim-left-f 19 --p-trim-left-r 22 --p-n-threads 0 --o-table UPSTREAM/resultados-dada2-270-220/table.qza --o-representative-sequences UPSTREAM/resultados-dada2-270-220/rep-seqs.qza --o-denoising-stats UPSTREAM/resultados-dada2-270-220/stats-dada2.qza
```

Posteriormente se analiza el porcentaje de lecturas que permanecen en ambos ajustes, para seleccionar el que conserve un mayor número de las mismas. En este caso, se seleccionó el ajuste 285f-202r, que conservó el 48% (1,740,740) de las lecturas crudas.

```
qiime feature-table summarize --i-table UPSTREAM/resultados-dada2-285-202/table.qza --o-visualization UPSTREAM/resultados-dada2-285-202/table.qzv --m-sample-metadata-file $PWD/metadata.tsv
```

```
qiime feature-table tabulate-seqs --i-data UPSTREAM/resultados-dada2-285-202/rep-seqs.qza --o-visualization UPSTREAM/resultados-dada2-285-202/rep-seqs.qzv
```

```
qiime metadata tabulate --m-input-file UPSTREAM/resultados-dada2-285-202/stats-dada2.qza --o-visualization UPSTREAM/resultados-dada2-285-202/stats-dada2.qzv
```

```
qiime feature-table summarize --i-table UPSTREAM/resultados-dada2-270-220/table.qza --o-visualization UPSTREAM/resultados-dada2-270-220/table.qzv --m-sample-metadata-file $PWD/metadata.tsv
```

```
qiime feature-table tabulate-seqs --i-data UPSTREAM/resultados-dada2-270-220/rep-seqs.qza --o-visualization UPSTREAM/resultados-dada2-270-220/rep-seqs.qzv
```

```
qiime metadata tabulate --m-input-file UPSTREAM/resultados-dada2-270-220/stats-dada2.qza --o-visualization UPSTREAM/resultados-dada2-270-220/stats-dada2.qzv
```

Filtrado de lecturas de muy baja frecuencia. Se realiza un filtrado de aquellas lecturas con frecuencia total <7 entre todas las muestras. Esto reduce en gran medida la presencia de lecturas espurias, que realmente no se corresponden con un amplificado de origen bacteriano.

```
qiime feature-table filter-features --i-table UPSTREAM/resultados-dada2/table.qza --p-
min-frequency 7 --o-filtered-table UPSTREAM/resultados-dada2/table-filtered.qza
```

```
cd UPSTREAM
```

```
qiime feature-table summarize --i-table resultados-dada2/table-filtered.qza --o-
visualization resultados-dada2/table-filtered.qzv --m-sample-metadata-file
/home/qiime2/TMF_CU/metadata.tsv
```

```
qiime feature-table filter-seqs --i-data resultados-dada2/rep-seqs.qza --i-table
resultados-dada2/table-filtered.qza --o-filtered-data resultados-dada2/rep-seqs-
filtered.qza
```

Asignación taxonómica. Se empleó un clasificador bayesiano entrenado frente a la base de datos SILVA 138.

```
mkdir taxonomy
```

```
cd ..
```

```
qiime feature-classifier classify-sklearn --i-classifier /home/qiime2/silva-138-99-nb-
classifier.qza --i-reads UPSTREAM/resultados-dada2/rep-seqs-filtered.qza --o-
classification UPSTREAM/taxonomy/taxonomy-silva.qza --p-reads-per-batch 1500 --p-pre-
dispatch 1*n_jobs -verbose
```

Filtrado de lecturas de origen no bacteriano.

```
cd UPSTREAM
```

```
mkdir filter-finished-data
```

```
qiime taxa filter-table --i-table resultados-dada2/filtered-table.qza --i-taxonomy
taxonomy/taxonomy-silva.qza --p-include 'D__Bacteria;' --p-exclude
Mitochondria,Chloroplast --o-filtered-table filter-finished-data/feature-table.qza
```

```
qiime feature-table filter-seqs --i-data resultados-dada2/rep-seqs-filtered.qza --i-
table filter-finished-data/feature-table.qza --o-filtered-data filter-finished-
data/seqs.qza
```

```
qiime feature-table summarize --i-table filter-finished-data/feature-table.qza --o-
visualization filter-finished-data/feature-table.qzv --m-sample-metadata-file
/home/qiime2/TMF-CU-2021/metadata.tsv
```

Se elimina el control negativo de la tabla de recuento de ASVs y de la de secuencias nucleotídicas.

```
qiime feature-table filter-samples --i-table filter-finished-data/feature-table.qza --m-metadata-file /home/qiime2/TMF-CU-2021/metadata.tsv --p-where "INCLUDE='TRUE'" --o-filtered-table filter-finished-data/feature-table.qza
```

```
qiime feature-table filter-seqs --i-data filter-finished-data/seqs.qza --i-table filter-finished-data/feature-table.qza --o-filtered-data filter-finished-data/seqs.qza
```

```
qiime feature-table summarize --i-table filter-finished-data/feature-table.qza --o-visualization filter-finished-data/feature-table-final.qzv --m-sample-metadata-file /home/qiime2/TMF-CU-2021/metadata.tsv
```

Construcción de árboles filogenéticos de ASVs a partir de la tabla de secuencias nucleotídicas.

```
mkdir phylogenetic-tree
```

```
qiime alignment mafft --i-sequences filter-finished-data/seqs.qza --o-alignment phylogenetic-tree/aligned-rep-seqs.qza
```

```
qiime alignment mask --i-alignment phylogenetic-tree/aligned-rep-seqs.qza --o-masked-alignment phylogenetic-tree/masked-aligned-rep-seqs.qza
```

```
qiime phylogeny fasttree --i-alignment phylogenetic-tree/masked-aligned-rep-seqs.qza --o-tree phylogenetic-tree/unrooted-tree.qza
```

```
qiime phylogeny midpoint-root --i-tree phylogenetic-tree/unrooted-tree.qza --o-rooted-tree phylogenetic-tree/rooted-tree.qza
```

Inspección del *rarefaction plot*. Se emplea para elegir el umbral de muestreo de lecturas necesario para normalizar los datos y así poder calcular los parámetros de diversidad. En este caso, se decide fijar la profundidad de muestreo en 23474 lecturas, conservando así todas las muestras y garantizando una estimación fiable de la diversidad de las mismas.

```
mkdir diversity
```

```
qiime diversity alpha-rarefaction --i-table UPSTREAM/filter-finished-data/feature-table.qza --p-max-depth 50000 --m-metadata-file metadata.tsv --o-visualization diversity/alpha-rarefaction.qzv
```

```
qiime tools view diversity/alpha-rarefaction.qzv
```

Análisis de diversidad, incluyendo parámetros tanto filogenéticos como no filogenéticos.

```
qiime diversity core-metrics-phylogenetic --i-phylogeny UPSTREAM/phylogenetic-
tree/rooted-tree.qza --i-table UPSTREAM/filter-finished-data/feature-table.qza --p-
sampling-depth 23474 --m-metadata-file metadata.tsv --output-dir diversity/core-metrics-
results
```

Alfa.

```
qiime diversity alpha --i-table UPSTREAM/filter-finished-data/feature-table.qza --p-
metric chao1 --o-alpha-diversity diversity/core-metrics-results/chao1.qza
```

```
qiime diversity alpha-group-significance --i-alpha-diversity diversity/core-metrics-
results/chao1.qza --o-visualization diversity/core-metrics-results/chao1.qzv --m-
metadata-file metadata.tsv
```

```
qiime diversity alpha-group-significance --i-alpha-diversity diversity/core-metrics-
results/shannon_vector.qza --o-visualization diversity/core-metrics-
results/shannon_vector.qzv --m-metadata-file metadata.tsv
```

```
qiime diversity alpha-group-significance --i-alpha-diversity diversity/core-metrics-
results/faith_pd_vector.qza --m-metadata-file metadata.tsv --o-visualization
diversity/core-metrics-results/faith-pd-group-significance.qzv
```

```
qiime diversity alpha-correlation --i-alpha-diversity diversity/core-metrics-
results/faith_pd_vector.qza --m-metadata-file metadata.tsv --o-visualization
diversity/core-metrics-results/faith_pd_correlation.qzv
```

Beta.

```
qiime diversity beta-group-significance --i-distance-matrix diversity/core-metrics-
results/unweighted_unifrac_distance_matrix.qza --m-metadata-file metadata.tsv --m-
metadata-column disease --o-visualization diversity/core-metrics-results/unweighted-
unifrac-Matrix-disease-significance.qzv --p-pairwise
```

```
qiime diversity beta-group-significance --i-distance-matrix diversity/core-metrics-
results/unweighted_unifrac_distance_matrix.qza --m-metadata-file metadata.tsv --m-
metadata-column State-FMT --o-visualization diversity/core-metrics-results/unweighted-
unifrac-Matrix-State-significance.qzv --p-pairwise
```

```
qiime diversity beta-group-significance --i-distance-matrix diversity/core-metrics-
results/unweighted_unifrac_distance_matrix.qza --m-metadata-file metadata.tsv --m-
```

```
metadata-column donor --o-visualization diversity/core-metrics-results/unweighted-  
unifrac-Matrix-donor-significance.qzv --p-pairwise
```

Diagrama de barras de composición taxonómica.

```
qiime feature-table filter-samples --i-table UPSTREAM/filter-finished-data/feature-  
table.qza --m-metadata-file metadata2.tsv --p-where "INCLUDE='TRUE'" --o-filtered-table  
beta-div-taxa-bars/grouped-table.qza
```

```
qiime feature-table group --i-table beta-div-taxa-bars/grouped-table.qza --p-axis  
sample --m-metadata-file metadata2.tsv --m-metadata-column "State-FMT" --p-mode mean-  
ceiling --o-grouped-table beta-div-taxa-bars/all-table.qza
```

```
qiime taxa barplot --i-table beta-div-taxa-bars/all-table.qza --i-taxonomy  
UPSTREAM/taxonomy/taxonomy-silva.qza --m-metadata-file metadatabar3.tsv --o-  
visualization beta-div-taxa-bars/all.qzv
```

```
qiime tools view beta-div-taxa-bars/all.qzv
```

V. Material publicado

Aquí se recogen las publicaciones derivadas de las investigaciones llevadas a cabo en esta Tesis Doctoral.



Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Editorial

Challenges of landscaping and modulation strategies in human intestinal microbiota[☆]



Desafíos para la caracterización y estrategias de la modulación en la microbiota intestinal humana

The incorporation of molecular techniques based on massive sequencing and the bioinformatics tools to interpret the results is still a pending challenge in Clinical Microbiology Laboratories. Being able to identify microorganisms without cultivation has allowed us to expand our knowledge of complex ecosystems, such as the intestinal microbiome. In the article by Ventero et al., 2020, these techniques (DNA extraction of microorganisms present in stool, PCR amplification of the 16S rDNA gene and massive sequencing by Illumina technology) were applied to monitor the bacterial composition of the microbiota of a patient who received a faecal microbiota transfer (FMT) from a healthy donor by colonoscopy.¹ The main objective of this work was to compare the usefulness of different bioinformatics tools in the analysis of metagenomic results.

For the microbiome characterization, ecological parameters are used to define the total number of species and their distribution (alpha diversity: Shannon and Chao1 indexes) and to compare ecosystems of different subjects or times (beta diversity: Bray-Curtis and Unifrac indexes). Cut-off points to classify a microbiome as healthy or pathological have not been yet established, although the general rule is that the higher the alpha diversity, the healthier and more resilient the ecosystem. Similarly, there is no consensus on the “normal” microbiota composition, either for the presence/absence of particular taxa or for their abundance, although we can compare different samples from the same patient over time, as in the case of Ventero et al., or between groups of subjects. As cited in the article that originated this editorial, LEfSe (Linear discriminant analysis Effect Size) is one of the most demanding tools for identifying taxa with statistically significant differential abundance and is also one of the most widely used in research work.² This tool, as many others, is usually available in freely accessible web repositories for global analysis (<https://www.microbiomeanalyst.ca/>,

<https://huttenhower.sph.harvard.edu/galaxy/>, <https://microbiome-tools.embl.de/>, etc.) or as downloadable and executable software in a Linux environment (<https://github.com/SegataLab/lefse/>).

It is highly recommended that a bioinformatician with biological knowledge integrating the available clinical information (metadata) in the analysis, since without both facets it is difficult to reach solid conclusions. This whole process must always be carried out in a clinical context by qualified personnel, since, as mentioned above, there is currently no parameter that can differentiate a healthy microbiota from a pathological one, and the particularities of each patient must always be considered. In recent years these molecular technologies have contributed to revealing the importance of the gut ecosystem in human health. Most of the studies have focused on understanding the bacterial composition, being the characterization of the virome or mycobiome still pending, and most importantly, the global microbial metabolism and the interaction of their metabolites with our human cells.

Increasing knowledge about the microbiota composition and functionality will be essential to define and identify specific pathological situations, but we will also need to integrate the physical and biological rules governing microorganisms in order to be able to carry out specific therapeutic actions. Definitely modifying the composition of a microbiome is beyond our reach today. All studies point to diet as the main factor modulating the composition of the intestinal microbiota, while available probiotics, most of them based on food-derived species, have shown limited action and almost always no engraftment ability. Second-generation probiotics based on bacteria that are a common part of the human microbiota from healthy subjects, such as *Akkermansia muciniphila*, *Faecalibacterium prausnitzii* and *Clostridium leptum*, are expected to appear in the near future.³

Currently the most drastic strategy available for microbiota modulation is FMT, being the treatment of recurrent *Clostridioides difficile* infection the exclusive indication with sufficient scientific evidence of their usefulness, as described by Ventero et al. This pathology has become increasingly important in recent years due to its rising incidence, high morbidity and mortality, high consumption of healthcare resources and prolonged hospitalisation of patients suffering from it.⁴ The prevalence of this infection is

DOI of original article: <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2020.05.023>

[☆] **Related content:** María Paz Ventero, Noelia Espinosa, Rodrigo Jover, Yolanda Guillen, Esperanza Merino, Juan Carlos Rodríguez. Evolution of intestinal microbiome in a process of faecal microbiota transfer (FMT) in a patient with *Clostridioides difficile* infection: NGS analysis with different software programs. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2021;39:184–187.

<https://doi.org/10.1016/j.eimc.2021.02.001>

0213-005X/© 2021 Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

increasing in all developed countries, with an estimated 124,000 cases per year in Europe, representing the sixth most frequent nosocomial pathogen during 2016–2017.⁵ In Spain, a notable increase in this pathology has also been documented due to a better diagnosis based on clinical suspicion, a higher prevalence of predisposing factors such as advanced age, pluripathological status, and mainly antibiotic use, and finally the irruption of hyper-virulent hyperepidemic strains as 027 and 078 ribotypes.⁶

The natural history of infection begins with exposure to antibiotics that lead to the disruption of the gut microbiota with decrease of their alpha diversity. Subsequently, *C. difficile* increases its population and begins to synthesise toxins responsible for diarrhoea and tissue damage. Interestingly, the study of the microbiome shows that during infection *C. difficile* coexists with other microorganisms, contradicting the theory that the gut microbiota must be totally devastated for infection to occur.⁷ Current evidence supports that it is the loss of functionality of the ecosystem that triggers this disease, rather than the alteration of its taxonomic composition,⁸ as different species may have common metabolic pathways and, conversely, some pathways are only present in certain bacterial species.

However, the active fraction of faecal material that limits *C. difficile* toxin production is currently unknown, and the therapeutic effect of FMT is attributed to the restoration of ecosystem biodiversity, but this theory is increasingly questioned, as Ventero et al.¹ show that *C. difficile* coexists with other species during the infection. In fact, some patients during the diarrhoea period have been shown to maintain their microbiota.⁷ Another fact that has challenged the central theory of the FMT effect is the therapeutic success achieved using pre-filtered (bacteria-free) faeces, although so far this has only been reported once.⁹ In recent years, some alternatives to FMT have been proposed that involve greater control of the intervention, such as the use of probiotics and bacterial consortia, especially those strains producing bacteriocins with activity against *C. difficile*.¹⁰ *Lactobacillus casei* has a protective role,¹¹ while a lower density of *Bacteroidetes* has been significantly associated with a worse prognosis.⁷ Recent metabolomic studies¹² have identified alterations in the functionality of the microbiota during *C. difficile* infection, especially related to bile acids and leucine fermentation, which would give more weight to the functional role of the ecosystem than to its specific taxonomic composition. In this regard, it has been shown how FMT affects the metabolism of the patients' ecosystem, especially the production of short-chain fatty acids and endogenous amines.¹³

The future expectations of FMT for therapeutic purposes are numerous and affect numerous pathologies. There is growing evidence of its usefulness in the intestinal decolonisation of antibiotic multiresistant bacteria,^{14,15} or in the maintenance of immunity during oncological treatments.^{16,17} The preservation of healthy microbiota prior to therapeutic procedures that affect their functionality for a subsequent reintroduction (autologous transfer) is also increasing acceptance. All these aspects will increase the quality of life of our patients and must be centralised in Clinical Microbiology Laboratories, so it is a priority to incorporate the necessary methodology to determine the composition and functionality of the microbiome, as well as the tools to modulate it.

Funding

This work was supported by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness, Instituto de Salud Carlos III (PI20/00164), and

co-funded by the European Regional Development Fund (ERDF) and the Spanish Net-work for Research in Infectious Diseases (REIPIRD16/0016/0003). Manuel Ponce was the recipient of a Rio Hortega contract (CM19/00069) from the Instituto de Salud Carlos III.

Conflict of interest

The authors certify that there are no potential conflicts of interest regarding this study.

References

- Ventero MP, Espinosa N, Jover R, Guillen Y, Merino E, Rodríguez JC. Evolution of intestinal microbiome in a process of faecal microbiota transfer (FMT) in a patient with *Clostridioides difficile* infection: NGS analysis with different software programs. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2021;39:184–7. <https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-6-r60>.
- Segata N, Izard J, Walron L, Gevers D, Miropolsky L, Garrett W, et al. Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biol*. 2011;12:R60. <https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-6-r60>.
- O'Toole PW, Marchesi JR, Hill C. Next-generation probiotics: the spectrum from probiotics to live biotherapeutics. *Nat Microbiol*. 2017;2:17057. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2017.57>.
- Marra AR, Perencevich EN, Nelson RE, Samore M, Khader K, Chiang HY, et al. Incidence and outcomes associated with *Clostridium difficile* infections: a systematic review and meta-analysis. *JAMA Netw Open*. 2020;3:e1917597. <https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2019.17597>.
- Suetens C, Latour K, Kärki T, Ricchizzi E, Kinross P, Moro ML, et al. Prevalence of healthcare-associated infections, estimated incidence and composite antimicrobial resistance index in acute care hospitals and long-term care facilities: results from two European point prevalence surveys, 2016 to 2017. *Euro Surveill*. 2018;23:e1002150. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2018.23.46.1800516>.
- Esteban-Vasallo MD, Naval Pellicer S, Domínguez-Berjón F, Cantero Caballero M, Asensio Á, Saravia G, et al. *Clostridium difficile*-related hospitalizations in Madrid (Spain) between 2003 and 2014, a rising trend. *J Infect*. 2016;72:401–3. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2015.12.003>.
- Hernández M, de Frutos M, Rodríguez-Lázaro D, López-Urrutia L, Quijada NM, Eiros JM. Faecal microbiota of toxigenic *Clostridioides difficile*-associated diarrhea. *Front Microbiol*. 2019;9:3331. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03331>.
- Pérez-Cobas AE, Artacho A, Ott SJ, Moya A, Gosalbes MJ, Latorre A. Structural and functional changes in the gut microbiota associated to *Clostridium difficile* infection. *Front Microbiol*. 2014;5:335. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00335>.
- Ott SJ, Waetzig GH, Rehman A, Moltzau-Anderson J, Bharti R, Grasis JA, et al. Efficacy of sterile fecal filtrate transfer for treating patients with *Clostridium difficile* infection. *Gastroenterology*. 2017;152:799–811. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.11.010>, e7.
- Valdés-Varela L, Alonso-Guervos M, García-Suárez O, Gueimonde M, Ruas-Madiedo P. Screening of *Bifidobacteria* and *Lactobacilli* able to antagonize the cytotoxic effect of *Clostridium difficile* upon intestinal epithelial ht29 monolayer. *Front Microbiol*. 2016;7:577. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00577>.
- Ma Y, Yang JY, Peng X, Xiao KY, Xu Q, Wang C. Which probiotic has the best effect on the prevention of *Clostridium difficile*-associated diarrhea? A systematic review and network meta-analysis. *J Dig Dis*. 2020;21:69–80. <https://doi.org/10.1111/1751-2980.12839>.
- Robinson JL, Weir WH, Crowley JR, Hink T, Reske KA, Kwon JH, et al. Metabolomic networks connect host-microbiome processes to human *Clostridioides difficile* infections. *J Clin Invest*. 2019;130:3792–806. <https://doi.org/10.1172/JCI126905>.
- Bruno G, Gagliardi A, Oliva A, Trancassini M, Maccone A, Cicerone C, et al. Faecal microbial transplantation impact on gut microbiota composition and metabolome, microbial translocation and T-lymphocyte immune activation in recurrent *Clostridium difficile* infection patients. *New Microbiol*. 2019;42:221–4.
- Seong H, Lee SK, Cheon JH, Yong DE, Koh H, Kang YK, et al. Faecal microbiota transplantation for multidrug-resistant organism: efficacy and response prediction. *J Infect*. 2020;81:719–25. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2020.09.003>.
- Bar-Yoseph H, Carasso S, Shklar S, Korytny A, Even Dar R, Daoud H, et al. Oral capsulated fecal microbiota transplantation for eradication of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae colonization with a metagenomic perspective. *Clin Infect Dis*. 2020;8. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa737>.
- Stower H. Microbiome transplant-induced response to immunotherapy. *Nat Med*. 2021;27:21. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-060122>.
- Lau HCH, Sung JJ, Yu J. Gut microbiota: impacts on gastrointestinal cancer immunotherapy. *Gut Microbes*. 2021;13:1–21. <https://doi.org/10.1080/19490976.2020.1869504>.

Manuel Ponce-Alonso^a, Sergio García-Fernández^b,
Rosa del Campo^{a,*}

^a Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Ramón y Cajal,
Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS), and Red
Española de Investigación en Patología Infecciosa (REIPI), Instituto de
Salud Carlos III, Madrid, Spain

^b Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Marqués de
Valdecilla, Santander, Spain

* Corresponding author.
E-mail address: rosacampo@yahoo.com (R. del Campo).

Article

Long-Term Impact of Suppressive Antibiotic Therapy on Intestinal Microbiota

Rosa Escudero-Sánchez ¹ , Manuel Ponce-Alonso ² , Hugo Barragán-Prada ³, María Isabel Morosini ², Rafael Cantón ² , Javier Cobo ¹  and Rosa del Campo ^{2,*} 

- ¹ Servicio de Enfermedades Infecciosas, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS), and Red Española de Investigación en Patología Infecciosa (REIPI), 28034 Madrid, Spain; rosa.escudero@salud.madrid.org (R.E.-S.); javier.cobo@salud.madrid.org (J.C.)
 - ² Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS), and Red Española de Investigación en Patología Infecciosa (REIPI), 28034 Madrid, Spain; lugonauta@gmail.com (M.P.-A.); mariaisabel.morosini@salud.madrid.org (M.I.M.); rafael.canton@salud.madrid.org (R.C.)
 - ³ Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS), 28034 Madrid, Spain; hugobprada@gmail.com
- * Correspondence: rosa.campo@salud.madrid.org; Tel.: +34-913-368-832

Abstract: The aim was to describe the safety of indefinite administration of antibiotics, the so-called suppressive antibiotic therapy (SAT) and to provide insight into their impact on gut microbiota. 17 patients with SAT were recruited, providing a fecal sample. Bacterial composition was determined by 16S rDNA massive sequencing, and their viability was explored by PCR-DGGE with and without propidium monoazide. Presence of antibiotic multiresistant bacteria was explored through the culture of feces in selective media. High intra-individual variability in the genera distribution regardless of the antibiotic or antibiotic administration ingestion period, with few statistically significant differences detected by Bray-Curtis distance-based principle component analysis, permutational multivariate analysis of variance and linear discriminant analysis effect size analysis. However, the microbiota composition of patients treated with both beta-lactams and sulfonamides clustered by a heat map. Curiously, the detection of antibiotic resistant bacteria was almost anecdotic and CTX-M-15-producing *E. coli* were detected in two subjects. Our work demonstrates the overall clinical safety of SAT and the low rate of the selection of multidrug-resistant bacteria triggered by this therapy. We also describe the composition of intestinal microbiota under the indefinite use of antibiotics for the first time.

Keywords: suppressive antibiotic therapy; gut microbiota; PCR-DGGE; bacterial viability; propidium monoazide; antibiotic multiresistant colonization



Citation: Escudero-Sánchez, R.; Ponce-Alonso, M.; Barragán-Prada, H.; Morosini, M.I.; Cantón, R.; Cobo, J.; del Campo, R. Long-Term Impact of Suppressive Antibiotic Therapy on Intestinal Microbiota. *Genes* **2021**, *12*, 41. <https://doi.org/10.3390/genes12010041>

Received: 27 November 2020

Accepted: 29 December 2020

Published: 30 December 2020

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Increased life expectancy with an acceptable quality of life is a relevant characteristic of current society. The rate of joint replacement surgery is increasing worldwide, with estimates of up to 80,000 operations annually in Spain and an incidence of further prosthetic joint infection of 3–4% [1]. Prosthetic infection increases not only morbidity and mortality rates (approximately 2–7% for patients over 80 years of age) but also healthcare costs [2]. The factors that contribute to implant associated infections are related to the implanted biomaterial, surgical procedure, soft tissue and immunological system status, and infective microorganism-related factors [2]. Managing this situation, including the surgical and non-surgical approaches, is complex. A curative approach is not possible for a small proportion of patients, whose only option for controlling symptoms and maintaining functionality is the indefinite administration of antibiotics, also known as suppressive antibiotic therapy (SAT), an apparently safe and well-tolerated treatment [3–6]. The antimicrobial impact of SAT is not limited to the infection site; one of the most concerning adverse effect is the

disturbance of the commensal gut microbiota. Although several studies have assessed the long-term and short-term effects of particular antibiotics on gut microbiota [7–11], this feature has not been explored in patients undergoing SAT, who are usually elderly and have numerous comorbidities and are therefore candidates for colonization/infection by pathogens such as *Clostridioides difficile* and multidrug-resistant bacteria. The aim of this study was to describe the safety of SAT over extended periods and its ecological impact on gut microbiota.

2. Materials and Methods

2.1. Study Design

We conducted a prospective observational study at our center's Department of Infectious Diseases from 2016 to 2018 on patients undergoing SAT due to unresolved implant-associated infection managed with implant maintenance. The inclusion criteria were an age over 18 years, regular follow-up in our consultation, signing the written informed consent document and undergoing SAT for at least an entire month. The exclusion criteria were a history of inflammatory bowel disease (IBD), colorectal cancer, *C. difficile* infection in the previous 3 months and the consumption of other antibiotics due to a different infectious episode in the previous 30 days. Each patient provided a fecal sample, and their demographic and clinical characteristics were recorded from their clinical charts in an anonymous confidential database. This study was approved by the center's local ethics committee (27 March 2017 acta 321).

2.2. Sample Processing

After collecting the feces, the samples were divided into two aliquots and immediately frozen at -80°C . One aliquot was employed to determine the colonization of viable antibiotic multidrug-resistant bacteria by conventional microbiological cultures, whereas the remaining aliquot was reserved to determine the whole bacterial composition by 16S rDNA amplification and massive sequencing.

To select multidrug-resistant bacteria, the samples were cultivated in M-Enterococcus agar plates supplemented with 6 mg/L of vancomycin, mannitol-salt agar plates supplemented with 4 mg/L of oxacillin, MacConkey agar plates supplemented with 1 mg/L of cefotaxime and with 2 mg/L of imipenem. We performed extended incubation at 37°C for at least 5 days to allow for the growth of fastidious organisms. Colonies were identified by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight Mass Spectrometry (Bruker Daltonics, Leipzig, Germany), and their antibiotic susceptibility was determined using the MicroScan WalkAway system (Beckman Coulter, Brea CA, USA).

To determine the whole microbiota composition, we completely solubilized portions of 0.5 mg of feces in 5 mL of sterile water and employed 0.5 mL of this solution to obtain total DNA using the QIAamp kit (Qiagen, Hilden, Germany), determining their concentration and quality using the Qubit fluorometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). We amplified the V3-4 region of the bacterial 16S rDNA gene by PCR and then used the amplicons to prepare the sequencing library, following the Illumina 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation Guide. Lastly, 16S rDNA massive sequencing was performed on a MiSeq platform (Illumina, San Diego CA, USA) at the Foundation for the Promotion of Health and Biomedical Research (FISABIO) in Valencia, Spain.

2.3. Bioinformatics and Statistical Analysis

The 16S rDNA sequencing data analysis and statistics were performed using the QIIME2 (version 2018.4) software package [12]. Taxonomic annotation of the operational taxonomic units was performed by employing the classify-sklearn naïve Bayes taxonomy classifier via the “q2-feature-classifier” plugin for QIIME2, using the SILVA 132 database as reference [13]. The relative abundance and contingency tables included singletons and very low represented taxons. Alpha and beta diversity parameters were calculated using the “diversity” plugin for QIIME2. The taxonomic alpha diversity and community richness

were estimated using the Shannon and Chao1 indices, respectively. Significant differences in these parameters, according to the type of antibiotic employed for treatment, were tested using a Kruskal-Wallis pairwise analysis. Values were considered statistically significant if <0.05 . The bacterial composition between samples (or beta diversity) was estimated using the Bray-Curtis distance, which determines a matrix of dissimilarity scores based on the taxa present and their relative abundance [14]. After grouping the samples by antibiotic therapy type, a permutational multivariate analysis of variance was applied to test whether the intragroup distances differed significantly from the intergroup distances. We also graphically explored the Bray-Curtis distances by a principal coordinate analysis using the “emperor” plugin for QIIME2 [15]. We built a heat map using the 50 genera with a higher median relative abundance using the “heatmap” plugin for QIIME2. Lastly, we performed a linear discriminate analysis effect size (LEfSe) to assess the differential abundance of selective taxa between the antibiotic therapy groups [16]. The alpha value for the factorial Kruskal-Wallis test was 0.05, and the threshold for the logarithmic linear discriminant analysis score for discriminative features was set at 2.0. All sequencing reads that map to the human reference genome have been removed from the sequencing files.

2.4. Bacterial Viability

As bacterial viability cannot be inferred from the high-throughput sequencing data, we aimed to evaluate the SAT impact on alive bacteria using propidium monoazide (PMA), a photoreactive DNA dye that does not interact with intact biological membranes, instead targeting free DNA and dead cells. Once PMA is intercalated into a DNA molecule, it prevents its amplification by PCR, obtaining only positive amplification from viable bacteria.

Consequently, all fecal samples were processed in parallel with and without PMA in addition to a control group of dead bacteria after boiling for 15 min. The PMA was subsequently activated by incubating in the dark for 5 min and photoactivating for 30 min with blue LED light. We then extracted total DNA using the QIAamp kit (Qiagen, Hilden, Germany) and performed universal bacterial amplification using rDNA 16S primers. Amplicons were further separated and visualized on a gradient of denaturing acrylamide gel (DGGE) to differentiate live and dead bacterial species.

3. Results

3.1. Clinical Data and Adverse Effects

Of the 20 patients treated in our department who met the inclusion criteria, 17 of them signed the informed consent and provided a fecal sample. Table 1 shows the patients' demographic and clinical data, with a homogeneous sex distribution (8 female and 9 male patients) and a mean age of 75.9 ± 12.5 years. One of the patients (34 years old) was considerably younger than the others, who were between 66 and 88 years old. The Charlson index that predicts 10-year survival in patients with multiple comorbidities had a median value of 1.24 ± 1.48 /IQR 1 (0–1.5), estimating a probability of 10-years survival of 96%. The unresolved prosthetic infections were mainly caused by *Staphylococcus aureus* (8 patients, 47.1%), and *Staphylococcus epidermidis* (3 patients, 17.6%). By the sample collection time, the patients had taken antibiotics for a median of 32 months (range, 1–109 months).

Each antibiotic therapy was individually considered based on the patients' characteristics, tolerability, safety profile, drug-drug interactions, and the antibiotic susceptibility of the infective microorganism. The prescribed oral antibiotics were beta-lactams (6 patients, 35.2%), cotrimoxazole (4 patients, 23.5%), fluoroquinolones (4 patients, 23.5%, one of them in combination with rifamycin), tetracyclines (2 patients 11.7%), and clindamycin (1 patient 5.8%). The remaining patient was hospital-admitted with cancer, had a central catheter and was administered intravenous teicoplanin.

The patients were questioned as to SAT-related adverse effects, with 5 (29.4%) reporting mild gastrointestinal symptoms. Three patients had asymptomatic bacteriuria, whereas a fourth patient experienced a single episode of urinary tract infection caused by a microorganism resistant to the antibiotic used in the SAT regimen (doxycycline); however,

intestinal colonization by the infective microorganism was not demonstrated. Lastly, one of the female patients reported vaginal candidiasis and weight gain, in clear association with amoxicillin intake (Table 1).

Table 1. Epidemiological and clinical data of the 17 patients with SAT.

Patient	Sex (Age in Years)	Charlson Index	Location of Infection	Microorganism	Antibiotic (Family) [Months of Antibiotic Intake]	Symptomatology Attributable to SAT
1	male (79)	1	Abdominal (mesh)	MSSA	Cefadroxil (betalactam) (17)	Flatulence
2	male (73)	1	PJI (Knee)	MSSA	Doxycycline (glycopeptide) (10)	Urinary infection
3	female (83)	0	PJI (Hip)	<i>Enterobacter cloacae</i>	Ciprofloxacin (fluoroquinolone) (17)	
4	female (83)	0	PJI (Hip)	MSSA	Cephalexin (betalactam) (18)	Asymptomatic bacteriuria
5	male (89)	1	PJI (Hip)	MSSA	Cephalexin (betalactam) (14)	
6	female (79)	0	PJI (Knee)	MRSE	Cotrimoxazole (109)	Diarrhoea and Asymptomatic bacteriuria
7	female (80)	1	PJI (Knee)	MSSA	Levofloxacin (fluoroquinolone) /Rifamycin (1)	
8	female (88)	0	PJI (Knee)	<i>Escherichia coli</i>	Cotrimoxazole (62)	Asymptomatic bacteriuria
9	male (73)	1	Vertebral Instrumentation	Unidentified	Cotrimoxazole (54)	Constipation
10	male (84)	3	PJI (Hip)	MSSA	Cephalexin (betalactam) (19)	
11	female (70)	1	PJI (Shoulder)	<i>Enterococcus faecalis</i>	Amoxicillin (betalactam) (11)	Weight gain and Candidiasis
12	male (66)	2	PJI (Hip)	MSSE	Doxycycline (tetracycline) (48)	Diarrhoea
13	female (82)	1	PJI (Shoulder)	<i>Cutibacterium granulosum</i>	Moxifloxacin (fluoroquinolone) (20)	Intestinal distension
14	female (74)	0	PJI (Knee)	MSSA	Clindamycin (macrolide) (21)	
15	male (72)	6	Osteosynthesis material (Humerus)	MRSE	Teicoplanin (glycopeptide) (1)	
16	male (34)	1	Vertebral Instrumentation	Polymicrobial	Cotrimoxazole (102)	
17	male (81)	2	Osteosynthesis material (Tibia)	MSSA	Cefadroxil (1)	

MSSA: methicillin-susceptible *S. aureus*; MRSA: methicillin-resistant *S. aureus*; MSSE: methicillin-susceptible *S. epidermidis*; MRSE: methicillin-resistance *S. epidermidis*; PJI: Prosthetic joint infection. Charlson index estimated the 10-years survival: 0 = 98%, 1 = 96%, 2 = 90%, 3 = 77%, 4 = 53%, 5 = 21%, and 6 = 2%.

3.2. Fecal Colonization by Antimicrobial Resistant Bacteria

The fecal carriage of antibiotic multidrug-resistant microorganisms was not detected by selective culturomics, with the exception of two extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) producing *Escherichia coli* isolates in patients 7 and 15, which were further characterized as CTX-M-15. Both patients were treated with non-beta-lactams antibiotics: levofloxacin/rifamycin and teicoplanin, respectively.

3.3. Gut Microbiota Composition

For the gut microbiota characterization, we evaluated the richness and diversity of the gut microbiota using the Shannon and Chao1 alpha diversity indices (Figure 1), detecting a similar pattern for beta-lactam and sulfonamide-treated patients, whereas tetracyclines (and particularly fluoroquinolones) provoke a considerable decrease in the Chao1 index. The most aberrant ecosystem corresponded to patient 7, who had been taking levofloxacin plus rifamycin for a single month. On the contrary, patient 15 was also treated with intravenous teicoplanin during a month but he presented high alpha-diversity values.

Figure 2 shows the phyla distribution according to the massive sequencing analysis. There was high variability among all patients and phyla, particularly for *Firmicutes* (median value, 76.6%; range, 45–95%), *Bacteroidetes* (8.7%, 0.7–45%), *Proteobacteria* (2.1%, 0.006–28%), *Actinobacteria* (3.1%, 0.2–22%), and *Verrucomicrobia* (0.01%, 0–15%). The abundance of the referent genera from the each phyla was compared by the prescribed antibiotic and the intake duration: *Faecalibacterium* from *Firmicutes*, *Bacteroides* from *Bacteroidetes*, *Escherichia/Shigella* from *Proteobacteria*, *Akkermansia* from *Verrucomicrobia*, and *Bifidobacterium* from *Actinobacteria* (Figure 3). As expected, the analysis showed high intraindividual variability; however, *Akkermansia* was more depleted by sulfonamides, whereas quinolones appeared to negatively affect *Bifidobacterium* abundance. A low abundance of *Escherichia/Shigella* was observed in all patients, except for patient 10.

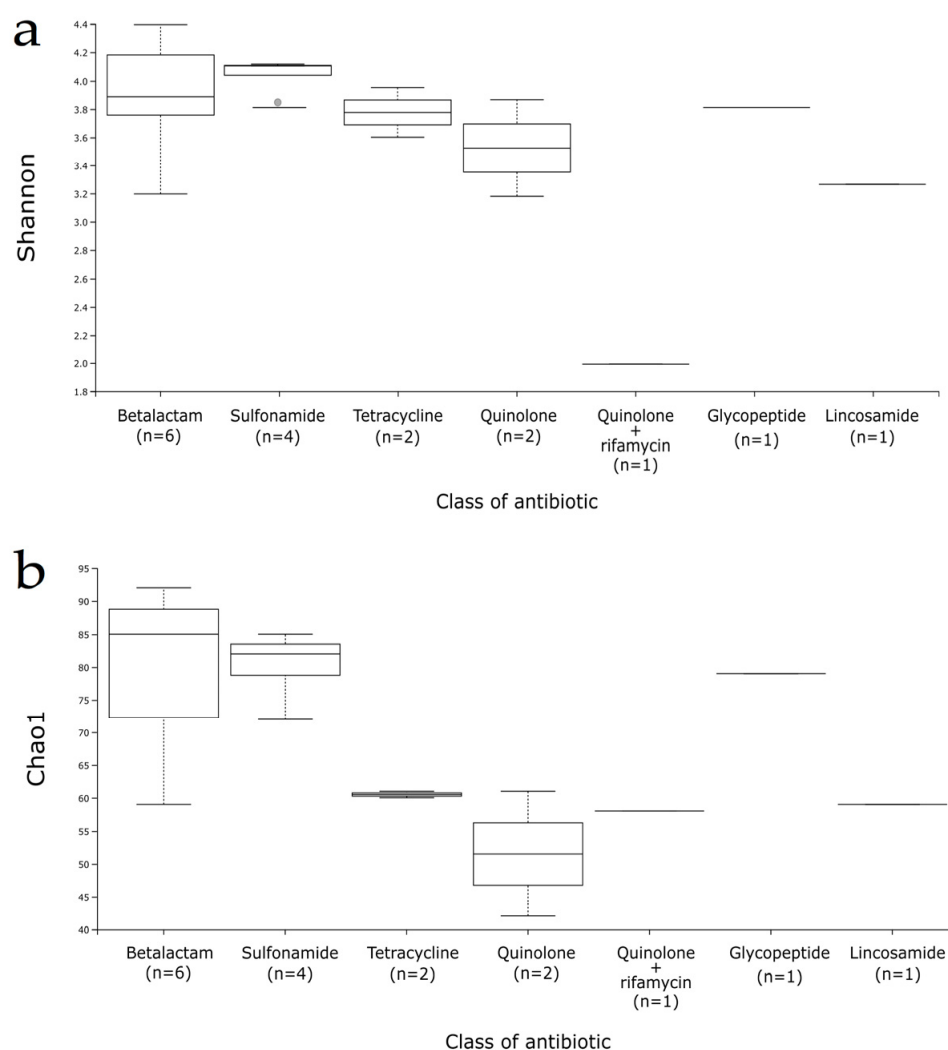


Figure 1. Alpha diversity boxplot of samples according to the antibiotic class. (a) Shannon index, (b) Chao1 index.

The beta diversity analysis using the Bray-Curtis distance-based principle component analysis and the permutational multivariate analysis of variance detected no clustering patterns according to antibiotic class or SAT duration (Figure 4). There were also no significant differences in the LEfSe analysis using default settings; however, to identify the microorganisms affected by each antibiotic, we performed a less strict comparison (Figure 5). The analysis revealed that beta-lactams inhibit *Escherichia/Shigella*, *Dorea* and *Solobacterium* genera, the *Acidaminococcaceae* family and the *Actinomyces* phyla while favoring the expansion of *Flavonifractor*, *Sutterella*, *Christensenella*, *Anaerofustis*, *Haemophilus* and *Gelria* genera. The impact of sulfonamides was considerably lower, only inhibiting the *IncertaeSedis* and favoring *Faecalibacterium*, *Prevotella*, *Pseudobutyrvibrio*, *Dorea*, *Collinsella*, *Mogibacterium*, *Alloprevotella*, *Olsenella* and *Howardella*.

Despite each individual having their particular microbiota and the fact that the antibiotic effect might not be generalizable to all individuals (mostly due to the differing gut resistome of each participant), we decided to interconnect the bacterial abundances with the SAT antibiotic using a heat map analysis (Figure 6). The results demonstrated that 3 out of 6 patients receiving beta-lactam clustered together, whereas in the 4 patients receiving sulfonamides the grouping occurred in pairs.

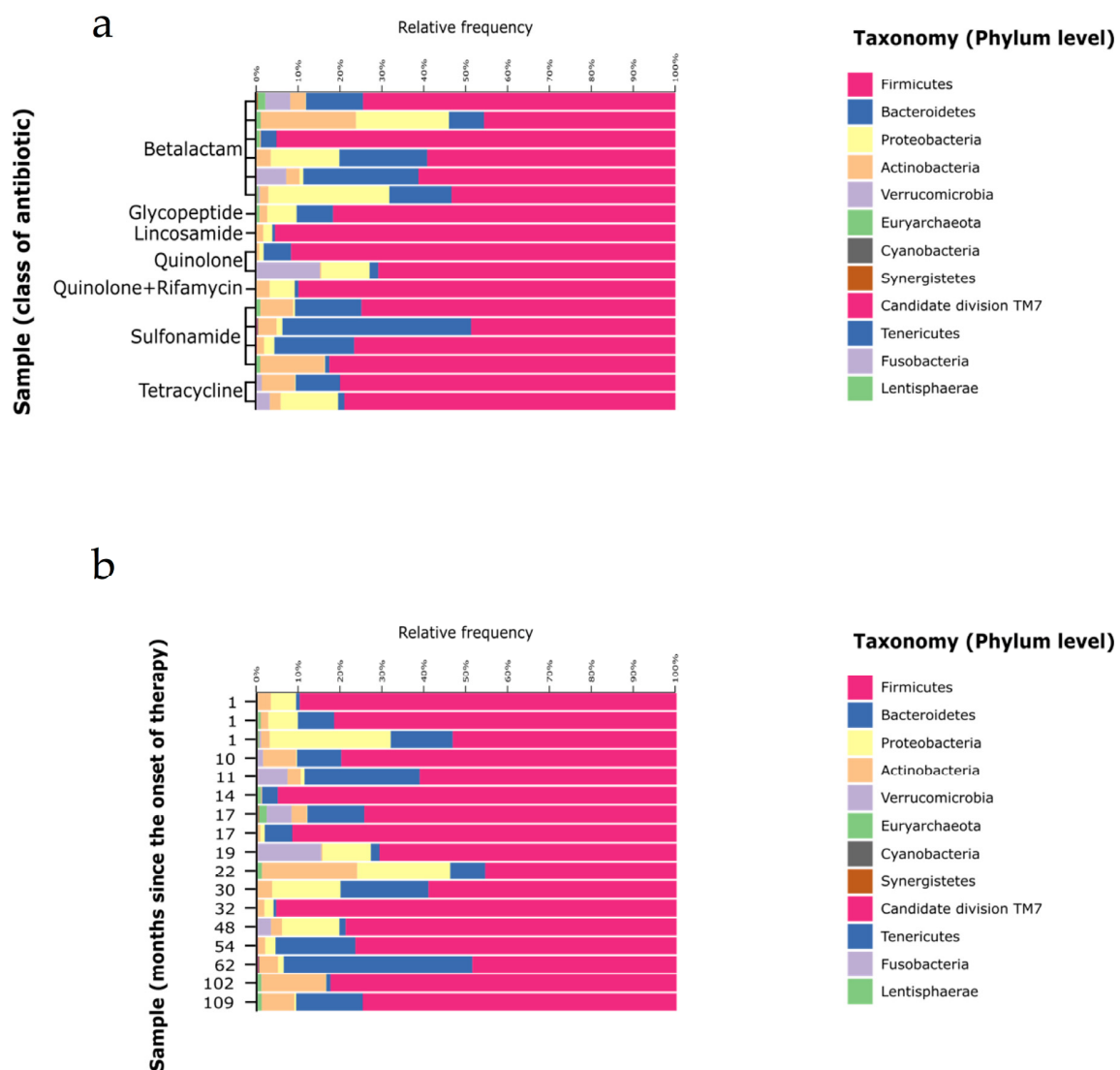


Figure 2. General overview of bacterial phyla distribution of the 17 samples considering the antibiotic class (a) and the length of the treatment (b).

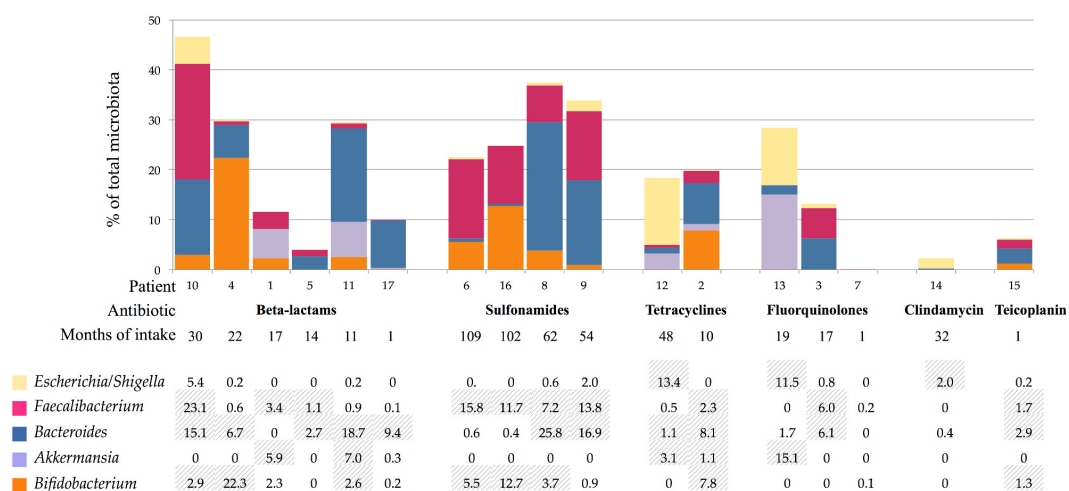


Figure 3. Abundance percentages of particular genera of majoritarian phyla for each patient: in columns is represented the addition of each genera proportion respect to the total microbiota percentages, above detailed. Striped cells correspond to those with higher abundance.

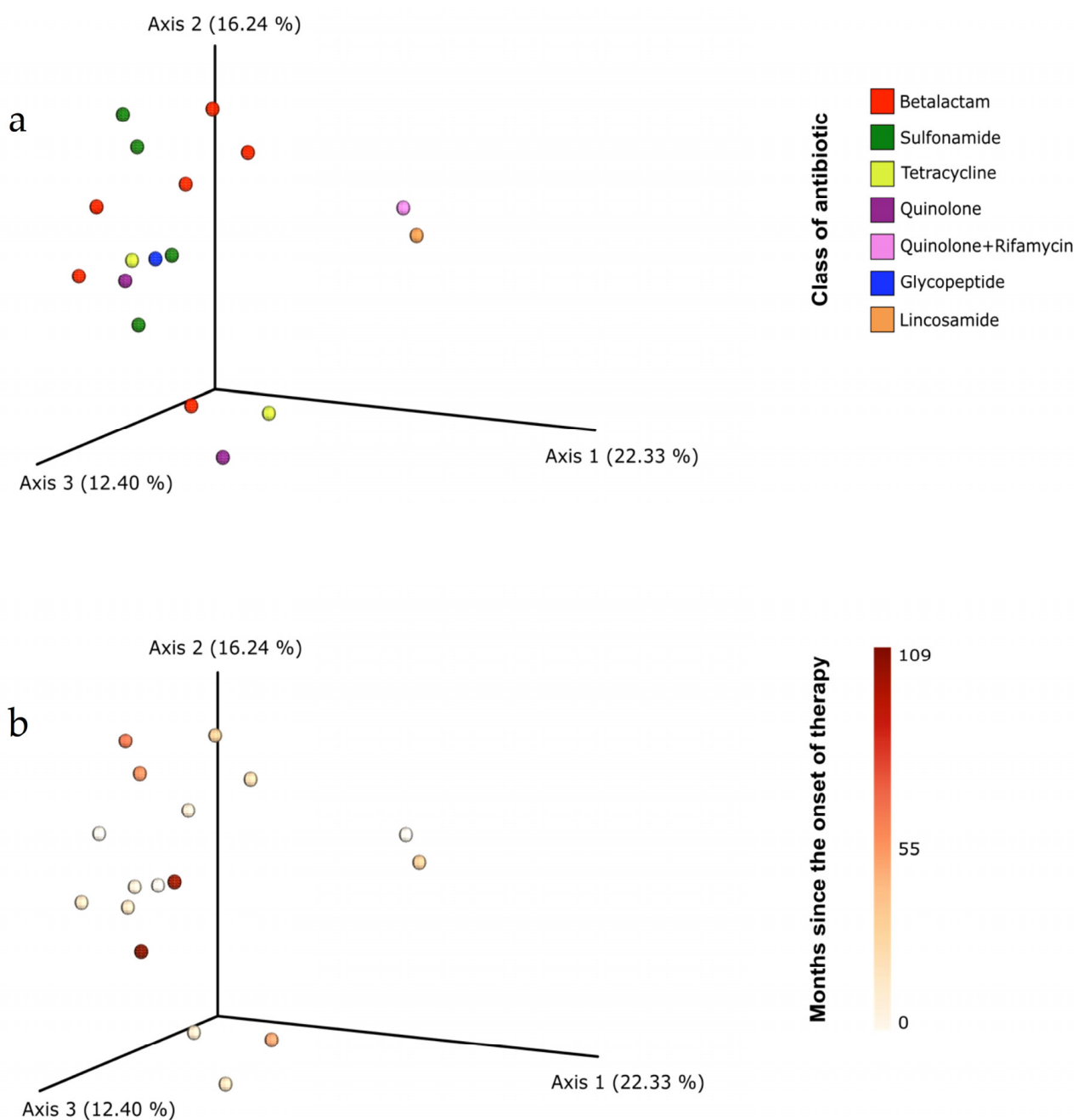


Figure 4. Principal coordinates analysis (PCoA) plot displaying the beta-diversity spatial ordination among samples taking account the antibiotic class (a) and the period of intake (b).

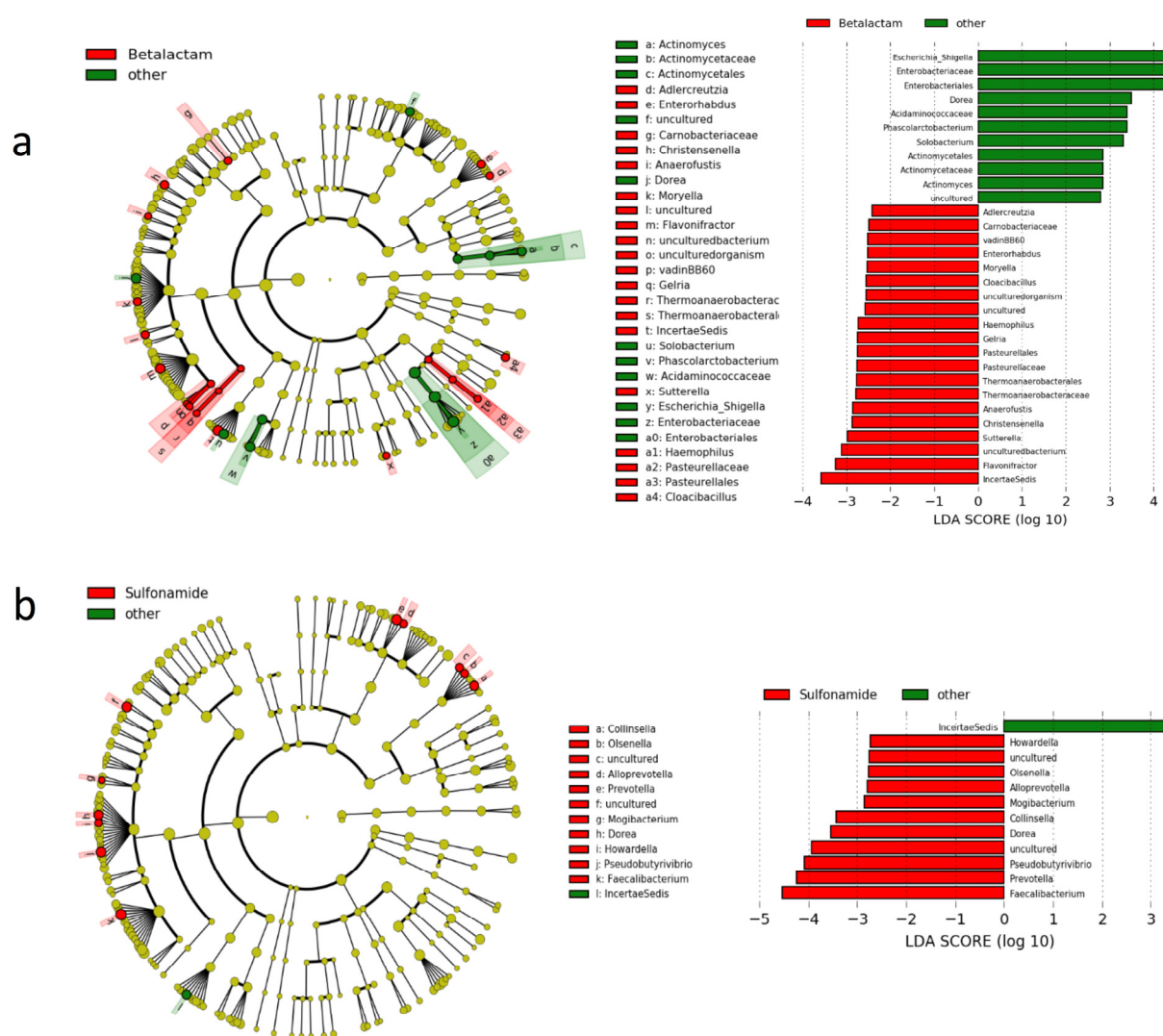


Figure 5. Differentially abundant microbial clades according to linear discriminate analysis effect size (LEfSe). The left side of each graph depicts a cladogram, where dark-yellow circles represent non-significant microbial clades, green circles represent significantly more abundant clades and red circles represent significantly less abundant clades. On the other side of each graph, significant clades and their associated LDA score are shown. (a) Comparison between patients receiving betalactam antibiotics and the other patients (b) Comparison between patients receiving sulfonamides and the other patients.

3.4. Bacterial Viability

Lastly, we assessed the viability of the fecal bacteria using PCR-denaturing gradient gel electrophoresis (with and without PMA) to inhibit the amplification of non-viable cells, thereby avoiding unspecific DNA amplifications of transient bacteria (Figure 7). We observed a similar intensity of bands in the experiments with and without PMA, which makes us presuppose that most of the intestinal bacteria preserved their viability, without significant differences between patients.

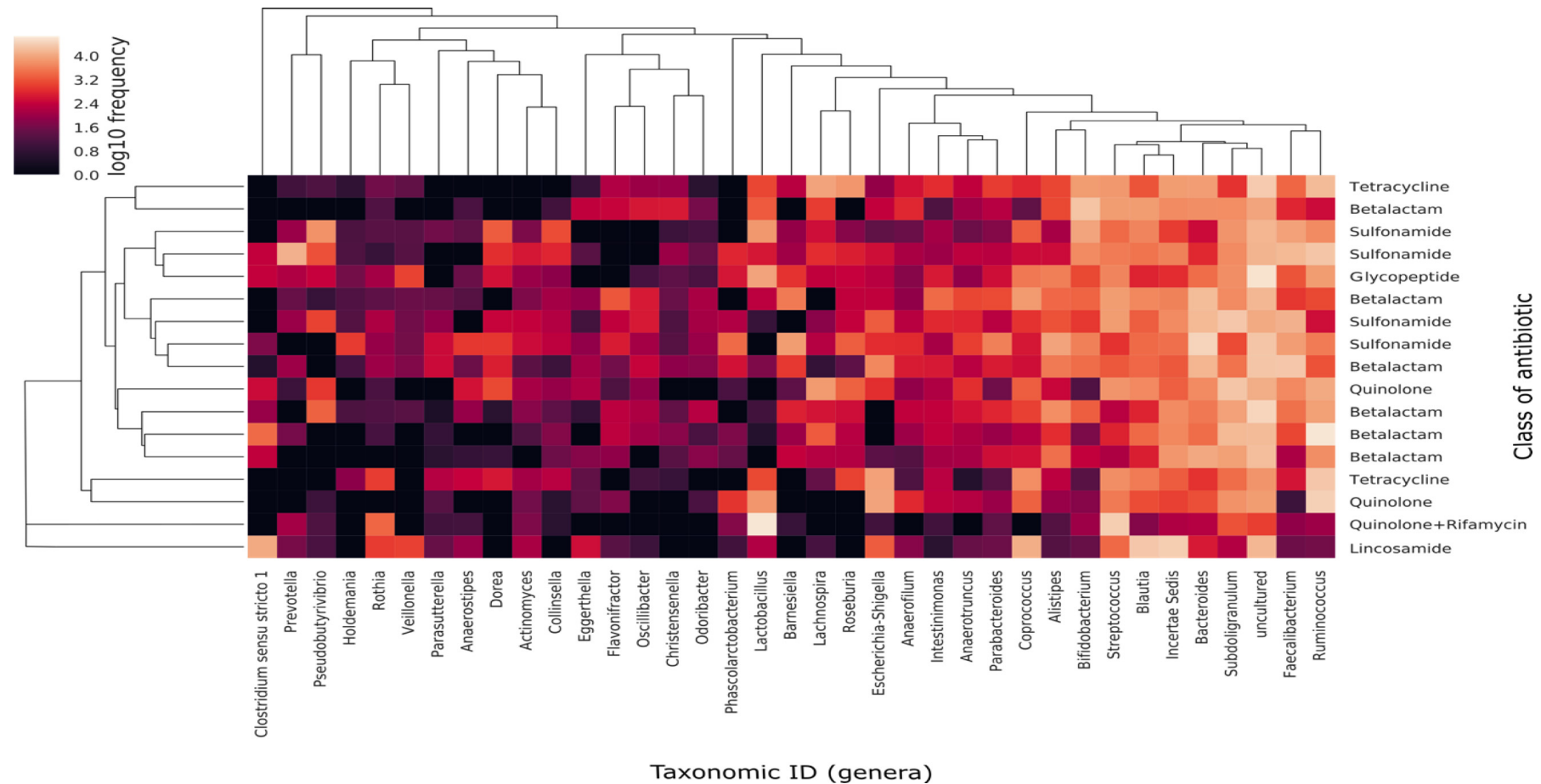


Figure 6. Heat map of the relative abundance and distribution of the 50 most abundant genera among samples. Each dot represents the overall bacterial community in each sample Y axis shows individual samples, tagged according to class of antibiotic and displayed following a dendrogram (left side of the graph) constructed by clustering analysis of Bray-Curtis distances among samples. X axis represents the 50 most abundant genera in terms of median of relative frequencies. Genera dendrogram was constructed following Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages (UPGMA) clustering analysis, which groups genera according to their co-occurrence among samples.

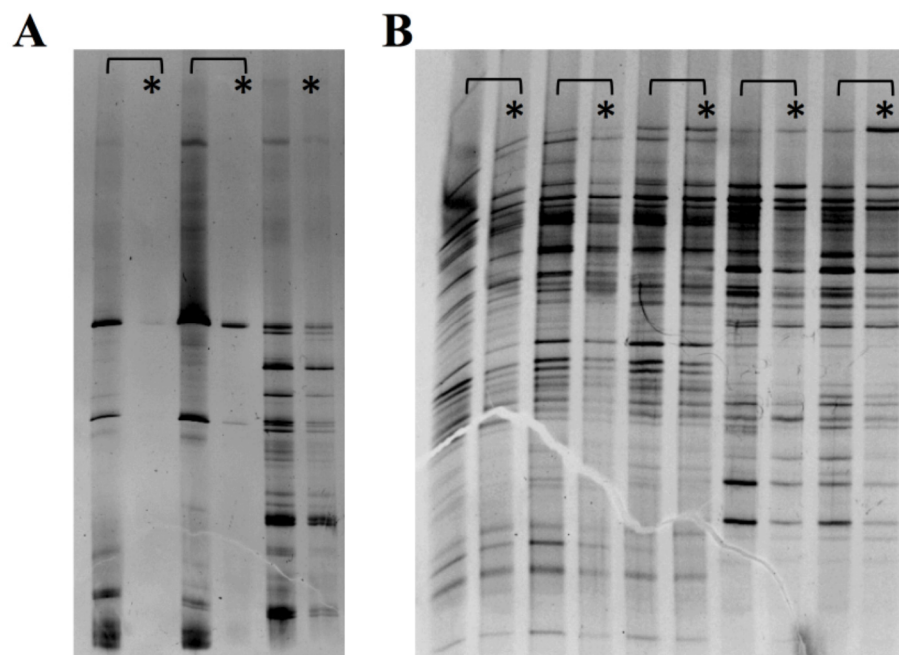


Figure 7. PCR-DGGE experiments for bacterial viability with (*) and without PMA. **(A):** Controls for alive bacteria respect to the same preparation but boiled to destroy bacterial cells. **(B):** Fecal samples from our patients with (*) and without PMA. The similar intensity of the bands across the experiments with and without PMA suggests that the bacteria were viable.

4. Discussion

The short and long-term impact of antibiotics on intestinal microbiota has been documented by nonculture-based techniques [17–22], demonstrating high intraindividual and interindividual variability, even for similar antimicrobial compounds. Most of those studies indicated an individual antibiotic response strongly influenced by the gut ecosystem's initial diversity and strength [23]. In the present study, we explored for the first time (to our knowledge) the impact of SAT on the gut microbiota of an aging population (all less one) with comorbidities (median Charlson index of 1.24) and unresolved bacterial infections. Our expected results included fecal colonization by antibiotic multidrug-resistant bacteria, not only by continuous antibiotic selection but also as a consequence of the frequent hospital visits of these elderly patients, as well as the disruption of the gut ecosystem. Surprisingly, neither of these two expectations came true.

SAT is not just a therapeutic option but is in fact the last option for treatment for implants-associated infections when the curative surgical approach is not feasible. SAT safety was our first goal, and we observed no serious complications in our cohort except for patient 11, who reported vaginal candidiasis and weight gain after amoxicillin intake. One of the most relevant consequences of prolonged antibiotic therapy is the infection by toxigenic *C. difficile* due to disruption of the commensal microbiota. The protective role of *Barnesiella* genera and the *Lachnospiraceae* family has been reported [24], and both were abundant in our cohort ($0.7 \pm 1.8\%$; range, 0–6.9% for *Barnesiella*; and $19.3 \pm 15\%$; range 3.6–72.0% for the *Lachnospiraceae* family), and that could be the reason of the low *C. difficile* prevalence among our patients.

The weight gain and vaginal candidiasis reported by patient 11 (who had taken amoxicillin for 11 months) are related to major changes in gut microbiota. The growth-promoter property of antibiotics is well known because the property has been extensively employed for livestock but at low doses. Although other patients in our study had been treated with beta-lactams, patient 11 was unique in taking amoxicillin, and we cannot rule out that an increase in body mass index was related to the SAT intake, as has been previously published by other authors [25–27]. Lastly, the mild intestinal adverse effects

such as diarrhea and flatulence observed in our study tended to disappear during the follow-up or were controlled.

Unexpectedly, antibiotic multidrug-resistant microorganisms were not detected in feces, except for two ESBL producing *E. coli* isolates but in two patients who had not been treated with a beta-lactam. Despite the oral intake, most of the antibiotic dose is absorbed in the small intestine, passing to the blood compartment, with only small amounts of the antibiotic reaching the colon. However, non-modified antibiotic molecules could also be reintroduced into the lumen through biliary excretion, particularly the lipophilic antibiotics such as tetracyclines and fluoroquinolones. Available data on the selection process of antibiotic-resistant bacteria are inferred from in vitro experiments, and some discrepancies can occur in vivo [24]. One factor to consider is that antimicrobials (such as azithromycin) can exert adverse effects regardless of their antimicrobial activity, as well as potent anti-inflammatory effects [28]. The interplay between microbiota and immunity is one of the main factors influencing homeostasis [29,30]; although the potential antibacterial activity of other drugs or foods should also be considered [31].

Despite previous efforts, specific intestinal microbiota targets have not yet been established for each family of antimicrobials. Aminoglycosides appear to select *Bacteroidetes* and *Firmicutes* phyla, whereas quinolones activity largely varies in different individuals [32]. Fluoroquinolones appear to have a deeper impact [20,22], although other authors have reported a low effect for fluoroquinolones and vancomycin (intravenous), whereas trimethoprim-sulfamethoxazole had very little impact [33]. The addition of a carbon-derived supplement that absorbs excess antibiotic in the lumen has been proven to protect intestinal microbiota [34], and this strategy should be considered for extended antibiotic therapies such as SAT. All available data indicate individualized activity of the antibiotics in the gut microbiota according to the previous individual composition of the microbiota [20,35]. Our population was characterized by their advanced age and clinical status, the median value of Charlson index was 1.24 ± 1.48 /IQR 1 (0–1.5). Despite the lack of a baseline sample for all patients prior to starting the SAT, we observed a remarkable conservation of the bacterial alpha-diversity and beta-diversity after the extended antibiotic exposure. Moreover, we detected certain patterns, mainly in the beta-lactams and sulfonamide, despite those being the most widely used antibiotics.

The long-term antibiotic effects on the entire gut ecosystem have not been extensively studied, and bacterial signaling is probably different when they are excited/stimulated by antimicrobial molecules. *Bacteroidetes*, *Bifidobacterium*, strict anaerobes, and minority populations seem to be the most fragile bacterial populations [18,36–39], and our results showed the disparity in the abundance of some of these populations.

Our study's main limitations are the small number of patients for each antimicrobial type, the specific clinical features of each individual that prevent an homogeneous comparison and the lack of baseline samples to better determine the long-term impact of the antibiotics. In contrast, the study's strength was the inclusion of the PMA technique to assure bacterial viability, which was demonstrated as high and comparable in all patients.

5. Conclusions

In summary, our study demonstrates the overall safety of SAT and the low-rate of antibiotic multi-drug resistant bacterial selection triggered by this therapy. We also described the composition of the intestinal microbiota under the indefinite use of antibiotics for the first time. Our data suggest that SAT is safe in a clinical context of specialized clinical follow-up that monitors adverse effects, interactions and toxicity, introducing the necessary modifications in the treatment.

Author Contributions: Conceptualization, R.E.-S. and R.d.C.; methodology, R.E.-S., M.P.-A., H.B.-P. and M.I.M.; software, M.P.-A.; validation, M.P.-A. and H.B.-P.; formal analysis, R.E.-S., R.C., J.C. and R.d.C.; resources, R.d.C.; data curation, R.E.-S. and M.P.-A.; writing—original draft preparation, R.E.-S., M.P.-A., and R.d.C.; writing—review and editing, all authors; funding acquisition, R.d.C. and M.P.-A. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the project PI17/00115 which recipient is R.d.C. and by Plan Nacional de I+D+i 2013–2016 and Instituto de Salud Carlos III, Subdirección General de Redes y Centros de Investigación Cooperativa, Ministerio de Economía, Industria y Competitividad, Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI, RD16/0016/0011) cofinanced by European Development Regional Fund “A way to achieve Europe” (ERDF), Operative program Intelligent Growth 2014–2020. RE-S is supported by REIPI. M.P.-A. was supported by the Programa Operativo de Empleo Juvenil, co-financed by the European Social Fund Investing in your future (ESF) and ERDF (PEJD-2018-PRE/BMD-8237), and by a Rio Hortega contract (CM19/00069) from the Instituto de Salud Carlos III.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the Ethics Committee of Ramón y Cajal Hospital (27 March 2017 acta 321).

Data Availability Statement: Metagenomic sequencing datasets generated and analyzed during the current study are available in the European Nucleotide Archive under accession number: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJNA633161>.

Acknowledgments: We are grateful to Marta Cobo for their technical support.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social. Subdirección General de Información Sanitaria e Innovación. Registro de Atención Especializada/Conjunto Mínimo Básico de Datos (RAE-CMBD) de los hospitales del Sistema Nacional de Salud. Available online: <http://icmbd.es> (accessed on 21 June 2020).
- Kapadia, B.H.; Berg, R.A.; Daley, J.A.; Fritz, J.; Bhav, A.; Mont, M.A. Periprosthetic joint infection. *Lancet* **2016**, *387*, 386–394. [\[CrossRef\]](#)
- Escudero-Sanchez, R.; Senneville, E.; Digumber, M.; Soriano, A.; Del Toro, M.D.; Bahamonde, A.; Del Pozo, J.L.; Guio, L.; Murillo, O.; Rico, A.; et al. Suppressive antibiotic therapy in prosthetic joint infections: A multicentre cohort study. *Clin. Microbiol. Infect.* **2020**, *26*, 499–505. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Leijtens, B.; Weerwag, L.; Schreurs, B.W.; Kullberg, B.J.; Rijnen, W. Clinical outcome of antibiotic suppressive therapy in patients with a prosthetic joint infection after hip replacement. *J. Bone Jt. Infect.* **2019**, *4*, 268–276. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Prendki, V.; Ferry, T.; Sergent, P.; Oziol, E.; Forestier, E.; Fraisse, T.; Tounes, S.; Ansart, S.; Gaillat, J.; Bayle, S.; et al. Prolonged suppressive antibiotic therapy for prosthetic joint infection in the elderly: A national multicentre cohort study. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2017**, *36*, 1577–1585. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Wouthuyzen-Bakker, M.; Nijman, J.M.; Kampinga, G.A.; van Assen, S.; Jutte, P.C. Efficacy of antibiotic suppressive therapy in patients with a prosthetic joint infection. *J. Bone Jt. Infect.* **2017**, *2*, 77–83. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Jernberg, C.; Löfmark, S.; Edlund, C.; Jansson, J.K. Long-term ecological impacts of antibiotic administration on the human intestinal microbiota. *ISME J.* **2007**, *1*, 56–66. [\[CrossRef\]](#)
- Jakobsson, H.E.; Jernberg, C.; Andersson, A.F.; Sjölund-Karlsson, M.; Jansson, J.K.; Engstrand, L. Short-term antibiotic treatment has differing long-term impacts on the human throat and gut microbiome. *PLoS ONE* **2010**, *5*, e9836. [\[CrossRef\]](#)
- Burdet, C.; Nguyen, T.T.; Duval, X.; Ferreira, S.; Andremon, A.; Guedj, J. Impact of antibiotic gut exposure on the temporal changes in microbiome diversity. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2019**, *63*, e00820-19. [\[CrossRef\]](#)
- Becattini, S.; Taur, Y.; Pamer, E.G. Antibiotic-induced changes in the intestinal microbiota and disease. *Trends Mol. Med.* **2016**, *22*, 458–478. [\[CrossRef\]](#)
- Lange, K.; Buerger, M.; Stallmach, A.; Bruns, T. Effects of antibiotics on gut microbiota. *Dig. Dis.* **2016**, *34*, 260–268. [\[CrossRef\]](#)
- Caporaso, J.G.; Kuczynski, J.; Stombaugh, J.; Bittinger, K.; Bushman, F.D.; Costello, E.K.; Fierer, N.; Peña, A.G.; Goodrich, J.K.; Gordon, J.I.; et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat. Methods* **2010**, *7*, 335–336. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Quast, C.; Pruesse, E.; Yilmaz, P.; Gerken, J.; Schweer, T.; Yarza, P.; Peplies, J.; Glöckner, F.O. The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. *Nucl. Acids Res.* **2013**, *41*, D590–D596. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Bray, J.R.; Curtis, J.T. An ordination of the upland forest communities of Southern Wisconsin. *Ecol. Monogr.* **1957**, *27*, 325–349. [\[CrossRef\]](#)
- Vázquez-Baeza, Y.; Pirrung, M.; Gonzalez, A.; Knight, R. EMPeror: A tool for visualizing high-throughput microbial community data. *Gigascience* **2013**, *2*, 16. [\[CrossRef\]](#)
- Segata, N.; Izard, J.; Waldron, L.; Gevers, D.; Miropolsky, L.; Garrett, W.S.; Huttenhower, C. Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biol.* **2011**, *12*, R60. [\[CrossRef\]](#)
- Jernberg, C.; Lofmark, S.; Edlund, C.; Jansson, J.K. Long-term impacts of antibiotic exposure on the human intestinal microbiota. *Microbiology* **2010**, *156*, 3216–3223. [\[CrossRef\]](#)
- Palleja, A.; Mikkelsen, K.H.; Forslund, S.K.; Kashani, A.; Allin, K.H.; Nielsen, T.; Hansen, T.H.; Liang, S.; Feng, Q.; Zhang, C.; et al. Recovery of gut microbiota of healthy adults following antibiotic exposure. *Nat. Microbiol.* **2018**, *3*, 1255–1265. [\[CrossRef\]](#)

19. Fouhy, F.; Guinane, C.M.; Hussey, S.; Wall, R.; Ryan, C.A.; Dempsey, E.M.; Murphy, B.; Ross, R.P.; Fitzgerald, G.F.; Stanton, C.; et al. High-throughput sequencing reveals the incomplete, short-term recovery of infant gut microbiota following parenteral antibiotic treatment with ampicillin and gentamicin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2012**, *56*, 5811–5820. [\[CrossRef\]](#)
20. Dethlefsen, L.; Relman, D.A. Incomplete recovery and individualized responses of the human distal gut microbiota to repeated antibiotic perturbation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108* (Suppl. S1), 4554–4561. [\[CrossRef\]](#)
21. Pérez-Cobas, A.E.; Gosalbes, M.J.; Friedrichs, A.; Knecht, H.; Artacho, A.; Eismann, K.; Otto, W.; Rojo, D.; Bargiela, R.; von Bergen, M.; et al. Gut microbiota disturbance during antibiotic therapy: A multi-omic approach. *Gut* **2013**, *62*, 1591–1601. [\[CrossRef\]](#)
22. Panda, S.; El khader, I.; Casellas, F.; López Vivancos, J.; García Cors, M.; Santiago, A.; Cuenca, S.; Guarner, F.; Manichanh, C. Short-term effect of antibiotics on human gut microbiota. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e95476. [\[CrossRef\]](#)
23. Raymond, F.; Ouameur, A.A.; Déraspe, M.; Iqbal, N.; Gingras, H.; Dridi, B.; Leprohon, P.; Plante, P.L.; Giroux, R.; Bérubé, È.; et al. The initial state of the human gut microbiome determines its reshaping by antibiotics. *ISME J.* **2016**, *10*, 707–720. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
24. Schubert, A.M.; Sinani, H.; Schloss, P.D. Antibiotic-induced alterations of the murine gut microbiota and subsequent effects on colonization resistance against *Clostridium difficile*. *mBio* **2015**, *6*, e00974. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
25. Li, R.; Wang, H.; Shi, Q.; Wang, N.; Zhang, Z.; Xiong, C.; Liu, J.; Chen, Y.; Jiang, L.; Jiang, Q. Effects of oral florfenicol and azithromycin on gut microbiota and adipogenesis in mice. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0181690. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
26. Thuny, F.; Richet, H.; Casalta, J.P.; Angelakis, E.; Habib, G.; Raoult, D. Vancomycin treatment of infective endocarditis is linked with recently acquired obesity. *PLoS ONE* **2010**, *5*, e9074. [\[CrossRef\]](#)
27. Angelakis, E.; Million, M.; Kankoe, S.; Lagier, J.C.; Armougom, F.; Giorgi, R.; Raoult, D. Abnormal weight gain and gut microbiota modifications are side effects of long-term doxycycline and hydroxychloroquin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2014**, *58*, 3342–3347. [\[CrossRef\]](#)
28. Ianiro, G.; Tilg, H.; Gasbarrini, A. Antibiotics as deep modulators of gut microbiota: Between good and evil. *Gut* **2016**, *65*, 1906–1915. [\[CrossRef\]](#)
29. Sun, L.; Zhang, X.; Zhang, Y.; Zheng, K.; Xiang, Q.; Chen, N.; Chen, Z.; Zhang, N.; Zhu, J.; He, Q. Antibiotic-Induced disruption of gut microbiota alters local metabolomes and immune responses. *Front. Cell Infect. Microbiol.* **2019**, *9*, 99. [\[CrossRef\]](#)
30. Mu, C.; Zhu, W. Antibiotic effects on gut microbiota, metabolism, and beyond. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2019**, *103*, 9277–9285. [\[CrossRef\]](#)
31. Maier, L.; Pruteanu, M.; Kuhn, M.; Zeller, G.; Telzerow, A.; Anderson, E.E.; Brochado, A.R.; Fernandez, K.C.; Dose, H.; Mori, H.; et al. Extensive impact of non-antibiotic drugs on human gut bacteria. *Nature* **2018**, *555*, 623–628. [\[CrossRef\]](#)
32. Ng, K.M.; Aranda-Díaz, A.; Tropini, C.; Frankel, M.R.; Van Treuren, W.; O’Laughlin, C.T.; Merrill, B.D.; Yu, F.B.; Pruss, K.M.; Oliveira, R.A.; et al. Recovery of the gut microbiota after antibiotics depends on host diet, community context, and environmental reservoirs. *Cell Host Microbe*. **2019**, *26*, 650–665.e4. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
33. Morjaria, S.; Schluter, J.; Taylor, B.P.; Littmann, E.R.; Carter, R.A.; Fontana, E.; Peled, J.U.; van den Brink, M.R.M.; Xavier, J.B.; Taur, Y. Antibiotic-induced shifts in fecal microbiota density and composition during hematopoietic stem cell transplantation. *Infect. Immun.* **2019**, *87*, e00206–19. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
34. Burdet, C.; Sayah-Jeanne, S.; Nguyen, T.T.; Miossec, C.; Saint-Lu, N.; Pulse, M.; Weiss, W.; Andreumont, A.; Mentré, F.; de Gunzburg, J. Protection of hamsters from mortality by reducing fecal moxifloxacin concentration with dav131a in a model of moxifloxacin-induced *Clostridium difficile* colitis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2017**, *61*, e00543–17. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
35. Leong, K.S.W.; Derraik, J.G.B.; Hofman, P.L.; Cutfield, W.S. Antibiotics, gut microbiome and obesity. *Clin. Endocrinol.* **2018**, *88*, 185–200. [\[CrossRef\]](#)
36. Yi, H.; Kim, H.S. Antibiotic scars left on the gut microbiota from the stringent response. *Trends Microbiol.* **2018**, *26*, 735–737. [\[CrossRef\]](#)
37. Wei, S.; Mortensen, M.S.; Stokholm, J.; Brejnrod, A.D.; Thorsen, J.; Rasmussen, M.A.; Trivedi, U.; Bisgaard, H.; Sørensen, S.J. Short- and long-term impacts of azithromycin treatment on the gut microbiota in children: A double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *EBioMedicine* **2018**, *38*, 265–272. [\[CrossRef\]](#)
38. Kim, S.; Covington, A.; Pamer, E.G. The intestinal microbiota: Antibiotics, colonization resistance, and enteric pathogens. *Immunol. Rev.* **2017**, *279*, 90–105. [\[CrossRef\]](#)
39. Fujisaka, S.; Ussar, S.; Clish, C.; Devkota, S.; Dreyfuss, J.M.; Sakaguchi, M.; Soto, M.; Konishi, M.; Softic, S.; Altindis, E.; et al. Antibiotic effects on gut microbiota and metabolism are host dependent. *J. Clin. Investig.* **2016**, *126*, 4430–4443. [\[CrossRef\]](#)

Article

Machine Learning Study in Caries Markers in Oral Microbiota from Monozygotic Twin Children

Esther Alia-García ¹, Manuel Ponce-Alonso ^{2,†} , Claudia Saralegui ^{2,†}, Ana Halperin ² , Marta Paz Cortés ¹ ,
María Rosario Baquero ¹ , David Parra-Pecharromán ^{1,3}, Javier Galeano ^{4,*}  and Rosa del Campo ^{1,2,†} 

¹ Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Alfonso X El Sabio, Villanueva de la Cañada, 28691 Madrid, Spain; estheraliagarcia@yahoo.es (E.A.-G.); mpazcor@uax.es (M.P.C.); mbaquart@uax.es (M.R.B.); dparrpec@uax.es (D.P.-P.); rosacampo@yahoo.com (R.d.C.)

² Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Ramón y Cajal and Instituto Ramón y Cajal de Investigaciones Sanitarias (IRYCIS), 28034 Madrid, Spain; lugonauta@gmail.com (M.P.-A.); claudiasaralegui1994@gmail.com (C.S.); ana.halperin@gmail.com (A.H.)

³ Departamento de Biología, Servicio de Criminalística, Dirección General de la Guardia Civil, 28003 Madrid, Spain

⁴ Complex Systems Group, Universidad Politécnica de Madrid, 28040 Madrid, Spain

* Correspondence: javier.galeano@upm.es

† Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI).



Citation: Alia-García, E.; Ponce-Alonso, M.; Saralegui, C.; Halperin, A.; Paz Cortés, M.; Baquero, M.R.; Parra-Pecharromán, D.; Galeano, J.; del Campo, R. Machine Learning Study in Caries Markers in Oral Microbiota from Monozygotic Twin Children. *Diagnostics* **2021**, *11*, 835. <https://doi.org/10.3390/diagnostics11050835>

Academic editor: Jae-Hong Lee

Received: 13 April 2021

Accepted: 3 May 2021

Published: 6 May 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: In recent years, the etiology of caries has evolved from a simplistic infectious perspective based on *Streptococcus mutans* and/or *Lactobacillus* activity, to a multifactorial disease involving a complex oral microbiota, the human genetic background and the environment. The aim of this work was to identify bacterial markers associated with early caries using massive 16S rDNA. To minimize the other factors, the composition of the oral microbiota of twins in which only one of them had caries was compared with their healthy sibling. Twenty-one monozygotic twin pairs without a previous diagnosis of caries were recruited in the context of their orthodontic treatment and divided into two categories: (1) caries group in which only one of the twins had caries; and (2) control group in which neither of the twins had caries. Each participant contributed a single oral lavage sample in which the bacterial composition was determined by 16S rDNA amplification and further high-throughput sequencing. Data analysis included statistical comparison of alpha and beta diversity, as well as differential taxa abundance between groups. Our results show that twins of the control group have a closer bacterial composition than those from the caries group. However, statistical differences were not detected and we were unable to find any particular bacterial marker by 16S rDNA high-throughput sequencing that could be useful for prevention strategies. Although these results should be validated in a larger population, including children from other places or ethnicities, we conclude that the occurrence of caries is not related to the increase of any particular bacterial population.

Keywords: machine learning; oral microbiota; LEfSe; PCoA; alloprevotella; prevotella; core microbiota

1. Introduction

The microbial colonization of the oral cavity starts immediately after birth, differencing among early colonizers (*Streptococcus*, *Veillonella* and *Lactobacillus*), constant (*Gemella*, *Granulicatella*, *Haemophilus* and *Rothia*) and late colonizers (*Actinomyces*, *Porphyromonas*, *Abitrophia* and *Neisseria*) [1–3]. The establishment of this ecosystem and its further composition is influenced by numerous factors as the mode of delivery, diet and antibiotic consumption [4]. Oral health is not only a local stomatological problem, but also an important driver of systemic health, as it has been linked to numerous disorders of the digestive, cardiovascular and genitourinary tracts [5–7].

Caries is the most prevalent human disease worldwide, although its incidence varies according to geography and ethnicity [8], and it has conventionally been attributed to the

direct action of acidogenic bacteria such as *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* since these microorganisms have been isolated from the lesions. The application of molecular tools based on high-throughput sequencing of the 16S rDNA gene has revealed that microbiota associated to caries is a much more complex ecosystem than expected (<http://www.homd.org/>, accessed on 5 May 2021) [9]. While traditional studies classified bacteria as pathogens or commensals according to their potential etiological role on diseases, greater focus has been put on the new concepts of eubiosis/dysbiosis and the disbalance of alkalinogenic/acidogenic bacteria in the caries [3,4]. In addition, metatranscriptomic analyses have permitted to extend the cause of oral diseases as periodontitis from the action of a single microorganism to the metabolic activity of the entire ecosystem [10]. Consequently, the number of microorganisms linked to caries has increased considerably in the last decade [11–13], including *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Veillonella*, *Actinomyces*, *Granulicatella*, *Leptotrichia*, *Megasphaera*, *Olsenella*, *Shuttleworthia* and, most recently, *Scardovia*, *Atopobium* and *Selemonas* [14]. One of the major challenges is to identify early markers of caries in order to monitor and prevent this disease during childhood. The exploration of biomarkers in saliva has already demonstrated its usefulness in other pathologies [7,15].

Due to all this complexity in the detection of caries markers, we think that a predictive analysis using machine learning tools can be a good starting point in the study of caries using the oral microbiota. Despite the fact that the implementation of Artificial Intelligence (AI) is still far from being completely common in oral health, some studies highlight the improvements that its use would imply in different areas [16].

The rationale of the present work was to identify bacterial biomarkers in saliva for early caries detection. For this purpose, we explored by massive 16S rDNA sequencing combined with robust bioinformatics tools, statistical analysis and machine learning the oral microbiota of monozygotic twins with and without caries.

2. Materials and Methods

2.1. Patients and Samples

Twenty-one pairs of monozygotic twins were recruited by the first author EAG and divided into two categories: (1) caries group where only one of the twins had caries (22 infants, 73% females, median age of 9 years, range from 6 to 12 years); and (2) control group where neither of them had caries (20 infants, 70% females, median age of 6.7 years, range from 4 to 12 years) (Table 1). Infants were enrolled in 2018 from January to May in four different dental clinics of Madrid (Spain) within the context of their orthodontic treatment. Each child contributed with a single oral lavage sample after 5 min of vigorous rinsing with 10 mL of sterile water. Samples were immediately frozen after collection and stored at -80°C until processing. The inclusion criteria were twins aged 4–12 years whose parents and they accepted to participate in the study. In the caries group kids with clear lesions as well as pre-cavity lesions, mainly white spots, were included, whereas other types of lesions were excluded. All participants were adequately instructed to avoid teeth brushing, food and sugar drinks intake during the 2 h before sampling.

2.2. Oral Microbiota Characterization

Oral lavages were slowly defrosted at -20°C during 24 h, followed by another 24 h at 4°C , and centrifuged at 14,000 r.p.m. for 15 min discharging the supernatant. Total DNA was obtained from the pellet with the Speedtools tissue DNA extraction kit (Biotools), determining their concentration and quality by Qubit fluorometer (Thermo Fisher Scientific, MA, USA). DNA samples were sent to FISABIO (Valencia, Spain) for massive sequencing (2×300 bp, MiSeq, Illumina. Cod. 15044223 Rev. A) of the V3 and V4 regions of the 16S rRNA gene, which were amplified with the following primers: Forward Primer: 5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGC CTACGGGNGGCWGCAG; and Reverse Primer: 5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGG GT ATCTAATCC. Sequence quality was measured according to the following parameters:

minimum length, 250 bp; trimming quality measure type, mean; trimming quality number from 3' extreme, 30; and trimming quality window, 10 bp. Shannon–Weaver and Chao1 indexes were used for bacterial alpha diversity estimation excluding taxa with three or fewer reads. Taxonomic affiliations were assigned using the Silva 119 database, and reads with an RDP score below 0.8 were assigned to the upper taxonomic rank, leaving the last rank as unidentified. Relative abundance and contingency tables of the operational taxonomic units (OTUs) included singletons and very low-represented taxa.

Table 1. Main characteristics of the 42 participants. C, caries; H, healthy.

Caries Group 22 Infants	Sex	Age
1C/1H	females	12
2C/1H	females	7
3C/1H	females	8
4C/1H	females	6
5C/1H	females	11
6C/1H	males	9
7C/1H	females	8
8C/1H	males	10
9C/1H	females	12
10C/1H	females	9
11C/1H	males	9
Control Group 20 Infants	Sex	Age
12	females	12
13	females	7
14	males	4
15	females	8
16	females	9
17	females	5
18	females	9
19	males	4
20	females	4
21	males	5

2.3. Statistical Analysis and Machine Learning Modeling

Statistical analysis was performed using R statistical software v3.5.3. Quantitative data of the reads were homogenized using their relative percentage from the total reads of each sample to allow the comparison between samples. Finally, the Galaxy Huttenhower Platform (<http://huttenhower.sph.harvard.edu/galaxy>, accessed on 5 May 2021) was used to calculate the Linear Discriminant Effect Size Analysis (LEfSe) algorithm to identify which microbial taxa explain significant differences among groups of samples [17]. The PCoA analyses were performed by Past 3.0 software. Raw sequences were deposited in the GenBank database as Bioproject PRJNA643173.

Simultaneously, we carried out a statistical exploratory analysis to later search for a machine learning model for a possible caries prediction. To carry out this analysis, we ruled out bacterial species with fewer than 50 data with non-zero values. Exploratory analysis was performed using own software in Python. Machine Learning models were developed with Orange3 v3.27 [18]. We carried out different classification models in two ways. In the first case, we used healthy, control and cavity sample labels. In the second case, we only used healthy and caries labels to classify our samples. Using k-cross validation (k = 10), we tested five different classification model: Random Forest, Neural Network, Support Vector Machine, KNN model and a logistic regression.

To evaluate the results of the used algorithms, we used:

1. Classification accuracy is the proportion of correctly classified examples.

2. F-1 is a weighted harmonic mean of precision and recall.
3. Precision is the proportion of true positives among instances classified as positive, e.g., the proportion of cavity correctly identified as cavity.
4. Recall is the proportion of true positives among all positive instances in the data, e.g., the number of cavity among all diagnosed as cavity.

3. Results

Both groups of participants were comparable in demographic and anthropometric terms, and all were recruited during their orthodontic treatment without previous suspicion of caries. Oral lavages were processed in a single session and the 16S rDNA massive sequencing was developed successfully, passing the quality filters with adequate negative controls. The numbers of read counts were comparable for all samples. The alpha diversity indexes analyzed by the Shannon–Weaver and Chao 1 alpha diversity indexes showed no significant differences between groups, but more disperse values were detected in the caries group (Figure 1).

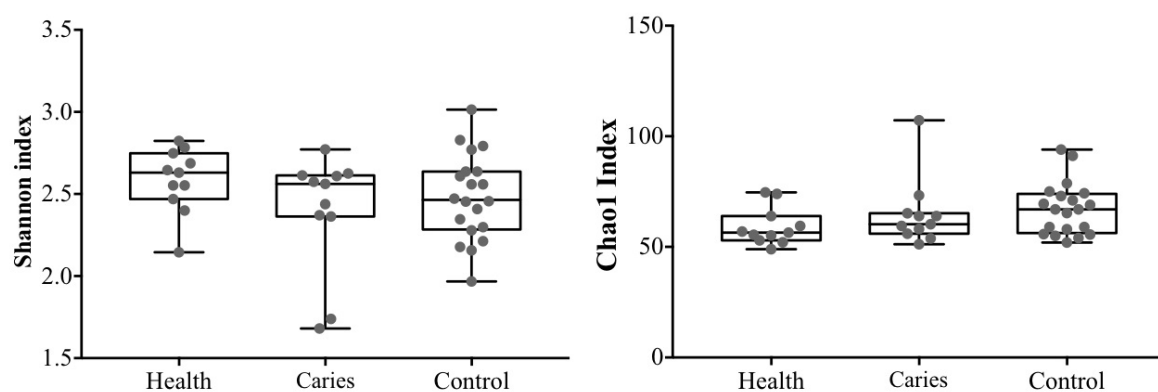


Figure 1. Alpha diversity indexes in all samples. Statistical differences were not detected.

Phyla distributions showed a preserved pattern for each pair of twins, including those from the caries group (Figure 2). Children with caries had a similar phyla distribution to their healthy siblings, whereas controls presented higher proportions of Firmicutes and lower proportions of Proteobacteria.

Up to 119 genera were identified, although 13 of them accounted for 90% of the total abundance [*Streptococcus* ($\approx 30\%$), *Prevotella* ($\approx 10\%$), *Neisseria* ($\approx 9\%$), *Veillonella* ($\approx 8\%$), *Gemella* ($\approx 7\%$), *Haemophilus* ($\approx 6\%$), *Alloprevotella* ($\approx 5\%$), *Rothia* ($\approx 5\%$), *Porphyromonas* ($\approx 2\%$), *Fusobacterium* ($\approx 2\%$), *Leptotrichia* ($\approx 2\%$), *Granulicatella* ($\approx 2\%$) and *Actinomyces* ($\approx 2\%$)]. The remaining genera represented 10% of the abundance, comprising 106 genera with a total population density less than 1 for each one (Figure 3).

To obtain a global overview of the oral microbiome complexity, we designed an interaction network representing all taxa detected for each subject in circles proportional to their frequency and joined the circles, called nodes, proportional to their frequency joining the circles by lines, called links, to build a network per sample. Subsequently, we superimposed all the individual networks to define the core of the microbiome of each condition (caries, health and controls), and the thickness of the links between nodes is the accumulated number of lectures in all samples, representing the stability in the coexistence of the connecting taxa (Figure 4).

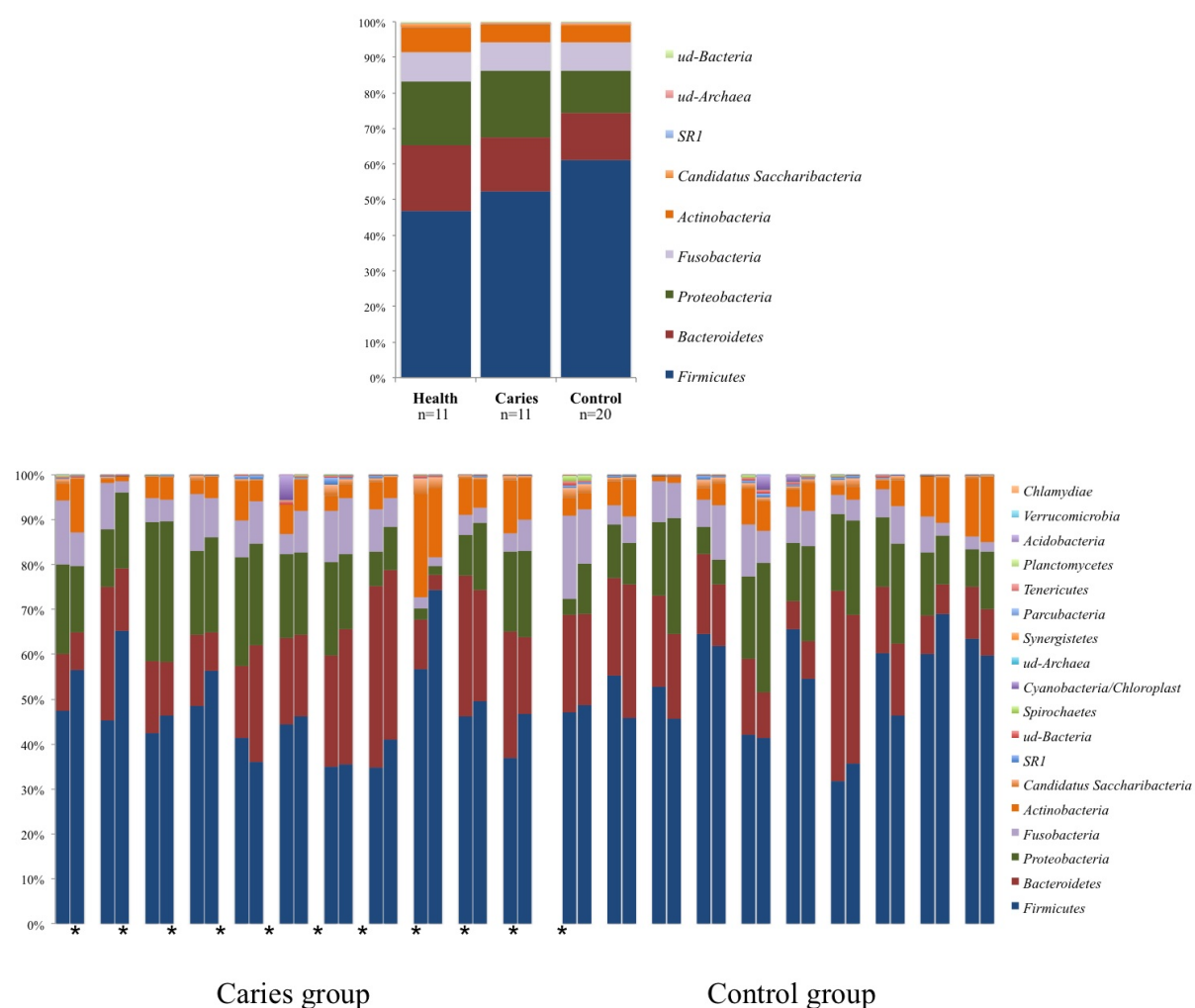


Figure 2. Phyla distribution: (top) the median values for each phyla and group; and (bottom) all individual values. * Represents Children with caries.

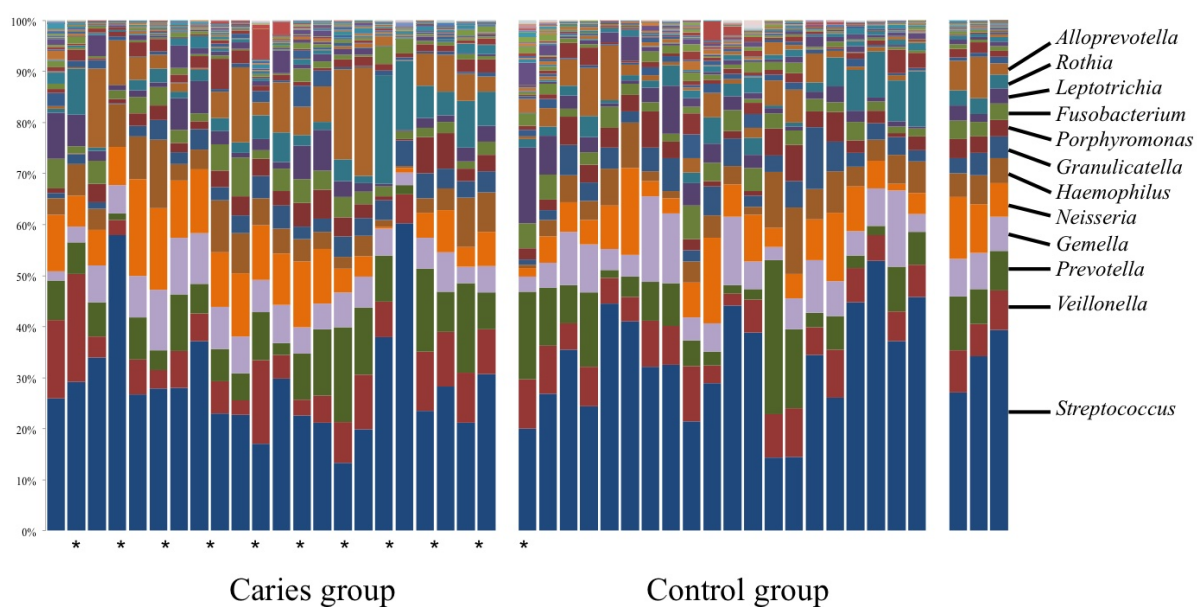


Figure 3. Distribution of the major bacterial genera among all participants. * Represents Children with caries.

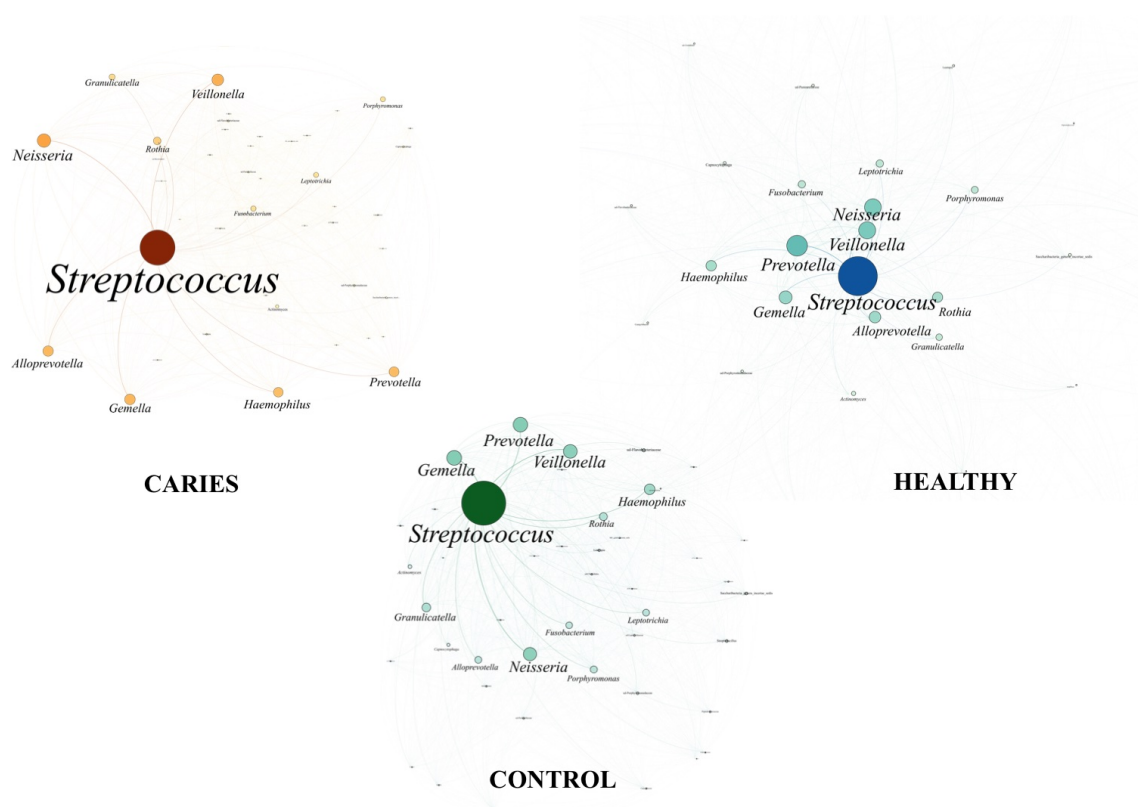


Figure 4. Complex networks core microbiota for the three differenced subjects using Gephi.

PCoA analysis separated the healthy, caries and control groups (Figure 5), showing a higher level of *Veillonella*, *Prevotella* and *Fusobacterium* genera linked to a healthy status, whereas *Alloprevotella* and *Granulicatella* were the most differentiated genera among children with cavities. The control group was allocated in a separate quadrant marked by the abundance of *Capnocytophaga*, *Lautropia* and *Streptobacillus*. Curiously, most of the control group twins were located on the same quadrant (8 out of 10 pairs), three pairs being located in Quadrant 3 (dominated by *Gemella* and *Haemophilus*), three in Quadrant 4 (*Streptococcus* and *Rothia*) and two in Quadrant 1 (*Prevotella* and *Veillonella*). The remaining two pairs of control twins were located on separated coordinates (Quadrants 1–3 and 2–3). Considering the twins of the caries group, only 6 out of the 11 pairs had both children located in the same quadrant: one in Quadrant 1 (*Prevotella* and *Veillonella*), three in Quadrant 2 (*Neisseria*, *Alloprevotella* and *Leptotrichia*), one in Quadrant 3 (*Gemella* and *Haemophilus*) and one in Quadrant 4 (*Streptococcus* and *Rothia*). The remaining five pairs were distributed in separated quadrants: two pairs in Quadrants 1–2, one pair in Quadrants 2–3, one in Quadrants 1–4 and one in Quadrants 1–3.

Furthermore, differential abundance analysis on microbiota composition by LEfSE in relation to the group, age and the sex of children did not obtain any significant result.

Finally, to address the possibility to predict the cavity in patients, we developed five classification models using machine learning tools (Table 2). The model that showed the highest classification accuracy (CA) was the Random Forest model with a value of 0.881 followed by the Neural Network with 0.810. Studying the confusion matrix, from the point of view of caries, the Random Forest model does not produce false positives but does generate quite a few false negatives (54.5%). On the contrary, Neural Network model produce 16.1% false positives but a lower percentage, with respect to the Random Forest, of false negatives (27.3%).

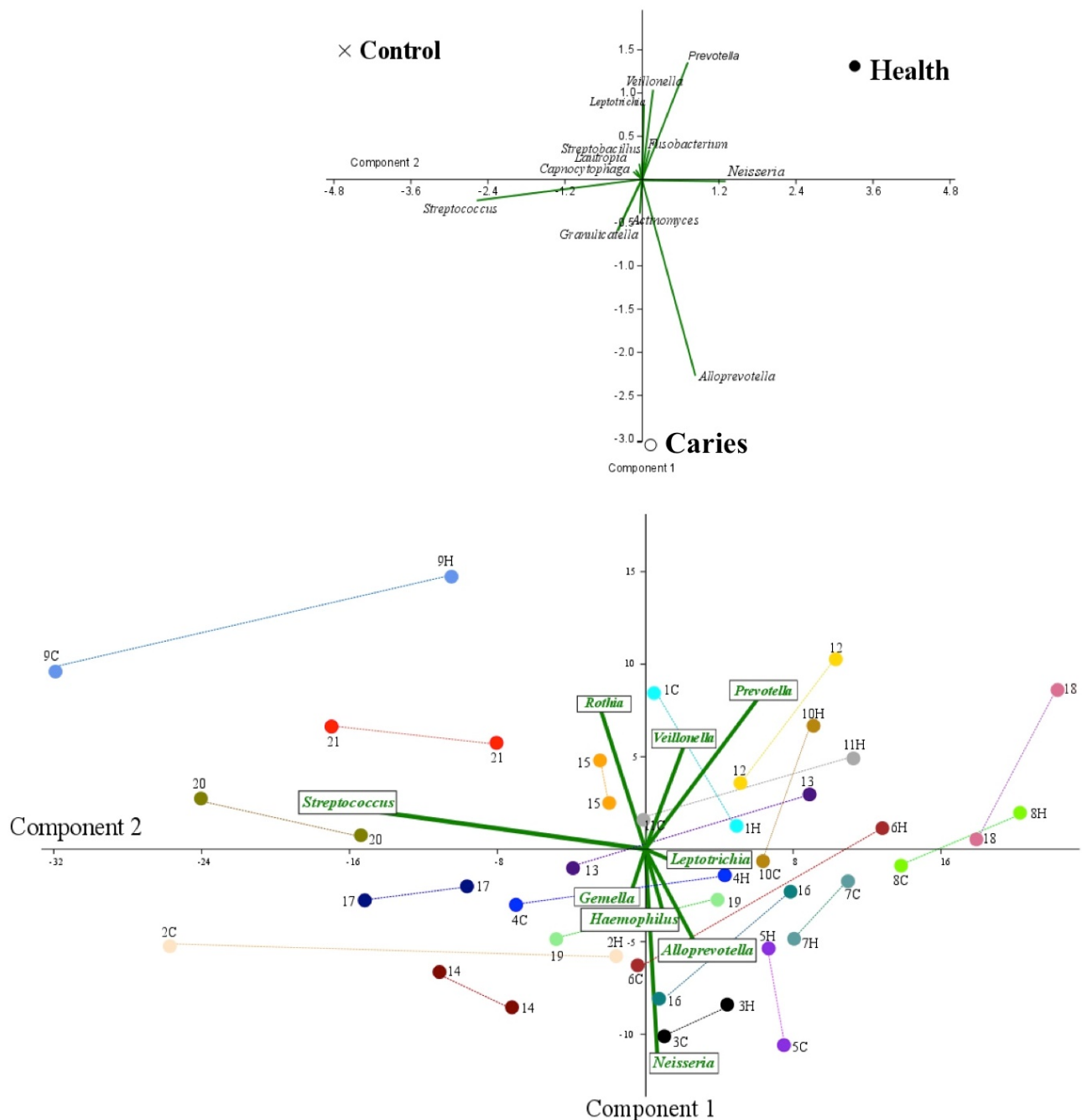


Figure 5. PCoA analysis: (top) the median value for the three categories of subjects respect to the abundance bacterial genera; and (bottom) the same analysis but considering each of the children and in relation to their sibling. The pairs of twins are linked by colored lines. Random colors are used to highlight the two pairs of twins.

Table 2. Results of the accuracy of the 5 model used in this study. We have used different measures: Classification accuracy (CA), F1, precision, and recall.

Model	CA	F1	Precision	Recall
kNN	0.666	0.655	0.646	0.665
SVM	0.738	0.627	0.545	0.738
Random Forest	0.881	0.874	0.880	0.881
Neural Network	0.810	0.814	0.823	0.810
Logistic Regression	0.595	0.601	0.607	0.595

4. Discussion

In the last years, the etiology of caries has evolved from a simplistic infectious perspective (*S. mutans* and/or *Lactobacillus* colonization) to a multifactorial disease involving oral microbiota, human genetic background and environment [3]. In accordance, research tools have evolved from culturomics to metagenomics, transcriptomics and proteomics. Diet continues to be one of the most decisive factors in caries incidence and accounts for the individual susceptibility in relation to carbohydrates intake and bacterial fermentation [19,20], whereas human genetic background seems to be not so relevant, as previously expected [4,21]. The main objective of our work was twofold, on the one hand, to detect early metagenomic markers based on the abundance of particular genera in the oral microbiota associated with caries in the context of monozygotic twins with the same genetic, dietary and environmental context, and, on the other hand, address a classification model to predict caries using this microbiota of patients. When the participation in the project was offered to children, none of them had been previously diagnosed of caries. The bioinformatic analyses showed a more uniform microbiota in the control twin group, but without statistical significance. We were unable to identify any bacterial taxon exclusive of participants with caries, discarding the contribution of oral bacteria microbiota at the initial cariogenic process.

To obtain a representative sample of the entire oral microbiota, all children refrained from tooth brush and avoided food intake for at least 2 h. Despite the high and continuous contamination of the oral microbiota with foreign environmental microorganisms, intra-individual particularities of saliva microbiota have been postulated as a forensic marker to identify subjects, even for twins [22]. Some studies perform the sampling directly from the lesion or at the supragingival plaque, but we decided to use rinsing of the total oral microbiota as a representative sample easily collected by children with the absence of macroscopically visible lesions, which seems to be the most suitable option for surveillance purposes. Even though saliva and supragingival plaque are different in terms of bacterial composition [23], saliva has been used in similar studies, providing differentiation between subjects with and without caries [24]. The use of saliva in the identification of biomarkers associated to both local and general health was previously validated [7,15].

Previous studies on monozygotic and dizygotic twins reported discordant results regarding the incidence of caries and the oral microbiota composition [4,21,23,25,26], although those studies have been conducted in different age groups and using different microbiological methodologies, which could explain the lack of reproducibility. In the last years, tools for massive sequencing data analysis have been evolving considerably, allowing us to applied some of those novel tools to our data, including LEfSE and network analysis of the ecosystem.

Our PCoA analysis consistently associates a higher abundance of *Alloprevotella* in subjects with cavities, whereas in their healthy counterparts *Prevotella* was the most differential marker. Surprisingly, both genera belong to the same family and might have synonymous metabolic functions, although we cannot rule out synergistic effects of combination of microorganisms [27] and, most notably, the interaction of particular bacterial genera with fungi or virus, which has not been extensively explored. Most of the published studies using the entire oral microbiota with a metagenomic approach failed to find significant differences among healthy and caries status in non-related subjects [4,11,24,28,29]. However, a structural conservation between twins can be observed in our PCoA analysis, where control subjects are also more homogeneous (8/10 in the same quadrant) than the caries group (6/11), suggesting an incipient diversification on the oral microbiome.

As in other human ecosystems, the oral microbiome is usually constant and specific in each individual, but may be influenced by ethnicity [30]. A higher prevalence of caries has been described in a group of subjects from China, with special enrichment of *Scardovia* [24], whereas this genus is not particularly abundant in our population. In the study by Yasunaga et al., individuals without caries had more diverse communities, with a significantly higher proportion of the genus *Porphyromonas*, in particular *Porphyromonas pasteri* [31]. Belström

et al. also observed a higher alpha diversity in subjects with caries and an enrichment of *Neisseria*, *Haemophilus* and *Fusobacterium* compared to individuals without caries [29]. In contrast, in our study, both bacterial density and alpha diversity parameters are similar in children of both groups and conditions. An important point is that the composition of the community does not necessarily reflect its metabolic activity [10], particularly in microorganisms represented in low proportions, and it could have essential metabolic activities for the community [5].

Extremely high levels of *S. mutans* have been associated with caries, and, whereas *Streptococcus* was the majoritarian genera, we cannot investigate this point since our metagenomic approach is not able to assign to the level of species, due to the short length of the sequences obtained by massive sequencing. The dominance of *Streptococcus* in the oral cavity can be found in both patients with caries and in controls [29,32], as observed in our case, but being more abundant in the healthy control group than among the cavity group. A protective effect of some streptococcal species has been demonstrated [33], and, beyond the microbiota composition, there is an increasing emphasis on the global ecosystem richness, distribution and functionality [34]. However, in our case, LEfSE analysis failed in the discrimination of children by their cavity status, age, or sex, being the oral microbiota of all participants comparable.

In this study, the classification models showed relatively good precision in predicting caries in our data set (Table 2). The best performing classification models were Random Forest that showed the highest classification accuracy (CA) of a value of 0.881 and closely followed by Neural Networks with an CA of 0.810. One of the most interesting points of the Random Forest model was that it did not produce false positives. However, the worst aspect of these models was the percentage of false negatives (54.5%). On the contrary, the Neural Network model produced 16.1% false positives but a lower percentage, with respect to the Random Forest model, of false negatives (27.3%). This problem could be overcome with a large data-set of caries patients.

The major strength and, at the same time, the major limitation of our study is the inclusive criteria of children, which were enrolled during their orthodontic treatment independently of their caries' status. In fact, all the detected lesions were small and superficial, corresponding probably to the onset of the disease. Of course, we are unable to ascertain if this was also the case of the control group, where caries were not observed in any children but could be closed to appearing. The oral microbiota could be also implicated in the tooth development [8], and likewise the age of the patient might be considered, since different composition of the oral microbiota has been related to it. Finally, our results show that machine learning models could help us in caries prevention using microbiota data, although they are still far from having good accuracy. In summary, our results demonstrate that composition of oral microbiota in twins is highly conserved independently of their cariogenic process. We were unable to find any bacterial marker by 16S rDNA massive sequencing associated to caries; on the contrary, Isola et al. demonstrated a significant relationship between the salivary IL-6 concentration and existence of periodontitis [7,15].

Author Contributions: E.A.-G., M.R.B., D.P.-P. and R.d.C., study design, data analysis and drafting of the paper; M.P.-A., C.S., A.H. and J.G., data analysis and drafting of the paper; and M.P.C., data collection and drafting of the paper. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: Claudia Saralegui was financed by a project of the Fundación Mutua Madrileña (grant to Rosa del Campo achieved in 2017 call with reference number AP165902017). This study was supported by Instituto de Salud Carlos III and the European Regional Development Fund (ERDF, 'A way to achieve Europe') (PI17/115 to Rosa del Campo) and Fundación Universidad Alfonso X El Sabio – Santander Universidades (Project number 1.010.811).

Institutional Review Board Statement: The study protocol was approved by the Ethical Committee of the Alfonso X El Sabio University (reference CE2017_0011) approved on 23 February 2017. The research was conducted ethically, in accordance with the World Medical Association Declaration

of Helsinki. All participants and their parents/legal guardians signed a written informed consent form. Children received a report of their oral health status and were referred to dental treatment when necessary.

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: Data supporting our study can be found in the GenBank database as Bioproject PRJNA643173.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results

References

1. Dzidic, M.; Collado, M.C.; Abrahamsson, T.; Artacho, A.; Stensson, M.; Jenmalm, M.C.; Mira, A. Oral microbiome development during childhood: An ecological succession influenced by postnatal factors and associated with tooth decay. *ISME J.* **2018**, *12*, 2292–2306. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
2. Fakhruddin, K.S.; Ngo, H.C.; Samaranayake, L.P. Cariogenic microbiome and microbiota of the early primary dentition: A contemporary overview. *Oral Dis.* **2019**, *25*, 982–995. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
3. Lamont, R.J.; Koo, H.; Hajishengallis, G. The oral microbiota: Dynamic communities and host interactions. *Nat. Rev. Microbiol.* **2018**, *16*, 745–759. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
4. Gomez, A.; Nelson, K.E. The oral microbiome of children: Development, disease, and implications beyond oral health. *Microb. Ecol.* **2017**, *73*, 492–503. [\[CrossRef\]](#)
5. Hajishengallis, G.; Darveau, R.P.; Curtis, M.A. The keystone-pathogen hypothesis. *Nat. Rev. Microbiol.* **2012**, *10*, 717–725. [\[CrossRef\]](#)
6. Peres, M.A.; Macpherson, L.M.D.; Weyant, R.J.; Daly, B.; Venturelli, R.; Mathur, M.R.; Listl, S.; Celeste, R.K.; Guarnizo-Herreño, C.C.; Kearns, C.; et al. Oral diseases: A global public health challenge. *Lancet* **2019**, *394*, 249–260. [\[CrossRef\]](#)
7. Isola, G.; Polizzi, A.; Alibrandi, A.; Williams, R.; Leonardi, R. Independent impact of periodontitis and cardiovascular disease on elevated soluble urokinase-type plasminogen activator receptor (suPAR) levels. *J. Periodontol.* **2020**. [\[CrossRef\]](#)
8. Chen, T.; Shi, Y.; Wang, X.; Wang, X.; Meng, F.; Yang, S.; Yang, J.; Xin, H. High-throughput sequencing analyses of oral microbial diversity in healthy people and patients with dental caries and periodontal disease. *Mol. Med. Rep.* **2017**, *16*, 127–132. [\[CrossRef\]](#)
9. Fernández-Escapa, I.; Chen, T.; Huang, Y.; Gajare, P.; Dewhirst, F.E.; Lemon, K.P. New insights into human nostril microbiome from the expanded Human Oral Microbiome Database (eHOMD): A resource for species-level identification of microbiome data from the aerodigestive tract. *mSystems* **2018**, *3*, e00187-18.
10. Solbiati, J.; Frías-Lopez, J. Metatranscriptome of the oral microbiome in health and disease. *J. Dent. Res.* **2018**, *97*, 492–500. [\[CrossRef\]](#)
11. Jiang, W.; Ling, Z.; Lin, X.; Chen, Y.; Zhang, J.; Yu, J.; Xiang, C.; Chen, H. Pyrosequencing analysis of oral microbiota shifting in various caries states in childhood. *Microb. Ecol.* **2014**, *67*, 962–969. [\[CrossRef\]](#)
12. Xu, H.; Tian, J.; Hao, W.; Zhang, Q.; Zhou, Q.; Shi, W.; Qin, M.; He, X.; Chen, F. Oral Microbiome shifts from caries-free to caries-affected status in 3-year-old chinese children: A longitudinal study. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 2009. [\[CrossRef\]](#)
13. Xu, L.; Chen, X.; Wang, Y.; Jiang, W.; Wang, S.; Ling, Z.; Chen, H. Dynamic alterations in salivary microbiota related to dental caries and age in preschool children with deciduous dentition: A 2-year follow-up study. *Front. Physiol.* **2018**, *9*, 342. [\[CrossRef\]](#)
14. Kressirer, C.A.; Smith, D.J.; King, W.F.; Dobeck, J.M.; Starr, J.R.; Tanner, A.C.R. *Scardovia wiggisiae* and its potential role as a caries pathogen. *J. Oral Biosci.* **2017**, *59*, 135–141. [\[CrossRef\]](#)
15. Isola, G.; Giudice, A.L.; Polizzi, A.; Alibrandi, A.; Murabito, P.; Indelicato, F. Identification of the different salivary Interleukin-6 profiles in patients with periodontitis: A cross-sectional study. *Arch. Oral Biol.* **2021**. [\[CrossRef\]](#)
16. Schwendicke, F.; Samek, W.; Krois, J. Artificial Intelligence in Dentistry: Chances and Challenges. *J. Dent. Res.* **2020**, *99*, 769–774. [\[CrossRef\]](#)
17. Segata, N.; Izard, J.; Waldron, L.; Gevers, D.; Miropolsky, L.; Garrett, W.S.; Huttenhower, C. Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biol.* **2011**, *12*, R60. [\[CrossRef\]](#)
18. Demsar, J.; Curk, T.; Erjavec, A.; Gorup, C.; Hocevar, T.; Milutinovic, M.; Mozina, M.; Polajnar, M.; Toplak, M.; Staric, A.; et al. Orange: Data Mining Toolbox in Python. *J. Mach. Learn. Res.* **2013**, *14*, 2349–2353.
19. Ribeiro, A.A.; Azcarate-Peril, M.A.; Cadenas, M.B.; Butz, N.; Paster, B.J.; Chen, T.; Bair, E.; Arnold, R.R. The oral bacterial microbiome of occlusal surfaces in children and its association with diet and caries. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0180621. [\[CrossRef\]](#)
20. Ledder, R.G.; Kampoo, K.; Teanpaisan, R.; McBain, A.J. Oral microbiota in severe early childhood caries in Thai children and their families: A pilot study. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 2420. [\[CrossRef\]](#)
21. Silva, M.J.; Kilpatrick, N.M.; Craig, J.M.; Manton, D.J.; Leong, P.; Burgner, D.P.; Scurrah, K.J. Genetic and early-life environmental influences on dental caries risk: A twin study. *Pediatrics* **2019**, *143*, e20183499. [\[CrossRef\]](#)

22. Stahringer, S.S.; Clemente, J.C.; Corley, R.P.; Hewitt, J.; Knights, D.; Walters, W.A.; others. Nurture trumps nature in a longitudinal survey of salivary bacterial communities in twins from early adolescence to early adulthood. *Genome Res.* **2012**, *22*, 2146–2152. [[CrossRef](#)]
23. Wu, H.; Zeng, B.; Li, B.; Ren, B.; Zhao, J.; Li, M.; Peng, X.; Feng, M.; Li, J.; Wei, H.; et al. Research on oral microbiota of monozygotic twins with discordant caries experience—In vitro and in vivo study. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 7267. [[CrossRef](#)]
24. Zhou, J.; Jiang, N.; Wang, S.; Hu, X.; Jiao, K.; He, X.; Li, Z.; Wang, J. Exploration of human salivary microbiomes—insights into the novel characteristics of microbial community structure in caries and caries-free subjects. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0147039. [[CrossRef](#)]
25. Lovelina, F.D.; Shastri, S.M.; Kumar, P.D. Assessment of the oral health status of monozygotic and dizygotic twins—A comparative study. *Oral Health Prev. Dent.* **2012**, *10*, 135–139.
26. Zheng, Y.; Zhang, M.; Li, J.; Li, Y.; Teng, F.; Jiang, H.; Du, M. Comparative analysis of the microbial profiles in supragingival plaque samples obtained from twins with discordant caries phenotypes and their mothers. *Front Cell Infect Microbiol.* **2018**, *8*, 361. [[CrossRef](#)]
27. Simón-Soro, A.; Mira, A. Solving the etiology of dental caries. *Trends Microbiol.* **2015**, *23*, 76–82. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Jiang, S.; Gao, X.; Jin, L.; Lo, E.C. Salivary microbiome diversity in caries-free and caries-affected children. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, 1978. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Belstrom, D.; Constancias, F.; Liu, Y.; Yang, L.; Drautz-Moses, D.I.; Schuster, S.C.; Kohli, G.S.; Jakobsen, T.H.; Holmstrup, P.; Givskov, M. Metagenomic and metatranscriptomic analysis of saliva reveals disease-associated microbiota in patients with periodontitis and dental caries. *NPJ Biofilms Microbiomes* **2017**, *3*, 23. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Richards, V.P.; Alvarez, A.J.; Luce, A.R.; Bedenbaugh, M.; Mitchell, M.L.; Burne, R.A.; Nascimento, M.M. Microbiomes of site-specific dental plaques from children with different caries status. *Infect. Immun.* **2017**, *85*. [[CrossRef](#)]
31. Yasunaga, H.; Takeshita, T.; Shibata, Y.; Furuta, M.; Shimazaki, Y.; Akifusa, S. Exploration of bacterial species associated with the salivary microbiome of individuals with a low susceptibility to dental caries. *Clin. Oral Investig.* **2017**, *21*, 2399–2406. [[CrossRef](#)]
32. Wang, Y.; Zhang, J.; Chen, X.; Jiang, W.; Wang, S.; Xu, L.; Tu, Y.; Zheng, P.; Wang, Y.; Lin, X.; et al. Profiling of oral microbiota in early childhood caries using single-molecule real-time sequencing. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 2244. [[CrossRef](#)]
33. López-López, A.; Camelo-Castillo, A.; Ferrer, M.D.; Simon-Soro, A.; Mira, A. Health-associated niche inhabitants as oral probiotics: the case of *Streptococcus dentisani*. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 379. [[CrossRef](#)]
34. Kim, B.S.; Han, D.H.; Lee, H.; Oh, B. Association of salivary microbiota with dental caries incidence with dentine involvement after 4 years. *J. Microbiol. Biotechnol.* **2018**, *28*, 454–464. [[CrossRef](#)]



An Immunologic Compatibility Testing Was Not Useful for Donor Selection in Fecal Microbiota Transplantation for Ulcerative Colitis

Manuel Ponce-Alonso^{1,2*†}, Carlota García-Hoz^{3†}, Ana Halperin^{1,2}, Javier Nuño⁴, Pilar Nicolás⁵, Adolfo Martínez-Pérez⁵, Juan Ocaña⁴, Juan Carlos García-Pérez⁴, Antonio Guerrero⁶, Antonio López-Sanromán⁶, Rafael Cantón^{1,2}, Garbiñe Roy³ and Rosa del Campo^{1,2,7*}

OPEN ACCESS

Edited by:

Eric Cox,
Ghent University, Belgium

Reviewed by:

Richard Kellermayer,
Texas Children's Hospital,
United States
Yun-Sheng Yang,
People's Liberation Army
General Hospital, China

*Correspondence:

Manuel Ponce-Alonso
lagonauta@gmail.com
Rosa del Campo
rosa.campo@salud.madrid.org

[†]These authors have contributed
equally to this work

Specialty section:

This article was submitted to
Mucosal Immunity,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

Received: 20 March 2021

Accepted: 17 May 2021

Published: 04 June 2021

Citation:

Ponce-Alonso M, García-Hoz C, Halperin A, Nuño J, Nicolás P, Martínez-Pérez A, Ocaña J, García-Pérez JC, Guerrero A, López-Sanromán A, Cantón R, Roy G and del Campo R (2021) An Immunologic Compatibility Testing Was Not Useful for Donor Selection in Fecal Microbiota Transplantation for Ulcerative Colitis. *Front. Immunol.* 12:683387. doi: 10.3389/fimmu.2021.683387

¹ Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Ramón y Cajal and Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria, Madrid, Spain, ² Red Española de Investigación en Patología Infecciosa (REIPI), Madrid, Spain, ³ Servicio de Inmunología, Hospital Universitario Ramón y Cajal and Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria, Madrid, Spain, ⁴ Servicio de Cirugía General y del Aparato Digestivo, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid, Spain, ⁵ Organización Nacional de Trasplantes, Madrid, Spain, ⁶ Servicio de Gastroenterología y Hepatología, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid, Spain, ⁷ Universidad Alfonso X El Sabio, Madrid, Spain

Fecal microbiota transplantation (FMT) is an effective procedure against *Clostridioides difficile* infection (CDI), with promising but still suboptimal performance in other diseases, such as ulcerative colitis (UC). The recipient's mucosal immune response against the donor's microbiota could be relevant factor in the effectiveness of FMT. Our aim was to design and validate an individualized immune-based test to optimize the fecal donor selection for FMT. First, we performed an *in vitro* validation of the test by co-culturing lymphocytes obtained from the small intestine mucosa of organ donor cadavers (n=7) and microbe-associated molecular patterns (MAMPs) obtained from the feces of 19 healthy donors. The inflammatory response was determined by interleukin supernatant quantification using the Cytometric Bead Array kit (B&D). We then conducted a clinical pilot study with 4 patients with UC using immunocompetent cells extracted from rectal biopsies and MAMPs from 3 donor candidates. We employed the test results to guide donor selection for FMT, which was performed by colonoscopy followed by 4 booster instillations by enema in the following month. The microbiome engraftment was assessed by 16S rDNA massive sequencing in feces, and the patients were clinically followed-up for 16 weeks. The results demonstrated that IL-6, IL-8, and IL-1 β were the most variable markers, although we observed a general tolerance to the microbial insults. Clinical and colonoscopy remission of the patients with UC was not achieved after 16 weeks, although FMT provoked enrichment of the *Bacteroidota* phylum and *Prevotella* genus, with a decrease in the *Actinobacteriota* phylum and *Agathobacter* genus. The most relevant result was the lack of *Akkermansia* engraftment in UC. In summary, the clinical success of FMT in patients with UC appears not to be influenced by donor selection based on the

explored recipient's local immunological response to FMT, suggesting that this approach would not be valid for FMT fecal donor optimization in such patients.

Keywords: mucosal immunity, fecal microbiota transplantation, ulcerative colitis, donor selection, immunological compatibility

INTRODUCTION

The interaction between the gut microbiota and immune system plays a relevant role in the etiopathogenesis of inflammatory bowel diseases, such as ulcerative colitis (UC) (1, 2). A loss of immune tolerance to bacterial luminal antigens has been reported, triggering a local response (activation of dendritic cells), which spreads regionally and results in T-cell differentiation toward T helper (TH)-1, TH-2, TH-17 or regulatory T (Treg) phenotypes that ends in a "storm" of proinflammatory cytokines and chemokines, generating and perpetuating tissue damage (3). In fact, relevant differences in microbiota composition between inflamed and noninflamed intestinal mucosa have been reported in UC, according with the activity status of the disease (2, 4). The genetic basis of UC indicates the protective role of various human polymorphisms in the interleukin (IL)-27 gene (5), as well as the predominant involvement of a TH-17 response, in close relationship with the intestinal microbiota (6, 7).

The therapeutic approach for UC is currently based on inflammation control. Fecal microbiota transplantation (FMT) has emerged as a therapeutic option for UC, aiming to modulate the gut microbiota composition and thus the chronic inflammatory status (8, 9), although its clinical effectiveness is not as high as reported for *Clostridioides difficile* infection (CDI) (10, 11). Significant efforts have been made in recent years to determine the reasons behind this suboptimal performance, and a number of authors have suggested the importance of the donor's microbial composition as a determinant for FMT success in UC (12, 13), particularly in relation to ecosystem diversity (14) or the so-called super-donor phenomenon (15). A recent randomized controlled trial identified specific taxa from donor feces associated with higher clinical response rates in patients with UC who underwent FMT (16). Moreover, fecal mixing from various donors has been tested for higher FMT success rates (17). Despite this, donor selection for FMT in UC is not specific, resulting in random matching in most cases, and the molecular mechanisms by which the autoimmune response is modulated have not yet been elucidated.

The mucosal immune system surrounding the digestive tract protects against the entry of potential pathogens and simultaneously remains tolerant to the resident microbiota (18). Nevertheless, the distinction between commensal and pathogenic bacteria is usually hard to establish and often depends on concrete lineage-specific but species-independent virulence factors. One of the aims of FMT in UC is to modulate the dialogue between the gut microbiota and the mucosal immune system, although several mechanisms could be implicated. In that sense, the success could be determined by the interaction of the two players once the implantation of the donor microorganisms has been completed.

In this study, we designed a test based on the recipient's mucosal immune response against the donor's microbiome to optimize the fecal donor selection in FMT. First, we evaluated and optimized the viability and performance of the test using immunocompetent cells from jejunal specimens obtained from 7 cadaver organ donors, which were exposed to the microbe-associated molecular patterns (MAMPs) of 19 fecal samples from unrelated healthy donors. We then validated the test's clinical utility in 4 patients with UC who underwent FMT, employing the compatibility test results to guide the donor selection by confronting immune cells obtained from rectal biopsies against the MAMPs of 3 potential fecal donors. Lastly, we evaluated the impact of FMT in the gut bacterial ecosystem of these patients with UC and the intestinal microbiome of the transplant patients with CDI who shared the same fecal donors.

MATERIALS AND METHODS

In Vitro Optimization of the Compatibility Test

The test is based on exposing immunocompetent cells from either the recipient's gut mucosa or peripheral blood to antigenic MAMPs determinants of the gut of potential donors, determining cytokine production and selecting the donor with the least inflammatory reaction.

Test optimization was performed using immunocompetent cells recovered from jejunal segments and peripheral blood mononuclear cells extracted from 7 cadaver organ donors that were maintained alive through perfusion. Our center's ethics committee (Reference 253/17) approved the use of the cadavers, with the inclusion criteria of the donor family's acceptance and the complete integrity of the digestive system, while the exclusion criterion was a history of intestinal tumors or systemic infectious diseases. During the surgery, a fecal aliquot from the intestinal lumen was collected as a representative sample of the cadaver's microbiota.

Immunocompetent mucosal cells were recovered from a 3-cm jejunal segment removed during the organ donation surgery. After resection, the jejunum segment was submerged in Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Complete Medium (CM) (Life Technologies/Gibco, 11875-085) supplemented with 10% fetal bovine serum (Life Technologies/Gibco 16140-063), imipenem, gentamicin, vancomycin, and fluconazole, all at a concentration of 100 mg/l to inhibit the growth of the autochthonous microbiota. We manually stripped the mucosal layer and incubated the obtained fragments in 50 ml of RPMI 1640 CM supplemented with 10% fetal bovine serum (Life Technologies/Gibco 16140-063), 50 U/ml collagenase (Sigma-

Aldrich GE17-1440-02), and 100 U/ml DNase I recombinant grade I (Sigma-Aldrich 0436282001) for 120 min at 37°C with continuous stirring. The liberated cell suspension (intraepithelial lymphocytes, lamina propria leukocytes, and epithelial cells) was run up and down through an 18G needle and filtered through a cell strainer to remove debris. Cells were pelleted, counted, and suspended in RPMI CM at a density of 200,000 leukocytes/ml. We labeled 100 µl of the cell suspension with anti-CD45 monoclonal antibodies (Becton Dickinson) and fully acquired it in a flow cytometer (FACSCanto II, Becton Dickinson), counting the gated cells. Prior to the donor's death, 5 ml of peripheral blood was obtained, and the mononuclear cell fraction was purified by Ficoll-Paque density gradient (Sigma-Aldrich, GE17-14440-02).

We employed fecal aliquots from 19 unrelated healthy donors of our *C. difficile* FMT program as the antigenic stimulus. Feces were collected and maintained at -80°C until use. To obtain MAMPs determinants, 0.5 g of feces were completely solubilized in 5 ml of water, boiled for 15 min, centrifuged at 1500 rpm for 5 min, only saving the supernatant.

Co-cultures of the immunocompetent cells with alive bacteria were unsuccessful by premature apoptosis of the cells, and consequently we decide to use MAMPs in a cell culture plate (Thermo Fisher Scientific, USA) at 37 °C and 5% carbon dioxide. The immunological response of the immunocompetent cells was determined by measuring the concentration of inflammatory interleukins (IL-1β, IL-6, IL-8, IL-10, and IL-12p70) and tumor necrosis factor alpha (TNFα) using the Human Inflammatory Cytokine Cytometric Bead Array kit (Becton Dickinson, USA) in a flow cytometer.

We first assayed various settings for the dilution of MAMPs (1, 1/100, and 1/1000) and the incubation period (6, 18, and 24 h) to define the optimal conditions that preserve cell viability during cultivation and ensure the recovery of the cytokine signal. To this end, we employed the cells extracted from the jejunal segment of the first recruited organ donor and its own microbiota as an antigen stimulus. In addition, we tested if the extraction method conserved the integrity of the response capability of the intestinal immunocompetent cells. To do so, we measured the intracellular production of IFNγ and TNFα from immunocompetent CD45+ intestinal cells under a PMA-ionomycin stimulus and 3 different fecal microbiome extractions.

After setting the optimal conditions of the test, we examined whether the inflammatory response of immunocompetent gut mucosal cells against fecal MAMPs was comparable to that of peripheral cells in order to validate our compatibility test using a noninvasive sample (peripheral blood). To this end, we cultivated the jejunal and peripheral cells recovered from the 7 aforementioned cadavers (recipients) with MAMPs from feces of 19 putative donors and their own fecal microbiota. We included a negative control without antigen stimulus in each experiment.

In Vivo Validation in UC Patients

We recruited 4 patients with UC under the following inclusion criteria: extensive moderate UC refractory to conventional drug therapy and consent to be included in the study and to undergo FMT. Rectal biopsies including mucosal-associated lymphoid tissue were obtained from the enrolled patients.

Immunocompetent mucosal cells were liberated by enzymatic digestion after introducing the biopsies into 5 ml of RPMI 1640 CM supplemented with collagenase (50 U/ml) and DNA-ase (100 U/ml), incubated under vigorous stirring for at least 2 h at 37°C, with occasional homogenization by repeated needle aspiration. The mix was centrifuged at 1,800 rpm for 7 min, and the resulting pellet (containing intraepithelial lymphocytes, lamina propria leukocytes and epithelial cells) was suspended in 1 ml of fresh CM supplemented with imipenem, gentamicin, vancomycin, and fluconazole (100 mg/l each). We estimated the cell concentration by anti-CD45 labeling and adjusted it to 200,000 CD45+ leukocytes/ml.

For each patient with UC, the fecal microbiota from 3 unrelated donors previously recruited for our FMT program for CDI were processed, and MAMPs co-cultures of immunocompetent mucosal cells were performed as described above, reserving a culture of immunocompetent cells as a negative control to estimate the baseline cytokine production. After incubation, the entire well content was transferred to Eppendorf tubes and centrifuged at 14,000 rpm, collecting the supernatants that were stored at -80°C until cytokine determination. Lastly, cytokine determination was performed in a flow cytometer, as previously explained. The candidate whose fecal MAMPs triggered the mildest response in each patient was selected as the fecal donor.

FMT Procedure and Bacterial Engraftment Evaluation

We transferred the donor's microbiota to the patients with UC by colonoscopy using 100 g of fresh donor feces (less than 6 hours and conserved in anaerobiosis) previously suspended in 500 ml of distilled water and filtered to eliminate fiber and other solid residues. Additionally, patients were provided of 4 frozen individual syringes of 50 ml each with a similar fecal solution that kept at home at -20°C until self-administration by enema one per week (in total 4 instillations obtained from another 100 gr of feces). We assessed the engraftment of the transferred bacteria in fecal samples collected before and after 2 weeks, 1 month, and 2 months of FMT. We also included in the analysis 4 fecal samples from 2 patients with CDI (pre-FMT and post-FMT) who underwent FMT by a single colonoscopy using the same fecal donors as those for UC, to compare the FMT engraftment characteristics of the two diseases.

We determined the bacterial composition of the fecal samples by polymerase chain reaction, amplification of the 16S rDNA V3-V4 region, and massive sequencing (2x300 bp) on a MiSeq (Illumina, San Diego, CA, USA) platform. We analyzed the raw sequencing data using the QIIME 2 bioinformatics platform 2020.8 distribution (19), which were deposited in Genbank (PRJNA702025) (for accession details, see **Supplementary Data**). In brief, FASTQ files were demultiplexed and quality assessed using the q2-demux plugin. We then performed denoising, filtering, and chimera removal with the DADA2 pipeline (via q2-dada2 plugin), thereby identifying all amplicon sequence variants (ASVs) and their relative abundance in each sample. To minimize the number of spurious ASVs, those unique sequences with a total abundance lower than 7 reads across all

samples were filtered out. ASVs were taxonomically classified by using the classify-sklearn naïve Bayes taxonomy classifier (via the q2-feature-classifier plugin) against the SILVA 138 database (20). We performed a diversity analysis using the q2-diversity plugin, after samples were normalized *via* rarefaction (subsampling without replacement). The diversity analysis comprised alpha diversity metrics (Chao1, Shannon index, and Faith-PD, which measure the degree of microbiome diversity) and beta diversity metrics (unweighted UniFrac, which measures differences in microbiome composition between groups of samples). All statistical tests were conducted *via* the q2-diversity plugin.

Clinical Follow-Up of UC Patients

UC patients were followed-up for 16 weeks after FMT. Clinical UC activity was assessed by using the Simple Clinical Colitis Activity Index (SCCAI), and the Mayo endoscopic score. In addition, biologic markers (fecal calprotectin) and adverse events were recorded, and a colonoscopy examination was performed at the end of the follow-up.

RESULTS

In Vitro Optimization of the Test

As co-cultures with alive bacteria provoked apoptosis of the immunocompetent cells, the most suitable conditions for ensuring their viability corresponded to the use of the non-diluted MAMPs supernatant and incubations of 18 h (Figure 1). These conditions were set as the standard for the following experiments. In addition, the extraction technique preserved the integrity of the intracellular immune response capability of the intestinal cells, as shown in supplementary material (Figure S1).

Figures 1 and 2 illustrate the immunological response of the mononuclear cells obtained from the 7 cadavers against the 20 different fecal MAMPs supernatants. The cytokine production

pattern of the jejunal mucosal cells was not comparable to that of the peripheral blood mononuclear cells (Figure 2), ruling out the possibility of using this noninvasive sample as an alternative to intestinal biopsy. Mucosal cells showed a high variability of IL-8, IL-6, and IL-1 β production, whereas the concentration of TNF α , IL-10, and IL-12 were mostly undetectable in all experiments (Figure 3). Cadaveric organ donors 4 and 7 showed the widest range of mucosal cytokine response, while cadaveric organ donor 6 generated the most homogeneous response against all tested MAMPs: 19 from possible donors and their own bacterial ecosystem.

Although we observed considerable variability in the cytokine profiles, it is important to note that these levels were not particularly high, especially if we compare them with those produced by peripheral blood cells. Interestingly, the fecal microbial determinants from donor 18 generated the lowest mucosal immune response in 4 cadavers (numbers 3, 5, 6, and 7); in contrast, donor 18 provoked the third highest cytokine production in recipient 4. The least proinflammatory response from the two remaining cadavers (1 and 2) was generated by their own MAMPs. None of the 19 MAMPs generated the highest inflammatory response in more than one recipient, indicating scarce specificity in the mucosal inflammatory reaction.

Test Validation in UC Patients

We recruited 4 patients (3 men; median age, 54 years) with extensive moderate UC and refractory to several lines of immunosuppressive and biological therapies. The patients' condition had lasted a median of 6.5 years (range, 4–27 years). Table 1 summarizes the baseline characteristics of the 4 patients. Rectal biopsies from these patients yielded a low number of cells, limiting the compatibility test to 3 donor candidates.

Figure 4 shows the results of the compatibility test for each UC patient. Fecal donor candidate 1 was selected for patients 1 and 2, as this individual generated the mildest immune response in both cases, while donor candidate 2 was chosen as the FMT

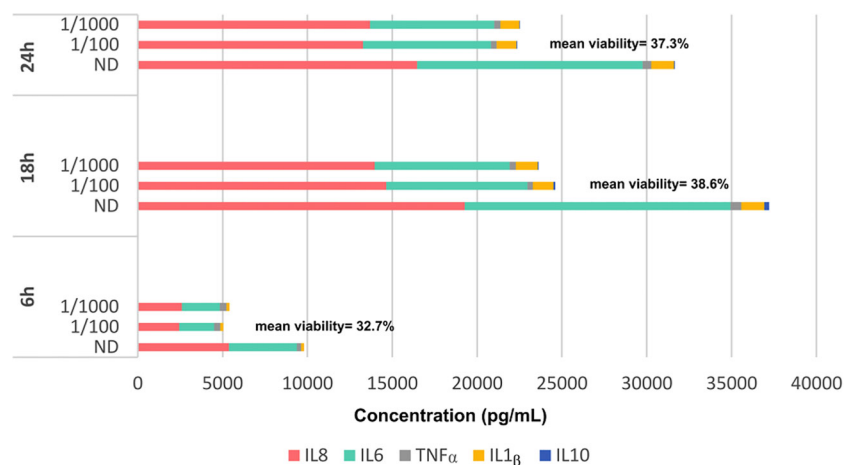


FIGURE 1 | Cytokine production of lymphoid cells obtained from a peripheral blood sample of a healthy volunteer under different incubation times (6, 18 and 24 h) and different dilutions of the fecal supernatant [non-diluted (ND), 1/100 and 1/1000]. Mean cell viability measured at each time is also showed.

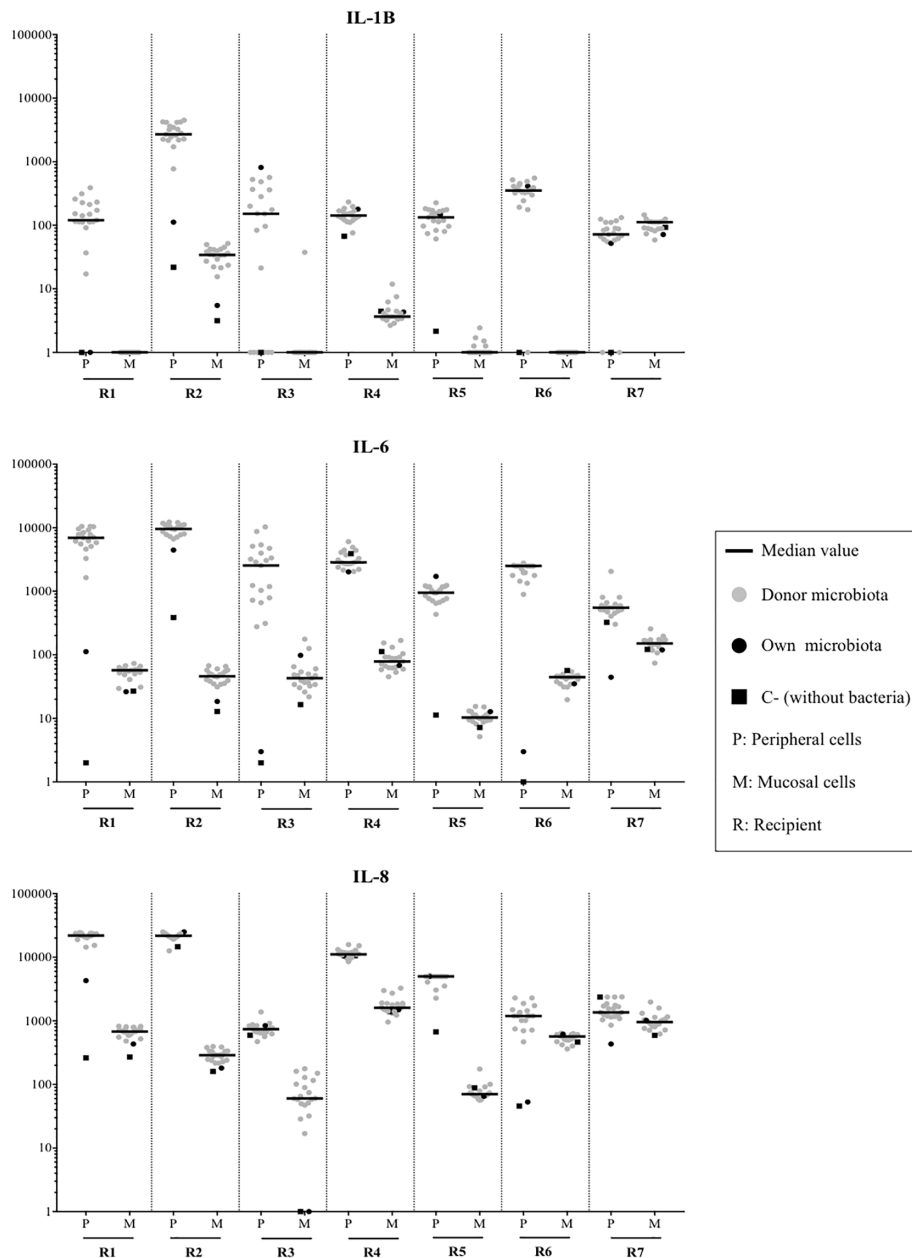


FIGURE 2 | Comparison of peripheral (P) and mucosal (M) immunological response for microbiota from 19 healthy donors, their own microbiota and a negative control without antigenic stimulus. The most variable markers (IL-1 β , IL-6 and IL-8) were shown. To note the logarithm scale of the Y axis.

donor for patients 3 and 4. It should be noted that the baseline cytokine expression levels were much higher than those observed in the assays with cadavers, which might be due to the patients' chronic inflammation state due to their colitis. Again, TNF α , IL-10, and IL-12 were not useful markers for donor selection, because they showed baseline or null expression levels.

We performed the FMT procedures with no noticeable adverse effects in any patient. First, a fecal infusion with 100 gr of fresh feces was performed by colonoscopy, followed by 4 rectal enemas obtained from another 100 g of stool and self-

administered 1 per week with a syringe containing 50 ml, which was kept frozen at -20°C until use.

FMT Engraftment in UC vs CDI

We performed 16s rDNA sequencing on the 22 fecal samples from the 4 patients with UC, the 2 selected donors, and the 2 patients with CDI, yielding 3,644,526 reads, whereas the negative control only yielded 123 reads, discarding external contamination. After quality filtering, chimera removal, merging, and discarding the very low-frequency sequences, we

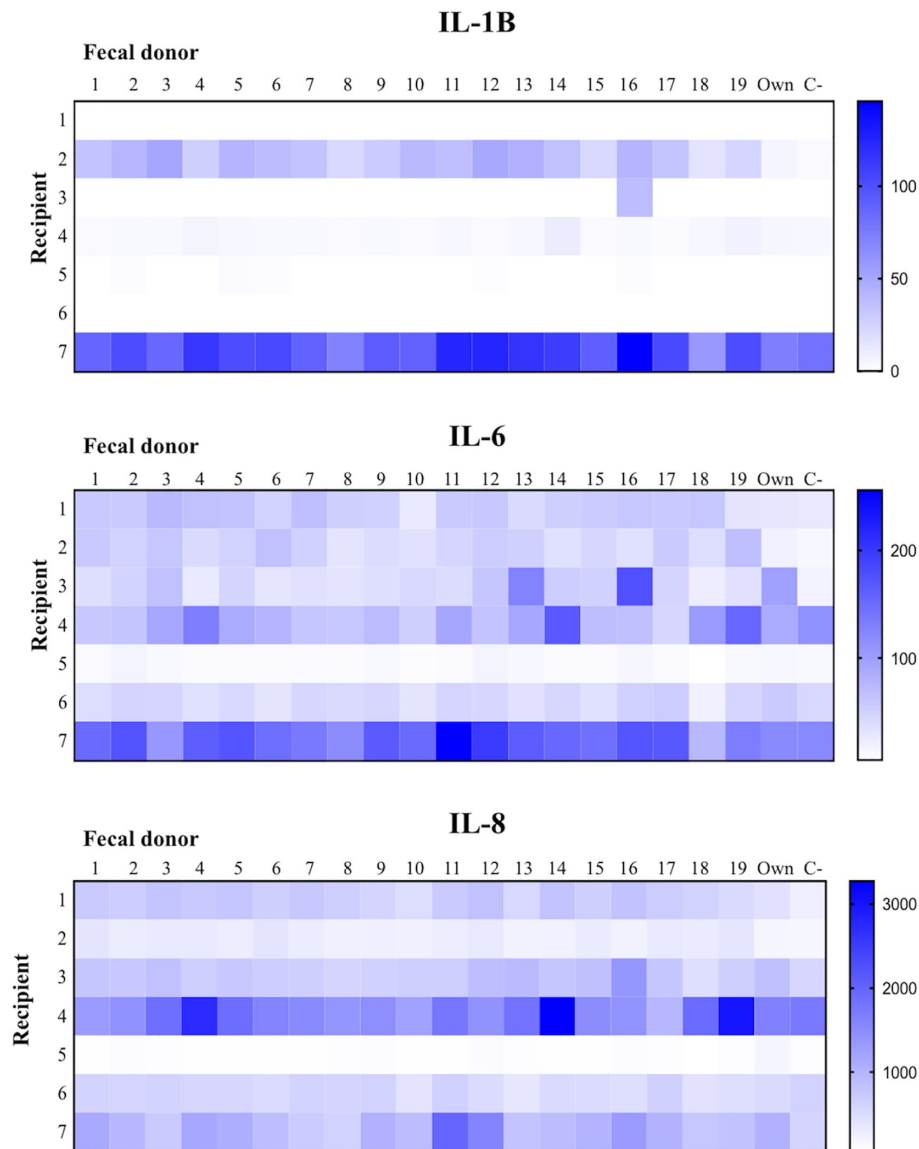


FIGURE 3 | Intrarecipient variability immunological activation (only with mucosal associated immunocompetent cells) against microbiota from 19 healthy donors, their own microbiota and the negative control without microorganisms.

TABLE 1 | Clinical characteristics of the four patients with ulcerative colitis.

Patient	Age, sex	Extension ¹	Years from diagnosis	Treatment before FMT ²	Steroid dose at FMT
UC1	42, male	E3	27	AZA, MCP, IFX, ADA, GOL, VDZ, TACRO	15 mg
UC2	41, male	E3	5	AZA, IFX, ADA, VDZ	none
UC3	71, female	E3	4	IFX, MTX, VDZ, ADA, TACRO	4 mg
UC4	66, male	E3	8	AZA, MCP, ADA, IFX, MTX, GOL, VDZ	10 mg

¹Following Montreal classification.

²FMT, fecal microbiota transplantation; AZA, azathioprine; MCP, mercaptopurine; IFX, infliximab; ADA, adalimumab; GOL, golimumab; VDZ, vedolizumab; TACRO, tacrolimus; MTX, methotrexate.

ultimately obtained a total of 1,739,846 reads. After the taxonomic assignment, nonbacterial sequences were removed, and 1,737,688 reads of 1402 ASVs were ultimately considered.

For the diversity analysis, all samples were normalized *via* rarefaction, which was set to 23,405 sequences to maximize the retention of samples and to preserve representative diversity.

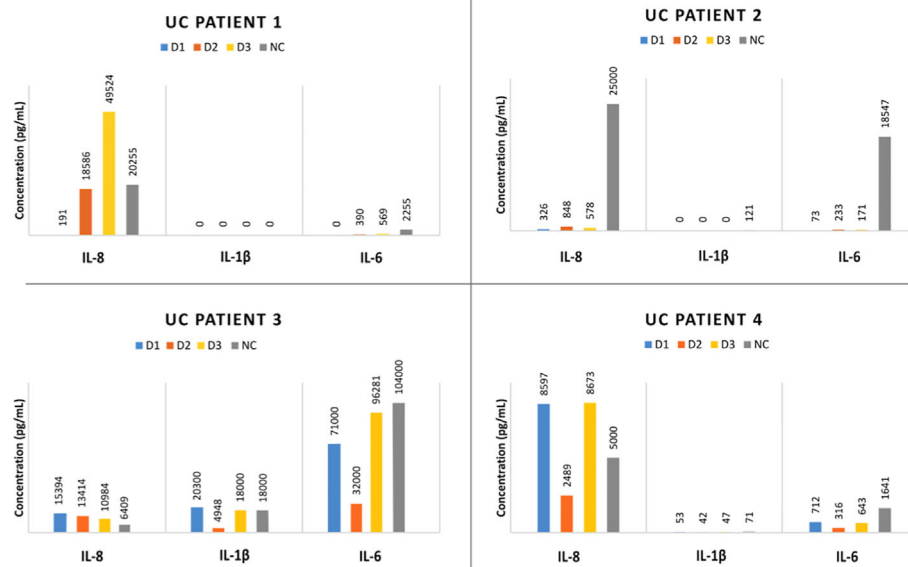


FIGURE 4 | Results from *in vivo* evaluation of the test using 4 patients with ulcerative colitis (UC). Each quadrant showed the cytokine production of each patient against the 3 donor candidates' microbiota. The basal cytokine production (without any antigenic stimulus) of the immunocompetent cells is also depicted (named as NC, negative control).

Alpha diversity measures the ecosystem's degree of richness, to wit, the number of different species and their relative abundance. The lowest alpha diversity values were observed for the patients with CDI (3.8 ± 1.1 Shannon, 87.0 ± 28.2 Chao1, and 6.8 ± 0.1 Faith's PD), followed by the patients with UC (5.0 ± 0.5 Shannon, 154.7 ± 46.4 Chao1, and 10.4 ± 2.0 Faith's PD) and fecal donors (5.6 ± 0.6 Shannon, 286.0 ± 82.0 Chao1, and 16.4 ± 2.9 Faith's PD). The alpha diversity metrics of the patients with UC were significantly increased ($p < 0.007$) after FMT (287.7 ± 69.0 Chao1 and 15.9 ± 1.9 Faith's PD), suggesting the incorporation of new bacterial species after the procedure. In contrast, the alpha diversity of the patients with CDI showed a slightly but not statistically significant increase ($p > 0.05$) after FMT (4.3 ± 0.7 Shannon, 120.5 ± 37.5 Chao1, and 10.1 ± 2 Faith's PD).

The fecal microbiome composition is detailed in the supplementary material (Figure S2). Up to 227 genera were detected in the whole population; the pre-FMT CDI samples had the lowest count ($n=63$), and the post-FMT UC samples had the highest count ($n=206$). The microbiome from the patients with CDI had considerable differences with regard to the rest of the samples, highlighting the abundance of the *Proteobacteria* phylum (29.8%), and *Streptococcus* (25.4%), *Ruminococcus* (14%), and *Weissella* (8.4%) genera. Conversely, the microbial composition of the donors and pre-FMT UC samples were more similar, highlighting the proportions of the *Bacteroidota* (15.7/12.3%) and *Verrucomicrobiota* (10.9/0.8%) phyla and the *Agathobacter* (10.6/8.1%) and *Akkermansia* (10.9/0.5%) genera. The most relevant differences between the donors and the pre-FMT patients with UC focused on *Firmicutes* (70.6/76.5%) and *Actinobacteriota* (2.5/7.7%) phyla and *Faecalibacterium* (6.7/10.9%) and *Bacteroides* (8.6/11.8%) genera.

The impact of FMT on the patients with UC resulted in the enrichment of *Bacteroidota* phylum (12.3/22.9%) and *Prevotella* genus (0.8/6.2%) and the decrease of the *Actinobacteriota* phylum (7.7/3.7%) and *Agathobacter* genus (8.1/3.0%). We should also mention the deficient engraftment of *Akkermansia* after FMT (0.8%), despite it being the most abundant genera in the donors (10.9%). In contrast, FMT in the patients with CDI produced a noticeable enrichment of the *Akkermansia* genus (0.1/17.7%) and a decrease of the *Firmicutes* phylum (63.7/45.8%) and *Ruminococcus* genus (14.0/0.9%).

Microbial communities can also be compared using beta diversity distances. We calculated the unweighted UniFrac distances between samples and used the distances to build a principal coordinates analysis plot (Figure 5). Although the analysis failed to detect statistically significant clusters, likely related to the small sample size, the visual inspection of the plot showed certain relevant trends. First, the donors, the patients with CDI, and those with UC could be separated by their microbiome composition; the patients with UC were the least homogeneous group. Second, FMT appears to have little effect on acquiring new taxa in the patients with CDI. Conversely, the patients with UC appear to be more affected by FMT through the acquisition of certain new taxa from donors to recipients (agreeing with the aforementioned increase in alpha diversity values after FMT), a situation that did not occur for UC patient 3, whose microbiome was barely modified by the intervention.

Clinical Follow-Up of Patients With Ulcerative Colitis

Figure 6 summarizes the results of the clinical follow-up of the patients with UC. The colonoscopy at 16 weeks showed no

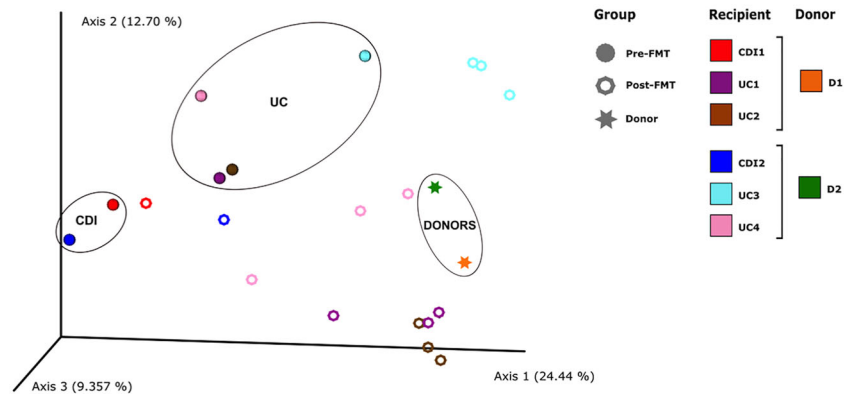


FIGURE 5 | PCoA based on unweighted UniFrac distances calculated from the microbiological profiles of stool samples. Each point represents a sample, color indicates each subject, and the shape indicates if a sample was obtained before or after fecal microbiota transplantation (FMT), or whether it comes from a donor. In addition, brackets indicate which donor were selected for each patient.

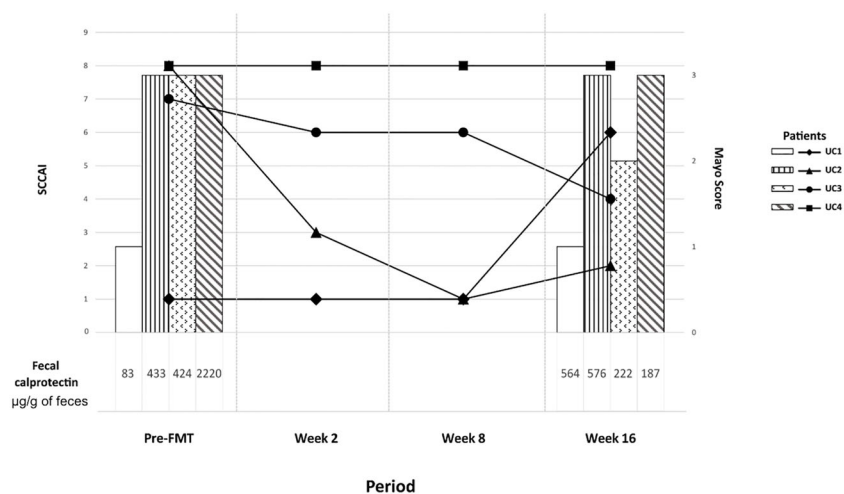


FIGURE 6 | Clinical evolution of the four patients with ulcerative colitis over time, from the moment before fecal microbiota transplantation (FMT) (left) to the end of the follow-up at week 16 (right). The solid lines represent the SCCAI value at each time, whereas the bars (only recorded before FMT and at week 16 after FMT) showed the Mayo endoscopic score. Finally, fecal calprotectin levels for each patient before FMT and at week 16 were showed under the X axis.

significant improvement in disease activity in any of the patients. Two patients (2 and 3) showed a slight decrease in SCCAI over time, whereas patient 1 had an increase in this value after FMT. Lastly, fecal calprotectin levels were comparable among the time points or even higher after the procedure (except for patient 4).

DISCUSSION

UC is an inflammatory bowel disease in which the dialogue between the gut microbiota and mucosal immunity is affected (2, 21, 22). FMT has been proposed as a useful tool for modifying the microbial gut ecosystem. Although FMT has a clinical efficacy in CDI of approximately 90%, it rarely achieves rates

above 40-50% in UC (11, 23). Given that the immunological factor is particularly relevant in these patients, our present study proposed exploring the recipient's immunological compatibility with respect to the antigenic MAMPs determinants of different donors to optimize the selection.

The first objective was to determine whether the inflammatory response of peripheral mononuclear cells could be comparable to those obtained from the gastrointestinal mucosal tract for use as a noninvasive sample. However, the results highlighted the relevance of the cells' origin; while the inflammatory response of peripheral blood was overwhelming (as probably occurs during a bacteremia process), the jejunal mucosal cells exhibited a considerably lower reaction, close to tolerance. In fact, there was noticeably low inflammatory

reaction against most of the tested MAMPs, which was also reproduced in rectal cells obtained from UC patients. This tendency could be related to frequent exposure to alien microorganisms that could be ingested with food or after environmental exposure.

One strength of the *in vitro* optimization of the test was the use of jejunal surgical specimens to obtain immunocompetent cells from the mucosa, which was motivated by: 1) the possibility of recovering a larger number of cells, and 2) the opportunity to reproduce the most functional model possible. Obviously, the colon is the natural target for FMT, especially when using the colonoscopy route; however, immune cells are mostly concentrated in the small intestine. The scheme we proposed allowed us to compare the intra-recipient reaction against 19 microbial ecosystems, and although the inflammatory status of these cadavers is not the most suitable, the results showed considerable variability, demonstrating individual compatibilities.

The first FMT studies on UC pointed to limited efficacy, although recent revisions (11, 23) observed higher remission when using high fecal dosage, regardless of the donor, and the previous administration of antibiotics; however, certain other variables might also be involved (24), as the duration and severity of the disease (11). None of our 4 patients showed relevant clinical improvement after FMT, which contrast with previous reports (25–27); however, the beneficial effects reported in those studies were not long lasting. Conversely, a recent study (28) provided evidence for the long-term efficacy of FMT in patients with UC, particularly associated with the increase in *Proteobacteria* and the decrease in *Bacteroidota* phyla. Other authors have suggested the role of the abundance of *Eggerthella*, *Lactobacillus*, and *Ruminococcus* before FMT or in the days immediately following the procedure as a predictive marker for maintaining clinical remission (29). It is important to note that our patients were particularly refractory to both immunosuppressive and biological therapies, which could negatively affect the clinical efficacy of FMT. In that sense, higher FMT success rates have been reported in young patients with UC with moderate activity compared with older patients or those with more aggressive clinical presentations (30), which is probably related to a higher retention of the bacterial dialogue with the mucosal immune system. Beyond the donor characteristics, the high genetic and microbiological variability of the recipient should also be taken into account in order to obtain FMT success (11).

Our results demonstrated relevant changes in microbiome composition provoked by FMT, with a greater impact on UC than CDI and including the acquisition of previously undetected bacterial taxa, although this was not associated with clinical improvement. The most noticeable result was the lack of *Akkermansia* intestinal engraftment in the patients with UC, whereas the abundance of this genus in the patients with CDI after FMT was comparable with that observed in the donors. These observations exemplify how the intestinal tract lumen, which strictly should not be considered part of our body, harbors a resident microbiota that competes with the transferred

ecosystem after FMT, limiting colonization. This battle appears to depend more on bacterial fitness than on the immune reaction, given the tolerant response observed in most tests. Consequently, immunological compatibility is not an essential factor to explore when selecting stool donors for FMT, although, in a subsequent stage, we should analyze the interactions between the two microbiota to select the donor most likely to displace the recipient's resident microbiota.

The limitations of this study are the low number of patients with UC recruited for FMT and their clinical characteristics of long-term refractory disease. In addition, the use of more selective and specific immunological markers, such as those related to the inflammatory TH-17/TH-1 axis (31) or Treg pathways (32) might be more appropriate or discriminating; however, the success of FMT does not appear to depend on immunological factors. To obtain mucosal-associated immune cells in the patients with UC, we employed rectal biopsies; however, the numbers of recovered cells from these samples were limited and conditioned the assay to only 3 donor candidates, and results obtained with jejunal cells are not completely reproducible at this location. Finally, achieving MAMPs by heat inactivation could not be the best approximation, but co-culture was ruled out because of cell apoptosis due to bacterial growth.

In summary, we designed, optimized, and evaluated a compatibility test for FMT donor selection based on the inflammatory reaction of mucosal immune cells against fecal microbiota, although we cannot rule out other immune response pathways non-explored in our work and that could be critical in the recipient compatibility with the microbiota of different donors. Our experiments with immune cells obtained from the jejunal mucosa of organ donors and from rectal biopsies of patients with UC showed that tolerance with scarce or null inflammatory activation was the most frequent finding, ruling out the requirement of our test. Microbial replacement by FMT was demonstrated in both the CDI and UC models using shared donors. Although we suggest that clinical success in UC could be more dependent on the microbial interactions than on the immunological influence, the higher efficacy for CDI could be a consequence of other unexplored factors.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The original contributions presented in the study are publicly available. This data can be found at https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Traces/study/?acc=PRJNA702025&o=acc_s%3Aa.

ETHICS STATEMENT

The studies involving human participants were reviewed and approved by CEIC Hospital Ramón y Cajal, Madrid, Spain. The patients/participants provided their written informed consent to participate in this study.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

MP-A, CG-H, RC, GR, and RC conceived the experiments and supervised the final manuscript. JN, PN, AM-P, JO, and JG-P provided the surgical pieces. AG and AL-S recruited and clinically followed the patients with UC. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

FUNDING

This work was supported by the Instituto de Salud Carlos III, PI17/00115 and PI20/00164 to RdC, and REIPI (RD16/0016/0011) actions, cofinanced by the European Development Regional Fund “A way to achieve Europe” (ERDF). Also, MPA was supported by a Rio Hortega contract (CM19/00069) from the Instituto de Salud Carlos III and the European Regional Development Fund (ERDF, “A way to achieve Europe”).

REFERENCES

- Zhang M, Sun K, Wu Y, Yang Y, Tso P, Wu Z. Interactions Between Intestinal Microbiota and Host Immune Response in Inflammatory Bowel Disease. *Front Immunol* (2017) 14:942(8). doi: 10.3389/fimmu.2017.00942
- Kellermayer R, Zilbauer M. The Gut Microbiome and the Triple Environmental Hit Concept of Inflammatory Bowel Disease Pathogenesis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* (2020) 71(5):589–95. doi: 10.1097/MPG.0000000000002908
- Zou J, Liu C, Jiang S, Qian D, Duan J. Crosstalk Between Gut Microbiota and Intestinal Mucosal Immunity in the Development of Ulcerative Colitis. *Infect Immun* (2021) 1:IAI.00014–21. doi: 10.1128/IAI.00014-21
- Forbes JD, Van Domselaar G, Bernstein CN. Compartments Within the Gastrointestinal Tract of Inflammatory Bowel Disease Patients Microbiome Survey of the Inflamed and Noninflamed Gut at Different. *Inflamm Bowel Dis* (2016) 22:817–25. doi: 10.1097/MIB.0000000000000684
- Yamamoto-Furusho JK, Posadas-Sánchez R, Alvarez-León E, Vargas-Alarcón G. Protective Role of Interleukin 27 (IL-27) Gene Polymorphisms in Patients With Ulcerative Colitis. *Immunol Lett* (2016) 172:79–83. doi: 10.1016/j.imlet.2016.02.010
- Atarashi K, Tanoue T, Ando M, Kamada N, Nagano Y, Narushima S, et al. Th17 Cell Induction by Adhesion of Microbes to Intestinal Epithelial Cells. *Cell* (2015) 163:367–80. doi: 10.1016/j.cell.2015.08.058
- Ueno A, Ghosh A, Hung D, Li J, Jijon H. Th17 Plasticity and its Changes Associated With Inflammatory Bowel Disease. *World J Gastroenterol* (2015) 21(43):12283–95. doi: 10.3748/wjg.v21.i43.12283
- Paramsothy S, Paramsothy R, Rubin DT, Kamm MA, Kaakoush NO, Mitchell HM, et al. Faecal Microbiota Transplantation for Inflammatory Bowel Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Crohns Colitis* (2017) 11(10):1180–99. doi: 10.1093/ecco-jcc/jjx063
- Green JE, Davis JA, Berk M, Hair C, Loughman A, Castle D, et al. Efficacy and Safety of Fecal Microbiota Transplantation for the Treatment of Diseases Other Than *Clostridium Difficile* Infection: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Gut Microbes* (2020) 12(1):1–25. doi: 10.1080/19490976.2020.1854640
- Allegretti JR, Mullish BH, Kelly C, Fischer M. The Evolution of the Use of Faecal Microbiota Transplantation and Emerging Therapeutic Indications. *Lancet* (2019) 394(10196):420–31. doi: 10.1016/S0140-6736(19)31266-8
- Kellermayer R. Fecal Microbiota Transplantation: Great Potential With Many Challenges. *Transl Gastroenterol Hepatol* (2019) 4:40. doi: 10.21037/tgh.2019.05.10
- Choi HH, Cho YS. Fecal Microbiota Transplantation: Current Applications, Effectiveness, and Future Perspectives. *Clin Endosc* (2016) 49(3):257–65. doi: 10.5946/ce.2015.117

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Marta Cobo, from the Microbiology Department of Hospital Universitario Ramón y Cajal, for her contributions in the manipulation, storage and DNA extraction of fecal samples; to Dr. José Ramón Foruny, from the Gastroenterology Department of Hospital Universitario Ramón y Cajal, for his contribution in performing colonoscopies, and especially to Dr. Pilar Francino, from Area de Genòmica i Salut, Fundació per al Foment de la Investigació Sanitària i Biomèdica de la Comunitat Valenciana (FISABIO-Salut Pública), València, for her support in 16S rDNA massive sequencing studies.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2021.683387/full#supplementary-material>

- Bibbò S, Settanni CR, Porcari S, Bocchino E, Ianiro G, Cammarota G, et al. Fecal Microbiota Transplantation: Screening and Selection to Choose the Optimal Donor. *J Clin Med* (2020) 9(6):1757. doi: 10.3390/jcm9061757
- Sokol H. Toward Rational Donor Selection in Faecal Microbiota Transplantation for IBD. *J Crohns Colitis* (2016) 10:375–6. doi: 10.1093/ecco-jcc/jjw005
- Wilson BC, Vatanen T, Cutfield WS, O’Sullivan JM. The Super-Donor Phenomenon in Fecal Microbiota Transplantation. *Front Cell Infect Microbiol* (2019) 9:2. doi: 10.3389/fcimb.2019.00002
- Paramsothy S, Nielsen S, Kamm MA, Deshpande NP, Faith JJ, Clemente JC, et al. Specific Bacteria and Metabolites Associated With Response to Fecal Microbiota Transplantation in Patients With Ulcerative Colitis. *Gastroenterology* (2019) 156(5):1440–1454.e2. doi: 10.1053/j.gastro.2018.12.001
- Paramsothy S, Kamm MA, Kaakoush NO, Walsh AJ, van den Bogaerde J, Samuel D, et al. Multidonor Intensive Faecal Microbiota Transplantation for Active Ulcerative Colitis: A Randomised Placebo-Controlled Trial. *Lancet* (2017) 389(10075):1218–28. doi: 10.1016/S0140-6736(17)30182-4
- Arévalo Sureda E, Pierzynowska K, Pierzynowski SG, Pérez-Cano FJ. The Immature Gut Barrier and its Importance in Establishing Immunity in Newborn Mammals. *Front Immunol* (2020) 11:1153. doi: 10.3389/fimmu.2020.01153
- Bolyen E, Rideout JR, Dillon MR, Bokulich NA, Abnet CC, Al-Ghalith GA, et al. Reproducible, Interactive, Scalable and Extensible Microbiome Data Science Using QIIME 2. *Nat Biotechnol* (2019) 37:852–7. doi: 10.1038/s41587-019-0209-9
- Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, et al. The SILVA Ribosomal RNA Gene Database Project: Improved Data Processing and Web-Based Tools. *Nucleic Acids Res* (2013) 41(Database issue):D590–6. doi: 10.1093/nar/gks1219
- Byndloss MX, Litvak Y, Bäumlér AJ. Microbiota-Nourishing Immunity and its Relevance for Ulcerative Colitis. *Inflamm Bowel Dis* (2019) 25(5):811–5. doi: 10.1093/ibd/izz004
- Ahlawat S, Kumar P, Mohan H, Goyal S, Sharma KK. Inflammatory Bowel Disease: Tri-Directional Relationship Between Microbiota, Immune System and Intestinal Epithelium. *Crit Rev Microbiol* (2021) 12:1–20. doi: 10.1080/1040841X.2021.1876631
- Zhao HL, Chen SZ, Xu HM, Zhou YL, He J, Huang HL, et al. Efficacy and Safety of Fecal Microbiota Transplantation for Treating Patients With Ulcerative Colitis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Dig Dis* (2020) 21(10):534–48. doi: 10.1111/1751-2980.12933
- Ng SC, Kamm MA, Yeoh YK, Chan PKS, Zuo T, Tang W, et al. Scientific Frontiers in Faecal Microbiota Transplantation: Joint Document of Asia-Pacific

- Association of Gastroenterology (APAGE) and Asia-Pacific Society for Digestive Endoscopy (Apsde). *Gut* (2020) 69(1):83–91. doi: 10.1136/gutjnl-2019-319407
25. Dang XF, Wang Q-X, Yin Z, Sun L, Yang WH. Recurrence of Moderate to Severe Ulcerative Colitis After Fecal Microbiota Transplantation Treatment and the Efficacy of re-FMT: A Case Series. *BMC Gastroenterol* (2020) 20(1):401. doi: 10.1186/s12876-020-01548-w
 26. Haifer C, Saikal A, Paramsothy R, Kaakoush NO, Leong RW, Borody TJ, et al. Response to Faecal Microbiota Transplantation in Ulcerative Colitis is Not Sustained Long Term Following Induction Therapy. *Gut* (2020), gutjnl-2020-323581. doi: 10.1136/gutjnl-2020-323581
 27. Schierová D, Březina J, Mrázek J, Fliegerová KO, Kvasnová S, Bajer L, et al. Gut Microbiome Changes in Patients With Active Left-Sided Ulcerative Colitis After Fecal Microbiome Transplantation and Topical 5-Aminosalicylic Acid Therapy. *Cells* (2020) 9(10):2283. doi: 10.3390/cells9102283
 28. Fang H, Fu L, Li X, Lu C, Su Y, Xiong K, et al. Long-Term Efficacy and Safety of Monotherapy With a Single Fresh Fecal Microbiota Transplant for Recurrent Active Ulcerative Colitis: A Prospective Randomized Pilot Study. *Microb Cell Fact* (2021) 20(1):18. doi: 10.1186/s12934-021-01513-6
 29. Li Q, Ding X, Liu K, Marcella C, Liu X, Zhang T, et al. Fecal Microbiota Transplantation for Ulcerative Colitis: The Optimum Timing and Gut Microbiota as Predictors for Long-Term Clinical Outcomes. *Clin Transl Gastroenterol* (2020) 11(8):e00224. doi: 10.14309/ctg.0000000000000224
 30. Sood A, Singh A, Mahajan R, Midha V, Kaur K, Singh D, et al. Clinical Predictors of Response to Faecal Microbiota Transplantation in Patients With Active Ulcerative Colitis. *J Crohns Colitis* (2020) 9:jjaa163. doi: 10.1093/ecco-jcc/jjaa163
 31. Lin X, Sun Q, Zhou L, He M, Dong X, Lai M, et al. Colonic Epithelial mTORC1 Promotes Ulcerative Colitis Through COX-2-mediated Th17 Responses. *Mucosal Immunol* (2018) 6:1663–73. doi: 10.1038/s41385-018-0018-3
 32. Brown EM, Kenny DJ, Xavier RJ. Gut Microbiota Regulation of T Cells During Inflammation and Autoimmunity. *Annu Rev Immunol* (2019) 37:599–624. doi: 10.1146/annurev-immunol-042718-041841

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2021 Ponce-Alonso, García-Hoz, Halperin, Nuño, Nicolás, Martínez-Pérez, Ocaña, García-Pérez, Guerrero, López-Sanromán, Cantón, Roy and del Campo. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

