

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

**FACULTAD DE FARMACIA**

**Departamento de Microbiología II**



**ANÁLISIS METAGENÓMICO DE LA MICROBIOTA  
INTESTINAL EN PACIENTES CON COLITIS ULCEROSA**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR**

**Juan Manuel Sánchez Calvo**

Bajo la dirección de los doctores

Rosa del Campo Moreno  
Antonio López San Román

**Madrid, 2013**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE FARMACIA**

**Departamento de Microbiología II**



**ANÁLISIS METAGENÓMICO DE LA MICROBIOTA  
INTESTINAL EN PACIENTES CON COLITIS  
ULCEROSA**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**

**PRESENTADA POR**

**Juan Manuel Sánchez Calvo**

Bajo la dirección de los doctores

Rosa del Campo Moreno

Antonio López San Román

**Madrid, 2012**









Universidad Complutense de Madrid

Facultad de Farmacia. Departamento de Microbiología II

**Análisis Metagenómico de la Microbiota Intestinal  
en Pacientes con Colitis Ulcerosa**

Tesis doctoral presentada por

**Juan Manuel Sánchez Calvo**

Para la obtención del grado de Doctor

Los directores del trabajo

**Dra. Rosa del Campo Moreno**

**Dr. Antonio López San Román**

Servicio de Microbiología

Servicio de Gastroenterología



Memoria presentada en la Facultad de Farmacia  
de la Universidad Complutense de Madrid  
por Don Juan Manuel Sánchez Calvo  
para la obtención del grado de doctor

### **Directores**

Dra. Rosa del Campo Moreno. Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Ramón y Cajal e Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS).

Dr. Antonio López San Román. Servicio de Gastroenterología. Facultativo Especialista Adjunto. Hospital Universitario Ramón y Cajal.



**Rosa del Campo**, como Investigador Estabilizado del IRYCIS en el Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Ramón y Cajal de Madrid, y

**Antonio López-San Román**, Facultativo Especialista de Área, del Servicio de Gastroenterología del Hospital Universitario Ramón y Cajal de Madrid;

*CERTIFICAN:*

Que la presente memoria titulada “**Análisis Metagenómico de la Microbiota Intestinal en Pacientes con Colitis Ulcerosa**”, ha sido realizada bajo ha sido realizada bajo nuestra dirección por el doctorando **Juan Manuel Sánchez Calvo** en el Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Ramón y Cajal, y estimando que se encuentra finalizada y en condiciones de optar al grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid, se solicita sea admitida a trámite para su lectura y defensa pública.

*Madrid, a 05 de Junio de 2012*

Dra. Rosa del Campo

Dr. Antonio López-San Román



“En la Tierra no vivimos en la Era del Hombre o de los humanos,  
vivimos hoy, y siempre, en la Era de la Bacterias”.

Stephen Jay Gould (1941-2002).



## Agradecimientos:

A la Dra. Rosa M<sup>a</sup> del Campo, mi directora de tesis, a quien tengo que agradecer enormemente el haberme acogido como si fuera uno más de su multitudinaria familia. Muchas gracias por tu apoyo, tu persistencia y tu generosidad. Sin ti no lo habría conseguido.

Al Dr. Antonio López San Román sin el cual esto no hubiera sido posible, ya que fue el encargado de coordinar todo el proyecto en el Servicio de Gastroenterología del Hospital y una parte fundamental del mismo, ya que, además de dirigirme la Tesis, siempre encontré en él un apoyo.

Al Dr. José Ramón Foruny, quien se encargó de realizar todas las colonoscopias y mantener actualizada la base de datos. Siempre tuvo una sonrisa y no desistió nunca hasta que tuvimos los pacientes necesarios para llevar a cabo el estudio.

Al Dr. Rafael Cantón le agradezco mucho todo lo que hizo por nosotros. Siempre estuviste ahí y no sabes lo que nos han ayudado tus consejos. Te debemos más de una. Me alegro mucho de haber realizado la tesis y la especialidad en tu Hospital. Creo que ha sido una oportunidad única. Gracias.

A Merche, la cual siempre estuvo ahí para ayudarme y explicarme lo que necesité durante toda el tiempo que permanecí a su lado. Gracias por quedarte conmigo y ayudarme tanto en este enigmático camino que es la ciencia. No sé como lo hacía, pero siempre le salían las cosas. Que sepas que tienes un amigo incondicional.

A Gustavo, Luis y Bea. Gracias por hacer de estos cuatro años que pasamos juntos los mejores años de mi vida. Nunca os olvidaré.

A mis compañeros del Hospital Universitario Ramón y Cajal, Raquel, José María, Mario, María Gálvez, Desirée, Ana, Claudio, Ana Luisa, María, Juande y Azucena, así como del resto de las personas que me ayudaron en mi aprendizaje en la Unidad de Gestión Clínica de Microbiología. Siempre estuvisteis ahí y me hicisteis todo más fácil. Muchas gracias también a vosotros.

A mis padres, por estimular desde pequeño mi curiosidad y mi capacidad de aprendizaje. Sin vuestra ayuda tampoco habría llegado hasta aquí, pues es vuestro cariño y la educación que he recibido la que ha obrado esto. Os quiero.

A mis hermanos y al resto de mi familia, que también han contribuido a mejorar este largo camino que es la vida. Gracias por apoyarme y animarme en todas mis decisiones.

Finalmente no puedo dejar pasar por alto a la persona más importante de mi vida. Es la que realmente me conoce y me comprende y siempre ha estado apoyándome en esta ardua tarea. Creo que sin ella no lo hubiera terminado, al igual que todas las cosas que he conseguido a lo largo de mi vida. Tú has sido mi inspiración y mi fuerza. Mil veces gracias. Te quiero.

Al término de esta etapa de mi vida, quiero expresar un profundo agradecimiento a quienes con su ayuda, apoyo y comprensión me alentaron a lograr esta hermosa realidad.

Gracias.





---

<b>I. ANTECEDENTES DEL TEMA</b>	<b>9</b>
<b>1. COLITIS ULCEROSA</b>	<b>9</b>
1.1. Concepto	9
1.2. Clasificación	9
1.3. Epidemiología	10
1.4. Etiología	11
1.5. Patogénesis	14
1.6. Clínica	17
1.7. Diagnóstico y gradación de la actividad	17
1.8. Anatomía Patológica	18
1.9. Tratamiento	20
<b>2. MICROBIOTA INTESTINAL</b>	<b>22</b>
2.1. Evolución de la microbiota intestinal a lo largo del tiempo	22
2.2. Funciones de la microbiota intestinal	23
2.3. Composición de la microbiota en sujetos sanos y enfermos diagnosticados de Colitis Ulcerosa	25
2.3.1. Heces	25
2.3.2. Mucosa cólica	26
<b>3. COLITIS ULCEROSA: RELACIÓN CON LAS BACTERIAS</b>	<b>28</b>
<b>4. TÉCNICAS MOLECULARES TRADICIONALES</b>	<b>34</b>
4.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	35
4.1.1. Amplificación	36
4.1.2. Secuenciación	40
4.2. Electroforesis en Gel de Campo Pulsado	41
4.3. MALDI-TOF MS	43
<b>5. METAGENÓMICA</b>	<b>45</b>
5.1. Historia de la pirosecuenciación	45
5.2. Principio de la pirosecuenciación	46

5.3. Sistema GS FLX	46
<b>II. OBJETIVOS</b>	<b>51</b>
<b>III. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>55</b>
<b>1. DISEÑO DEL ESTUDIO Y RECOGIDA DE MUESTRAS</b>	<b>55</b>
1.1. Microbiota intestinal de sujetos sanos y pacientes diagnosticados de Colitis Ulcerosa	55
1.2. Estudio familiar de las variaciones de la microbiota intestinal	56
<b>2. PROCESADO DE LAS MUESTRAS</b>	<b>57</b>
2.1. Heces	57
2.2. Biopsias	57
<b>3. CEPAS BACTERIANAS</b>	<b>57</b>
<b>4. MEDIOS DE CULTIVO EMPLEADOS</b>	<b>58</b>
<b>5. DETECCIÓN DE BACTERIAS VIABLES EN HECES</b>	<b>58</b>
<b>6. EXTRACCIÓN DE ADN</b>	<b>59</b>
6.1. Extracción de ADN de cultivos bacterianos puros	59
6.2. Extracción fenol/cloroformo del ADN total en heces y biopsias	59
6.3. Cuantificación de ADN	59
<b>7. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)</b>	<b>60</b>
7.1. PCR cualitativa	60
7.2. PCR cuantitativa	60
<b>8. ELECTROFORESIS EN GEL DE CAMPO PULSADO (PFGE)</b>	<b>63</b>
8.1. Preparación de la muestra para campo pulsado	63
8.2. Condiciones para la electroforesis en campo pulsado	64
<b>9. SECUENCIACIÓN AUTOMÁTICA EN GELES DESNATURALIZANTES</b>	<b>64</b>
<b>10. MALDI-TOF MS</b>	<b>65</b>
<b>11. PIROSECUENCIACIÓN</b>	<b>66</b>
<b>12. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS</b>	<b>68</b>
<b>IV. RESULTADOS</b>	<b>71</b>

<b>1. MICROBIOTA INTESTINAL DE SUJETOS SANOS Y DE PACIENTES DIAGNOSTICADOS DE COLITIS ULCEROSA</b>	<b>71</b>
<b>1.1. Diferencias en la microbiota intestinal de sujetos sanos y de pacientes diagnosticados de Colitis Ulcerosa</b>	<b>71</b>
1.1.1. Rectas de calibrado	71
1.1.2. Curvas de fusión	72
1.1.3. PCR-RT de biopsias	74
1.1.4. PCR-RT de heces	76
1.1.5. Comparación entre los resultados obtenidos en las PCR-RT entre las biopsias y las heces	76
<b>1.2. Clasificación de Montreal</b>	<b>79</b>
<b>1.3. Índice Mayo</b>	<b>81</b>
1.3.1. En función de la actividad	81
1.3.2. En función de la gravedad	81
<b>1.4. Índice Geboes</b>	<b>84</b>
<b>1.5. Evolución en el tiempo de la enfermedad</b>	<b>86</b>
<b>1.6. Tratamiento</b>	<b>88</b>
<b>1.7. Relación con el tabaco</b>	<b>90</b>
<b>2. ESTUDIO FAMILIAR DE LAS VARIACIONES DE LA MICROBIOTA INTESTINAL</b>	<b>92</b>
<b>2.1. Variaciones en la microbiota intestinal en un paciente con Colitis Ulcerosa a lo largo de un año</b>	<b>92</b>
<b>2.2. Diferencias en la densidad de la microbiota intestinal entre los miembros de una misma familia</b>	<b>97</b>
<b>2.3. Identificación de especies y cepas de microorganismos mediante la utilización de MALDI-TOF y Campo Pulsado</b>	<b>102</b>
2.3.1. <i>Escherichia coli</i>	102
2.3.2. Enterococos	104
<b>V. DISCUSIÓN</b>	<b>109</b>

<b>VI. CONCLUSIONES</b>	<b>131</b>
<b>VII. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>135</b>
<b>FIGURAS</b>	<b>169</b>
<b>TABLAS</b>	<b>171</b>
<b>ABREVIATURAS Y SIGLAS</b>	<b>175</b>

**A**ntecedentes del tema



## **I. ANTECEDENTES DEL TEMA**

### **1. COLITIS ULCEROSA**

#### **1.1. Concepto**

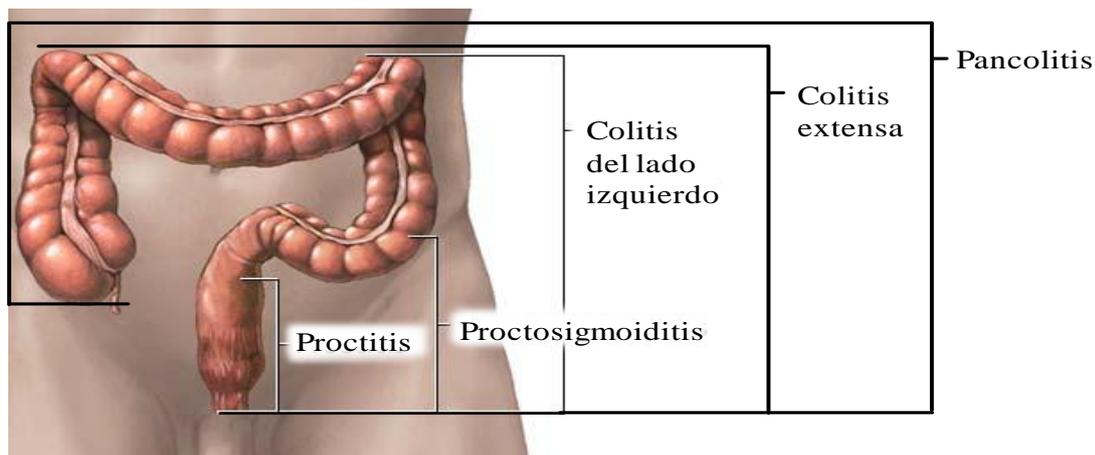
En el concepto de Enfermedad Inflamatoria Intestinal (EII) se engloban tres cuadros clínicos diferentes, con síntomas a veces parecidos: la Enfermedad de Crohn, la Colitis no clasificada y la Colitis Ulcerosa. Esta última, que es objeto de esta tesis, se caracteriza por la inflamación que afecta de forma prácticamente constante al recto y que se puede extender de manera proximal y continua en una longitud variable, pudiendo afectar a la totalidad del colon (Gassull y cols., 2007; Farreras y Rozman., 2008). En la histología se observa típicamente un infiltrado inflamatorio mixto en la lámina propia que altera la arquitectura glandular, depleción de células caliciformes secretoras de moco y acúmulos de neutrófilos en las criptas formando microabscesos. Es un proceso crónico y recidivante, de causa desconocida y para el que, actualmente, carecemos de tratamiento curativo.

#### **1.2. Clasificación**

Las lesiones de la Colitis Ulcerosa son continuas, pero en función de su localización se definen diferentes cuadros (Langan y cols., 2007) (Figura 1):

- a) Proctitis: Afecta solo al recto
- b) Proctosigmoiditis: Afecta al recto y al colon sigmoide
- c) Colitis izquierda: Afecta al recto, colon sigmoide y descendente
- d) Colitis extensa: Afecta hasta el ángulo hepático
- e) Pancolitis: Afecta a todo el colon

Esta clasificación, puramente anatómica, recoge la más moderna clasificación de Montreal, en la que se dividen los casos de Colitis Ulcerosa según su extensión y su actividad. Según el primer parámetro, se distinguen los subtipos E1 (limitada al recto), E2 (que llega hasta el ángulo esplénico) y E3 (que lo sobrepasa). La actividad de la enfermedad da lugar a los subtipos S0, S1, S2 y S3, de gravedad creciente (Silverberg y cols., 2005).



**Figura 1.** Tipos de Colitis ulcerosas en función de su localización. (Modificada de [http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/esp\\_imagepages/19308.htm](http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/esp_imagepages/19308.htm)).

### 1.3. Epidemiología

La incidencia, la prevalencia e incluso el comportamiento clínico de la Colitis Ulcerosa son muy variables en las diferentes regiones del mundo (Portela y cols., 2010). Así, la incidencia puede variar entre 5 y 18 casos por 100.000 habitantes (Farreras y Rozman, 2008), aunque las cifras son mayores en América del Norte y en el Norte y Oeste de Europa. En estas regiones existe una estabilidad en la incidencia de la enfermedad, mientras que en otras zonas del mundo como Asia, Sudamérica y Sur y Este de Europa, las tasas de incidencia eran inicialmente bajas pero han empezado a incrementarse (Lakatos, 2006). En España, la tasa de incidencia varía entre 0,6 y 8 casos por 100.000 habitantes (Pajares y Gisbert, 2001; Herrerías-Gutiérrez y cols., 2009), al igual que en otros países del Sur de Europa (López-Serrano y cols., 2009). Los estudios epidemiológicos han demostrado que se diagnostican más casos en las áreas urbanas que en las áreas rurales (Baumgart y Carding, 2007).

En relación a la **edad** de aparición, la Colitis Ulcerosa puede manifestarse a cualquier edad, pero en nuestro entorno existe un pico de incidencia máxima entre los 35 y 45 años, con un segundo pico en mayores de 65 años (López-Serrano y cols., 2009).

En relación al **sexo**, la mayoría de los estudios indican que la incidencia es ligeramente mayor en hombres que en mujeres (Brullet y cols., 1998; Rodrigo y cols., 2004), aunque los últimos datos recogen un aumento considerable de la incidencia en el sexo femenino (López-Serrano y cols., 2009), que probablemente esté debido a factores medioambientales,

hormonales y a cambios en los patrones de conducta relacionados con el tabaco (Tysk y Järnerot, 1992). La mayor incidencia en las mujeres, coincide con el periodo **fértil** (Cornish y cols., 2007). Las mujeres gestantes y afectas de Colitis Ulcerosa mal controlada tienen mayor riesgo de parto a pretérmino, muerte fetal, retraso en el crecimiento del feto y cesárea que la población general (Stephansson y cols., 2011).

Con respecto a la **raza**, la tasa de incidencia es mayor en los sujetos de raza blanca que en los afroamericanos (Thukkani y cols., 2011). También se ha visto que esta enfermedad es de tres a cinco veces más elevada en la población judía que en la europea y en la americana (Baumgart y Carding, 2007). En Israel, los judíos Ashkenazi tienen una mayor incidencia que los judíos Sefardíes, pero una menor incidencia que los judíos Ashkenazi que viven en Estados Unidos o el Norte de Europa, lo que sugiere que en la etiopatogenia no sólo la herencia desempeña un importante papel, sino también factores ambientales y exógenos (Niv y cols., 2000; Birkenfeld y cols., 2009).

#### **1.4. Etiología**

Si bien las causas de la enfermedad no están claras, y en consecuencia, seguimos sin disponer de un tratamiento etiopatogénico eficaz, en los últimos años se han aportado importantes avances en el conocimiento de sus mecanismos causales. Actualmente, la hipótesis más aceptada es que se trata de un grupo heterogéneo de enfermedades, con una manifestación final común que es la inflamación de la mucosa, y con una patogenia en la que están implicados varios factores genéticos y ambientales (Thompson y Lees, 2011). El resultado de estos fenómenos combinados conduce a una respuesta inmunitaria alterada frente a uno o varios antígenos, e implica a las bacterias comensales en una regulación alterada de las células T de la mucosa determinada genéticamente.

##### ***1) Factores ambientales***

Los estudios epidemiológicos han demostrado una clara asociación de diversos factores ambientales con el desarrollo de la Colitis Ulcerosa. Dentro de estos factores ambientales, los que tienen mayor relevancia son el tabaco, la dieta, la higiene, la existencia de una apendicectomía previa, la profesión, el estatus social, los agentes infecciosos y los cambios estacionales (Krishnan y Korzenik, 2002).

Entre los pacientes diagnosticados de Colitis Ulcerosa hay una menor proporción de fumadores que en la población general. También se ha comprobado una menor tasa de eventos desfavorables en los pacientes con Colitis Ulcerosa que fuman, como por ejemplo el número de recaídas, los episodios de hospitalización, la toma de esteroides por vía oral y las intervenciones quirúrgicas (van der Heide y cols., 2009). Estudios experimentales sugieren un efecto beneficioso de la nicotina que parece disminuir la inflamación como consecuencia de un incremento de la producción de moco y una disminución de las citoquinas proinflamatorias y del óxido nítrico (Cosnes, 2004).

La **alimentación** también parece estar implicada en la fisiopatología de la Colitis Ulcerosa. Se ha sugerido que un mayor consumo de azúcar refinado y de carbohidratos, al igual que un consumo elevado de proteínas y grasas, sería un factor de riesgo para el desarrollo de esta enfermedad (Bianchi Porro y Panza, 1985; Thornton y cols., 1985; Persson y cols., 1992; Husain y Korzenik, 1998). Por el contrario, dietas ricas en frutas, vegetales y fibra parecen disminuir el riesgo de padecerla (Lucendo y Rezende, 2009; Gentschew y Ferguson, 2012). Otros estudios concluyen que el consumo de margarina, carne roja o queso podría contribuir al desarrollo de la enfermedad (Maconi y cols., 2010), mientras que la vitamina C actuaría como agente protector (Sakamoto y cols., 2005).

La **higiene** personal juega también un papel importante, ya que vivir en áreas urbanas, tener un alto nivel educacional y un elevado estatus social son factores de riesgo, mientras que padecer gastroenteritis e infecciones respiratorias se considera un factor protector (López-Serrano y cols., 2010; Singhal y cols., 2011). Esto puede ser debido a que el saneamiento excesivo limita la exposición a los antígenos medioambientales, lo que impide la maduración funcional del sistema inmune de la mucosa intestinal e induce a una tolerancia inmunológica, la cual se traduce en una respuesta inadecuada cuando el sujeto se vuelve a exponer a esos antígenos.

Hay estudios que sugieren un valor protector a una **apendicectomía previa** (Carbonnel y cols., 2009), aunque en teoría, estos pacientes son menos propensos a la apendicitis debido a la alteración de la movilidad intestinal o a las anomalías de la mucosa cólica. Es probable que la extirpación del apéndice altere el equilibrio de las células T colaboradoras y supresoras de manera que resulte en una acción protectora (Russel y cols., 1997; Prieto y Friedman, 1999).

Otros autores han destacado el papel de la **actividad ocupacional**, sugiriendo que las profesiones de cartero de correos, trabajadores de la comunicación, obreros de las fundiciones y de la metalurgia, trabajadores de procesos químicos y carpinteros son los que mayor riesgo tienen de padecer esta enfermedad (Li y cols., 2009).

Con respecto al impacto de las **variaciones estacionales**, los últimos estudios realizados ponen de manifiesto que no existe ninguna relación entre el cambio de estación y el agravamiento de esta enfermedad (Lewis y cols., 2004; Soncini y cols., 2006).

## ***II) Factores genéticos***

La sospecha de que los factores genéticos contribuyen a la susceptibilidad de desarrollar las enfermedades inflamatorias intestinales se inició tras los estudios de agrupación familiar. En gemelos homocigóticos se observó una mayor concordancia respecto a la enfermedad que en mellizos (Orholm y cols., 2000).

Se ha demostrado que la probabilidad de desarrollar Enfermedad de Crohn en un familiar de un paciente afecto de Colitis Ulcerosa se incrementa hasta dos veces, y a su vez existe un riesgo cuatro veces mayor de padecer Colitis Ulcerosa en un familiar de un paciente con Enfermedad de Crohn (Brant y Shugart, 2004; Brant, 2009).

La mayoría de los estudios genéticos realizados se han centrado en la región HLA (Antígenos de los Leucocitos Humanos) que se encuentra en el brazo corto del cromosoma 6, el cual juega un papel importante en el sistema inmune. Por ello, los genes localizados en los alelos HLA de Clase I y Clase II son candidatos susceptibles de estar implicados en el desarrollo de la Colitis Ulcerosa (Baumgart y Carding, 2007).

Otros estudios han demostrado que la presencia de 2 polimorfismos, C3435T y G2677T/C en el gen MDR(resistencia multidrogas)-1, es frecuente en los pacientes con Colitis Ulcerosa. Este gen codifica para la Glicoproteína P. Estos polimorfismos se traducen en una baja expresión de la proteína, que parece ser fundamental en la defensa contra las bacterias intestinales (Ho y cols., 2003; Schwab y cols., 2003).

Otros autores han encontrado una asociación muy cercana entre los polimorfismos de los miembros de la familia del Factor Nuclear kappa Beta (NFkB) y la Colitis Ulcerosa. Se estudiaron los polimorfismos de la región promotora del gen NFkB1, localizado en el

cromosoma 4q, el cual está involucrado en una gran variedad de procesos regulatorios como la inmunidad innata y adaptativa, el crecimiento, la apoptosis y la diferenciación celular. Así se encontró una mayor frecuencia de aparición del polimorfismo 94ATTG en la región promotora del gen NFkB1 en pacientes holandeses de raza blanca enfermos de Colitis Ulcerosa comparado con los controles sanos (Borm y cols., 2005).

En definitiva, la base genética del individuo y el número de genes alterados que afectan a diferentes puntos a lo largo de este proceso secuencial, pueden determinar el momento de inicio, la intensidad y la evolución de la enfermedad.

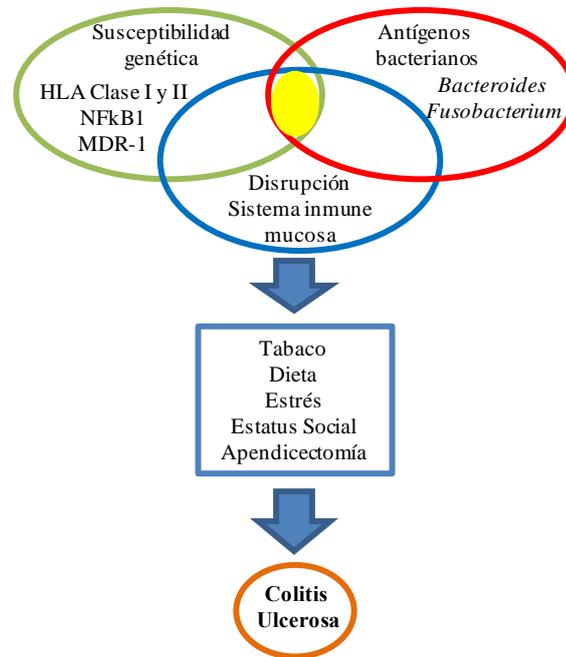
### **III) Factores infecciosos**

Algunas de las similitudes entre la Colitis Ulcerosa y la Colitis Infecciosa han llevado a los investigadores a la búsqueda de microorganismos potencialmente implicados en la inflamación crónica del intestino grueso. Sin embargo, hasta ahora, ninguno de estos agentes se ha asociado por sí solo y de forma inequívoca con el desarrollo de esta enfermedad inflamatoria (Lukas y cols., 2006). En un estudio de parejas de gemelos, se puso de manifiesto que las infecciones gastrointestinales recurrentes antes de los 20 años eran un factor de riesgo para desarrollar Colitis Ulcerosa y esto podría ser debido a cambios, a largo plazo, en la microbiota intestinal o alteraciones en la respuesta de esta (Halfvarson y cols., 2006). Algunos autores han observado un incremento en la mucosa intestinal de la concentración de bacterias anaerobias gram-negativas, y en especial de *Escherichia coli*, *Bacteroides* spp. y *Fusobacterium varium*, junto con una alta frecuencia de invasión de *Peptostreptococcus*, en comparación con sujetos sanos (Ohkusa y cols., 2002; Furrie y cols., 2004; Macfarlane y cols., 2004; Tamboli y cols., 2004). Sin embargo, la pregunta de si la disbiosis presente en pacientes con Colitis Ulcerosa es la causa o la consecuencia de la enfermedad, por el momento carece de una respuesta.

### **1.5. Patogénesis**

El modelo más aceptado actualmente en la patogenia de la Colitis Ulcerosa es el que propone que la enfermedad se produce en personas genéticamente susceptibles por una respuesta inapropiada del sistema inmune frente a un agente externo, que para muchos no es otro que la propia microbiota intestinal (Torres y Rios, 2008) (Figura 2). De hecho, se sabe que las bacterias que forman parte de la microbiota intestinal de los pacientes influyen en las

respuestas inmunitarias locales y sistémicas. El equilibrio entre la homeostasis y la inflamación crónica está determinado genéticamente por la respuesta inmune del huésped frente a los antígenos luminales (Lukas y cols., 2006).



**Figura 2.** Esquema del modelo actual de la etiopatogenia de la Colitis Ulcerosa.

Dos de las hipótesis actuales que relacionan a la microbiota intestinal con la Colitis Ulcerosa se describen a continuación:

#### **a) Hipótesis de la higiene y los “viejos amigos”**

La elevada incidencia de Colitis Ulcerosa en los países industrializados refuerza la idea de que los factores medioambientales tienen un papel importante. La hipótesis de la higiene explica que criar a los niños en un medioambiente extremadamente limpio y aséptico, afecta negativamente al desarrollo del sistema inmune y los predispone a padecer en un futuro enfermedades inmunológicas (Koloski y cols., 2008).

Los múltiples receptores del sistema inmune innato o toll-like receptors (TLRs) tienen la capacidad de reconocer a “los viejos amigos” (lactobacilos, helmintos, micobacterias

saprófitas y otros), que son catalogados como inofensivos como consecuencia de su presencia continua a lo largo de la historia evolutiva de los mamíferos (Xavier y Podolsky, 2007; Rook, 2009). Estos antígenos estimulan las células dendríticas y participan en su maduración. Las células dendríticas inmaduras activan y estimulan a las células T reguladoras, produciéndose un desequilibrio entre el balance de los linfocitos Th1 y Th2, así como entre las células T efectoras y reguladoras (Netea y cols., 2005). La primera posibilidad representa una situación normal gracias a la exposición continuada a los mismos antígenos que inducen una activación continua de las células dendríticas y de las células T reguladoras que producen una supresión inespecífica de la respuesta inflamatoria. La segunda posibilidad representa una respuesta inmune anormal, debido a la falta de exposición a los “viejos amigos” en los primeros años de vida (Rook, 2010). Esta reacción inmune actúa finalmente contra componentes específicos de la microbiota intestinal, dando lugar a una inflamación crónica (Rook y Brunet, 2005). El cambio de la inmunotolerancia a una inmunorreactividad específica, debido a la activación inapropiada del sistema inmune innato y adaptativo, es un momento crucial que predispone a una persona a desarrollar Colitis Ulcerosa (Lukas y cols., 2006).

### **b) Hipótesis de los dos componentes**

Esta teoría fue propuesta a partir unos estudios experimentales que demostraron que los microorganismos intestinales presentes en la Colitis Ulcerosa grave son patogénicos y causantes de reacciones alérgicas e inmunológicas (Maratka y Wagner, 1948). El primer componente de esta hipótesis es que la Colitis Ulcerosa se presenta como una inflamación hemorrágica congestiva de etiología desconocida, posiblemente relacionado con la genética y la inmunopatología, como lo demuestra la circulación de autoanticuerpos (Maratka y Wagner, 1963; Maratka, 2003). Este componente, de por sí, daría lugar a una enfermedad relativamente leve, con periodos de recurrencia que afectan principalmente al recto y con posible extensión a zonas adyacentes del colon. El componente secundario se superpondría sobre la lesión primaria, debido a infecciones no específicas producidas por microorganismos intestinales. Estos serían los responsables de la forma grave de la Colitis Ulcerosa, con complicaciones y secuelas, tanto locales como sistémicas. Esta es la razón del porqué en fases avanzadas la inflamación del colon, de cualquier naturaleza, tiene un carácter ulceroso similar, mientras que los cambios histológicos típicos son más evidentes en las primeras etapas (Maratka, 2003).

## 1.6. Clínica

Aunque la mayoría de las manifestaciones se localizan de forma primaria en el tracto gastrointestinal, hasta en el 25% de los pacientes aparecen también, en algún momento, signos de afectación extraintestinal: osteoarticular, dermatológica, ocular, renal, hepática y sistémica (Larsen y cols., 2010). En general, la intensidad de los signos y síntomas de la enfermedad depende de su localización anatómica y de la gravedad de la inflamación (Royero, 2003).

La enfermedad se suele manifestar en forma de brotes agudos, que a su vez pueden ser leves, moderados o graves. Los **brotes agudos** en la Colitis Ulcerosa se caracterizan generalmente por la aparición de deposiciones frecuentes y diarrea sanguinolenta, siendo menos importante el dolor abdominal (Rogler, 2009). La gravedad del brote viene determinada por la intensidad de los fenómenos clínicos que lo caracterizan. Se emplean muchas clasificaciones diferentes, entre las cuales destacan los criterios de Truelove y Witts que se basan en un conjunto de signos y síntomas de la enfermedad, junto con un conjunto de pruebas complementarias y radiológicas (Gassull y cols., 2007).

La definición de **remisión** se basa en características clínicas, y por ello, se define como la ausencia de diarrea en más de 3 deposiciones al día, ausencia de sangre en heces, así como de los problemas intestinales y extraintestinales asociados (Silverberg y cols., 2005; Rogler, 2009).

Los eventos adversos en la vida, el estrés crónico y la depresión parecen incrementar el riesgo de recaída en pacientes con enfermedad en remisión (Mawdsley y Rampton, 2005; Bernstein y cols., 2010).

## 1.7. Diagnóstico y gradación de la actividad

El diagnóstico de Colitis Ulcerosa está basado en la combinación de hallazgos clínicos, endoscópicos e histológicos, así como en la exclusión de otras etiologías, sobre todo la infecciosa (Ooi y cols., 2010). El cuadro clínico no es específico. Además, el empleo de algunos de los tratamientos útiles en estos pacientes puede ser peligroso si no se ha excluido una infección intestinal como causa de los síntomas. Por lo general, se recurre a una combinación de datos clínicos para la sospecha, pero la herramienta fundamental para el diagnóstico es la colonoscopia. En casos más graves, no se puede llevar a cabo de forma completa, pero en el resto deben explorarse la totalidad del colon y los últimos centímetros

del íleon. Se aprovechará el acto endoscópico para la toma de biopsias, cuyo examen histológico apoyará la sospecha clínica.

Además de hacer un diagnóstico de la entidad, debe procurarse enjuiciar la gravedad del caso, ya que las pautas de tratamiento empleadas van a variar. Como hemos dicho, disponemos de varios Índices de Actividad; si bien el de Truelove-Witts fue el primero descrito, hoy se emplea con frecuencia el denominado Índice de Actividad Clínica, también llamado Índice Mayo o calificación sintomática de Colitis Ulcerosa. Este índice calcula la gravedad de una manera sencilla tomando en cuenta el número de deposiciones, la sangre en heces, los hallazgos de la colonoscopia y la valoración global del médico (Tabla 1). A cada uno de los ítems anteriores se le asigna una calificación de 0 a 3 puntos, con puntuación global variable de 0 a 12 (Lewis y cols., 2008). Las puntuaciones más altas indican mayor gravedad (Naber y de Jong, 2003).

De acuerdo con la suma de puntuaciones, la actividad de la enfermedad se clasifica de la siguiente forma: 1-4 leve; 5-8 moderada y 9-12 grave. La remisión se ha definido como una puntuación menor de 2 y la mejoría como una disminución del índice de 2 o más puntos en relación con la basal (D'Haens y cols., 2007; Zwolinska-Wcislo y cols., 2009).

## **1.8. Anatomía Patológica**

Los cambios histológicos en la Colitis Ulcerosa son muy variados y ninguno de ellos es patognomónico. Se han descrito, en combinación variable, erosiones epiteliales, infiltrado mixto afectando a la mucosa, depleción de células caliciformes e inflamación de las criptas epiteliales, entre otros (Gassull y cols., 2007). Además de la naturaleza de los cambios, interesa describir su gravedad. Aunque son muchas las aportaciones, en el año 2000, Geboes y colaboradores establecieron un sistema sencillo para determinar la gravedad de la Colitis Ulcerosa. Para ello, dividió este sistema en 6 grados en función de la gravedad histopatológica. Los grados fueron: 0, solo cambios estructurales; 1, inflamación crónica; 2, neutrófilos en la lámina propia; 3, neutrófilos en el epitelio; 4, destrucción de las criptas; 5, erosiones o úlceras (Geboes y cols., 2000) (Tabla 2).

**Tabla 1.** Índice de actividad de Colitis Ulcerosa: Índice Mayo.

<b>NÚMERO DEPOSICIONES</b>	<b>PUNTUACIÓN</b>
Número normal de deposiciones para este paciente	<b>0</b>
1-2 deposiciones más de lo normal	<b>1</b>
3-4 deposiciones más de lo normal	<b>2</b>
5 o más deposiciones más de lo normal	<b>3</b>
<b>SANGRE EN HECES</b>	
No se aprecia	<b>0</b>
Deposición con restos de sangre menos de la mitad de las veces	<b>1</b>
Deposición con sangrado evidente la mayoría de las veces	<b>2</b>
Sólo sangre	<b>3</b>
<b>HALLAZGOS EN LA COLONOSCOPIA PROCTOSIGMOIDOSCOPIA</b>	
Normal o enfermedad inactiva	<b>0</b>
Enfermedad leve (eritema, patrón vascular disminuido, friabilidad leve)	<b>1</b>
Enfermedad moderada (eritema evidente, ausencia de patrón vascular, friabilidad, erosiones)	<b>2</b>
Enfermedad grave (hemorragia espontánea, ulceración)	<b>3</b>
<b>VALORACION GLOBAL DEL MÉDICO</b>	
Normal	<b>0</b>
Enfermedad leve	<b>1</b>
Enfermedad moderada	<b>2</b>
Enfermedad grave	<b>3</b>

**Tabla 2.** Clasificación de gravedad de Colitis Ulcerosa en función de las características histopatológicas.

<b>Grados</b>	<b>Características Histopatológicas</b>
<b>0</b>	Cambios en la arquitectura (normal, leve, moderado o grave)
<b>1</b>	Infiltrado inflamatorio crónico (sin incremento, incremento leve, moderado o marcado)
<b>2</b>	Presencia de neutrófilos y/o eosinófilos en la lámina propia (incremento leve, moderado o marcado)
<b>3</b>	Presencia de neutrófilos en el epitelio (sin o con afectación de las criptas)
<b>4</b>	Destrucción de las criptas (dudosa, probable o inequívoca)
<b>5</b>	Erosión, ulceración o presencia de tejido de granulación

## 1.9. Tratamiento

El esquema terapéutico actual de la Colitis Ulcerosa persigue múltiples objetivos. En primer lugar, controlar la afectación inflamatoria del colon y disminuir los síntomas clínicos. En segundo lugar, revertir las lesiones de la mucosa. En tercer lugar, evitar la aparición de nuevos brotes. En cuarto y último lugar, prevenir el desarrollo de neoplasias secundarias a la propia Colitis. Empleamos el tratamiento en dos situaciones diferentes: durante el brote agudo y en el mantenimiento.

En el tratamiento del brote agudo, en general, el enfoque terapéutico se determina según la gravedad de los síntomas y la extensión de la de afectación del colon (Carter y cols., 2004; Kornbluth y Sachar, 2004; Cima y Pemberton, 2005) (Figura 3).

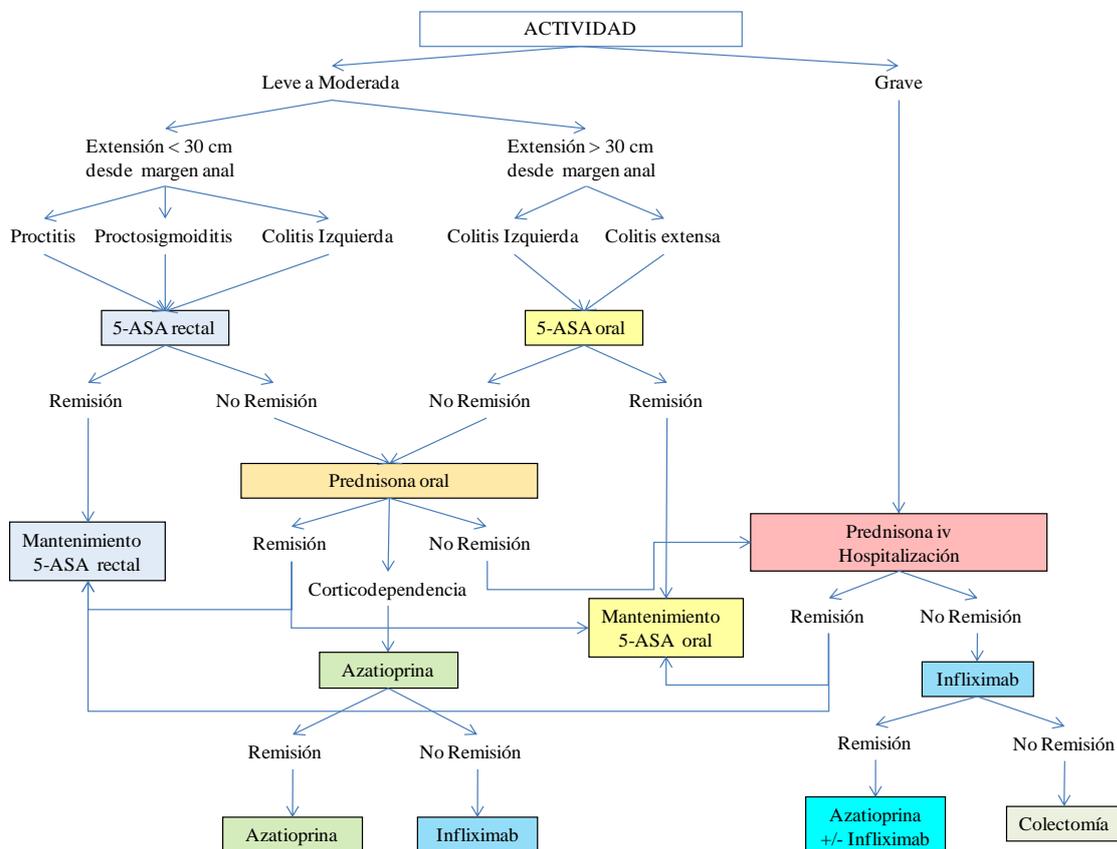
En pacientes con proctitis, proctosigmoiditis o colitis izquierda leve, el tratamiento de primera línea lo constituyen derivados del ácido salicílico como la mesalazina (ácido 5-aminosalicílico [5-ASA]) y la sulfasalazina (combinación de sulfapiridina y mesalazina), los cuales actúan tópicamente sobre la luz del colon suprimiendo la producción de numerosos mediadores proinflamatorios (Fitzgerald y Marsh, 1991). La inducción de la remisión es dosis-dependiente (Hanauer y cols., 2005). La mesalazina puede ser administrada, en el caso de lesiones que no se extiendan más allá de 30 cm del margen anal, en forma de supositorio en la proctitis o como espuma o enema en la proctosigmoiditis, y en el caso de lesiones que se extiendan más de 30 cm, en forma de preparados de liberación retardada por vía oral (Farreras y Rozman, 2008). Los pacientes que no respondan al tratamiento con mesalazina, deben ser tratados con prednisona por vía oral (Langan y cols., 2007), al igual que los afectados por brotes moderados.

Los pacientes que no respondan al tratamiento con corticoides por vía oral, deben ser hospitalizados y recibir prednisona por vía endovenosa. Si no se obtiene respuesta, debe iniciarse tratamiento con ciclosporina o infliximab, y si aun así no se obtiene la remisión, debe considerarse la colectomía quirúrgica (Lichtenstein y cols., 2006). Infliximab es un anticuerpo monoclonal frente a TNF(Factor de Necrosis Tumoral)- $\alpha$  que presenta un potente efecto antiinflamatorio, mientras que la ciclosporina es un inmunosupresor que actúa inhibiendo la calcineurina (Gassull, 2007).

En aquellos pacientes en los que se alcance la remisión clínica, se debe realizar tratamiento de mantenimiento para evitar las recurrencias (Sachar, 1995). Si se consigue la

remisión con corticoides o 5-ASA, el tratamiento de mantenimiento se debe realizar con este último.

Algunos pacientes presentan una actividad crónica persistente o experimentan recurrencias al disminuir o inmediatamente después de retirar los glucocorticoides (corticodependencia). El tratamiento con azatioprina es efectivo en estas situaciones. El tratamiento con infliximab funciona bien en aquellos pacientes que no responden al tratamiento con azatioprina.



**Figura 3.** Algoritmo terapéutico de Colitis Ulcerosa según su gravedad.

## 2. MICROBIOTA INTESTINAL

### 2.1. Evolución de la microbiota intestinal a lo largo del tiempo

Antes del parto, el feto crece y se desarrolla en el útero materno en un ambiente más o menos estéril. Sin embargo, tras la ruptura de las membranas y el inicio del parto queda expuesto a un mundo lleno de microorganismos, y desde ese mismo momento, el ser humano permanece colonizado por bacterias. Dentro del tracto gastrointestinal en particular, el colon es el mayor lugar de colonización, con un contenido de 1,5 kg de masa microbiana, que equivalen a  $10^{14}$  microorganismos (Moore y Holdeman, 1974; Nagalingam y Lynch, 2012). La composición de la microbiota varía a lo largo del tracto gastrointestinal en sus diferentes porciones (Ouwehand y Vesterlund, 2003) y también dentro de cada una de estas. Así, la mucosa cólica alberga una microbiota diferente a la de la luz intestinal y muy pocos microorganismos parecen estar en contacto directo con el epitelio (Zoetendal y cols., 2002).

Los cambios más drásticos en la composición de la microbiota intestinal tienen lugar durante la infancia. Durante los primeros días de vida, el intestino está habitado por microorganismos que se caracterizan por su inestabilidad. Posteriormente, la microbiota se estabiliza durante la lactancia o la formulación sólida. Los siguientes grandes cambios en la composición de la microbiota intestinal se producen tras la introducción de la alimentación sólida y el destete (Favier y cols., 2002). Así, los recién nacidos son rápidamente colonizados por microorganismos anaerobios facultativos como *E. coli* y *Streptococcus* spp., que alcanzan concentraciones de  $10^8$  a  $10^{10}$  unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo de heces en los primeros dos días de vida. Durante la primera semana de vida, las enterobacterias y los estreptococos alcanzan las concentraciones más elevadas (McFarland, 2000). A los 4-6 días, todos los niños nacidos por parto natural, están ya colonizados por bacterias anaerobias, frente al 9% de los niños nacidos por cesárea (Kleesen y cols., 2000). Alrededor del décimo día, todos los recién nacidos muestran una microbiota bastante heterogénea; las bifidobacterias predominan en los lactantes, mientras que encontramos una microbiota muy compleja en los niños alimentados con formulaciones sólidas (Mackie y cols., 1999). Durante el primer mes, las bifidobacterias y *E. coli* son las bacterias predominantes, seguidas por *Lactobacillus*, *Bacteroides* y bacterias gram-positivas, todas ellas en las mismas proporciones. Después del primer año de vida, *Lactobacillus*, *Bacteroides* y *Clostridium* aumentan en número, mientras que las bifidobacterias y *E. coli* disminuyen. En esta fase la microbiota intestinal del niño se parece cada vez más a la del adulto (Thompson-Chagoyan y cols., 2004), y los principales

grupos de bacterias son *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, estreptococos no hemolíticos, enterobacterias (*E. coli*, *Klebsiella*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia* y *Pseudomonas aeruginosa*) y *Bifidobacterium* spp. Después de esto, solo tienen lugar cambios relativamente pequeños, y el niño adquiere una microbiota similar a la del adulto, aproximadamente a los 2 años de edad. Los microorganismos que están siempre presentes en la microbiota de un individuo reciben el nombre de “núcleo individual”, mientras que aquellos que pueden ser detectados en la mayoría de las personas son llamados “núcleo común” (Zoetendal y cols., 2008).

Durante la edad adulta, la composición de la microbiota intestinal es relativamente estable a nivel de especie y predominan fundamentalmente los microorganismos anaerobios (*Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Clostridium*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus*, y *Ruminococcus*) (Guarner y Malagelada, 2003). Sin embargo, puede haber una variación sustancial de las cepas durante un breve periodo de tiempo (McCartney y cols., 1996). Los medicamentos, los hábitos dietéticos y alimenticios, y principalmente los tratamientos con sustancias antimicrobianas producen cambios en la microbiota intestinal (Tiihonen y cols., 2010).

## **2.2. Funciones de la microbiota intestinal**

### ***Producción de nutrientes esenciales en la mucosa***

El intestino humano es un exuberante ecosistema microbiano que recibe el nombre de microbioma y que contiene alrededor de un trillón de microorganismos con una carga genética 100 veces superior al genoma humano completo. La simbiosis de nuestro microbioma juega un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis y en la extracción de energía de la dieta (Tsai y Coyle, 2009; Macfarlane y Macfarlane, 2012). La importancia de la microbiota comensal para recuperar la energía de la dieta y producir vitaminas ha sido claramente demostrada en estudios en animales en un ambiente estéril que impedía la colonización del tracto gastrointestinal (Tremaroli y cols., 2010; Tsai y Coyle, 2009). Así, al comparar a los roedores habituales con los roedores libres de microorganismos, se observó que los animales con alimentación estándar requerían un 30% más de energía en su dieta, además de necesitar la suplementación de vitamina K y varias vitaminas del grupo B para ayudar a su crecimiento y desarrollo. En el ser humano, se estima que la liberación de

energía por parte de la microbiota comensal es aproximadamente el 10% de la energía absorbida, pero depende en gran medida la dieta consumida (Savage, 1986).

El genoma de nuestra microbiota intestinal, también conocido como microbioma, codifica numerosas funciones metabólicas que son únicas y no pueden ser llevadas a cabo por nosotros mismos, como por ejemplo, el procesamiento de componentes indigeribles de la dieta y los polisacáridos de las plantas. Estudios recientes han relacionado la microbiota intestinal con la obesidad. Estos estudios muestran que la obesidad está asociada con profundos cambios en la composición y en la función metabólica de la microbiota intestinal, permitiendo que la “microbiota obesa” obtenga más energía de la dieta (Harris y cols., 2012; Kallus y Brandt, 2012). Por otra parte, se ha demostrado que la microbiota intestinal, junto a sus productos, interactúa con las vías metabólicas del hospedador (como por ejemplo, las células epiteliales) y controla el gasto y el consumo de energía (Tilg, 2010).

Cani y colaboradores demostraron que el consumo elevado de grasa en la alimentación aumentaba la permeabilidad intestinal y la concentración de lipopolisacáridos (LPS) bacterianos en plasma. Cambios en la microbiota intestinal controlan esta endotoxina metabólica y la inflamación. Además, la ingestión elevada de grasas podría tener un efecto directo proinflamatorio/antiinflamatorio, dependiendo de la naturaleza de los ácidos grasos, así como consecuencias inflamatorias a largo plazo relacionadas con la sobrecarga de tejido adiposo, e indirectamente, modulan la endotoxemia metabólica y la inflamación a través de efectos sobre la microbiota (Cani y cols, 2009).

### ***Regulación de la estructura intestinal***

La estructura del tracto gastrointestinal varía a lo largo de su longitud y una de sus funciones más importantes es la de ayudar en la digestión, absorción y en la respuesta inmune en cada uno de los segmentos. La microbiota intestinal parece ser muy importante para mantener la proliferación y diferenciación celular, necesaria por otra parte para mantener la estructura del intestino (Falk y cols., 1998; Miron y Cristea, 2012).

### ***Protección contra los microorganismos externos***

La microbiota intestinal es un elemento muy importante en la barrera de defensa de la mucosa. De hecho, se ha demostrado que los animales criados en un ambiente estéril son más susceptibles de padecer infecciones. Esto se debe a que en un ecosistema estable constituido

por bacterias comensales, estas compiten con las bacterias patógenas por los nutrientes y los espacios libres. Además, el epitelio intestinal produce sustancias que inhiben el crecimiento de los microorganismos patógenos y de otras bacterias transitorias del exterior que no forman parte de la microbiota intestinal, por lo que la posibilidad de que esos microorganismos patógenos puedan invadir la mucosa es limitada (Bauer y cols., 2006).

### ***Maduración y función del sistema inmune de la mucosa***

Debido a la presencia constante de un gran número de antígenos procedentes de la alimentación y de los microorganismos que ingerimos, la microbiota comensal estimula y coordina la respuesta inmune del tracto gastrointestinal para mantener la salud. Al nacer, el sistema inmunitario es inmaduro y comienza a madurar con la exposición a los antígenos de la microbiota comensal (Rakoff-Nahoum y Medzhitov, 2006).

## **2.3. Composición de la microbiota en sujetos sanos y enfermos diagnosticados de Colitis Ulcerosa**

La microbiota intestinal está constituida por cerca de 1000 especies, la mayoría de ellas pertenecientes a las divisiones *Firmicutes* y *Bacteroidetes* y alcanza las concentraciones más elevadas en el íleon terminal y en el colon (Hattori y Taylor, 2009; Hegazy y El-Bedewy, 2010, Zhu y cols., 2010). Además, la mayoría de las personas comparten una microbiota que constituye el núcleo de la misma y que comprenden de 50 a 100 especies de bacterias y un microbioma que alberga a más de 6000 grupos de genes funcionales (Zhu y cols., 2010). El contenido de microorganismos en el colon oscila entre  $10^{10}$  y  $10^{11}$  UFC/g de tejido (Tappenden y Deutsch, 2007). La densidad de bacterias presentes en las heces oscila entre 6 y  $9 \times 10^{10}$  UFC/g, confirmado mediante técnicas moleculares (Thiel y Blaut, 2005).

### **2.3.1. Heces**

La mayoría de los estudios sobre la microbiota intestinal están basados en el análisis de las heces, ya que su recolección es sencilla y no invasiva. Sin embargo, esta microbiota podría no representar a todas las comunidades bacterianas que viven en el tracto gastrointestinal, y que sin embargo parecen ser similares en la fracción mucosa a lo largo del colon (Zoetendal y cols., 2002; Lepage y cols., 2005). Las bacterias detectadas en las heces son una mezcla de las bacterias de la luz intestinal y de aquellas libres o mal adheridas a la mucosa. Por otra parte,

un inadecuado almacenamiento de la muestra o un retraso en el procesamiento puede ser decisivo a la hora de poder detectar microorganismos especialmente lábiles como los anaerobios (Ott y cols., 2004).

### **A) Sujetos sanos**

El consorcio Europeo MetaHit ha establecido la existencia de tres enterotipos de microbiota intestinal en los sujetos sanos desde el punto de vista digestivo. Estos enterotipos se han realizado en función de las bacterias que constituyen el núcleo del microbioma. Así, se ha descrito el Enterotipo 1 con predominancia del género *Bacteroides*, el Enterotipo 2 con predominancia del género *Prevotella* y finalmente el Enterotipo 3 con mayor abundancia del género *Ruminococcus* (Arumugam y cols., 2011).

En otros estudios anteriores también se había puesto de manifiesto que el filo más prevalente era *Firmicutes* (38%), seguido por *Bacteroidetes* (20%), y mucho más alejado por *Actinobacteria* (2%) (Turnbaugh y cols., 2009; Qin y cols., 2010).

### **B) Pacientes diagnosticados de Colitis Ulcerosa**

El grupo de Sokol y colaboradores observó que el filo *Firmicutes*, representado fundamentalmente por los grupos *Clostridium coccoides-Eubacterium rectale* y *Clostridium leptum-Faecalibacterium prausnitzii*, se detectaba en mayor proporción en los pacientes con Colitis Ulcerosa activa que en los sujetos sanos (Sokol y cols., 2009). La densidad de *Bacteroidetes* en los pacientes con Colitis Ulcerosa activa fue similar al de los sujetos sanos, pero aumentaba en los pacientes en fase de remisión (Andoh y cols., 2007; Sokol y cols., 2009). También observaron un bajo número de *Bifidobacterium* en la microbiota de pacientes con Colitis Ulcerosa activa, al igual que otros autores (Favier y cols., 1997; Seksik y cols., 2003; Mylonaki y cols., 2005; Sokol y cols., 2009). La cantidad de lactobacilos era mayor en fase de remisión que en fase activa (Andoh y cols., 2007).

### **2.3.2. Mucosa cólica**

A diferencia de lo que ocurre en las heces, una biopsia de la mucosa cólica representa directamente la microbiota del tracto gastrointestinal de esa zona y parece la opción más adecuada para el estudio de las patologías relacionadas con ella. Existen algunos inconvenientes importantes en la utilización de muestras de biopsia. El principal

inconveniente es que deben ser recogidas por endoscopia, un procedimiento invasivo que no puede ser usado de forma rutinaria.

### **A) Sujetos sanos**

En un estudio publicado en 2011, realizado en una cohorte de sujetos sanos procedentes de Alemania, se estableció que la microbiota cólica de estos individuos estaba constituida por: *Firmicutes* (42,94%), *Bacteroidetes* (41,98%), *Proteobacteria* (12,30%) y *Actinobacteria* (2,77%). Estos sujetos se agruparon fundamentalmente en el clúster 3, constituido por un elevado porcentaje de *Ruminococcus obeum*. (Lepage y cols., 2011).

### **B) Pacientes diagnosticados de Colitis Ulcerosa**

En el trabajo de Lepage y colaboradores cuantificaron la microbiota de pacientes procedentes de Lituania con Colitis Ulcerosa activa y encontraron *Firmicutes* (26%), *Bacteroidetes* (8%), *Proteobacteria* (15%) y *Actinobacteria* (28%). Así, el clúster 1 estuvo representado por especies relacionadas con *Rhodococcus erythropolis* que constituyeron el 29,56%. Los pacientes agrupados en el clúster 2 presentaron porcentajes bajos de *Actinobacteria* pero proporciones más elevadas de *Proteobacteria*, principalmente *Escherichia* y *Shigella* (Lepage y cols., 2011).

En otro trabajo llevado a cabo en la mucosa rectal de pacientes con Colitis Ulcerosa predominaron *Bacteroides*, *Bifidobacterium* y *Prevotella*. Las especies más prevalentes de *Bacteroides* fueron *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Bacteroides vulgatus* y *Bacteroides fragilis*. El recuento de bifidobacterias fue 30 veces menor que en los sujetos sanos, siendo *Bifidobacterium angulatum* la más prevalente y *Bifidobacterium bifidum* y *Bifidobacterium longum* las que se encontraron en mayor densidad. Otros bacilos anaerobios fueron detectados como *Lactobacillus*, *Clostridium* y *Eubacterium*. La prevalencia de lactobacilos en la mucosa fue baja, mientras que los clostridios estuvieron en un número mayor que en los individuos sanos, siendo *Clostridium clostridiiforme* el predominante. Las especies de *Eubacterium* se detectaron en baja densidad en la mucosa rectal. También encontraron diversos cocos gram-positivos anaerobios facultativos y estrictos en la mayoría de los pacientes como *Enterococcus*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* y *Peptostreptococcus*, este último con una gran densidad de población. La prevalencia de cocos gram-negativos anaerobios fue baja, aunque cuando *Veillonella* estuvo presente, esta alcanzó una elevada

densidad. Con respecto a los bacilos gram-negativos, *E. coli* estuvo presente en la mayoría de los pacientes (Macfarlane y cols., 2004).

### **3. COLITIS ULCEROSA: RELACIÓN CON LAS BACTERIAS**

La comprensión de la verdadera función que juegan las bacterias en el tracto gastrointestinal humano y su papel tanto en la salud como en la enfermedad, está experimentando una revolución. La densidad total de las bacterias intestinales supera en número a las células humanas por un factor de 10:1 (Tancredi, 1992; Bengmark, 1998). También se ha demostrado que no son metabólicamente inertes y que su actividad metabólica equivale a la de un órgano virtual (O'Hara y Shanahan, 2006). Todo ello ha llevado a la denominación de microbioma. La relación entre el microbioma y el hospedador es claramente simbiótica. El ejemplo más frecuentemente citado de esta simbiosis es el de la producción de butirato, que depende exclusivamente de las bacterias del colon. El butirato es la principal fuente de energía de los colonocitos (células epiteliales que recubren el interior del colon y estimulan la proliferación y la diferenciación de las células epiteliales intestinales) (Pryde y cols., 2002; Thibault y cols., 2010).

Existen evidencias indirectas de la participación de los microorganismos en la Colitis Ulcerosa, como es la presencia de infiltrados de neutrófilos en la mucosa intestinal, que podrían ser producidos como respuesta a la presencia de antígenos luminales (Gitter y cols., 2001) y a la activación del NFkB (Bodger y cols., 2006) como consecuencia de la interacción de las bacterias con la superficie.

El deterioro de la barrera mucosa, ya sea por alteraciones genéticas, o como consecuencia de infecciones por patógenos recurrentes, puede afectar a las interacciones entre el epitelio y las bacterias. Además, el receptor de la flagelina bacteriana (principal componente de los flagelos de las bacterias), llamado TLR(toll-like receptor)-5, se localiza principalmente en la cara basolateral de la superficie de las células epiteliales y solo es accesible a la flagelina de las bacterias una vez que la barrera de la mucosa intestinal está deteriorada. La interacción entre la flagelina bacteriana y el receptor TLR5 desencadena la liberación de IL(interleuquina)-8 por las células epiteliales, que estimulan la activación y el reclutamiento de neutrófilos que terminan produciendo una Colitis crónica (Friswell y cols., 2010).

En la literatura, existen numerosos trabajos que han relacionado diversos géneros y especies bacterianas con la Colitis Ulcerosa, entre los que podemos destacar los siguientes:

### ***Bacteroides***

Este género comprende a un gran número de especies de bacilos gram-negativos y anaerobios, que pueden estar formando parte de la microbiota intestinal, o bien pueden estar implicados en patologías de diversa índole, fundamentalmente abscesos (Swidsinski y cols., 2009). Los miembros del género *Bacteroides* están entre las especies más frecuentemente representadas en el colon humano (Salyers, 1984). Unas pocas como *B. fragilis* son patógenas, pero la mayoría son especies comensales (Noor y cols., 2010).

Algunos estudios sugieren que el género *Bacteroides*, especialmente las especies *B. vulgatus* y *B. fragilis*, podrían jugar un papel muy importante en la patogénesis de la Colitis Ulcerosa (Matsuda y cols., 2000). Las enterotoxinas producidas por las cepas de *B. fragilis* han sido también asociadas a enfermedades que van acompañadas de diarrea. Además, *B. fragilis* estimula la liberación de IL-8 que está asociada a la patogenia de la Colitis Ulcerosa (Prindiville y cols., 2000; Sanfilippo y cols., 2000; Kim y cols., 2001; Rabizadeh y cols., 2007). En el estudio de Ohkusa y colaboradores, las cepas *B. vulgatus* 90 y *B. vulgatus* JCM 5826 en el modelo de invasión de las células epiteliales del colon, estimularon la liberación de IL-8 (Ohkusa y cols., 2009).

### ***Bifidobacterium***

Son bacilos gram-positivos anaerobios estrictos que se encuentran colonizando el tracto gastrointestinal (Tannock, 2002). Algunos autores han estudiado la relación de *Bifidobacterium* con la Colitis Ulcerosa y han comprobado que en los pacientes afectados, esta bacteria estaba en una menor proporción que en los individuos sanos, por lo que podría tener un papel protector (Macfarlane y cols., 2005; Mylonaki y cols., 2005). Por ello, esta bacteria ha sido utilizada como probiótico en estudios destinados a disminuir la inflamación e inducir y mantener la fase de remisión de la Colitis Ulcerosa (Nagasaki y cols., 2010; Sang y cols., 2010; Veiga y cols., 2010).

La actividad antiinflamatoria de *Bifidobacterium* podría deberse a que mejora la producción de citoquinas antiinflamatorias como IL-10 en las células mononucleares

presentes en sangre periférica, así como a que inhibe la secreción de IL-8 en las células epiteliales del intestino (Imaoka y cols., 2008). También se ha encontrado que los probióticos con *B. longum* reducen la producción de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\alpha$  e incrementan las citoquinas antiinflamatorias TGF (factor de crecimiento transformante)- $\beta$  en las células HT-29, las cuales juegan un papel importante en la regulación de la función de la barrera intestinal y en la tolerancia a las bacterias comensales (Bahrami y cols., 2011).

### *Campylobacter jejuni*

Se trata de bacilos gram-negativos microaerófilos y capnófilos que están relacionados, sobre todo, con infecciones gastrointestinales. Algunos estudios han sugerido que la infección por este microorganismo puede facilitar la invasión del epitelio del colon por organismos comensales no patógenos por un mecanismo paracelular o transcelular que es dependiente de la cepa (Kleessen y cols., 2002; Lamb-Rosteski y cols., 2008; Kalischuk y cols., 2009). *Campylobacter jejuni* es capaz de alterar las uniones epiteliales, aumentando la permeabilidad paracelular y permitiendo la translocación de los microorganismos no invasivos a través de las capas epiteliales. Además, el cambio de conformación de los receptores TLR aumenta la frecuencia de interacción con la microbiota intestinal, conduciendo a la liberación del NF $\kappa$ B y produciendo inflamación. Por otro lado, otras cepas de *C. jejuni* inducen una translocación transcelular mediante balsas lipídicas, que conduce a la interacción con los receptores NOD (Dominio de Oligomerización de Nucleótidos)-2 y a la liberación del NF $\kappa$ B (Macfarlane y cols., 2004).

### *Clostridium difficile*

Es un bacilo gram-positivo anaerobio y esporulado, que se encuentra relacionado fundamentalmente a diarreas asociadas al consumo de antibióticos. Los pacientes con Colitis Ulcerosa infectados con *C. difficile* tienden a tener una enfermedad más prolongada con una marcada respuesta en la fase aguda, asociada con unos niveles relativamente altos en suero de la proteína C reactiva (Ricciardi y cols., 2009). Dado que el portador asintomático de *C. difficile* existe en pacientes con Colitis Ulcerosa, la principal implicación clínica es que a todos los pacientes que sufran recaídas de esta enfermedad se les debe recoger una muestra de

heces para estudiar la presencia de este microorganismo y de sus toxinas, especialmente aquellos pacientes que reciban terapia inmunosupresora (Issa y cols., 2007).

### *Escherichia coli*

Es un bacilo gram-negativo que pertenece a la familia de las enterobacterias. Está implicado en una gran variedad de patologías y forma parte de la microbiota gastrointestinal del ser humano, siendo una de las especies más representadas en los individuos sanos (Macfarlane y cols., 2004).

El primer vínculo de unión entre la Enfermedad Inflamatoria Intestinal y este microorganismo fue sugerido en 1978 por Tabaqchali y colaboradores quienes informaron de una elevación en los títulos de anticuerpos frente al antígeno O de *E. coli* en pacientes con esta enfermedad (Tabaqchali y cols., 1978). Otros estudios han mostrado un incremento de *E. coli* asociado a la mucosa, posiblemente en un grado ligeramente menor que en la Enfermedad de Crohn (Swidsinski y cols., 2002; Kotlowski y cols., 2007). Por el contrario, también se ha descrito que no muestran ninguna asociación, probablemente por diferencias en la técnica de muestreo, como la eliminación de las capas de mucus previas al cultivo (Martin y cols., 2004). Tampoco hay evidencia de invasión de la mucosa por *E. coli* en pacientes con Colitis Ulcerosa. Parece más probable que, en la Colitis Ulcerosa, la mucosa asociada a *E. coli* pueda interaccionar con la superficie de las células epiteliales pero sin invadirla. Esto encajaría con la naturaleza superficial de la Colitis Ulcerosa leve y con la activación del NFkB de la superficie epitelial en la fase temprana de la enfermedad (Bodger y cols., 2006). Otro resultado probable de esa interacción sería la liberación de IL-8 por las células epiteliales. Hay evidencias que sugieren que este hecho es consecuencia de la interacción de la flagelina bacteriana con el receptor TLR5. Cabe destacar que esto puede ser el resultado de la interacción de cepas de *E. coli* tradicionalmente consideradas como comensales (Bambou y cols., 2004).

Un reciente estudio pone de manifiesto la presencia de *E. coli* adherente e invasiva en las biopsias de los pacientes recién diagnosticados de la enfermedad, lo que sugiere que estas cepas podrían tener un papel muy importante en las fases iniciales al comienzo de la enfermedad (Sepehri y cols., 2011).

Estudios de probióticos con la cepa de *E. coli* Nissle 1917 (Mutaflor R) han demostrado efectos beneficiosos en los pacientes con Colitis Ulcerosa, tanto en el mantenimiento de la remisión como en la reducción de los síntomas durante la fase activa de la enfermedad (Henker y cols., 2008; Matthes y cols., 2010).

### ***Fusobacterium***

Bacilo gram-negativo anaerobio que produce grandes cantidades de ácido butírico como producto final de su metabolismo (Jousemies-Somer, 1997). *Fusobacterium varium* forma parte de la microbiota normal del tracto gastrointestinal (Citron, 2002) y es la especie del género *Fusobacterium* que con más frecuencia se ha relacionado como agente implicado en la Colitis Ulcerosa.

Ohkusa y colaboradores encontraron una gran densidad de *F. varium* en la mucosa cólica inflamada de los pacientes con Colitis Ulcerosa y anticuerpos específicos frente a este microorganismo en el suero (Ohkusa y cols., 2002; Ohkusa y cols., 2009). También encontraron que la producción de citoquinas por las células epiteliales del colon es un mecanismo primario de defensa del hospedador, debido a que estableció un modelo *in vitro* por el que las bacterias comensales atacaban o penetraban en las células epiteliales. De esta manera, se ha puesto de manifiesto que *F. varium* estimula la liberación de citoquinas como IL-8 y TNF- $\alpha$ . Además, se ha comprobado mediante inmunohistoquímica, que la expresión de IL-8, TNF- $\alpha$  y NFkB p65 del núcleo estaba aumentada en la mucosa rectal de los pacientes con Colitis Ulcerosa activa, pero no en la fase de inactividad (Ohkusa y cols., 2009).

Otros estudios utilizaron un enema con ácido butírico producido por *F. varium* para inducir la apoptosis en el epitelio cólico en un modelo de ratón, con la consecuente formación de abscesos en las criptas y lesiones parecidas a las de la Colitis Ulcerosa, así como la inducción de apoptosis en un cultivo de células *in vitro* (Ohkusa y cols., 2003; Yoshida y cols., 2006).

### ***Helicobacter***

Las especies de este género son bacilos gram-negativos espirilares curvados que colonizan las capas mucosas del tracto gastrointestinal. En función del lugar de colonización, las especies del género *Helicobacter* se dividen en dos grupos: las especies gástricas,

representadas por *Helicobacter pylori*, las cuales han sido asociadas con gastritis y otros trastornos gástricos y duodenales; y las especies enterohepáticas, que colonizan el sistema hepatobiliar y a las que se ha querido relacionar con enfermedades hepáticas e intestinales crónicas, así como con la Enfermedad Inflamatoria Intestinal (Zhang y cols., 2006).

Diferentes especies del género *Helicobacter* han sido utilizadas para inducir Colitis en modelos de roedores, como por ejemplo, *Helicobacter hepaticus* y *Helicobacter bilis* (Cahill y cols., 1997; Shomer y cols., 1997). Se observó una reducción de los organismos comensales en respuesta a la infección por *Helicobacter*, ya que la respuesta inmune mediada por las inmunoglobulinas G frente a las bacterias comensales es anterior a la aparición de la Colitis, pero tiene lugar tras la infección por *H. bilis* (Kuehl y cols., 2005; Whary y cols., 2006; Jergens y cols., 2007). Esto sugiere un papel potencial de *Helicobacter* en la inducción del cambio de la microbiota sana a la disbiosis (Fox, 2007).

En los últimos años, las técnicas moleculares han permitido la identificación de estos microorganismos en pacientes con Colitis Ulcerosa. Así, algunos estudios han demostrado que la prevalencia de especies distintas de *Helicobacter pylori* es mayor en los adultos y en los niños con Colitis Ulcerosa que en los sujetos sanos, aunque esto parece ser más evidente en los pacientes con Enfermedad de Crohn (Hansen y cols., 2010; Genta y Sonnenberg, 2012).

### ***Lactobacillus***

Bacilo gram-positivo anaerobio o microaerófilo que se encuentra formando parte de la microbiota de las mucosas. Aunque la mayoría de las especies de este género son bacterias beneficiosas para el ser humano, en individuos inmunodeprimidos pueden producir graves patologías.

Por lo general, son microorganismos reconocidos como seguros, que mejoran las alteraciones de la microbiota por sus efectos probióticos, tienen efectos antidiabéticos y antihiperlipidémicos, inhiben la carcinogénesis, tienen efectos anticólicas e inducen la activación no específica del sistema inmune del individuo (Perdigon y cols., 1991; Taranto y cols., 1998; Collins y Gibson, 1999; Tabuchi y cols., 2003; Peran y cols., 2007).

#### 4. TÉCNICAS MOLECULARES TRADICIONALES

Los ácidos nucleicos y las proteínas son macromoléculas comunes a todos los seres vivos que cambian con el tiempo. Por ello, pueden considerarse como cronómetros moleculares o documentos de la historia evolutiva. Asumiendo que los cambios se producen al azar y que aumentan con el tiempo de manera lineal, las diferencias en la secuencia de los monómeros (nucleótidos o aminoácidos) que integran macromoléculas homólogas, presentes en dos formas de vida, reflejan la distancia evolutiva existente entre ellas. Esta idea se ha venido utilizando durante décadas para establecer las relaciones filogenéticas entre los seres vivos, creando un marco apropiado para su clasificación e identificación (Zuckerkanndl y Pauling, 1965).

El 16S ARN ribosómico (ARNr) es la macromolécula más ampliamente utilizada en estudios de filogenia y taxonomía bacteriana. Su aplicación como cronómetro molecular fue propuesta por Carl Woese en la década de los 70 (Amaral-Zettler y cols., 2008). Los estudios de Woese originaron la división de los procariotas en dos grupos o reinos: Eubacteria y Archaeobacteria, cuya divergencia es tan profunda como la encontrada entre ellos y los eucariotas. Además, permitieron establecer las divisiones mayoritarias y subdivisiones dentro de ambos reinos (Woese, 1987). Posteriormente, Woese introdujo el término dominio para sustituir al reino como categoría taxonómica de rango superior, y distribuyó a los organismos celulares en tres dominios: Bacteria, Archaea y Eukarya, el último de los cuales engloba a todos los seres eucariotas (Woese y cols., 1990). Desde entonces, el análisis del 16S ARNr se ha utilizando ampliamente para establecer las relaciones filogenéticas dentro del mundo procariota, causando un profundo impacto en nuestra visión de la evolución y, como consecuencia, en la clasificación e identificación bacteriana. De hecho, las ediciones vigentes de los dos tratados fundamentales de bacteriología, el *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (<http://www.springer-ny.com/bergeysoutline/main.htm>) y *The Prokaryotes* (<http://www.prokaryotes.com>), basan su estructuración del mundo procariota en las relaciones filogenéticas establecidas con esta macromolécula.

En la actualidad, la mayor parte de las bacterias de interés clínico pueden identificarse fácilmente mediante técnicas microbiológicas convencionales que requieren el aislado previo del agente patógeno y se basan en características fenotípicas. Sin embargo, existen situaciones en las cuales la identificación fenotípica necesita mucho tiempo, resulta difícil o, incluso, imposible. En estas circunstancias, la identificación molecular basada en el análisis del 16S

ARNr (o del gen que lo codifica) puede representar una ventaja tanto en tiempo como en precisión, llegando incluso a competir de manera favorable con otras técnicas rápidas y eficaces, como las inmunológicas.

#### 4.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

##### *Gen 16 S ARNr*

Es un polirribonucleótido de aproximadamente 1.500 nucleótidos (nt), codificado por el gen rrs a partir de cuya secuencia se puede obtener información filogenética y taxonómica. Como cualquier secuencia de nucleótidos de cadena sencilla, el 16S ARNr se pliega en una estructura secundaria, caracterizada por la presencia de segmentos de doble cadena, alternando con regiones de cadena sencilla (Neefs y cols., 1990). Proceden de las subunidades pequeñas de los ribosomas y reciben el nombre de ARNr SSU (del inglés, **s**mall **s**ub**u**nit). Se encuentran altamente conservados, presentando regiones comunes a todos los organismos, pero contienen además variaciones que se concentran en zonas específicas. El análisis de la secuencia de fragmentos del gen 16S ARNr de distintos grupos filogenéticos reveló un hecho adicional de gran importancia práctica: la presencia de una o más secuencias características que se denominan oligonucleótidos firma. Se trata de secuencias específicas cortas que aparecen en todos o en la mayor parte de los miembros de un determinado grupo filogenético, y nunca, o sólo raramente, están presentes en otros grupos, incluidos los más próximos. Por ello, los oligonucleótidos firma pueden utilizarse para ubicar a cada bacteria dentro de su propio grupo (Woese y cols., 1985).

El 16S ARNr presenta una serie de características, en base a las cuales fue considerado por Woese como cronómetro molecular definitivo (Woese, 1987):

1. Se trata de una molécula muy antigua, presente en todas las bacterias actuales. Constituye, por tanto, una diana universal para su identificación.
2. Su estructura y función han permanecido constantes durante un tiempo muy prolongado, de modo que las alteraciones en la secuencia reflejan probablemente cambios aleatorios.
3. Los cambios ocurren de manera suficientemente lenta, como para aportar información acerca de todos los procariotas a lo largo de toda la escala evolutiva. Los

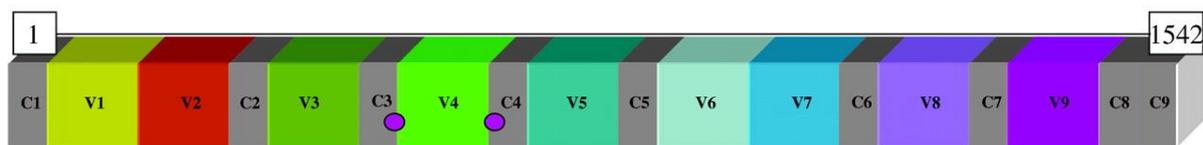
ARNr SSU contienen, sin embargo, suficiente variabilidad para diferenciar, no sólo los organismos más alejados, sino también los más próximos.

4. El tamaño relativamente largo, 1500 nt, minimiza las fluctuaciones estadísticas.

5. La conservación en estructura secundaria puede servir de ayuda en las comparaciones, aportando una base para el alineamiento preciso.

6. Dado que resulta relativamente fácil secuenciar los fragmentos de 16S ARNr, existen bases de datos amplias en continuo crecimiento.

Una vez determinada la secuencia de nucleótidos y establecidas las comparaciones, será el grado de similitud entre las secuencias de 16S ARNr de dos bacterias lo que indique su relación evolutiva.



**Figura 4.** Representación del gen 16S ARNr con sus regiones variables (v) y conservadas (c).

#### 4.1.1. Amplificación

La amplificación del 16S ARNr se realiza en un termociclador (aparato que va a mantener la temperatura necesaria en cada una de las etapas que conforman un ciclo), gracias a la reacción en cadena de la polimerasa. Esta técnica fue descrita por primera vez por Saiki y colaboradores y posteriormente perfeccionada por Mullis en el año 1987 (Cuchacovich, 2006).

##### **Reactivos:**

Para llevar a cabo la reacción se necesitan los siguientes reactivos (Murray y cols., 2007):

- Cuatro desoxinucleótidos-trifosfato (dNTP): actúan como sustratos para polimerizar el ADN (ácido desoxirribonucleico). Son los desoxinucleótidos de Adenina (dATP), Timina (dTTP), Citosina (dCTP) y Guanina (dGTP).
- Dos cebadores o iniciadores: oligonucleótidos que son, cada uno, complementarios a una de las dos hebras del ADN. Son secuencias cortas, de entre seis y cuarenta nucleótidos, normalmente de 18 a 22, que permiten que la ADN polimerasa inicie la

reacción. Deben estar situados enfrentados y a no mucha distancia. Delimitan la zona de ADN a amplificar, es decir, corresponden a los nucleótidos que definen los extremos de la secuencia que se desea replicar.

- Iones divalentes: se suele usar magnesio ( $Mg^{2+}$ ), agregado comúnmente como cloruro de magnesio ( $MgCl_2$ ), o algún otro catión divalente. Actúan como cofactores de la ADN polimerasa. La concentración de iones magnesio es un parámetro fundamental que influye tanto en la eficiencia como en la especificidad de la PCR, de tal forma que concentraciones bajas de magnesio disminuyen la eficiencia y el rendimiento de la PCR, mientras que concentraciones elevadas del mismo aumentan, tanto la estabilidad del complejo formado por el cebador y la hebra de ADN que actúa como molde, como la eficiencia de la PCR, pero disminuyen la especificidad de la reacción debido a que los cebadores pueden unirse a sitios inespecíficos del ADN molde y secuencias no deseadas pueden ser amplificadas (Owczarzy y cols., 2008).
- Iones monovalentes: se utiliza el potasio ( $K^+$ ) en forma de KCl.
- Una solución tampón (buffer): mantiene el pH adecuado para el funcionamiento de la ADN polimerasa.
- ROX (6-carboxi-X-rodamina): detector de referencia pasivo que sirve para minimizar los errores de pipeteo, tanto en el volumen como en la concentración (Wang y cols., 2007a).
- ADN polimerasa o mezcla de distintas polimerasas con temperatura óptima alrededor de 70 °C (la más común es la polimerasa *Taq* (*Termus aquaticus*)).
- ADN molde, que contiene la región de ADN que se va a amplificar.

### ***Enzimas implicadas***

Todas las ADN polimerasas catalizan la misma reacción en la cual un nucleótido es añadido al extremo 3' del cebador (función polimerasa 5'→3'):  $ADN_n + dNTP \leftrightarrow ADN_{n+1} + PPi$  (pirofosfato inorgánico) (Figura 5). Aunque esta reacción puede ser reversible por pirofosforolisis, el PPi es hidrolizado por pirofosfatasa inorgánica. En general, la síntesis de ADN por polimerasas termoestables requiere la formación del complejo formado por el cebador y la hebra molde de ADN para comenzar, aunque algunas enzimas pueden sintetizar ADN sin la presencia de cebadores o ADN molde (Pavlov y cols., 2004).

La ADN polimerasa requiere de la presencia de iones  $Mg^{2+}$  para comenzar la síntesis. El  $Mg^{2+}$  puede ser sustituido por iones  $Mn^{2+}$ , los cuales inducen a una elevada tasa de error durante la síntesis de ADN pero permiten también que las polimerasas utilicen ARN como molde (Pavlov y cols., 2004).

Muchas ADN polimerasas poseen un dominio N-terminal que está asociado con funciones complementarias, como el dominio exonucleasa  $5' \rightarrow 3'$  en la polimerasa *Taq* o el dominio exonucleasa  $3' \rightarrow 5'$  proofreading (corrección de errores en la polimerasa *Thermococcus gorgonarius* (*Tgo*)) (Figura 5). La incorporación de un nucleótido no complementario en la cadena de ADN en formación conduce a la translocación del extremo  $3'$  de la cadena de ADN en el dominio  $3'$ -exonucleasa de la polimerasa, donde la base introducida erróneamente es eliminada por hidrólisis:  $ADN_{n+1} + H_2O \rightarrow ADN_n + dNMP$ . Esta reacción es irreversible y aumenta considerablemente la precisión de la copia del ADN molde. Si la polimerasa encuentra muchos nucleótidos desaparejados en el extremo  $3'$  del complejo, es capaz de degradar la secuencia de la molécula de ADN desde el extremo  $3'$ . Esta reacción requiere la presencia de iones divalentes como el  $Mg^{2+}$ , pero es ineficiente cuando el número de nucleótidos modificados en el extremo  $3'$  es muy elevado (Pavlov y cols., 2004).

Algunas ADN polimerasas tienen actividad nucleasa  $5' \rightarrow 3'$  y son capaces de cortar y cambiar un nucleótido por otro y reparar el ADN (Pavlov y cols., 2004).

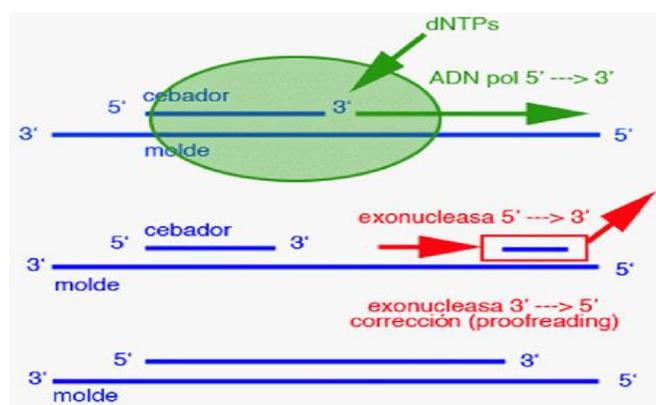


Figura 5. Funciones del ADN polimerasa.

### *Ciclos de amplificación*

El proceso de PCR por lo general consiste en una serie de 20 a 35 cambios repetidos de temperatura llamados ciclos. Cada ciclo suele consistir en 2-3 pasos a diferentes

temperaturas. La PCR común se realiza con ciclos que tienen tres pasos de temperatura. Los ciclos, cuando las *Taq* necesitan activarse por calor, están precedidos por un choque térmico a alta temperatura ( $> 90^{\circ}\text{C}$ ), y van seguidos por otros choques térmicos al final del proceso para la extensión de producto final. Las temperaturas usadas y el tiempo aplicado en cada ciclo dependen de gran variedad de parámetros. Éstos incluyen la enzima usada para la síntesis de ADN, la concentración de iones divalentes y de los dNTP en la reacción, la temperatura de unión de los cebadores, así como la longitud del ADN que se desea amplificar (Murray y cols., 2007).

### ***Tipos de PCR***

#### **I) PCR convencional**

Se lleva a cabo en un termociclador estándar y se utiliza para la identificación de microorganismos a partir de muestras clínicas o cultivo. Una vez el producto haya sido amplificado, este deberá secuenciarse en algunos de los sistemas ya conocidos (Bartlett y Stirling, 2003).

#### **II) PCR en tiempo real (PCR-RT)**

La PCR-RT ha revolucionado la forma de diagnosticar los patógenos humanos en los laboratorios de microbiología clínica (Cockerill, 2003; Bankowski y Anderson, 2004). Este método combina la química de la PCR con la detección de la fluorescencia liberada por el producto amplificado en el mismo recipiente en el que ha tenido lugar la reacción. La detección del producto amplificado en la PCR tiene lugar en pocas horas, por lo que es un método de detección mucho más rápido que la PCR convencional (Espy y cols., 2006).

La PCR-RT tiene una sensibilidad y especificidad equivalente a la PCR convencional combinada con el Southern blot. Además, como los pasos de amplificación y detección de los ácidos nucleicos son llevados a cabo en el mismo recipiente de reacción, el riesgo de contaminación del posterior análisis es menor comparado con los métodos basados en PCR convencional. La PCR-RT requiere menos pasos y es una técnica más simple para llevar a cabo que la PCR convencional (Espy y cols., 2006).

Existen varios métodos para la detección de los ácidos nucleicos, pero solo describiremos la técnica que usa SYBR Green.

### ***SYBR Green***

Es un fluoróforo (molécula que emite fluorescencia) que actúa como agente intercalante del ADN que sirve para detectar la acumulación de cualquier producto de ADN de doble cadena. Tras la formación del producto de ADN amplificado, numerosas moléculas de este fluoróforo se unen al producto formado y emiten una intensa señal de fluorescencia que es fácilmente detectado por el sistema (VanGuilder y cols., 2008) (Figura 5).

El SYBR Green proporciona sensibilidad en la detección pero no especificidad. Para aumentar la especificidad de la técnica se lleva a cabo, al final de la amplificación, una fase de disociación, que consiste en someter al producto amplificado (amplicón) a un ciclo de temperatura elevada, con la finalidad de fundir al producto amplificado, el cual emitirá fluorescencia a una temperatura característica llamada temperatura de fusión ( $T_m$ ) del amplicón, y mediante el análisis de esta curva de fusión podemos detectar los diferentes productos amplificados. Esta  $T_m$  del amplicón dependerá del porcentaje de G+C y de la longitud del producto amplificado (Espy y cols., 2006).

### **4.1.2. Secuenciación**

La secuenciación del ADN comenzó en 1977, cuando Frederick Sanger desarrolló el método dideoxi y Maxam y Gilbert desarrollaron el método químico (Maxam y Gilbert, 1977; Sanger y cols., 1977).

#### ***Método enzimático de Sanger***

El principio clave del método de Sanger es el uso de dideoxinucleótidos trifosfato (ddNTP) como terminadores de la cadena de ADN (Sanger y cols., 1977).

El método clásico de terminación de la cadena o método de Sanger necesita una hebra molde de ADN de cadena sencilla, un cebador de ADN, una ADN polimerasa I de *E. coli* con nucleótidos marcados radiactivamente o mediante fluorescencia y nucleótidos modificados que terminan la elongación de la cadena de ADN. La muestra de ADN se divide en cuatro reacciones de secuenciación separadas que contienen los cuatro desoxinucleótidos estándar (dATP, dGTP, dCTP y dTTP) y una ADN polimerasa. En cada reacción se añade solo uno de los cuatro dideoxinucleótidos (ddATP, ddGTP, ddCTP, o ddTTP). Estos dideoxinucleótidos terminan la elongación de la cadena al carecer de un grupo 3'-OH que se necesita para la formación del enlace fosfodiéster entre dos nucleótidos durante la elongación de la cadena de

ADN. La incorporación de un didesoxinucleótido en la nueva cadena de ADN termina su extensión, lo que produce varios fragmentos de ADN de longitud variable. Los didesoxinucleótidos se añaden a concentraciones lo suficientemente bajas como para que produzcan todas las posibilidades de fragmentos de ADN y al mismo tiempo sean suficientes para realizar la secuenciación (Hutchison, 2007). Los fragmentos de ADN sintetizados y marcados de nuevo son desnaturalizados por calor y separados por tamaño (con una resolución de un solo nucleótido) mediante electroforesis en gel de poliacrilamida-urea. Cada una de las cuatro reacciones de síntesis se corre en carriles individuales (Carril A, T, G y C) y se visualizan las bandas de ADN mediante autorradiografía o luz ultravioleta (UV), y la secuencia de ADN se puede leer directamente a partir de la placa de rayos X o de la imagen del gel.

### *Secuenciadores capilares*

Este sistema separa, detecta y analiza secuencias de ADN marcadas con fluorescencia basándose en el tamaño de la secuencia. Los resultados se dan como cromatogramas que registran los picos de fluorescencia. Las reacciones de secuenciación se efectúan por separado mediante un termociclador (MacBeath y cols., 2001).

## **4.2. Electroforesis en Gel de Campo Pulsado**

La movilidad electroforética de las moléculas de ADN con una longitud mayor de 20 Kilobases (Kb) es casi independiente de la masa molecular en los campos eléctricos unidireccionales, debido a los efectos de extensión y orientación. Por ello, para separar estas moléculas de ADN mediante campos eléctricos pulsados, se debe aplicar la corriente de manera intermitente y en una sola dirección, en direcciones opuestas o en ángulos obtusos. La separación por la masa molecular es debido a que las moléculas de ADN que están extendidas y orientadas en los campos eléctricos originales, se relajan hacia conformaciones en forma de ovillo cuando el campo eléctrico es eliminado o se cambia la amplitud y/o dirección del mismo. El grado de relajación dependerá del tamaño del ADN. El grado de separación óptimo se determina por la relación entre la duración del pulso y el tiempo de reorientación del ADN. Sin embargo, los efectos de captura se observan cuando el tiempo del pulso es parecido al tiempo que tarda el ADN en cambiar su orientación, provocando que las moléculas de ADN migren en un orden que no depende de su masa molecular (Stellwagen y Stellwagen, 2009).

## **Enzimas implicadas en el proceso**

### **I) Lisozima**

Fue descubierta por Alexander Fleming en 1922. Es una enzima de 14,4 KDa que daña las células bacterianas catalizando la hidrólisis de las uniones beta 1,4 entre los residuos de ácido N-acetilmurámico y N-acetil-D-glucosamina del peptidoglicano (Ganz, 2004).

Se utiliza en técnicas como la electroforesis en gel en campo pulsado porque rompe la pared de microorganismos gram-positivos como los enterococos.

### **II) Proteinasa K**

Es una serín-proteasa de amplio espectro. Esta enzima fue descubierta en 1974 en un extracto del hongo *Tritirachium album*. La proteinasa K es capaz de digerir la queratina del pelo, de ahí su nombre (Ebeling y cols., 1974).

Se usa en genética molecular para digerir proteínas y eliminar los contaminantes de las preparaciones que contienen ácidos nucleicos, ya que inactiva las nucleasas que podrían degradar el ADN o el ARN durante el proceso de purificación. Es muy adecuada para esta aplicación, ya que la enzima se activa en presencia de productos químicos que desnaturalizan las proteínas, tales como el SDS y la urea, agentes quelantes como EDTA, reactivos con grupos sulfhidrilo, así como inhibidores de tripsina o quimotripsina. Además, es estable en un amplio rango de pH (4-12), con un pH óptimo entre 7,5 y 12 (Panek y cols., 2011).

### **III) SmaI**

Es una enzima de restricción producida por el microorganismo *Serratia marcescens* que posee una diana de restricción en el ADN de cadena doble dependiente de una secuencia no metilada, palindrómica y no escalonada, sobre la cual su actividad catalítica hidrolasa genera extremos romos (Rodrigues da Cunha y cols., 2012) (Tabla 3).

**Tabla 3.** Sitio de reconocimiento de *SmaI*.

<b>Sitio de reconocimiento</b>	<b>Resultado del corte</b>
5' CCCGGG 3' 3' GGGCCC 5'	5' CCC GGG 3' 3' GGG CCC 5'

#### IV) *Xba*I

Es una enzima de restricción producida por el microorganismo *Xanthomonas badrii* que posee una diana de restricción en el ADN de cadena doble dependiente de una secuencia no metilada, palindrómica y escalonada, sobre la cual su actividad catalítica hidrolasa genera extremos cohesivos (Van Cott y Wilson, 1988) (Tabla 4).

**Tabla 4.** Sitio de reconocimiento de *Xba*I.

Sitio de reconocimiento	Resultado del corte
5' TCTAGA 3' 3' AGATCT 5'	5' T CTAGA 3' 3' AGATC T 5'

#### 4.3. MALDI-TOF MS

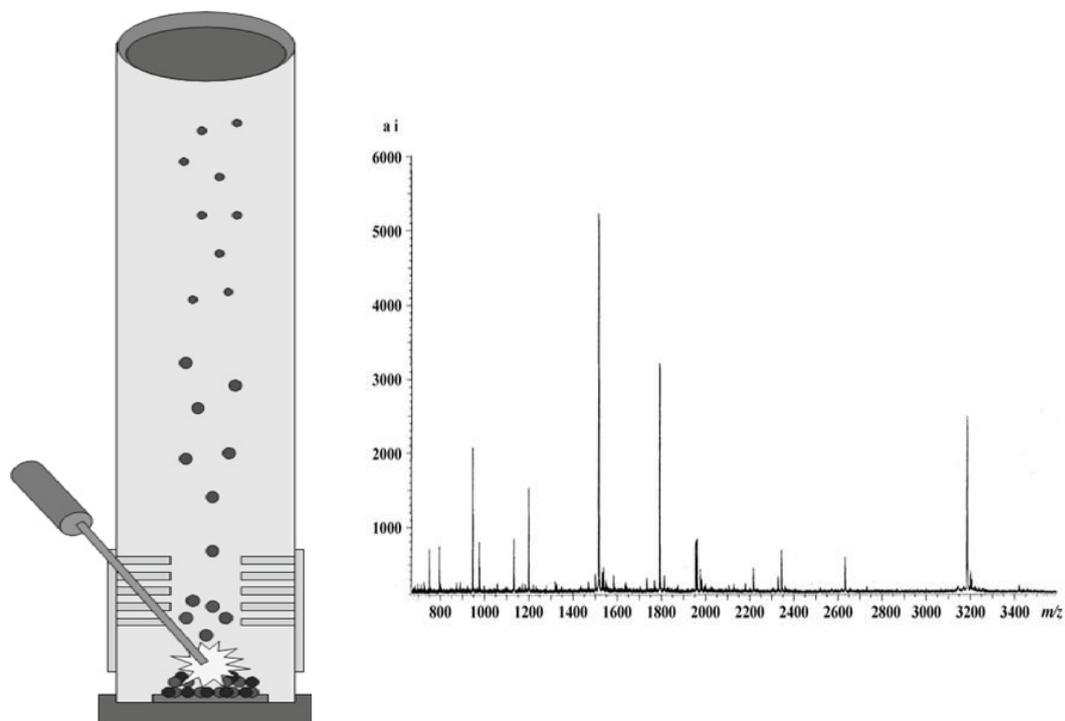
Recibe este nombre por sus siglas en inglés Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry y fue propuesto por primera vez por Karas y colaboradores en 1987 (Karas y cols., 1987).

El concepto es bastante simple: cuando iones de diferente masa y carga son expuestos a un campo eléctrico, esto les permite recorrer un espacio de una longitud dada en un tiempo determinado que depende de su masa y de su carga. Para ello, se mezcla una muestra con una matriz para conseguir su cristalización dentro de ella. Posteriormente, la muestra cristalizada es introducida dentro de un espectrómetro de masas, donde se bombardea con un laser UV. La matriz absorbe la energía del laser y la muestra se vaporiza, liberando iones de varios tamaños. Estos iones pasan a través de unas ranuras de aceleración y viajan a través de un tubo de vuelo, donde los iones más pequeños viajan más rápido que los grandes. Cuando los iones alcanzan el final del tubo de vuelo pasan por un detector. El tiempo de vuelo requerido para alcanzar el detector es utilizado para calcular la masa de los iones. La información recogida, después de que los iones alcancen el detector, es utilizada para crear un espectro de masas, el cual informa, no solo de la masa y la carga de los iones, sino también del número de iones de un tamaño determinado que alcanzó el detector (Giebel y cols., 2010) (Figura 6).

La tecnología del MALDI-TOF MS se utiliza para caracterizar a los microorganismos por dos motivos fundamentalmente. El primer motivo es porque las células intactas se utilizan

para generar un único espectro que es conocido como la huella digital del microorganismo, el cual se compara con huellas digitales recogidas previamente. Por esta razón, es una técnica bastante sencilla, ya que utiliza células intactas con un mínimo procesamiento. Por lo general, solo requiere que un microorganismo aislado sea cultivado en un medio sólido o líquido de cultivo. Las células intactas de ese microorganismo se mezclan posteriormente con la matriz en la superficie de una placa. Una vez seca, la muestra es analizada en el MALDI-TOF MS. El espectro contiene una serie de picos que constituyen la huella digital. Los picos representan a moléculas biológicas, incluidas proteínas, que se encuentran dentro o en la superficie de los microorganismos, aunque algunos picos pueden representar a moléculas biológicas de origen intracelular o citoplasmáticas. La presencia de estas proteínas se ha atribuido a las diferencias en la expresión génica que tienen lugar en las bacterias a nivel de género, especie y cepa (Giebel y cols., 2010).

La segunda razón por la que se utiliza este sistema para la caracterización de los microorganismos es porque, a través del espectro de masa de microorganismos desconocidos, podemos identificarlos al compararlos con los espectros de masas de proteínas que se encuentran en la base de datos. Una vez que han sido identificadas las proteínas, el microorganismo puede deducirse fácilmente (Giebel y cols., 2010).



**Figura 6.** Funcionamiento del sistema MALDI-TOF MS y espectro generado por el sistema informático acoplado.

## 5. METAGENÓMICA

Clásicamente, todos los estudios previos sobre la microbiota intestinal se han apoyado en el análisis del gen 16S ARNr mediante el uso de técnicas moleculares como la electroforesis en gel por gradiente desnaturalizante (DGGE), la hibridación fluorescente *in situ* (FISH), la PCR cuantitativa o la secuenciación capilar por el método de Sanger (Zoetendal y cols., 2008). Sin embargo, para abordar un análisis del complejo y denso ecosistema microbiano, estos métodos proporcionan una visión incompleta de la composición microbiana, revelando solo la existencia de los taxones más abundantes. En los últimos años, el rápido desarrollo de las técnicas de secuenciación de última generación ha permitido secuenciar un gran número de taxones mediante el gen 16S ARNr de bacterias no cultivables, con un coste económico y de tiempo mucho más bajo que la secuenciación tipo Sanger. Además, estas técnicas evitan el paso previo por procedimientos basados en la clonación y/o cultivo, que antes eran necesarios, con sus sesgos asociados, permitiendo que las comunidades microbianas puedan ser investigadas con una mayor resolución e identificando taxones que son menos abundantes (Maccaferri y cols., 2011). Sin embargo, esto podría disminuir la certeza taxonómica debido a longitudes de lectura más cortas, y a veces de peor calidad (Claesson y cols., 2009).

Recientes trabajos basados en técnicas de alto rendimiento para el estudio de la composición microbiana han usado la tecnología de la pirosecuenciación con el sistema 454 Life Science (Margulies y cols., 2005; Wang y cols., 2012) y la secuenciación masiva mediante el sistema Illumina (Lazarevic y cols., 2009; Qin y cols., 2010).

### 5.1. Historia de la pirosecuenciación

Esta técnica fue descubierta en el año 1985 por Nyrén y Lundin mediante la monitorización continua de la formación de ATP en la reacción ATP sulfurilasa usando la enzima luciferasa purificada de la luciérnaga (Nyrén y Lundin, 1985). Esta técnica se basó en la adición secuencial de nucleótidos sobre una cadena de ADN molde, y la secuencia de esta cadena fue deducida por el orden en que los diferentes nucleótidos fueron incorporados en la cadena de ADN en crecimiento, la cual era complementaria del ADN molde. En 1987, Nyrén describió como la actividad de la ADN polimerasa podía ser monitorizada por bioluminiscencia (Nyrén, 1987; Hyman, 1988). Posteriormente esta técnica fue desarrollada para la secuenciación de ADN en tiempo real (Ronaghi y cols., 1996; Ronaghi y cols., 1998).

En 1986 surgieron los pirosecuenciadores de primera generación, como el GS 20, el cual hacía lecturas de secuencias de 100 pares de bases (pb) y era capaz de secuenciar de 30 a 60 Megabases (Mb) por carrera. Posteriormente, en el año 2006, aparecieron los pirosecuenciadores de segunda generación como el GS FLX Standard, que era capaz de leer secuencias de 250 pb y secuenciar 150 Mb por carrera. Finalmente, en el año 2008, aparecieron los pirosecuenciadores de tercera generación, como el GS FLX Titanium, con capacidades de lectura superiores a 350 pb y 400 Mb por carrera.

## **5.2. Principio de la pirosecuenciación**

La pirosecuenciación es un método de secuenciación de ADN basado en la monitorización a tiempo real de la síntesis de ADN (Ahmadian y cols., 2006).

Las cuatro enzimas implicadas en la pirosecuenciación son el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I, la ATP sulfúrilasa, la luciferasa y la apirasa. La mezcla de la reacción también contiene los sustratos de las enzimas como la adenosina 5-fosfosulfato (APS), D-luciferina y la secuencia de ADN molde con un cebador unido para ser usado como material de partida de la ADN polimerasa. Los cuatro nucleótidos son añadidos uno a uno de manera cíclica y una cámara detecta la producción de luz (Ahmadian y cols., 2006) (Figura 7).

## **5.3. Sistema GS FLX**

Un aspecto importante de esta técnica es que todos los pasos se realizan “in vitro”, a diferencia de la tecnología Sanger.

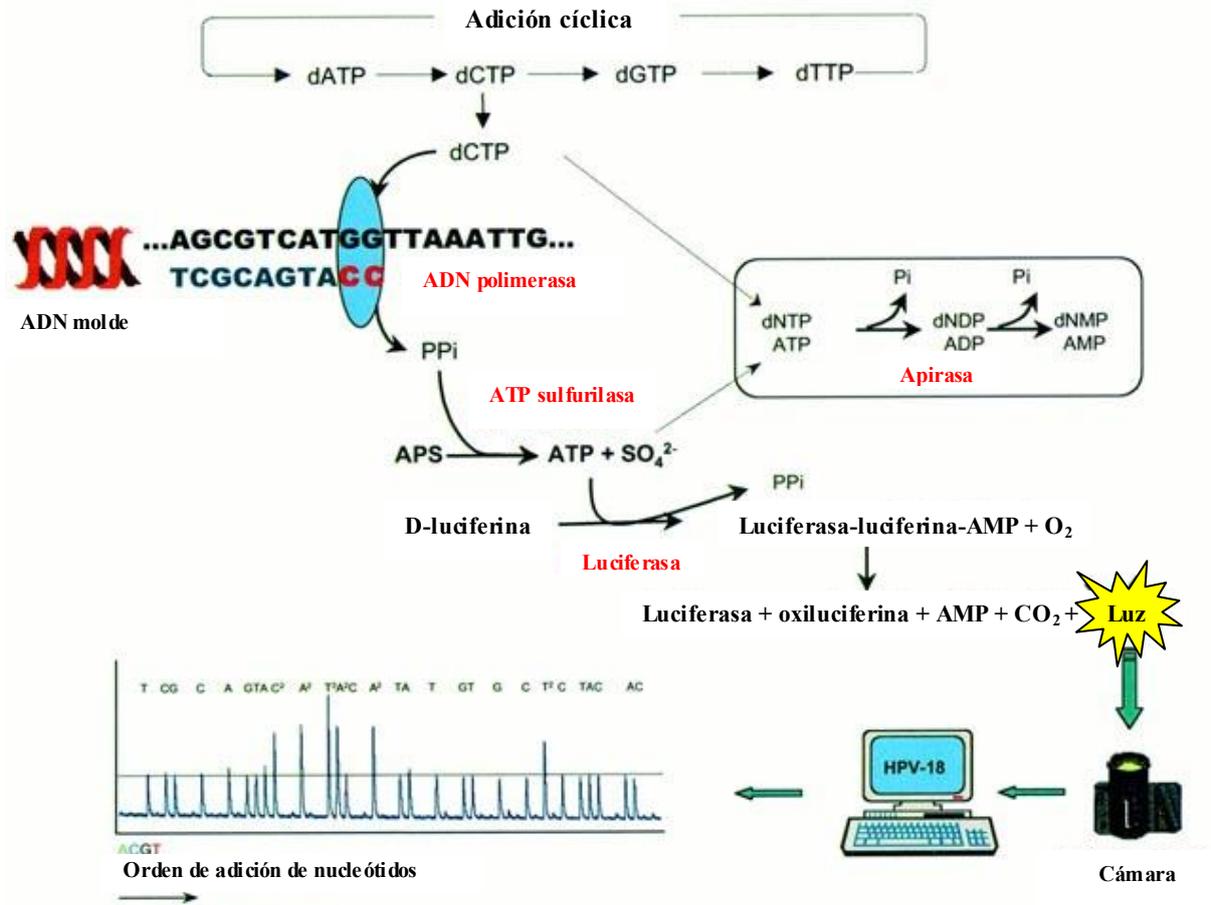
Este sistema produce alrededor de 400.000 lecturas con una longitud media de 250 pb y una puntuación media por encima del 99,5% de la tasa de precisión (Droege y Hill, 2008). Estos tamaños de lectura son suficientes para cubrir la mayoría de las regiones variables del gen 16S ARNr. Un gran número de muestras pueden ser agrupadas en una placa mediante la utilización de breves secuencias de códigos de barra, o identificadores múltiples, aumentando la especificidad de los cebadores de la PCR para la región variable que quiere ser secuenciada (Andersson y cols., 2008).

Existen nueve regiones variables en el gen 16S ARNr que están flanqueadas por regiones conservadas en la mayoría de las bacterias y pueden ser usadas como diana para los

cebadores en la reacción de PCR con una especificidad bacteriana casi universal (Claesson y cols., 2010).

La pirosecuenciación ha sido aplicada a un amplio rango de comunidades microbianas y a las regiones variables del 16S ARNr, como la región V6 de las poblaciones microbianas que viven en las profundidades oceánicas (Sogin y cols., 2006; Huber y cols., 2007), las regiones V1, V2, V3 y V6 en el tracto gastrointestinal de humanos (Dethlefsen y cols., 2008; Turnbaugh y cols., 2009; Zhang y cols., 2009) y monos (McKenna y cols., 2008), así como la región V9 de microorganismos que proceden del suelo (Roesch y cols., 2007). También son importantes los estudios comparativos que se han centrado en evaluar la idoneidad de secuenciar las diferentes regiones variables, como Sundquist y colaboradores que están a favor de secuenciar las regiones V1/V2/V4 (Sundquist y cols., 2007), Wang y colaboradores secuencian las regiones V2/V4 (Wang y cols., 2007b), Liu y colaboradores las regiones V2/V3/V4 (Liu y cols., 2008) y Chakravorty y colaboradores las regiones V2/V3 (Chakravorty y cols., 2007). Recientemente, Claesson y colaboradores compararon la mayor y la menor cobertura de la pirosecuenciación de las regiones V4 y V6 y concluyeron que la clasificación RDP (Ribosomal Database Project) se ajustaba más a las lecturas de las secuencias de la región V4 que la región V6 para el tracto gastrointestinal humano, a nivel de género. Por otra parte, una baja cobertura (40.000 lecturas por muestra) fue suficiente para capturar la mayoría de la diversidad bacteriana que fue identificada por una profundidad de secuencia cinco veces mayor (Claesson y cols., 2009).

El RDP proporciona datos, herramientas y servicios relacionados con las secuencias de ARNr para investigar las comunidades microbianas. Desde Enero de 2007, la clasificación RDP mantiene más de 300.000 secuencias bacterianas a las que cada mes se añaden 5.000 nuevas secuencias. Para manejar este volumen, Wang y colaboradores desarrollaron un método de clasificación Bayesiana para clasificar las secuencias bacterianas de ARNr dentro de la nueva clasificación taxonómica de Bergey. Esta clasificación es rápida, no requiere alineamiento de secuencias y trabaja adecuadamente con secuencias parciales (La gran mayoría de las secuencias de ARNr en las bases de datos públicas son parciales). Este sistema es capaz de clasificar a nivel de género secuencias completas y segmentos de 400 pb con una precisión superior al 88,7% (Wang y cols., 2007c).



**Figura 7.** Esquema de las reacciones que tienen lugar en el proceso de pirosecuenciación.

## Objetivos



## II. OBJETIVOS

Tras lo expuesto anteriormente en la sección de antecedentes del tema, podemos resumir que la Colitis Ulcerosa es una Enfermedad Inflamatoria Intestinal de carácter crónico que afecta al colon, en una extensión variable, pero incluyendo casi siempre al recto. Por el momento desconocemos su causa concreta, pero se ha relacionado con factores genéticos, ambientales y microbiológicos. Existe una clara predisposición genética en los individuos que sufren esta enfermedad, y la incidencia y prevalencia es mayor en países desarrollados. La microbiota intestinal también juega un papel importante en esta enfermedad, aunque no se sabe si su participación es como causa o como consecuencia de la misma.

Por todo ello, el **Objetivo Principal** de esta tesis fue estudiar la composición de la microbiota intestinal de los pacientes con Colitis Ulcerosa y compararla con la de voluntarios sanos.

Los **Objetivos Secundarios** fueron:

1. Analizar la composición cuantitativa de la microbiota intestinal para los principales grupos bacterianos presentes en pacientes afectados de Colitis Ulcerosa y voluntarios sanos mediante PCR-Q.
2. Estudiar las diferencias cualitativas y cuantitativas entre la microbiota intestinal presente en la mucosa sana y en la mucosa afectada de pacientes con Colitis Ulcerosa.
3. Comparar los resultados obtenidos en las muestras de biopsias con las muestras de heces.
4. Determinar si la composición de la microbiota intestinal puede variar en función del tipo y de la gravedad de Colitis Ulcerosa.
5. Contrastar los cambios en la composición de la microbiota intestinal de pacientes afectados de Colitis Ulcerosa según los criterios anatomopatológicos, el tiempo de evolución de la enfermedad, el tratamiento recibido y el consumo de tabaco.
6. Evaluar la evolución de la composición de la microbiota intestinal de un paciente diagnosticado de Colitis Ulcerosa durante un año mediante pirosecuenciación.
7. Confrontar la composición de la microbiota intestinal del paciente afecto con la del resto de su familia, analizando las posibles similitudes y diferencias.



# Material y Métodos



### **III. MATERIAL Y MÉTODOS**

#### **1. DISEÑO DEL ESTUDIO Y RECOGIDA DE MUESTRAS**

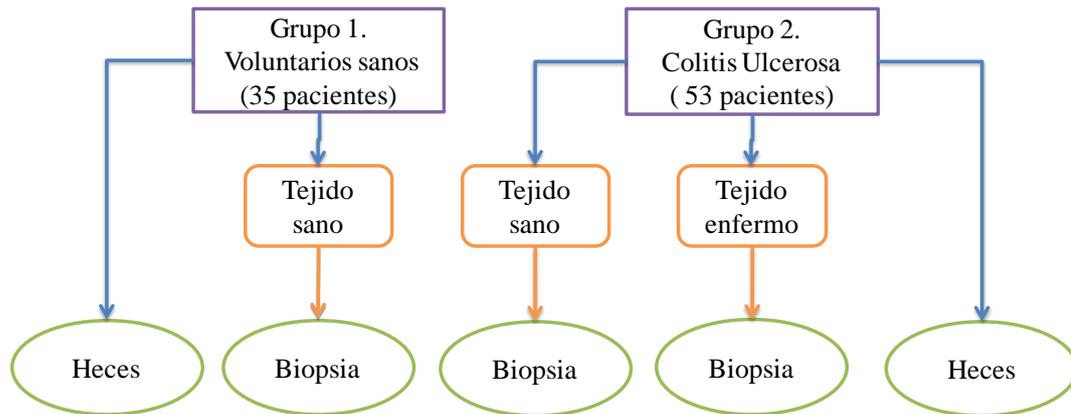
##### **1.1. Microbiota intestinal de sujetos sanos y pacientes diagnosticados de Colitis Ulcerosa**

Se realizó un estudio unicéntrico de tipo observacional en el que participaron 53 pacientes diagnosticados de Colitis Ulcerosa según los criterios habituales (Lennard Jones, 1989) (15 mujeres y 38 hombres) y 35 controles sanos (20 mujeres y 15 hombres). La recogida de muestras de biopsias en los pacientes con Colitis Ulcerosa tuvo lugar durante los periodos de remisión o de fase activa de la enfermedad. Se consideró como sano desde el punto de vista digestivo a todo sujeto sin ningún signo ni síntoma relacionable con el aparato digestivo y que acudieron a nuestro hospital para realizarse una colonoscopia de vigilancia como parte de un programa de cribado de cáncer colorrectal. Todos los participantes y controles incluidos en este estudio fueron debidamente informados de los objetivos de este proyecto y después rellenaron y firmaron un formulario de consentimiento informado como parte del protocolo de recogida de muestra.

Los sujetos fueron atendidos en la consulta de Enfermedad Inflamatoria Intestinal del Servicio de Gastroenterología del Hospital Universitario Ramón y Cajal por los médicos responsables de la misma (Antonio López San Román y Elena Garrido). Las colonoscopias fueron hechas por un endoscopista experimentado (José Ramón Foruny). Se recogieron variables de la Historia Clínica como: la edad, el sexo, el año del diagnóstico, el tiempo de evolución, la extensión de la enfermedad, el tratamiento recibido, tabaquismo, tipo de colonoscopia, número de deposiciones por encima de lo normal, presencia de sangre en las heces, actividad endoscópica, apreciación global de gravedad y gravedad histológica. El procesamiento de las muestras se realizó en el Servicio de Microbiología y Parasitología Clínica del mismo hospital.

De cada uno de los sujetos incluidos en el estudio se recogió una muestra de heces y al menos, una biopsia de mucosa cólica (Figura 8). Las muestras de heces fueron recogidas 48 horas antes de la realización de la colonoscopia para que la población bacteriana presente en la microbiota fecal no se viera afectada por los procedimientos de lavado del colon que tienen lugar en las 24 horas previas a la realización de la colonoscopia. Las biopsias fueron extraídas, en la mayoría de los casos, del colon izquierdo. Se tomaron tan solo de mucosa

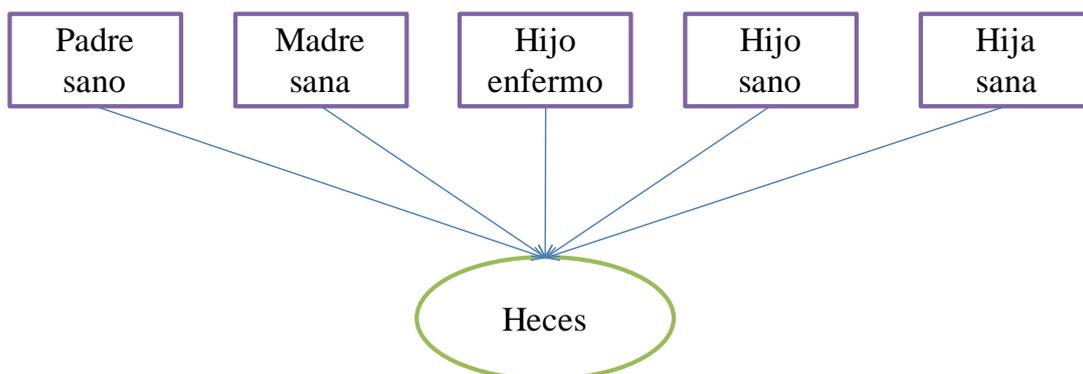
afecta, en los casos de pancolitis, y de mucosa macroscópicamente sana en aquellos casos de colitis menos extensa.



**Figura 8.** Esquema del diseño experimental del estudio de la microbiota intestinal en voluntarios sanos y en pacientes diagnosticados de Colitis Ulcerosa.

### 1.2. Estudio familiar de las variaciones de la microbiota intestinal

En este estudio de tipo observacional participó una familia constituida por el padre (65 años), la madre (51 años), un hijo sano (18 años), una hija sana (23 años) y un hijo afecto de Colitis Ulcerosa (20 años). A lo largo de un año, recogimos 7 muestras de heces del hijo enfermo (1 muestra cada 2 meses) para estudiar la variabilidad de su microbiota intestinal. Del resto de la familia se recogió una única muestra de heces con la finalidad de comparar la diversidad entre ellos, y a su vez, con respecto del paciente (Figura 9). El paciente afecto de Colitis Ulcerosa presentaba pancolitis y estaba siendo tratado con azatioprina, ya que anteriormente al periodo del estudio, había tenido un curso con dependencia de corticoides. Además, ningún miembro de la familia había tomado antibióticos en las cuatro semanas previas al comienzo del estudio.



**Figura 9.** Esquema del diseño experimental del estudio familiar de las variaciones de la microbiota intestinal.

## 2. PROCESADO DE LAS MUESTRAS

### 2.1. Heces

Todas las muestras de heces fueron tramitadas por el Servicio de Extracciones Centrales del hospital. A su llegada al laboratorio de Microbiología, las heces fueron congeladas inmediatamente a  $-80^{\circ}\text{C}$ . La descongelación de las muestras se produjo de manera gradual durante 24 horas a  $4^{\circ}\text{C}$  para minimizar la posible pérdida de los grupos bacterianos más sensibles a los cambios de temperatura.

El procesamiento de las heces se realizó de la siguiente forma: 0,5 g de heces se disgregaron en 5 ml de solución salina estéril (0,9% de NaCl), se agitaron en un vórtex hasta conseguir la total solubilización y homogeneización y después se centrifugaron suavemente (1.000 revoluciones por minuto (rpm) durante 10 minutos) para sedimentar los restos de fibra. Del sobrenadante de dicha centrifugación se recogió una alícuota de 2 ml que fue utilizada para los diferentes ensayos.

### 2.2. Biopsias

Se extrajeron, mediante pinza de biopsia endoscópica estándar, una muestra de mucosa del colon en los voluntarios sanos y dos muestras en los pacientes afectados de Colitis Ulcerosa (una procedente de mucosa enferma, y otra procedente de mucosa sana contigua a la parte afecta). Todas las biopsias se congelaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento. De igual forma a las heces, el proceso de descongelación se realizó lentamente a  $4^{\circ}\text{C}$ .

## 3. CEPAS BACTERIANAS

La metodología de PCR-Q con cebadores específicos de género pero inespecíficos de especie, necesita la inclusión de una cepa control que nos permite descartar aquellas mediciones que se alejen de la curva de fusión adecuada. Para cuantificar el género *Fusobacterium*, se utilizó ADN de una cepa de *Fusobacterium varium* ATCC 27725. Para el grupo de las Bacterias Lácticas se utilizó ADN de la especie *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* aislada de una muestra de yogur búlgaro artesanal. Para determinar la densidad del grupo *Bacteroides-Prevotella-Porphyromonas* se utilizó como control la cepa *Bacteroides vulgatus* ATCC 31376.

#### 4. MEDIOS DE CULTIVO EMPLEADOS

Los principales medios de cultivo utilizados para analizar la carga y las bacterias cultivables presentes en las heces de la familia son los siguientes:

- a) Agar M-*Enterococcus* (Becton, Dickinson and Company Sparks, EEUU), selectivo para enterococos.
- b) Agar Manitol Salino (Biomerieux, Francia), selectivo para estafilococos.
- c) Agar MRS (Becton, Dickinson and Company Sparks, EEUU), medio específico para Bacterias Ácido-Lácticas.
- d) Agar MacConkey (Biomerieux, Francia), medio selectivo para enterobacterias.
- e) Agar Brucella (Becton, Dickinson and Company Sparks, EEUU), medio utilizado para bacterias anaerobias.
- f) Agar Sangre (Biomerieux, Francia), medio de enriquecimiento que permite el crecimiento de la gran mayoría de las bacterias cultivables.
- g) Brain Heart Infusion (Oxoid, Reino Unido), medio líquido de enriquecimiento.
- h) Tryptic Soy Agar (Becton, Dickinson and Company Sparks, EEUU), favorece el crecimiento de microorganismos, tanto no exigentes como moderadamente exigentes.

Todos los medios de cultivo fueron preparados según las instrucciones del fabricante y se suplementaron con antibióticos cuando el medio lo requería. La esterilización fue llevada a cabo en autoclave durante 20 minutos a 121°C y 1 atmósfera manométrica de presión.

#### 5. DETECCIÓN DE BACTERIAS VIABLES EN HECES

Se realizaron diluciones seriadas ( $10^{-2}$ - $10^{-6}$ ) de cada una de las muestras de heces homogeneizadas en solución salina, sembrándose 100  $\mu$ l de cada dilución en placas de medio selectivo (Agar Manitol Salino, M-*Enterococcus*, MRS *Lactobacillus*, MacConkey y Brucella). Las placas se incubaron a 37° C durante 48 horas.

Tras la incubación, todas las colonias que presentaron morfología compatible con las bacterias que buscábamos, fueron re-estriadas para su posterior identificación mediante MALDI-TOF MS.

## **6. EXTRACCIÓN DE ADN**

### **6.1. Extracción de ADN de cultivos bacterianos puros**

Se resuspendió una colonia en 200 µl de agua desionizada ultrafiltrada estéril y se dejó en agua hirviendo durante 15 minutos para provocar la ruptura de la pared bacteriana. Posteriormente se centrifugó a 13.000 rpm durante 5 minutos para que el ADN se solubilizase y los restos bacterianos precipitasen. Finalmente se traspasó el sobrenadante a un tubo limpio, almacenándolo a 4°C hasta su uso.

### **6.2. Extracción fenol/cloroformo del ADN total en heces y biopsias**

Se centrifugaron 200 µl de las heces previamente procesadas a 3.000 rpm durante 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante y al sedimento se añadió 400 µl de un tampón de lisis (10 mM Tris pH 7,8; 5 mM EDTA pH 8,0; 0,5% SDS). En el caso de las biopsias, el tampón de lisis se añadió directamente sobre el tejido.

La mezcla se homogeneizó en el vórtex y se incubó en estufa a 37°C durante 30 minutos. Se añadió 5 µl de proteinasa K 50 mg/ml (Sigma-Aldrich, EEUU) y se dejó a 56°C durante 30 minutos hasta la completa disolución de la mezcla. Se favoreció la disolución del tejido agitando con el vórtex de vez en cuando. Transcurrido este tiempo, se incrementó la temperatura del baño hasta 95°C durante 10 minutos para desactivar la enzima. Una vez se hubo atemperado, se añadieron 400 µl de fenol en agitación y se centrifugó a 13.000 rpm durante 3 minutos. Se colocó la fase acuosa en otro eppendorf y se añadieron 40 µl de acetato de sodio 3 M y 500 µl de etanol absoluto frío. Se congeló a -20°C durante al menos 20 minutos y se centrifugó a 13.000 rpm durante 5 minutos. Finalmente se eliminó el sobrenadante y se añadió 100 µl de agua milli-Q estéril.

### **6.3. Cuantificación de ADN**

La concentración de ADN extraído de las muestras de heces y biopsias se determinó en un espectrofotómetro a través del software "Nanodrop 3.1.0". Después, se realizaron diluciones para unificar todas las muestras a una concentración final de 50 ng/µl.

## 7. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

### 7.1. PCR cualitativa

Las amplificaciones del ADN se llevaron a cabo en un termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Perkin Elmer Applied Biosystems, EEUU), en sistema de microplacas de 96 pocillos. El volumen final de todas las reacciones fue de 15  $\mu$ l y la mezcla se componía de dos cebadores (5 pmoles del cebador F (Forward) y 5 pmoles del cebador R (Reverse)), 2,4  $\mu$ l de dNTP [10 mM de dATP, dCTP, dGTP y dTTP], 1,5  $\mu$ l de buffer, 0,2  $\mu$ l de la enzima polimerasa *Taq* (Roche, Suiza), 1  $\mu$ l de ADN y agua milli-Q estéril hasta completar el volumen final de 15  $\mu$ l (Tabla 5).

**Tabla 5.** Cebadores específicos y condiciones de PCR para la amplificación e identificación de las bacterias utilizadas como control.

Gen	Secuencia (5'→3')	PCR	Ciclos	Tamaño
16S ARNr	16S-F: AGGATTA GATACCTGGTAGTCCA 16S-R: AGGCCCGGGAACGTATTCA C	94°C 30 s 52°C 30 s 72°C 45 s	30	500 pb

La determinación del tamaño de los productos de amplificación se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa (Laboratorios Conda, España) al 0,8% con TBE 1x (Tris Borato EDTA), utilizando el marcador de peso molecular  $\lambda$ -Hind III digest (Takara Bio Inc., Japón) en una cubeta Wide-Mini Sub Cell Gt (BioRad, EEUU) y con una fuente de corriente Power Pac 300 (BioRad). El tampón de carga utilizado fue 6x Loading Buffer (Takara). Los geles se tiñeron con bromuro de etidio (10 mg/ml), se visualizaron con luz ultravioleta y se fotografiaron.

### 7.2. PCR cuantitativa

Para la cuantificación de ADN usamos el sistema de PCR en tiempo real 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems, EEUU) en sistema de microplaca de 96 pocillos. El

volumen final de todas las reacciones fue de 20  $\mu$ l. Para la mezcla utilizamos 10  $\mu$ l del kit SYBR<sup>®</sup> Premix Ex *Taq* (25 mM TAPS pH 9.3, 50 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM 2-Mercaptoetanol, 200  $\mu$ M dNTP, 100  $\mu$ M [<sup>32</sup>P]-dCTP, 0,25 mg/ml ADN de esperma de salmón, enzima *Taq* ADN Polimerasa) (Takara Bio Inc., Japón), 0,4  $\mu$ l de ROX 1x (Takara Bio Inc., Japón), 1  $\mu$ l del cebador F 0,25  $\mu$ M, 1  $\mu$ l del cebador R 0,25  $\mu$ M, 1  $\mu$ l de ADN (50 ng/ $\mu$ l) y agua milli-Q c.s.p. 20  $\mu$ l. Los cebadores utilizados en estas reacciones así como las condiciones de amplificación se detallan en la Tabla 6.

En todas las reacciones, al finalizar todos los ciclos de amplificación, tuvimos que añadir una fase de disociación (95°C 15 s, 60°C 30 s, 95°C 15 s) para asegurarnos que el producto obtenido era el que buscábamos.

Para cada una de las reacciones específicas de cada grupo o especie bacteriana se realizaron rectas de calibrado utilizando diferentes concentraciones de ADN (10.000, 1.000, 100, 10, 1 y 0,1 pg) con los siguientes patrones: *F. varium* (Género *Fusobacterium*), *B. vulgatus* (grupo *Bacteroides-Prevotella-Porphyromonas*) y *L. bulgaricus* (grupo Bacterias Lácticas).

**Tabla 6.** Cebadores específicos y condiciones de PCR cuantitativa para la amplificación y cuantificación de los diferentes grupos bacterianos.

Bacteria	Secuencia (5' → 3')	PCR	Ciclos	Referencia
<i>Fusobacterium</i> spp. (273 pb)	FS-F: C(A/T)AACGCGATAAGTAATC FS-R: TGGTAACATACGA(A/T)AGGG	95°C 10 s 51°C 30 s 72°C 30 s	45	Nagano (2007)
<i>Bacteroides-Prevotella-Porphyromonas</i> (140 pb)	B-F: GGTGTCGGCTTAAGTGCCAT B-R: CGGA(C/T)GTAAGGGCCGTGC'	95°C 10 s 60°C 30 s 72°C 30 s	30	Rintilla (2004)
Bacterias Lácticas (341 pb)	Lac-F: AGCAGTAGGGAATCTTCCA Lac-R: ATTYCACCGCTACACATG	95°C 10 s 55°C 30 s 72°C 30 s	35	Walter (2001)

Los cebadores utilizados en PCR cuantitativa fueron enfrentados con la base de datos GenBank obteniéndose homologías correspondientes a las siguientes secuencias:

***Fusobacterium* spp.:** *Fusobacterium gonidiaformans*, *Fusobacterium necrophorum*, *Fusobacterium simiae*, *Fusobacterium naviforme*, *Fusobacterium varium*, *Fusobacterium nucleatum* y *Fusobacterium russii*.

***Bacteroides-Prevotella-Porphyrromonas:*** *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides stercolaris*, *Bacteroides vulgatus*, *Bacteroides eggerthii*, *Bacteroides acidofaciens*, *Bacteroides caccae*, *Bacteroides ovatus*, *Bacteroides uniformis*, *Bacteroides thetaiotamicron*, *Bacteroides distasonis*, *Bacteroides merdae*, *Bacteroides forsythus*, *Prevotella tanneriae*, *Prevotella bryantii*, *Prevotella ruminicola*, *Prevotella heparinolytica*, *Prevotella zoogloformans*, *Prevotella brevis*, *Prevotella loescheii*, *Prevotella buccae*, *Prevotella oralis*, *Prevotella enoeca*, *Prevotella melaninogenica*, *Prevotella veroralis*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella albensis*, *Prevotella nigrescens*, *Prevotella corporis*, *Prevotella disiens*, *Prevotella bivia*, *Prevotella pallens*, *Prevotella denticola*, *Porphyrromonas canoris*, *Porphyrromonas gingivalis*, *Porphyrromonas asaccharolytica*, *Porphyrromonas levii*, *Porphyrromonas cangingivalis*, *Porphyrromonas endodontalis*, *Porphyrromonas macacae*, *Porphyrromonas circumdentaria* y *Porphyrromonas catoniae*.

**Grupo Bacterias Lácticas:** *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus amylovorus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp *delbrueckii*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp *lactis*, *Lactobacillus amyloxyticus*, *Lactobacillus acetolerans*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus amylophilus*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus pontis*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus mucosae*, *Lactobacillus vaginalis*, *Lactobacillus panis*, *Lactobacillus oris*, *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus collinoides*, *Lactobacillus alimentarius*, *Lactobacillus farciminis*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus kefir*, *Lactobacillus fructivorans*, *Lactobacillus mali*, *Lactobacillus animalis*, *Lactobacillus murinus*, *Lactobacillus ruminis*, *Lactobacillus agilis*, *Lactobacillus salivarius* subsp *salicinius*, *Lactobacillus aviarius* subsp *aviarius*, *Lactobacillus sharpeae*, *Lactobacillus manihotivorans*, *Lactobacillus rhamnus*,

*Lactobacillus casei* subsp *casei*, *Lactobacillus zae*, *Lactobacillus paracasei* subsp *paracasei*, *Lactobacillus paracasei* subsp *tolerans*, *Lactobacillus coryniformis* subsp *coryniformis*, *Lactobacillus bif fermentans*, *Lactobacillus perolens*, *Lactobacillus sakei* subsp *sakei*, *Lactobacillus casei* subsp *fusiformis*, *Leuconostoc lactis*, *Pediococcus pentosaceus*, *Pediococcus parvulus*, *Pediococcus acidilacti*, *Pediococcus dextrinicus*, *Weissella halotolerans*, *Weissella confusa*, *Weissella paramesenteroides*, *Weissella hellenica*, *Weissella viridescens*, *Weissella kandleri* y *Weissella minor*.

## **8. ELECTROFORESIS EN GEL DE CAMPO PULSADO (PFGE)**

### **8.1. Preparación de la muestra para campo pulsado**

Esta técnica fue utilizada para analizar la relación genética de los aislados de enterococos y de *E. coli* obtenidos de las muestras de heces del estudio familiar incluido en el estudio. Para ello, se seleccionaron al menos cinco colonias de cada placa según su morfología. Cada una de las colonias seleccionadas se inoculó en 1 ml de caldo BHI (Brain Heart Infusion) y se incubó a 37°C durante 24h. Este cultivo se centrifugó durante 5 minutos a 13.000 rpm, se eliminó todo el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 100 µl de solución TBE 0,5x. En el caso de los enterococos, se adicionaron 10 µl de lisozima (10 mg/ml) y se dejó incubando 30 minutos a 30°C.

En la solución anterior se añadió 100 µl de agarosa al 2% disuelta en TBE 0,5x y con esta mezcla se hicieron unos tacos en moldes adecuados.

En el caso de los enterococos, después de su solidificación, se sumergieron en 1 ml de la solución de lisis (Tris-HCl 1M pH 7,6, ClNa 5M, EDTA 0,5M pH 8, sarcosil (lauril sarcosina sódica) 10%, Brij 10%, ácido desoxicólico 10% y agua destilada ultrafiltrada estéril) incubándose en el sistema orbital incubador Innova 4300 Incubator Shaker (New Brunswick Scientific Co., Inc, EEUU) durante 2 horas a 37°C.

Después se eliminó la solución de lisis y se añadió 1 ml de solución EPS (EDTA pH 9,5, sarcosil 10%, proteinasa K 20 mg/ml) incubándose nuevamente en el orbital a 56°C durante 24 horas.

Finalmente, se eliminó la solución EPS y se lavaron los tacos con 1 ml de TE (10 mM Tris-HCl pH 7,6, 1 mM EDTA pH 8) durante 10 minutos una vez a 56°C y otra vez a 37°C.

Después del último lavado se cambió de nuevo el TE y se mantuvieron con esta solución hasta su uso a 4°C.

Para cada de uno de los geles de campo pulsado se utilizó un tercio de los tacos, que se colocaron en un tubo eppendorf con 100 µl de solución con el tampón adecuado (Buffer 10x y BSA 0,1%) y 10 U de la enzima de restricción, que en el caso de los enterococos fue *SmaI* (Procedente de *S. marcescens*) (New England BioLabs, Inc, Reino Unido), y en el caso de *E. coli* fue *XbaI* (Procedente de *X. badrii*) (Takara), y se dejó la digestión a 37°C durante al menos 3 horas.

## **8.2. Condiciones para la electroforesis en campo pulsado**

Los bloques se cargaron en un gel de agarosa Certified Molecular Biology preparada al 1,2% y disuelta en TBE 0,5x. La separación de los fragmentos de ADN se llevó a cabo en el sistema CHEF-DRIII (BioRad, La Jolla, EEUU) con las siguientes condiciones: en *E. coli*, 6 v/cm<sup>2</sup> con rampas de 5-35 segundos durante 20 horas; en enterococos, 6 v/cm<sup>2</sup> con rampas de 5-35 segundos durante 23 horas.

Una vez finalizada la electroforesis, el gel se sumergió en agua con bromuro de etidio (0,5 µl/ml) durante 30 minutos y posteriormente se visualizó en un transiluminador con rayos UV. En cada gel se incluyeron dos carriles con marcadores de peso molecular que incluyen 50 líneas diferentes en un rango desde 48,5 hasta 1018,5 Kb (Lambda Ladder PFGE Marker, New England). La interpretación de los diferentes perfiles electroforéticos correspondientes a cada aislado se realizó de forma visual y también mediante el software Phoretix 5.0 (Nonlinear Dynamics Ltd., Reino Unido).

## **9. SECUENCIACIÓN AUTOMÁTICA EN GELES DESNATURALIZANTES**

La secuenciación del ADN fue realizada utilizando el kit “ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit” (Applied Biosystems, EEUU) en el secuenciador automático (ABIPRISM 377 DNA Sequencer, Applied Biosystems, EEUU).

El secuenciador automático ABI Prism 377 es un sistema de electroforesis y detección de fluorescencia controlada por un microprocesador que se utiliza para secuenciación

automática o análisis de fragmentos empleando el método de secuenciación automática en geles desnaturizantes.

El proceso consistió en realizar una PCR cualitativa del ADN extraído de la bacteria aislada en cultivo puro. Una vez finalizada la PCR se añadieron 0,2 µl de ExoSAP-IT (USB, EEUU) y 1,8 µl de agua milli-Q previamente mezclados, a 5 µl del material de la PCR. Esta mezcla se incubó de nuevo en el aparato de PCR (37°C 40 min, 80°C 15 min). Tras esto, se mezcló de nuevo 3 µl del producto con 1 µl del cebador 16S-Forward 0,25 µM, 2 µl de BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing RR-100 y 4 µl del tampón y agua milli-Q c.s.p. 20 µl. Finalmente, se realizó la PCR de secuenciación (96°C 10 s, 50°C 5 s, 60°C 4 min; 25 ciclos). El amplificado obtenido necesitó una precipitación con 3 µl de acetato sódico 3 M pH 4,6; 62,5 µl de etanol al 95% y 14,5 µl de agua milli-Q. Esta mezcla se agitó y se dejó incubar a temperatura ambiente durante 15 minutos. Después se centrifugó a 13.000 rpm durante 20 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se añadió 250 µl de etanol al 70%. Posteriormente se volvió a centrifugar a 13.000 rpm durante 5 minutos y se volvió a eliminar el sobrenadante. Finalmente, se secó en el sistema SAVANT Speed Vac Concentrator (Thermo Fisher Scientific, EEUU).

Las secuencias obtenidas se compararon con las previamente publicadas en el GenBank Database del NCBI mediante la utilización del programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>, National Center for Biotechnology Information).

## **10. MALDI-TOF MS**

El sistema MALDI Biotyper (Bruker Daltonics, EEUU) fue utilizado para identificar las especies bacterianas que crecieron en los medios de cultivo donde se sembraron las muestras de heces de la familia en estudio.

Las colonias crecidas, de no más de 24 horas, se inocularon sobre una tarjeta metálica y se extendieron adecuadamente. Posteriormente se añadió 0,7 µl de matriz y se dejó secar. Finalmente se introdujo la placa en el sistema y mediante la lectura de los espectros de masas de las proteínas que componían los microorganismos se identificaron.

## 11. PIROSECUENCIACIÓN

El sistema Genome Sequencer FLX Titanium (Roche, Alemania) fue utilizado para analizar las diferencias en la microbiota intestinal entre los miembros de una familia, uno de ellos afecto de CU y para la monitorización de su microbiota.

Esta técnica comenzó con el procesado y adaptación del ADN para obtener una librería de pequeños fragmentos monocatenarios. Lo primero fue fragmentar el ADN a secuenciar mediante un proceso físico conocido como “nebulización” donde el ADN se rompió en fragmentos de 200 a 800 pb aproximadamente.

Posteriormente, mediante protocolos estandarizados de biología molecular, se añadieron dos pequeñas secuencias adaptadoras a cada fragmento de ADN obtenido en la nebulización (adaptador A y adaptador B). Las secuencias adaptadoras fueron diseñadas para cumplir funciones en los pasos de selección, amplificación y secuenciación.

El siguiente paso fue seleccionar los fragmentos de ADN a los que se habían unido correctamente los adaptadores. Para esto, los fragmentos de ADN se unieron a unas esferas por la parte 3' del adaptador B. Los fragmentos que solo contenían adaptador A no se unieron a las esferas y fueron eliminados y los que contenían dos adaptadores B se unieron por dos puntos. Los fragmentos de doble cadena unidos a estas esferas fueron sometidos a alta concentración de NaOH que provocó la separación de las cadenas simples. Si el fragmento tenía dos adaptadores B se separaban las cadenas pero ambas permanecían unidas a las esferas. Como resultado de este sencillo proceso se liberaron de las esferas los fragmentos de cadena simple que tenían un adaptador de cada clase con el B situado en el extremo 5' del fragmento, ya que los fragmentos complementarios a estos permanecieron unidos por el extremo 3' del adaptador B.

Para el proceso de amplificación, los fragmentos libres de cadena simple se unieron a otras esferas que tenían un gran número de secuencias complementarias del adaptador A. Esta unión fue optimizada para que solo se uniera un fragmento a una esfera. Una vez se unieron los fragmentos a las esferas se introdujeron en una emulsión de agua y aceite de forma que cada esfera quedó dentro de una gota con todos los reactivos y enzimas necesarios para la PCR. Tras una serie de termociclos de PCR se habían generado en cada esfera un gran número de secuencias de doble cadena idénticas y unidas por el adaptador A. De nuevo, las esferas fueron sometidas a alta concentración de NaOH para separar las cadenas

complementarias. El resultado fue que cada esfera tenía adherida a su superficie un gran número de cadenas simples idénticas unidas por el extremo 3´.

Antes de empezar la secuenciación en sí misma se añadieron cebadores complementarios al adaptador B en posición 5´, ADN polimerasas y los cofactores necesarios para la síntesis de la cadena complementaria a los fragmentos unidos a las esferas.

El siguiente paso fue cargar las esferas en un dispositivo conocido como “PicoTiterPlate” que es el que se introdujo en el secuenciador. Este dispositivo constaba de más de un millón de pocillos de 44 micras de diámetro de forma que solo cabía una esfera con fragmentos de ADN por pocillo. Además de las esferas con ADN, se introdujeron otro tipo de esferas que contenían las enzimas necesarias para detectar la incorporación de nucleótidos durante la síntesis de la cadena complementaria.

Una vez se hubo cargado las esferas con ADN y las esferas con enzimas, el “PicoTiterPlate” se introdujo en el secuenciador. El secuenciador automatizó el proceso de secuenciación, la captura de imágenes y su interpretación. El secuenciador vertió automáticamente sobre los pocillos los reactivos necesarios y un tipo de nucleótido cada vez. Así de forma cíclica se fueron vertiendo Adeninas, Citosinas, Guaninas y Timinas. En cada pocillo, la ADN polimerasa añadió uno o más nucleótidos dependiendo de la secuencia que actuaba como molde y se emitió luz con una intensidad proporcional al número de nucleótidos incorporados a la nueva cadena que fue sintetizando durante el proceso de secuenciación. El secuenciador constó de un sistema óptico especial que recogió el patrón de destellos luminosos que se emitieron en el “PicoTiterPlate”. Mediante programas informáticos se interpretaron estos patrones de luz y se generaron unas gráficas que indicaron si había habido incorporación o no de nucleótidos y su número.

Después de esto se lavó el exceso de nucleótidos y reactivos y se repitió el proceso con otro tipo de nucleótido de forma cíclica hasta que finalizó la síntesis de una cadena complementaria a la cadena que actuaba como molde. El resultado fue la secuenciación de los fragmentos que había en cada pocillo.

## **12. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS**

Se utilizó el test de ANOVA para la comparación de tres poblaciones distintas y la “t de Student” para comparar dos poblaciones relacionadas. Para estudiar la homogeneidad de los datos se utilizó el test de Kolmogorov-Smirnov, y cuando no existió homogeneidad en la población estudiada, se analizaron los datos mediante test no paramétricos como el test de Wilcoxon con signo para la comparación de dos muestras relacionadas o la prueba de la U de Mann-Whitney para la comparación de dos poblaciones independientes.

**R**esultados



## IV. RESULTADOS

### 1. MICROBIOTA INTESTINAL DE SUJETOS SANOS Y DE PACIENTES DIAGNOSTICADOS DE COLITIS ULCEROSA

#### 1.1. Diferencias en la microbiota intestinal de sujetos sanos y de pacientes diagnosticados de Colitis Ulcerosa

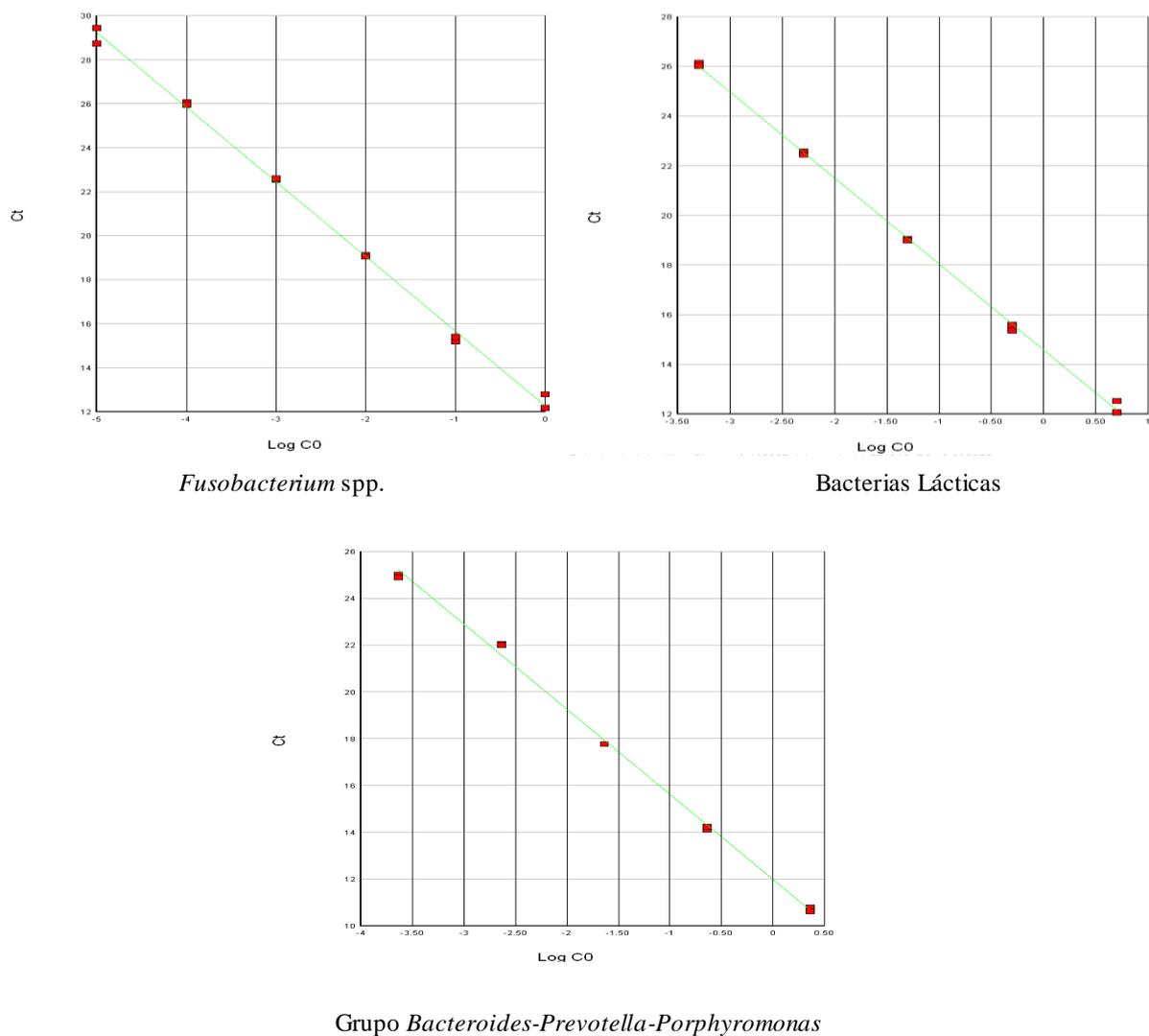
##### 1.1.1. Rectas de calibrado

Para analizar la composición cuantitativa de cada una de las especies y/o géneros bacterianos de la microbiota intestinal en pacientes diagnosticados de Colitis Ulcerosa y en sujetos sanos, tanto en las muestras de biopsias como en las heces, se utilizó la técnica de la PCR-Q en tiempo real con cebadores específicos para los grupos de *Fusobacterium*, Bacterias Lácticas y *Bacteroides-Prevotella-Porphyromonas*.

Como paso previo a todos los experimentos de PCR-RT, se realizaron rectas de calibrado con concentraciones crecientes de ADN, desde 0,1 hasta 10.000 pg de una cepa patrón conocida. Para el grupo de *Fusobacterium*, la bacteria usada en la recta de calibrado fue un aislado de *F. varium* (Figura 10). La calibración del grupo de Bacterias Lácticas fue realizada con una cepa de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* procedente de un yogur fresco (Figura 10). Para la cuantificación del grupo *Bacteroides-Prevotella-Porphyromonas* utilizamos un aislado de *B. vulgatus* (Figura 10). En la Tabla 7 se muestran los resultados de la eficiencia, el coeficiente de correlación y la pendiente para todos los experimentos anteriores.

**Tabla 7.** Valores obtenidos en las rectas de calibrado para cada una de las cepas patrón de los diferentes grupos de estudio.

Cepas patrón	Eficiencia	Coefficiente de correlación (R2)	Pendiente
<i>Fusobacterium varium</i>	103	0,987	-3,24
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	97	0,995	-3,41
<i>Bacteroides vulgatus</i>	93	0,998	-3,51



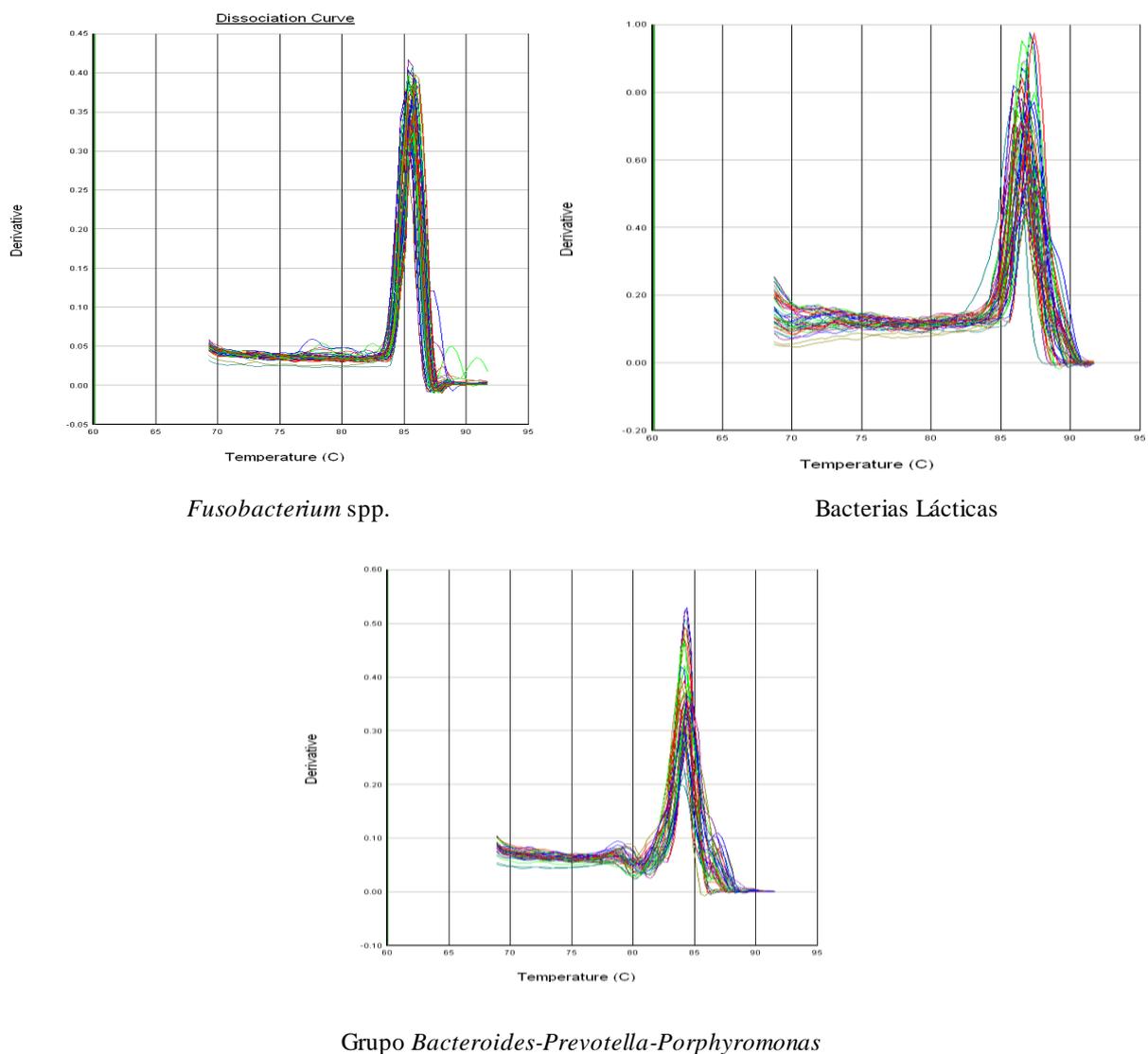
**Figura 10.** Rectas de calibrado obtenidas para cada uno de los grupos estudiados.

Los resultados de cuantificación para cada uno de los grupos de la microbiota se realizaron extrapolando el valor de cada una de las reacciones sobre el  $C_t$  (ciclo umbral) de la recta patrón.

### 1.1.2. Curvas de fusión

Para aumentar la especificidad de la amplificación de cada experimento, añadimos al final del proceso una curva de fusión del producto. La derivada de la curva de fusión nos reveló un pico máximo correspondiente a la temperatura de fusión del producto ( $T_m$ ). El área bajo la

curva (ABC) de este pico es proporcional a la cantidad de producto. Cuando se utiliza el sistema de detección SYBR-Green I se puede confirmar que la amplificación de la diana es específica, ya que cuando se obtienen productos inespecíficos diferentes del que nosotros buscamos, se detectan varios picos con  $T_m$  y ABC diferentes. De este modo también, la utilización de este fluoróforo sirve para caracterizar el producto. El valor de  $T_m$  varió para cada grupo bacteriano utilizado. Así, para el género *Fusobacterium*, la  $T_m$  fue de  $85,4\pm 0,3^\circ\text{C}$ , para las Bacterias Lácticas de  $86,5\pm 0,3^\circ\text{C}$  y para el grupo *Bacteroides-Prevotella-Porphyrromonas* de  $84,3\pm 0,3^\circ\text{C}$  (Figura 11).



**Figura 11.** Curvas de fusión obtenidas para cada uno de los grupos estudiados.

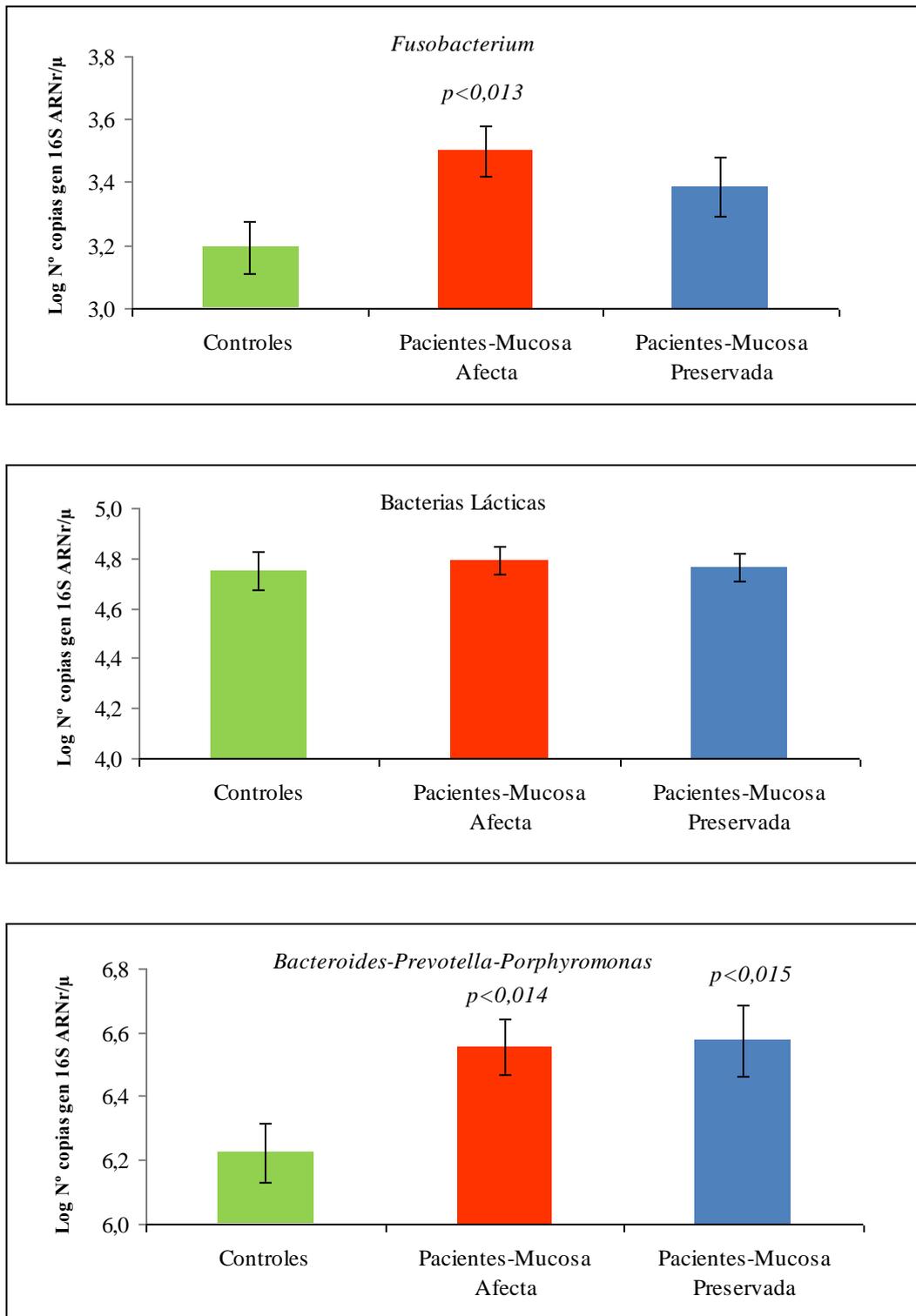
### 1.1.3. PCR-RT de biopsias

En todas las muestras de biopsias se cuantificaron los grupos *Fusobacterium*, Bacterias Lácticas y *Bacteroides-Prevotella-Porphyromonas*. Cada uno de los experimentos se realizó por triplicado y los resultados expresaron el valor medio y la desviación estándar de ambas determinaciones. En prácticamente el 100% de las muestras, se detectó la presencia de estos microorganismos. A continuación, se detallan los resultados obtenidos para cada uno de los grupos bacterianos.

Se observó de forma significativa una menor densidad de *Fusobacterium* en las biopsias de los controles sanos con respecto a las biopsias de la zona afectada de los pacientes con Colitis Ulcerosa ( $3,19 \pm 0,50$  vs  $3,50 \pm 0,59 \log_{10}$ ) ( $p < 0,013$ ). Asimismo, se observó una mayor cantidad de copias del gen 16S ARNr en la mucosa preservada de los pacientes con Colitis Ulcerosa ( $3,39 \pm 0,51 \log_{10}$ ) con respecto a la mucosa de los controles sanos ( $3,19 \pm 0,50 \log_{10}$ ), pero sin valor significativo ( $p < 0,127$ ). De forma similar, no observamos ninguna diferencia estadística cuando se comparó la mucosa preservada con la mucosa afectada de los pacientes ( $3,39 \pm 0,51$  vs  $3,50 \pm 0,59 \log_{10}$ ) ( $p < 0,375$ ) (Figura 12).

Para el grupo de las Bacterias Lácticas no se detectó ninguna diferencia estadísticamente significativa al analizar los resultados obtenidos en los tres tipos de biopsias. La concentración de Bacterias Lácticas fue muy similar en los tres tipos de muestra (Figura 12).

Cuando comparamos la densidad de *Bacteroides-Prevotella-Porphyromonas* en el grupo control con el tejido preservado ( $6,22 \pm 0,55$  vs  $6,57 \pm 0,59 \log_{10}$ ) y afectado ( $6,22 \pm 0,55$  vs  $6,55 \pm 0,64 \log_{10}$ ) de los pacientes, la diferencia fue estadísticamente significativa para los dos grupos ( $p < 0,015$  y  $p < 0,014$ , respectivamente). Por el contrario, no se evidenciaron diferencias cuando se comparó la mucosa preservada y la afectada de los pacientes con Colitis Ulcerosa ( $6,57 \pm 0,59 \log_{10}$  vs  $6,55 \pm 0,64 \log_{10}$ ,  $p < 0,803$ ) (Figura 12).



**Figura 12.** Diferencias en la densidad de bacterias en biopsias de *Fusobacterium*, Bacterias Lácticas y *Bacteroides-Prevotella-Porphyromonas* entre los sujetos sanos y los pacientes diagnosticados de Colitis Ulcerosa.

#### 1.1.4. PCR-RT de heces

En esta parte del estudio se utilizaron las muestras fecales de los voluntarios sanos y de los pacientes afectados de Colitis Ulcerosa. Cuando comparamos las diferencias en la densidad de población de *Fusobacterium* entre las heces de controles sanos y de pacientes, no encontramos diferencias significativas entre ellos. Este género estuvo presente en el 91% de los pacientes afectados de Colitis Ulcerosa y en el 87,5% de los controles (Figura 13).

Al comparar la densidad de Bacterias Lácticas tampoco se pudo detectar diferencias en su población. Estas bacterias estuvieron presentes en el 44% de los controles sanos y en el 40% de los pacientes afectados de Colitis Ulcerosa (Figura 13).

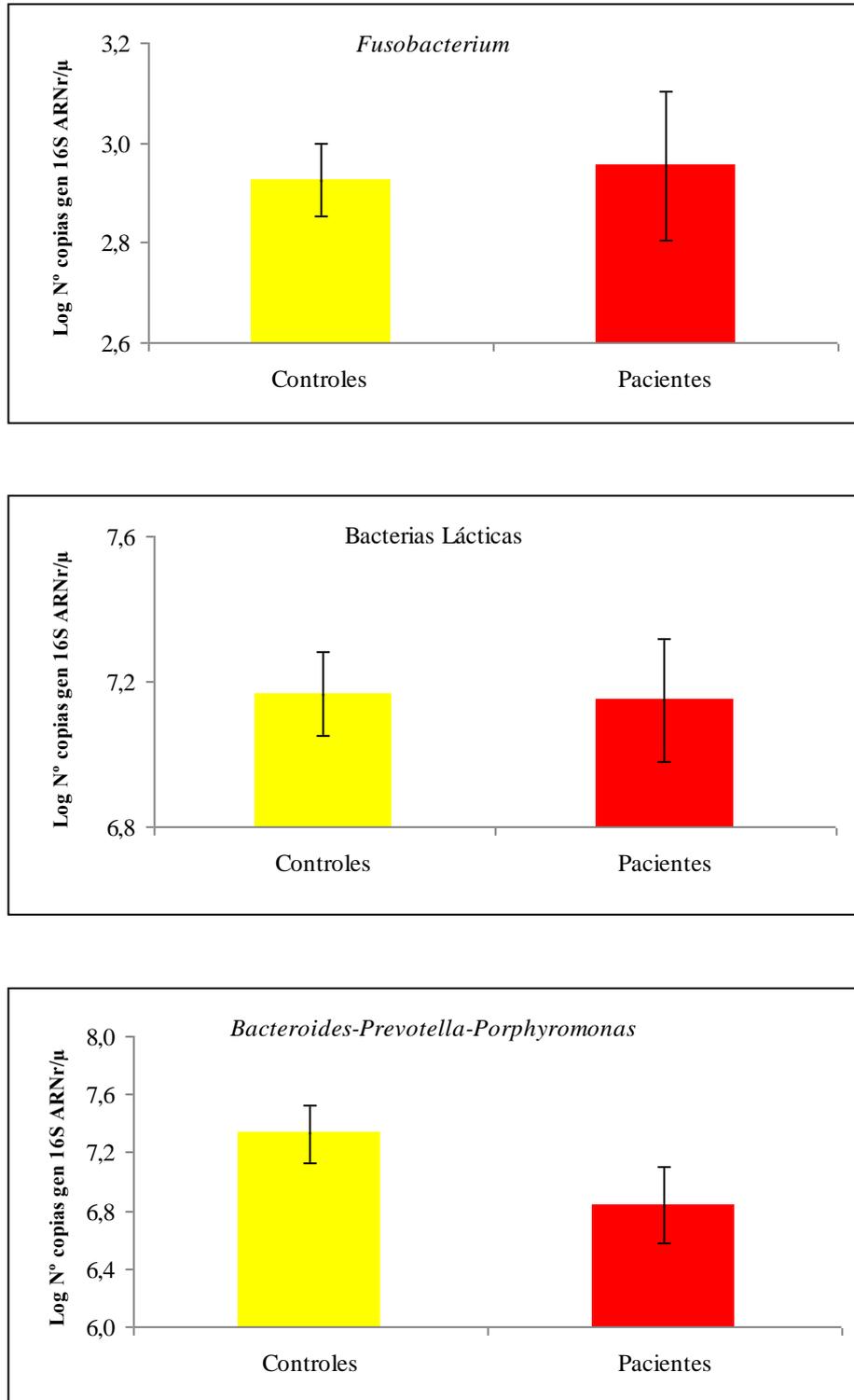
La presencia del grupo *Bacteroides-Prevotella-Porphyromonas* se evidenció en todos los sujetos estudiados, tanto sanos como pacientes, y aunque no se observaron diferencias significativas ( $p>0,05$ ), la densidad de este grupo bacteriano fue mayor en las heces de los controles (Figura 13).

#### 1.1.5. Comparación entre los resultados obtenidos en las PCR-RT entre las biopsias y las heces

La densidad de *Fusobacterium* fue mayor en los pacientes afectados de Colitis Ulcerosa que en los controles sanos cuando se utilizaron las biopsias, mientras que en las heces no hubo diferencias en ambos grupos. Además, la cantidad de *Fusobacterium* medida en las biopsias fue ligeramente superior que en las heces, sobre todo en los sujetos afectados de Colitis Ulcerosa.

Para las Bacterias Lácticas los valores fueron también similares en ambos grupos, aunque esta población se detectó en mayor número en las heces que en las biopsias.

Respecto del grupo *Bacteroides-Prevotella-Porphyromonas*, en el caso de las biopsias, los valores fueron mayores en los pacientes, mientras que en las heces ocurrió justamente lo contrario. El número de bacterias de este grupo fue mayor en las heces que en las biopsias.



**Figura 13.** Diferencias en la densidad de bacterias en la microbiota fecal del grupo *Fusobacterium*, Bacterias Lácticas y *Bacteroides-Prevotella-Porphyromonas* entre los sujetos sanos y los pacientes diagnosticados de Colitis Ulcerosa.

Debido a las variaciones entre las muestras de heces y biopsias, y a que en las heces no encontramos ninguna diferencia significativa entre los controles sanos y los pacientes, decidimos estudiar qué factores podían influir en estas diferencias. A continuación se presenta un resumen de las diferencias a nivel de diagnóstico clínico, anatomopatológico y de tratamiento de los pacientes afectados de Colitis Ulcerosa que formaron parte de este estudio (Tabla 8).

**Tabla 8.** Características de los pacientes afectados de Colitis Ulcerosa sometidos a estudio. E1, (Colitis limitada al recto); E2, (Colitis hasta el ángulo esplénico); E3, (Colitis que sobrepasa el ángulo esplénico); R, remisión; A, activa; G, grado; ASA, aminosalicilatos; AZA, azatioprina; Sin, sin tratamiento.

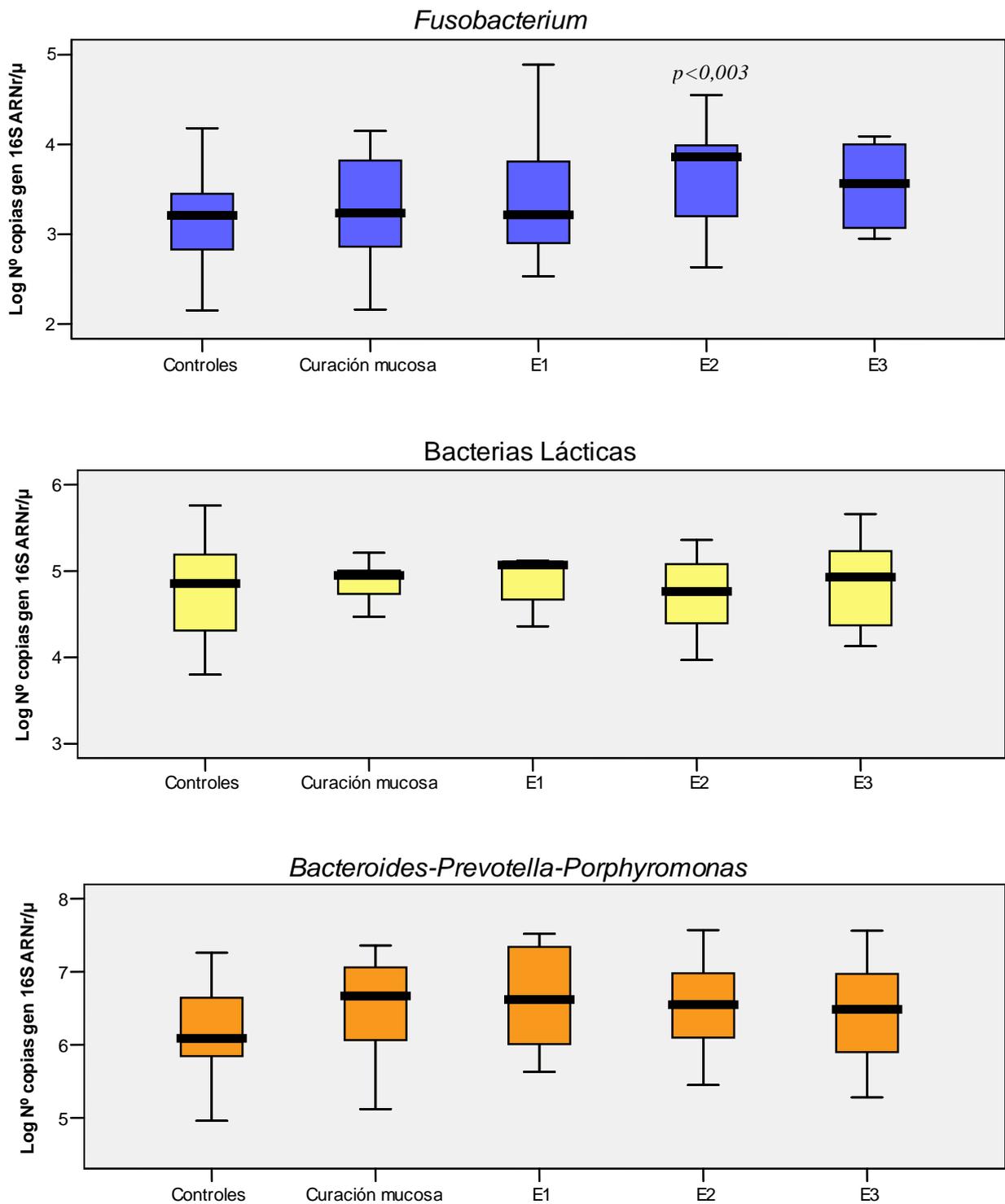
Clasificación Montreal	Índice Actividad	Brotos	Geboes	Tratamiento
12 Mucosa afecta sin alteraciones	11 R	11 Leve	G0	6 ASA 4 AZA 1 Sin
	1 A	1 Moderado	G0	ASA
10 E1	6 R	6 Leve	5 G0	4 ASA 1 Sin
			1 G4	ASA
	4 A	2 Leve	1 G0	ASA
			1 G2	Sin
2 Moderado	2 Moderado	G4	1 ASA 1 Otros	
21 E2	6 R	Leve	G0	4 AZA 2 ASA
	15 A	5 Leve	3 G2	ASA
			2 G4	1 ASA 1 Sin
		10 Moderado	1 G3	ASA
			5 G4	3 ASA 1 Infliximab 1 Corticoides
	4 G5	1 ASA 1 AZA 2 Corticoides		
			Corticoides	
10 E3	4 R	Leve	1 G0	
			1 G2	ASA
			1 G4	AZA
			1 G5	
	6 A	4 Leve	1 G0	ASA
			1 G2	Sin
			1 G4	ASA
			1 G5	AZA
		1 Moderado	G4	ASA
		1 Grave	G5	AZA

## 1.2. Clasificación de Montreal

En este apartado se analizó la relación entre el número de copias del gen 16S ARNr para cada grupo bacteriano y el tipo de Colitis Ulcerosa diagnosticada por colonoscopia. De esta manera, se incluyeron 35 controles sanos, 12 pacientes diagnosticados de Colitis Ulcerosa con curación mucosa, 10 pacientes con subtipo E1, 21 con subtipo E2 y 10 pacientes afectados con subtipo E3.

Respecto al género *Fusobacterium*, encontramos una mayor densidad de población en la mucosa cólica enferma de pacientes diagnosticados con subtipo E2 y E3, con respecto a los controles sanos, siendo estadísticamente significativo el incremento en el grupo de subtipo E2 ( $p < 0,003$ ) (Figura 14).

Cuando comparamos el grupo de Bacterias Lácticas y el grupo *Bacteroides-Prevotella-Porphyromonas* no encontramos ninguna diferencia significativa en las densidades de población de estos grupos de bacterias, aunque en *Bacteroides-Prevotella-Porphyromonas* se observó una mayor densidad en los pacientes con curación mucosa, que fue disminuyendo conforme aumentaba la extensión de la enfermedad (Figura 14).



**Figura 14.** Diferencias en la densidad bacteriana del grupo *Fusobacterium*, Bacterias Lácticas y *Bacteroides-Prevotella-Porphyromonas* en función del diagnóstico por colonoscopia. E1, (Colitis limitada al recto); E2, (Colitis hasta el ángulo esplénico); E3, (Colitis que sobrepasa el ángulo esplénico).

### 1.3. Índice Mayo

#### 1.3.1. En función de la actividad

La puntuación de la Clínica Mayo clasificó la enfermedad del paciente con Colitis Ulcerosa en activa o en remisión. En nuestro estudio, contamos con 35 controles, 26 pacientes con Colitis Ulcerosa activa y 27 afectados en remisión.

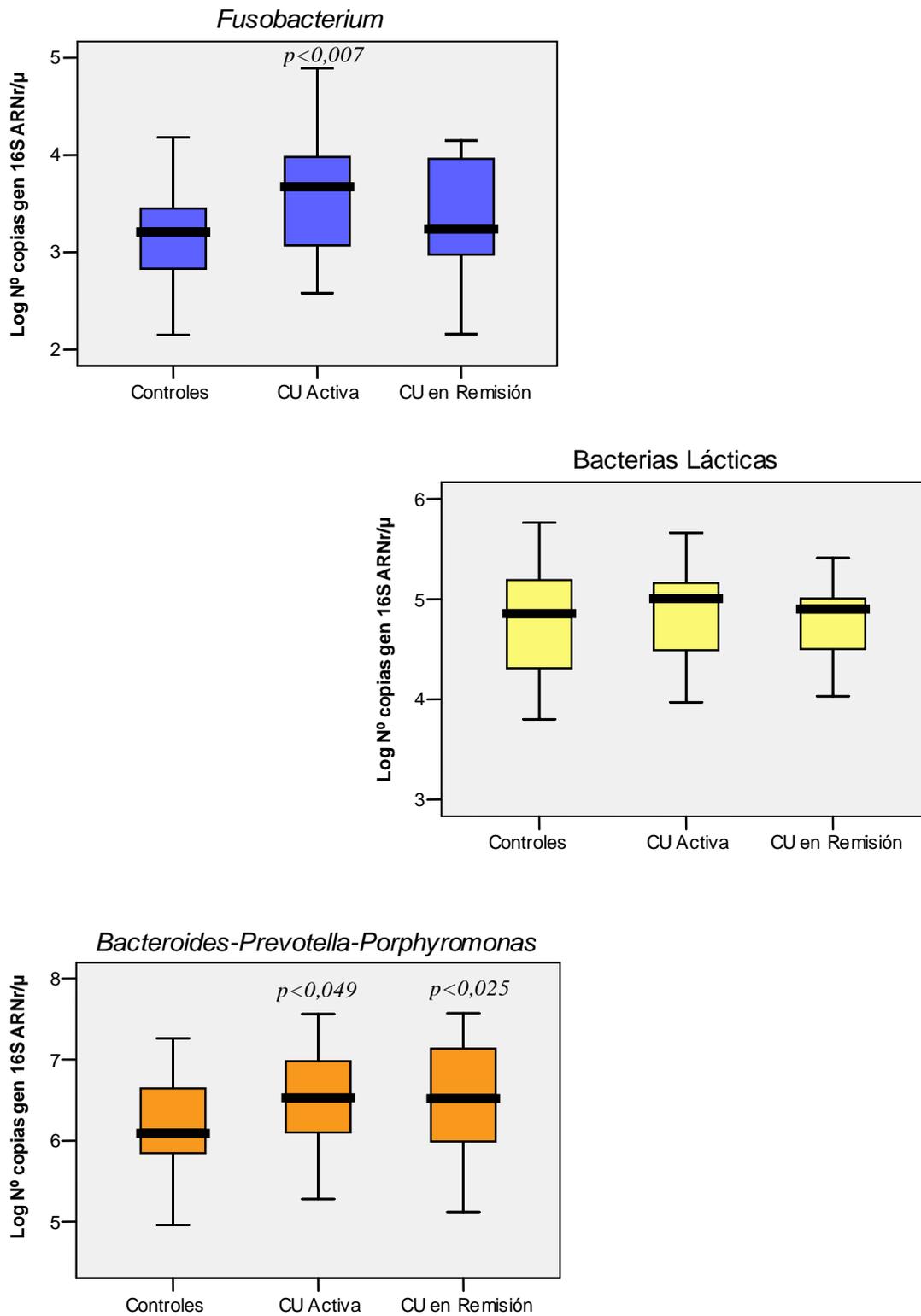
En la fase activa de la enfermedad detectamos mayores poblaciones de *Fusobacterium* y *Bacteroides-Prevotella-Porphyromonas* en la mucosa de estos sujetos en comparación con la población encontrada en los controles ( $p < 0,007$ ,  $p < 0,025$ , respectivamente). En *Fusobacterium* detectamos un menor número cuando el paciente se encontraba en remisión. Sin embargo, los integrantes del grupo *Bacteroides-Prevotella-Porphyromonas* se mantuvieron en una elevada proporción, incluso en mayor número que en la fase activa ( $p < 0,049$ ) (Figura 15).

#### 1.3.2. En función de la gravedad

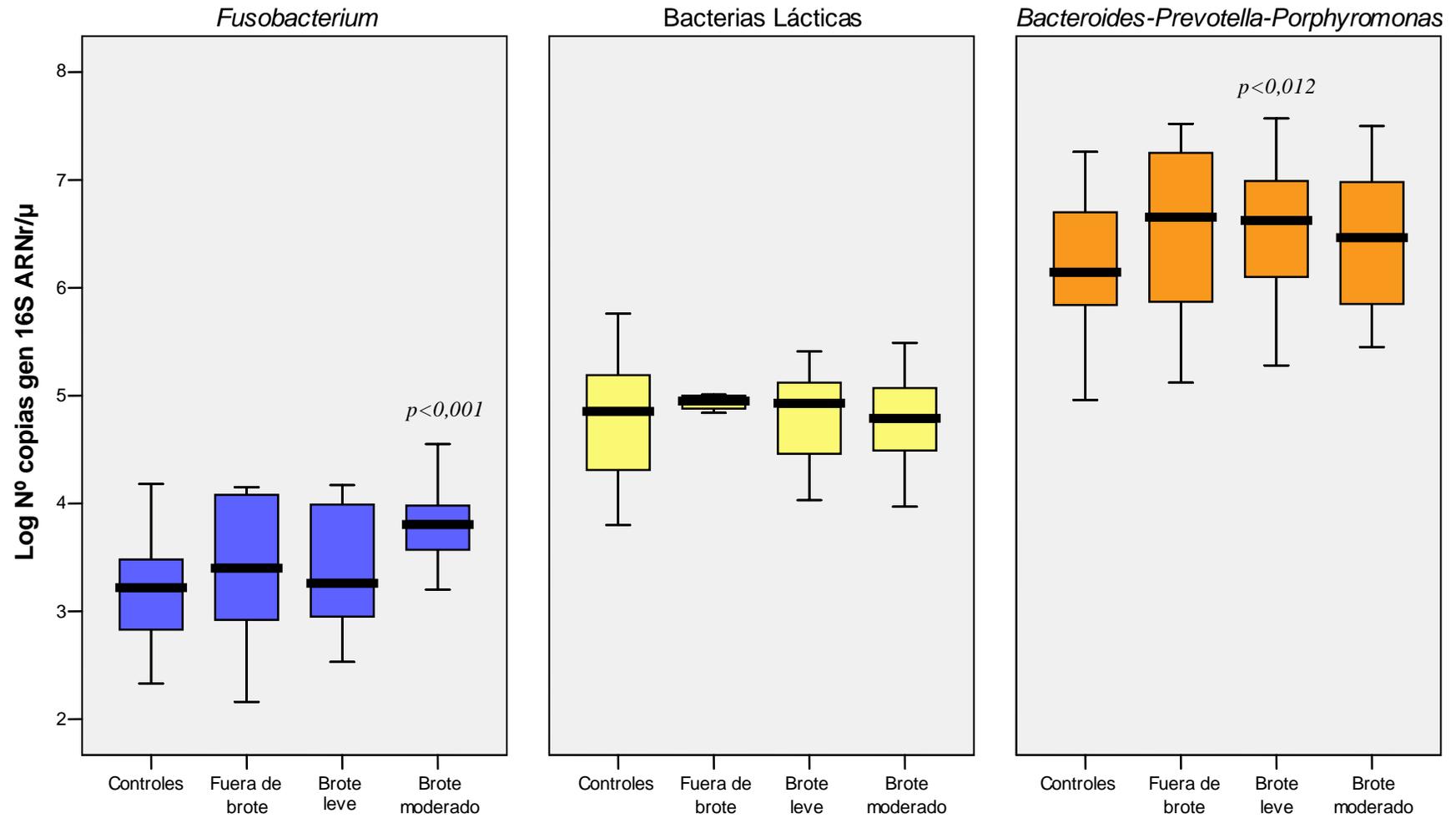
Es muy empleado en la actualidad el Índice Mayo para el cálculo de la gravedad de los brotes de Colitis Ulcerosa. Según los puntos de la escala de gravedad de Mayo se dividió los brotes en leves, moderados y graves. En este estudio contamos con 10 pacientes sin actividad (fuera de brote) (0 puntos), 28 pacientes con brote leve (1-4 puntos), 14 pacientes con brote moderado (5-8 puntos), 1 paciente con brote grave (9-12 puntos) y 35 controles. El paciente con brote grave no fue utilizado para hacer la estadística debido a que se trataba de un único sujeto.

Al comparar la densidad de *Fusobacterium* de la mucosa enferma con la mucosa sana de los controles, se observó una mayor población de bacterias en los pacientes fuera de brote y con brote leve, pero sin significancia estadística. Sin embargo, en los pacientes afectados con brote moderado sí encontramos un incremento importante ( $p < 0,001$ ) (Figura 16).

Al analizar en paralelo los brotes de Colitis Ulcerosa con la densidad de *Bacteroides-Prevotella-Porphyromonas*, observamos que hay un aumento en la densidad bacteriana en los pacientes fuera de brote y con brote leve ( $p < 0,012$ ) y se apreció un menor número de bacterias en los pacientes con brote moderado (Figura 16).



**Figura 15.** Diferencias en la densidad del grupo *Fusobacterium*, Bacterias Lácticas y *Bacteroides-Prevotella-Porphyromonas* según la actividad de la enfermedad.



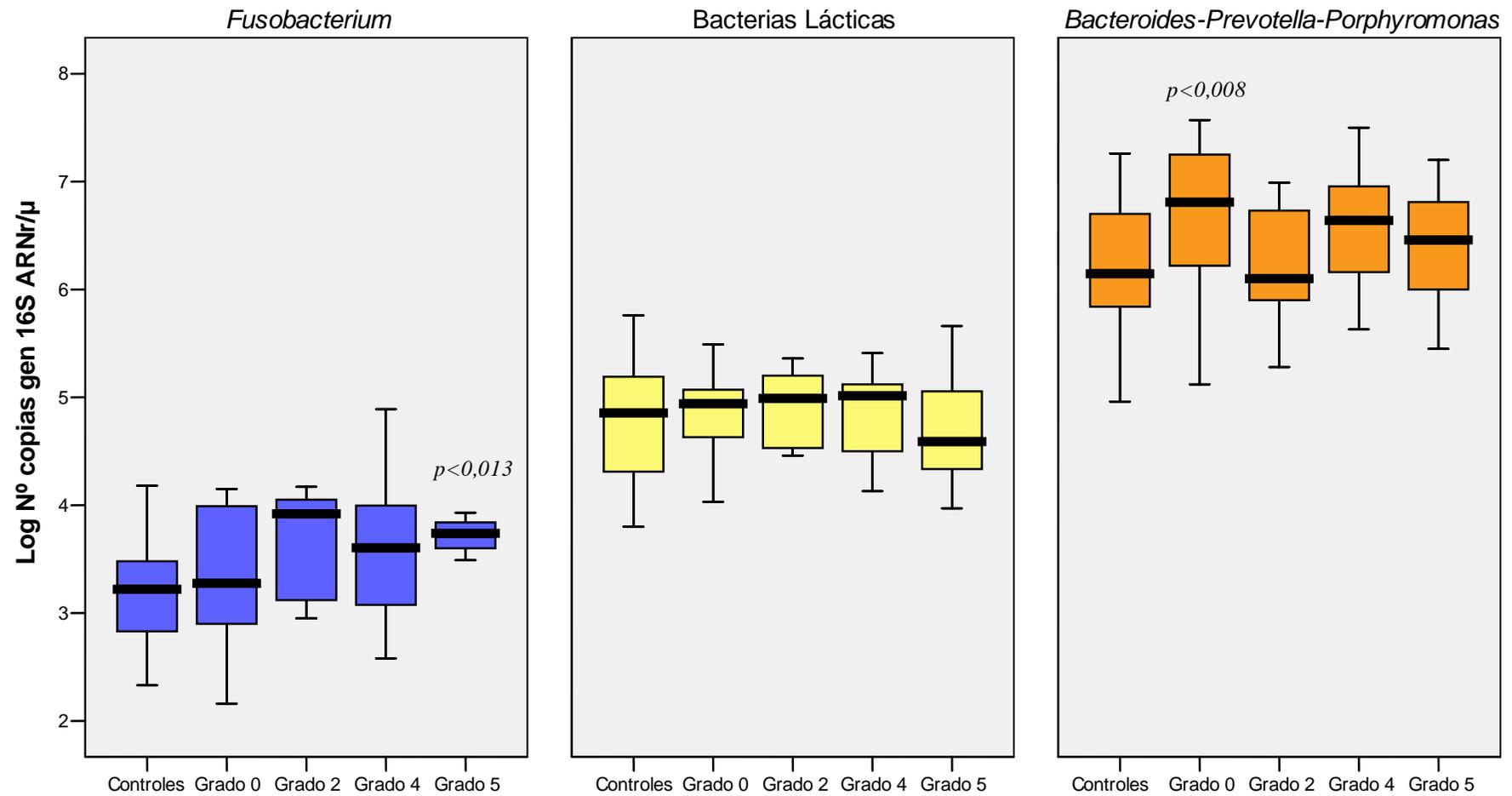
**Figura 16.** Diferencias en la densidad del grupo *Fusobacterium*, Bacterias Lácticas y *Bacteroides-Prevotella-Porphyromonas* entre sujetos sanos sin enfermedad y los pacientes afectados con y fuera de brotes de Colitis Ulcerosa.

#### 1.4. Índice Geboes

En función del grado de actividad de Colitis Ulcerosa, en el Servicio de Anatomía Patológica se estableció una escala de gradación de acuerdo al índice de Geboes (Geboes y cols., 2000). De esta forma, nuestros pacientes fueron clasificados de la siguiente manera: sujetos sanos, 35 controles; Grado 0, 26 pacientes; Grado 2, 6 pacientes; Grado 3, 1 paciente; Grado 4, 13 pacientes; Grado 5, 7 pacientes. El paciente con grado 3 no fue utilizado para llevar a cabo el estudio estadístico al tratarse de un único individuo.

Dentro del género *Fusobacterium*, pudimos observar un aumento de la densidad de su población en paralelo al aumento del grado de actividad de la Colitis Ulcerosa, siendo este incremento estadísticamente significativo en los pacientes con 5 grados de actividad en el estudio histológico ( $p < 0,013$ ) (Figura 17).

Al comparar la densidad del grupo *Bacteroides-Prevotella-Porphyromonas* entre los controles y los pacientes con diferentes grados de actividad histológica, encontramos que aquellos pacientes que no tenían actividad mostraban un incremento estadístico en la densidad de este grupo de bacterias ( $p < 0,008$ ). Sin embargo esta densidad disminuyó para el grado 2 y se mantuvo constante conforme aumentaron los grados de actividad histológica (Figura 17).



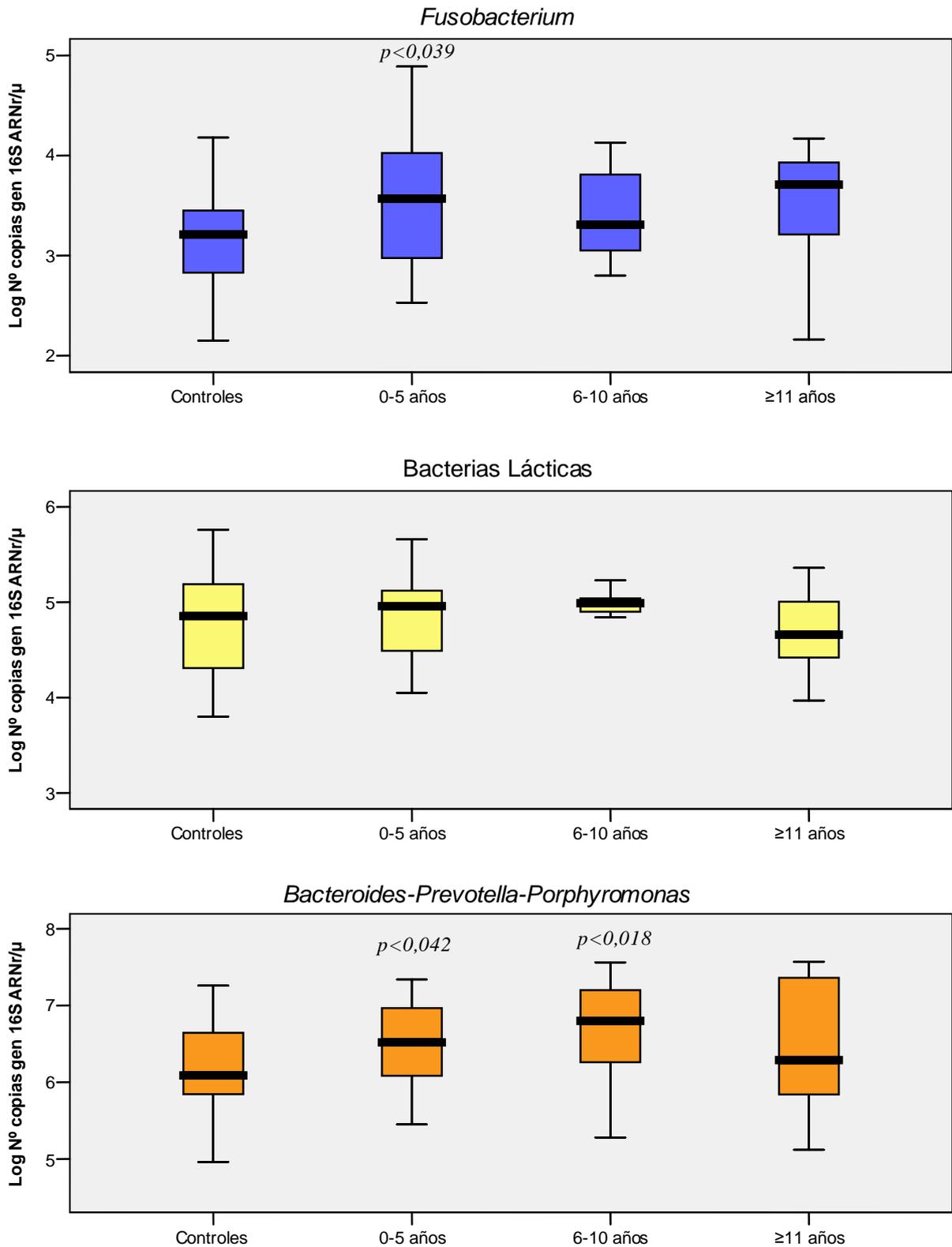
**Figura 17.** Diferencias en la densidad del grupo *Fusobacterium*, Bacterias Lácticas y *Bacteroides-Prevotella-Porphyromonas* en función del grado de actividad inflamatoria en la Colitis Ulcerosa.

### 1.5. Evolución en el tiempo de la enfermedad

En este apartado analizamos las variaciones de la microbiota de acuerdo a los años de evolución de la enfermedad, comparándola con la microbiota de los controles. Se dividieron en 4 grupos: 35 controles, 27 pacientes afectados de Colitis Ulcerosa desde el inicio de la enfermedad hasta los 5 años, 13 pacientes entre 6 y 10 años y 13 pacientes de más de 10 años de evolución de enfermedad.

En el género *Fusobacterium* pudimos observar que su población en la mucosa cólica enferma de los pacientes afectados de Colitis Ulcerosa durante los primeros 5 años de la enfermedad, aumentó de manera significativa ( $p < 0,039$ ) para luego disminuir hasta niveles encontrados en individuos sanos durante los 5 años siguientes. A partir de los 11 años de evolución, la densidad de la población bacteriana volvió a aumentar aunque no de manera significativa (Figura 18).

Mientras que en el grupo de Bacterias Lácticas no se detectó ninguna diferencia, para la población de *Bacteroides-Prevotella-Porphyromonas* sí que se observó un aumento significativo del número de copias del gen 16S ARNr en los primeros 10 años de la enfermedad, que disminuyó a partir de los 11 años (0-5 años,  $p < 0,042$ ; 6-10 años,  $p < 0,018$ ;  $\log_{10}$ ) (Figura 18).



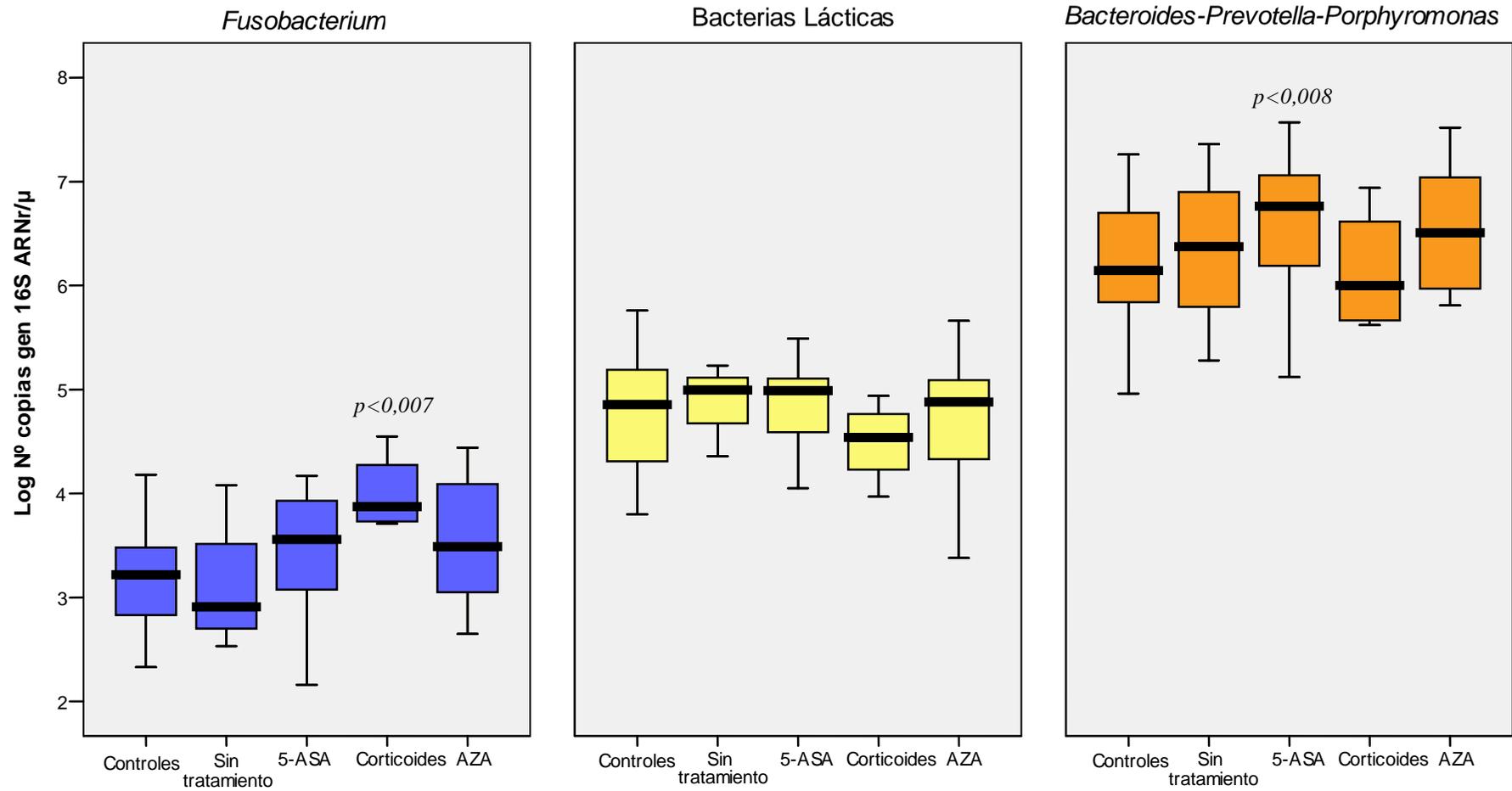
**Figura 18.** Diferencias en la densidad poblacional de *Fusobacterium*, Bacterias Lácticas y *Bacteroides-Prevotella-Porphyromonas* de acuerdo a los años de evolución de la enfermedad.

## 1.6. Tratamiento

Los pacientes incluidos en este estudio estaban recibiendo distintos esquemas terapéuticos: 5 pacientes no recibieron ningún tratamiento, mientras que 29 pacientes estaban medicados con 5-ASA, 13 con azatioprina (AZA), 4 con corticoides, 1 con infliximab y 1 con otros fármacos. Ninguno de los controles estaba recibiendo tratamiento alguno.

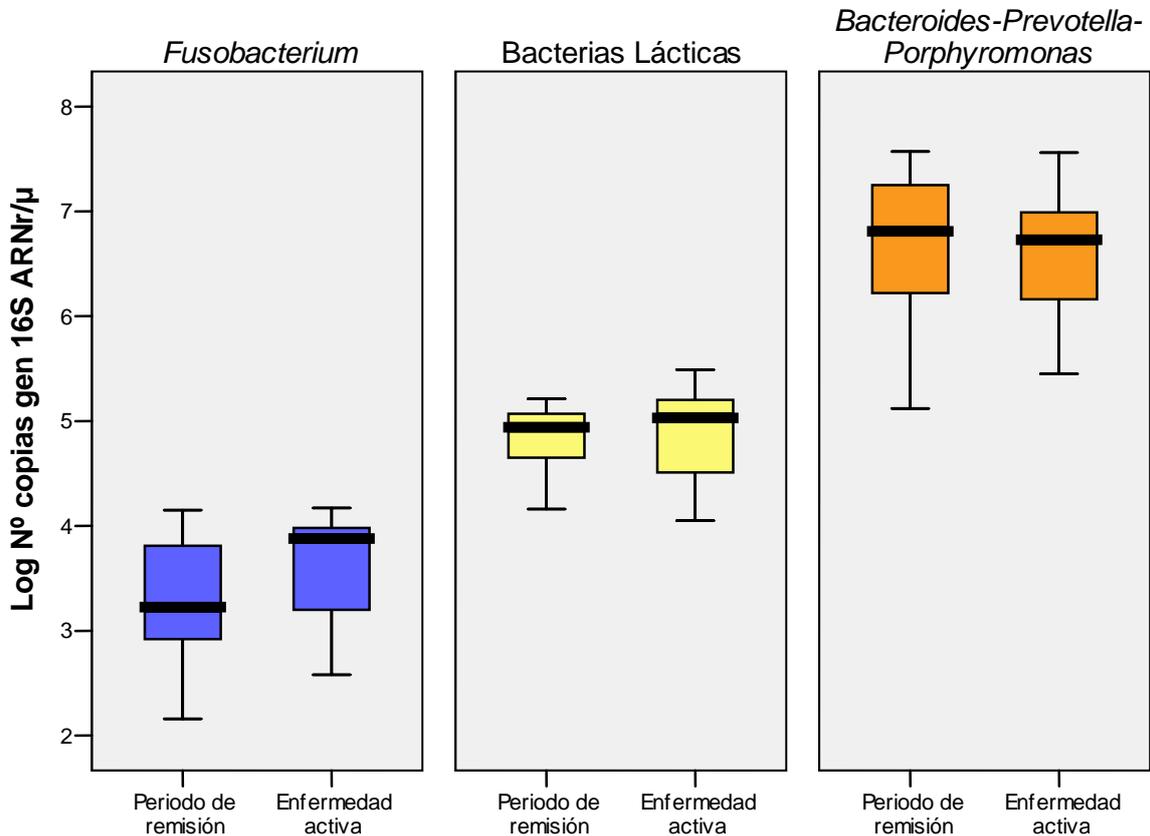
Cuando comparamos el efecto del tratamiento sobre la población de *Fusobacterium* en la mucosa cólica enferma de los pacientes diagnosticados de Colitis Ulcerosa, encontramos que no hay diferencias estadísticas en la densidad de estas bacterias, aunque se puede ver que existe una menor densidad bacteriana en los pacientes tratados con 5-ASA y AZA respecto de los pacientes con corticoides, donde la densidad de bacterias fue mayor ( $p < 0,007$ ) (Figura 19).

En la población de Bacterias Lácticas no se encontraron diferencias, y finalmente la población de *Bacteroides-Prevotella-Porphyromonas* fue menor en el grupo de pacientes tratados con corticoides con respecto a aquellos que no recibían tratamiento o que estaban siendo tratados con 5-ASA o AZA, aunque no fue significativa. Las densidades más elevadas de este grupo se observaron en los pacientes tratados con 5-ASA ( $p < 0,008$ ) (Figura 19).



**Figura 19.** Diferencias en la densidad del grupo *Fusobacterium*, Bacterias Lácticas y *Bacteroides-Prevotella-Porphyromonas* según el tratamiento.

Dentro del grupo de pacientes tratados con 5-ASA, 14 de ellos se encontraban en remisión y 15 en fase activa. Al comparar ambos grupos observamos que en los pacientes en remisión existía un menor número de fusobacterias, mientras que no se encontraron diferencias en el grupo de Bacterias Lácticas y *Bacteroides-Prevotella-Porphyromonas* (Figura 20).



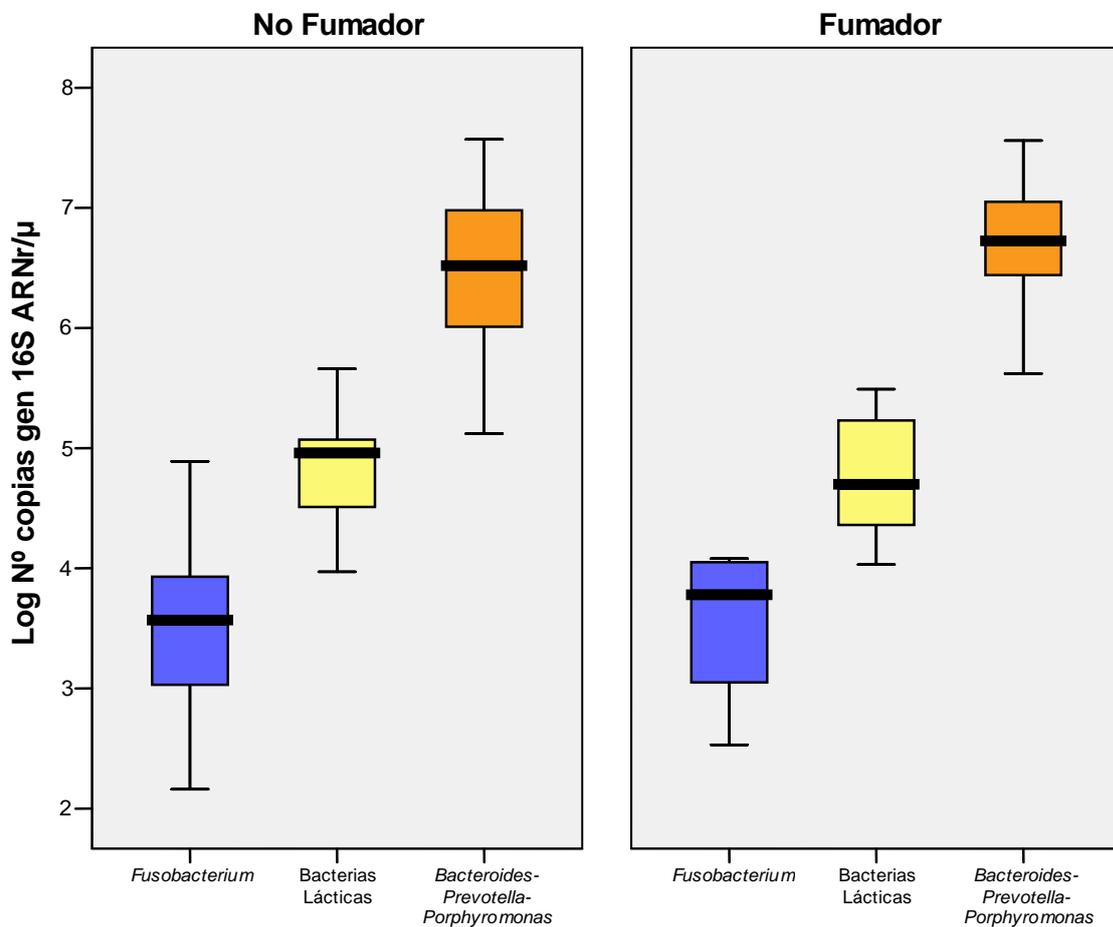
**Figura 20.** Diferencias en la densidad del grupo *Fusobacterium*, Bacterias Lácticas y *Bacteroides-Prevotella-Porphyromonas* en pacientes tratados con 5-ASA con Colitis Ulcerosa en remisión y en fase activa.

### 1.7. Relación con el tabaco

También quisimos analizar si el consumo de tabaco podía influenciar en las poblaciones bacterianas de la microbiota intestinal. De todos los pacientes afectos de Colitis Ulcerosa, 6 pacientes eran fumadores y 47 no fumaban en la actualidad o no habían fumado nunca.

Se constató una mayor densidad del grupo *Fusobacterium* en los sujetos fumadores, aunque sin significancia estadística (Figura 21).

En los pacientes fumadores también se demostró una menor concentración de Bacterias Lácticas y una mayor densidad de *Bacteroides-Prevotella-Porphyromonas*, ambos cambios sin significancia estadística (Figura 21).



**Figura 21.** Diferencias en la densidad del grupo *Fusobacterium*, Bacterias Lácticas y *Bacteroides-Prevotella-Porphyromonas* entre sujetos fumadores y no fumadores diagnosticados de Colitis Ulcerosa.

## 2. ESTUDIO FAMILIAR DE LAS VARIACIONES DE LA MICROBIOTA INTESTINAL

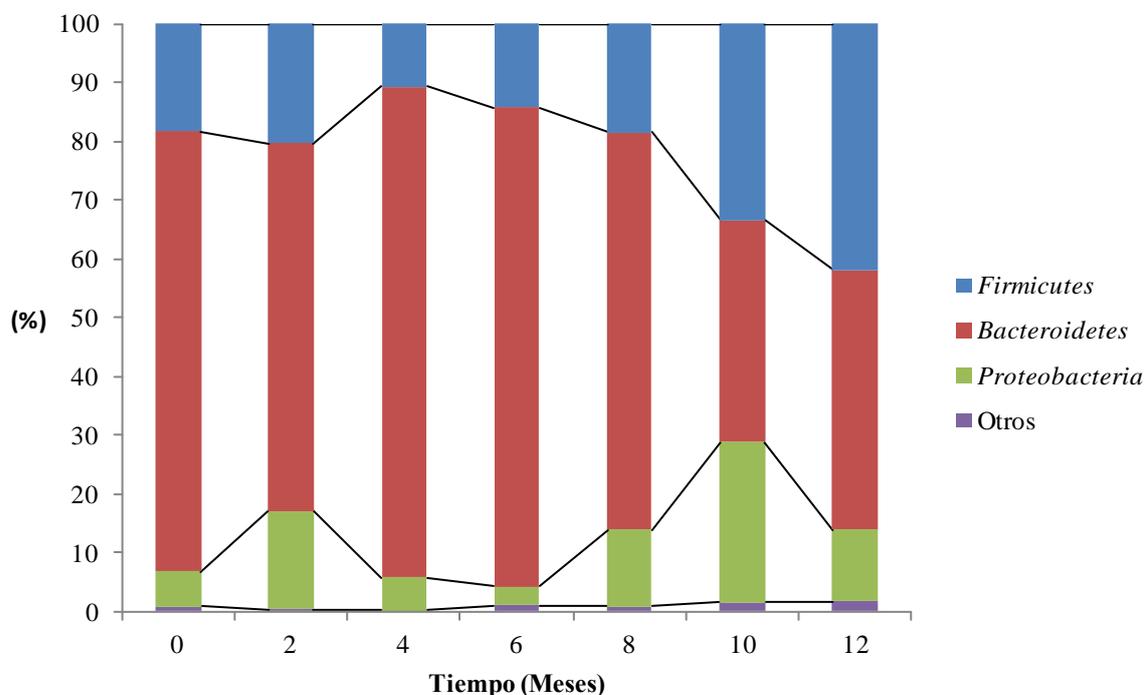
### 2.1. Variaciones en la microbiota intestinal en un paciente con Colitis Ulcerosa a lo largo de un año

La finalidad de este apartado fue estudiar las variaciones de la microbiota de un paciente con Colitis Ulcerosa a lo largo de un año en relación con sus manifestaciones clínicas. Para ello se recogieron 7 muestras de heces (una muestra cada 2 meses) desde Octubre de 2008 hasta Octubre de 2009. La primera muestra que se recogió, fue inmediatamente posterior a un brote de Colitis Ulcerosa; sin embargo el paciente se mantuvo en remisión y estable durante todo el tiempo que duró el seguimiento.

Para una optimización de los resultados, las heces fueron inmediatamente congeladas tras su recogida, y después se procesaron todas juntas al finalizar el período de estudio. El esquema de trabajo consistió en extraer ADN total de las muestras, amplificarlo con cebadores del gen 16S ARNr, purificarlo y proceder a su pirosecuenciación. Para interpretar los resultados, agrupamos las familias detectadas en filos, y en general podemos decir que se observó que cuando disminuyó la cantidad de *Bacteroidetes*, aumentaron los *Firmicutes* y las *Proteobacterias*. De igual manera, cuando *Bacteroidetes* aumentó, los otros dos filos disminuyeron, y cuando *Bacteroidetes* se mantuvo constante, *Firmicutes* y *Proteobacteria* también lo hicieron. Además, cuando la disminución de *Bacteroidetes* fue muy grande, comenzaron a aparecer filos bacterianos que anteriormente no se reflejaban en la composición de la microbiota como *Fusobacteria*, *Actinobacteria* y otras bacterias sin clasificar (Figura 22).

De las setenta y una familias estudiadas, solo 39 estuvieron presentes en las heces del paciente afecto de Colitis Ulcerosa (*Acidaminococcaceae*, *Actinomycetaceae*, *Bacillaceae*, *Bacteroidaceae*, *Burkholderiaceae*, *Campylobacteraceae*, *Carnobacteriaceae*, *Catabacteriaceae*, *Clostridiaceae*, *Comamonadaceae*, *Coriobacteriaceae*, *Corynebacteriaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Enterococcaceae*, *Erysipelotrichaceae*, *Eubacteriaceae*, *Fusobacteriaceae*, *Halomonadaceae*, *Heliobacteriaceae*, *Hyphomicrobiaceae*, *Lachnospiraceae*, *Lactobacillaceae*, *Leuconostocaceae*, *Listeriaceae*, *Methylocystaceae*, *Moraxellaceae*, *Mycobacteriaceae*, *Neisseriaceae*, *Oscillospiraceae*,

*Oxalobacteraceae*, *Pasteurellaceae*, *Peptococcaceae*, *Peptostreptococcaceae*, *Porphyromonadaceae*, *Prevotellaceae*, *Rikenellaceae*, *Streptococcaceae*, *Streptomycetaceae* y *Syntrophomonadaceae*), aunque no todas estuvieron representadas en las siete muestras de heces recogidas al paciente (Tabla 9). Solo 14 familias estuvieron presentes durante todo el año que duró el estudio.



**Figura 22.** Variación de los principales filos bacterianos en heces en un paciente afecto de Colitis Ulcerosa a lo largo de un año.

Las familias de microorganismos que estuvieron presentes en un mayor porcentaje fueron *Bacteroidaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Porphyromonadaceae*, *Clostridiaceae*, *Eubacteriaceae*, *Oscillospiraceae*, *Acidaminococcaceae*, *Lachnospiraceae* y *Rikenellaceae*.

En los dos primeros meses, se produjo una disminución de *Bacteroidaceae*, *Clostridiaceae* y *Lachnospiraceae*, mientras que el porcentaje de *Enterobacteriaceae*, *Eubacteriaceae*, *Oscillospiraceae*, *Acidaminococcaceae*, *Prevotellaceae* y *Rikenellaceae* experimentó un incremento (Figura 23).

A partir del cuarto mes, *Bacteroidaceae* volvió a aumentar hasta porcentajes similares a los encontrados al principio del estudio. *Clostridiaceae* y *Lachnospiraceae* se mantuvieron

sin cambios y en cambio disminuyeron *Enterobacteriaceae*, *Eubacteriaceae*, *Oscillospiraceae*, *Lachnospiraceae*, *Prevotellaceae* y *Rikenellaceae* (Figura 23).

Tras seis meses la densidad de *Bacteroidaceae*, *Clostridiaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Eubacteriaceae*, *Oscillospiraceae* y *Rikenellaceae* no experimentó ningún cambio. Por el contrario, *Acidaminococcaceae* disminuyó, mientras que *Lachnospiraceae* y *Prevotellaceae* aumentaron (Figura 23).

Llegado el octavo mes, *Bacteroidaceae* volvió a disminuir hasta niveles similares a los detectados en el cuarto mes y aumentaron *Acidaminococcaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Eubacteriaceae*, *Oscillospiraceae* y *Rikenellaceae*. La familia *Porphyromonadaceae*, que más o menos se había mantenido constante durante los primeros ocho meses de este estudio, experimentó un gran incremento en su participación (Figura 23).

Pasados diez meses desde el comienzo del correspondiente estudio, *Bacteroidaceae* continuó su descenso, mientras que *Acidaminococcaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Eubacteriaceae* y *Oscillospiraceae* continuaron aumentando su representación. *Rikenellaceae* se mantuvo constante, mientras que la densidad de *Porphyromonadaceae* disminuyó (Figura 23).

Una vez hubo finalizado el año, en la séptima muestra observamos que la densidad de *Bacteroidaceae* volvió a aumentar, al igual que *Clostridiaceae* y *Lachnospiraceae*, mientras que la representación de *Enterobacteriaceae*, *Oscillospiraceae* y *Eubacteriaceae* se redujo. *Porphyromonadaceae* continuó disminuyendo hasta los niveles más bajos alcanzados durante el año. *Acidaminococcaceae* y *Rikenellaceae* incrementaron ligeramente su representación, aunque no de manera significativa (Figura 23).

En la primera muestra del estudio, a los cuatro y a los seis meses, cuando la representación de *Bacteroidaceae* fue más elevada, solo encontramos dos familias (*Neisseriaceae* y *Syntrophomonadaceae*) que no estuvieron presentes en el resto de las muestras del estudio, mientras que otras 8 distintas (*Burkholderiaceae*, *Catabacteriaceae*, *Comamonadaceae*, *Corynebacteriaceae*, *Heliobacteriaceae*, *Hyphomicrobiaceae*, *Lactobacillaceae*, *Listeriaceae*) fueron encontradas cuando el porcentaje de esta disminuyó por debajo del 63%.

**Tabla 9.** Porcentaje representado por cada familia de bacterias presentes en las heces de un paciente afecto de Colitis Ulcerosa a lo largo de un año.

Familia	0 meses	2 meses	4 meses	6 meses	8 meses	10 meses	12 meses
<i>FIR-Acidaminococcaceae</i>	1,344	3,116	3,995	1,298	3,158	8,929	10,240
<i>ACT-Actinomycetaceae</i>	0,071	0	0,063	0,139	0,082	0,038	0,038
<i>FIR-Bacillaceae</i>	0,106	0,708	0	0,070	0	0	0,038
<i>BAC-Bacteroidaceae</i>	63,353	38,385	70,292	69,054	47,416	27,393	39,056
<i>PRO-Burkholderiaceae</i>	0	0,142	0	0	0	0	0
<i>PRO-Campylobacteraceae</i>	0	1,275	0,032	0,162	0,041	0	0
<i>FIR-Carnobacteriaceae</i>	0,106	0	0	0	0	0	0,0761
<i>FIR-Catabacteriaceae</i>	0	0,283	0	0	0	0	0
<i>FIR-Clostridiaceae</i>	11,390	6,516	5,041	5,587	5,127	6,659	10,849
<i>PRO-Comamonadaceae</i>	0	0	0	0	0,041	0	0
<i>ACT-Coriobacteriaceae</i>	0,212	0	0,032	0,116	0,205	0,530	0,838
<i>ACT-Corynebacteriaceae</i>	0	0	0	0	0	0,038	0
<i>PRO-Enterobacteriaceae</i>	5,448	14,873	4,883	2,712	11,977	27,015	12,143
<i>FIR-Enterococcaceae</i>	0,177	0,142	0	0	0	0	0,076
<i>FIR-Erysipelotrichaceae</i>	0,071	0,142	0,032	0,209	0,123	0,151	0,114
<i>FIR-Eubacteriaceae</i>	1,061	1,558	0,159	0,417	3,363	6,773	5,520
<i>FUS-Fusobacteriaceae</i>	0	0	0	0,255	0,041	0,076	0
<i>PRO-Halomonadaceae</i>	0	0	0,063	0,093	0,082	0	0
<i>FIR-Heliobacteriaceae</i>	0	0	0	0	0,287	0	0
<i>PRO-Hyphomicrobiaceae</i>	0	0,142	0	0	0	0	0
<i>FIR-Lachnospiraceae</i>	2,618	1,700	0,602	4,173	3,158	4,427	12,105
<i>FIR-Lactobacillaceae</i>	0	0	0	0	0	0	0,038
<i>FIR-Leuconostocaceae</i>	0,354	1,558	0,222	1,066	0,943	0,303	0,761
<i>FIR-Listeriaceae</i>	0	0	0	0	0,041	0	0
<i>PRO-Methylocystaceae</i>	0,283	0	0,539	0,093	0,779	0,151	0
<i>PRO-Moraxellaceae</i>	0,142	0,283	0	0,070	0,082	0,038	0,076
<i>ACT-Mycobacteriaceae</i>	0	0,142	0	0,070	0	0	0
<i>PRO-Neisseriaceae</i>	0,035	0	0	0	0	0	0
<i>FIR-Oscillospiraceae</i>	0,708	1,841	0,095	0,487	1,436	5,184	1,142
<i>PRO-Oxalobacteraceae</i>	0	0	0,063	0	0	0,038	0
<i>PRO-Pasteurellaceae</i>	0,0354	0	0	0	0	0	0,0381
<i>FIR-Peptococcaceae</i>	0,071	0	0	0,255	0,369	0,151	0,228
<i>FIR-Peptostreptococcaceae</i>	0,142	2,550	0,317	0,394	0,287	0,605	0,228
<i>BAC-Porphyromonadaceae</i>	9,622	11,898	12,873	10,292	17,350	7,038	1,637
<i>BAC-Prevotellaceae</i>	0,672	5,241	0,159	1,275	0,656	0,795	0,038
<i>BAC-Rikenellaceae</i>	1,273	7,082	0,412	0,927	2,215	2,724	3,502
<i>FIR-Streptococcaceae</i>	0,071	0,425	0,063	0,255	0,164	0,076	0,381
<i>ACT-Streptomycetaceae</i>	0	0	0	0,023	0,041	0	0
<i>FIR-Syntrophomonadaceae</i>	0	0	0	0,023	0	0	0
<b>Sin clasificar</b>	0,637	0,000	0,063	0,487	0,533	0,870	0,838

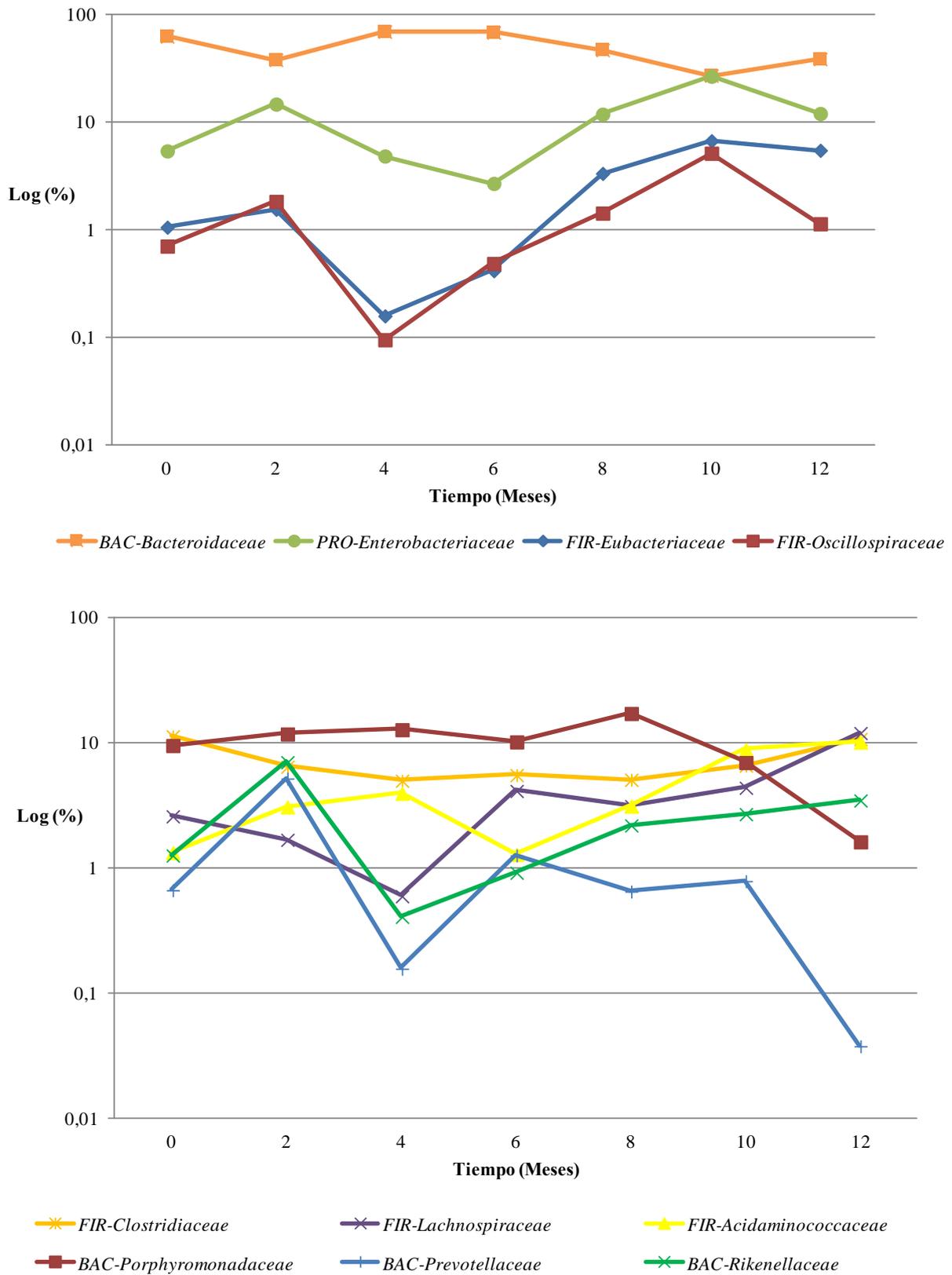


Figura 23. Variación de la microbiota intestinal en un paciente afecto de Colitis Ulcerosa a lo largo de un año.

## 2.2. Diferencias en la densidad de la microbiota intestinal entre los miembros de una misma familia

Para llevar a cabo esta parte del estudio, utilizamos la metodología de la pirosecuenciación de amplificados del gen 16S ARNr a partir del ADN extraído de las heces de cada uno de los miembros de la unidad familiar. De esta manera pudimos conocer las diferencias en la densidad de la microbiota intestinal del paciente afecto de Colitis Ulcerosa, del padre, de la madre, del hermano y de la hermana. Los principales filos analizados fueron: *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Fusobacteria*, *Lentisphaerae* y *Tenericutes*. Estos filos estaban compuestos por las familias representadas en la Tabla 10.

**Tabla 10.** Familias de microorganismos identificadas por pirosecuenciación.

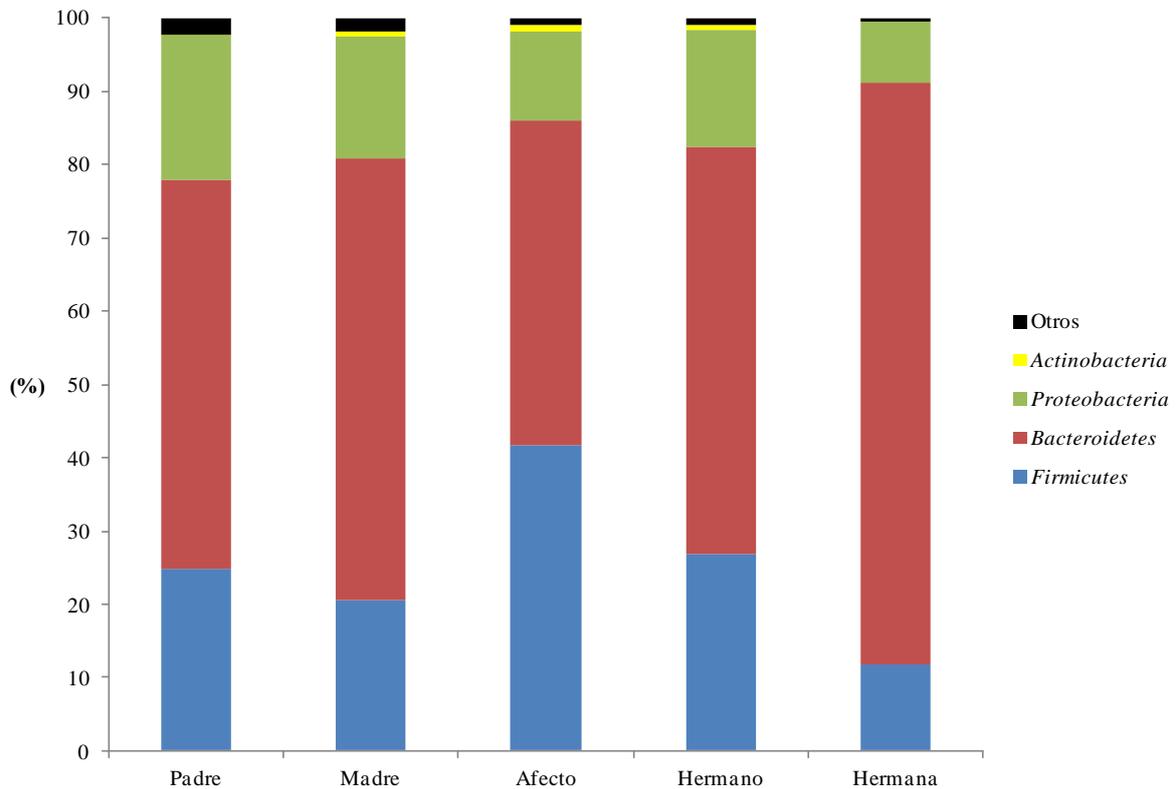
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Firmicutes</i>	<i>Proteobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>
<i>Bacteroidaceae</i>	<i>Acidaminococcaceae</i>	<i>Aurantimonadaceae</i>	<i>Actinomycetaceae</i>
<i>Flexibacteraceae</i>	<i>Bacillaceae</i>	<i>Burkholderiaceae</i>	<i>Bifidobacteriaceae</i>
<i>Porphyromonadaceae</i>	<i>Carnobacteriaceae</i>	<i>Desulfovibrionaceae</i>	<i>Coriobacteriaceae</i>
<i>Prevotellaceae</i>	<i>Clostridiaceae</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Corynebacteriaceae</i>
<i>Rikenellaceae</i>	<i>Enterococcaceae</i>	<i>Geobacteraceae</i>	<i>Glycomycetaceae</i>
	<i>Entomoplasmataceae</i>	<i>Kopriimonadaceae</i>	<i>Microbacteriaceae</i>
	<i>Erysipelotrichaceae</i>	<i>Methylocystaceae</i>	<i>Micrococcaceae</i>
	<i>Eubacteriaceae</i>	<i>Methylophilaceae</i>	
	<i>Lachnospiraceae</i>	<i>Moraxellaceae</i>	
	<i>Lactobacillaceae</i>	<i>Oxalobacteraceae</i>	
	<i>Leuconostocaceae</i>	<i>Pasteurellaceae</i>	
	<i>Oscillospiraceae</i>	<i>Rhizobiaceae</i>	
	<i>Paenibacillaceae</i>		
	<i>Peptococcaceae</i>		
	<i>Peptostreptococcaceae</i>		
	<i>Planococcaceae</i>		
	<i>Streptococcaceae</i>		
	<i>Syntrophomonadaceae</i>		
	<i>Thermolithobacteraceae</i>		
	<i>Turicibacteraceae</i>		

En el sujeto afecto de Colitis Ulcerosa, el filo más representado fue *Firmicutes* (n=14), seguido de *Bacteroidetes* (n=4), *Proteobacteria* (n=3) y *Actinobacteria* (n=2). En los sujetos sanos, el filo *Firmicutes* también fue el que estuvo representado por más familias (n=17), seguido de *Proteobacteria* (n=11), *Bacteroidetes* (n=5), *Actinobacteria* (n=5), *Fusobacteria* (n=1), *Lentisphaerae* (n=1) y *Tenericutes* (n=1).

Cuando comparamos la presencia de estos fillos entre los diferentes miembros de la familia, encontramos que en el hijo afecto de Colitis Ulcerosa, la relación entre *Firmicutes* y *Bacteroidetes* era de aproximadamente 1 (41,80% y 44,23%, respectivamente), mientras que en el resto de los miembros de la familia esta relación fue 3 veces mayor para *Bacteroidetes* (20,98% y 62,15% respectivamente). *Firmicutes* fue el segundo filo más abundante, tanto en los miembros sanos de la unidad familiar como en el hijo enfermo. Dentro de este filo destacaron, sobre todo, *Acidaminococcaceae*, *Clostridiaceae*, *Eubacteriaceae* y *Lachnospiraceae*. El filo *Proteobacteria* se mantuvo más o menos constante entre los diferentes miembros de la familia, aunque el padre tuvo un porcentaje de este filo dos veces mayor que la hija (19,65% y 8,33%, respectivamente). El filo *Actinobacteria* estuvo en un mayor número en el hijo afecto de Colitis Ulcerosa que en el resto de sus familiares, aunque el porcentaje que representó este filo fue muy pequeño en comparación con el resto (<1%). En el resto de los fillos no encontramos diferencias entre los sujetos estudiados, ya que su presencia entre estos individuos fue muy discontinua (Figura 24).

Las familias *Fusobacteriaceae*, *Victivallaceae* y *Spiroplasmataceae* fueron las únicas representantes de los fillos *Fusobacteria*, *Lentisphaerae* y *Tenericutes*. Los fillos *Fusobacteria*, *Lentisphaerae* y *Tenericutes*, así como otras bacterias sin clasificar, al no encontrarse en todos los miembros de la familia, fueron incluidos en el apartado de Otros.

En los cinco sujetos estudiados no se detectó ninguna bacteria de las siguientes familias: *Aerococcaceae*, *Alcaligenaceae*, *Anaerolinaceae*, *Campylobacteraceae*, *Catabacteriaceae*, *Comamonadaceae*, *Erythrobacteraceae*, *Flavobacteriaceae*, *Halomonadaceae*, *Heliobacteriaceae*, *Hyphomicrobiaceae*, *Listeriaceae*, *Methylobacteriaceae*, *Mycobacteriaceae*, *Mycoplasmataceae*, *Neisseriaceae*, *Nocardiaceae*, *Pseudonocardiaceae*, *Rhodocyclaceae*, *Rhodospirillaceae*, *Sphingomonadaceae*, *Streptomycetaceae*, *Thermoanaerobacteriaceae* y *Verrucomicrobiaceae* (Figura 25).



**Figura 24.** Distribución de los principales filos en una familia de cinco miembros con un hijo afecto de Colitis Ulcerosa.

Las familias de microorganismos que estuvieron presentes en una mayor proporción en todos los sujetos fueron *Bacteroidaceae*, *Clostridiaceae* y *Enterobacteriaceae*. Solo cinco familias de bacterias estuvieron presentes, únicamente, en el paciente afecto de Colitis Ulcerosa (*Actinomycetaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Erysipelotrichaceae*, *Pasteurellaceae* y *Streptococcaceae*) aunque en un porcentaje inferior al 1% del total. En cambio, veintidós familias no estuvieron representadas en este paciente, pero sí en el resto de sus familiares (*Aurantimonadaceae*, *Burkholderiaceae*, *Desulfovibrionaceae*, *Entomoplasmataceae*, *Flexibacteraceae*, *Fusobacteriaceae*, *Geobacteraceae*, *Glycomycetaceae*, *Kopriimonadaceae*, *Methylocystaceae*, *Methylophilaceae*, *Microbacteriaceae*, *Micrococcaceae*, *Oxalobacteraceae*, *Paenibacillaceae*, *Planococcaceae*, *Rhizobiaceae*, *Spiroplasmataceae*, *Syntrophomonadaceae*, *Thermolithobacteraceae*, *Turicibacteraceae* y *Victivallaceae*) (Figura 25).

La hermana fue la que presentó un mayor porcentaje de *Bacteroidetes* (79,41%), seguida de la madre (60,35%), el hermano (55,63%) y el padre (53,19%). Este orden se debe fundamentalmente a la contribución que aporta *Porphyromonadaceae* en los miembros femeninos de la familia (madre, 28,73%; hermana, 17,03%), ya que si tenemos en cuenta solo *Bacteroidaceae*, son la hermana (46,23%) y el hermano (45,88) los miembros de la familia que mayor porcentaje tienen en este filo, seguidos del padre (38,60%) y la madre (24,38%).

*Prevotellaceae* estuvo elevada significativamente en el padre (10,56%), respecto al resto, en los que se encontró en porcentajes ínfimos (<1%).

Otro hecho importante encontrado en los miembros femeninos de la familia fue que *Rikenellaceae* estuvo presente en la hermana en un 16,10%, siendo la tercera familia más representada, mientras que en la madre, el porcentaje que representaba fue más bajo, tan solo del 7,03%, aunque mayor que en el resto de los miembros masculinos.

Dentro de *Clostridiaceae*, el padre tuvo un mayor porcentaje (16,42%), seguido del hermano (11,76%) y del enfermo (10,85%). La madre (9,14%) y la hermana (3,89) son los sujetos que tuvieron una menor representación de esta familia.

Es importante destacar en el paciente enfermo con Colitis Ulcerosa que el porcentaje de *Acidaminococcaceae*, *Eubacteriaceae* y *Lachnospiraceae* fue significativamente mayor que el encontrado en el resto de los sujetos (10,24%, 5,52% y 12,11%, respectivamente).

El porcentaje de *Enterobacteriaceae* en la microbiota fecal fue bastante variable, de tal manera que oscilaba entre 19,13% en el padre y 8,33% en la hermana. El hermano afecto tuvo una representación del 12,14%. También hay que destacar que *Syntrophomonadaceae* estuvo presente únicamente en el hermano sano en un porcentaje bastante elevado (8,33%).

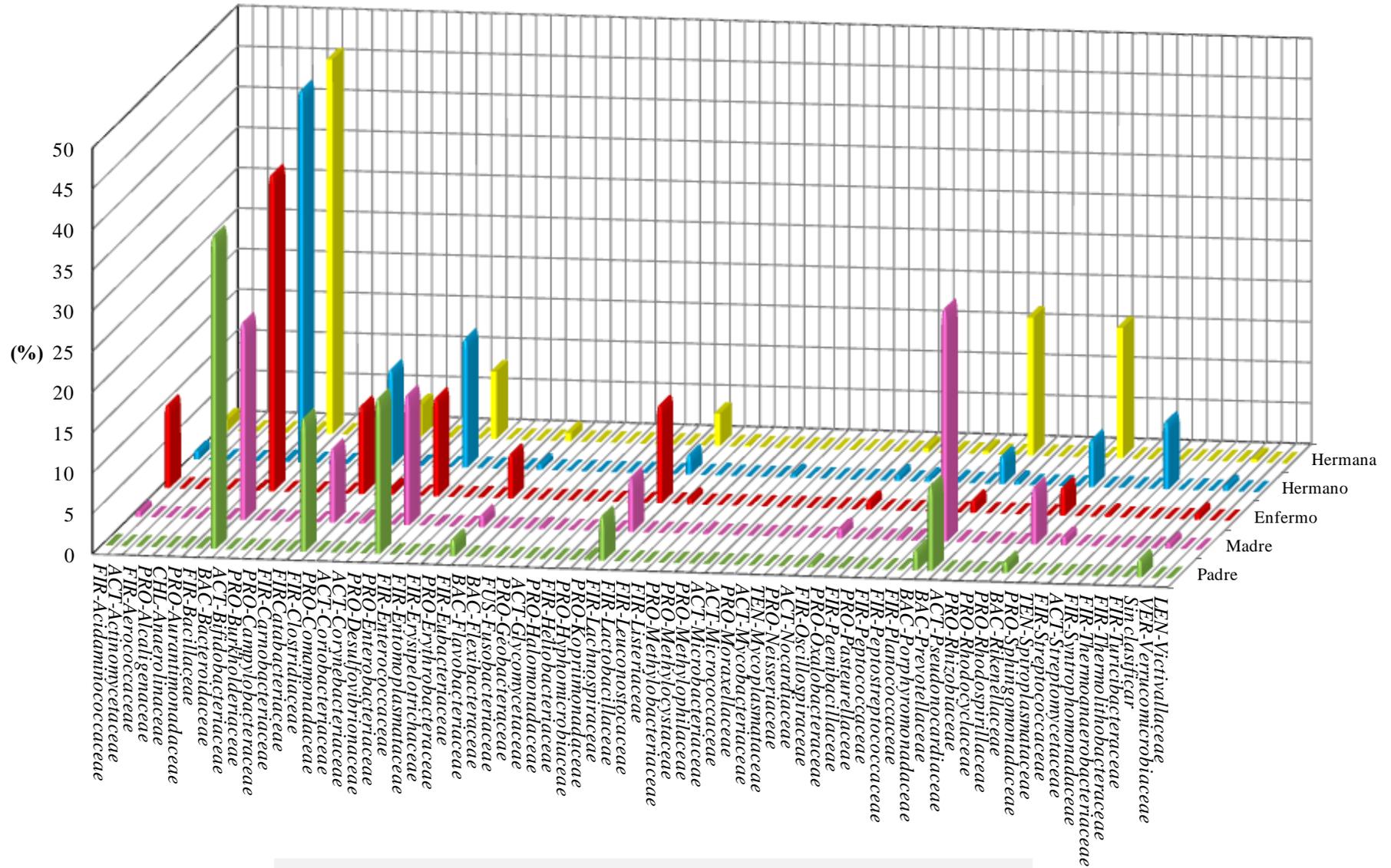


Figura 25. Composición de la microbiota intestinal en todos los miembros de una familia.

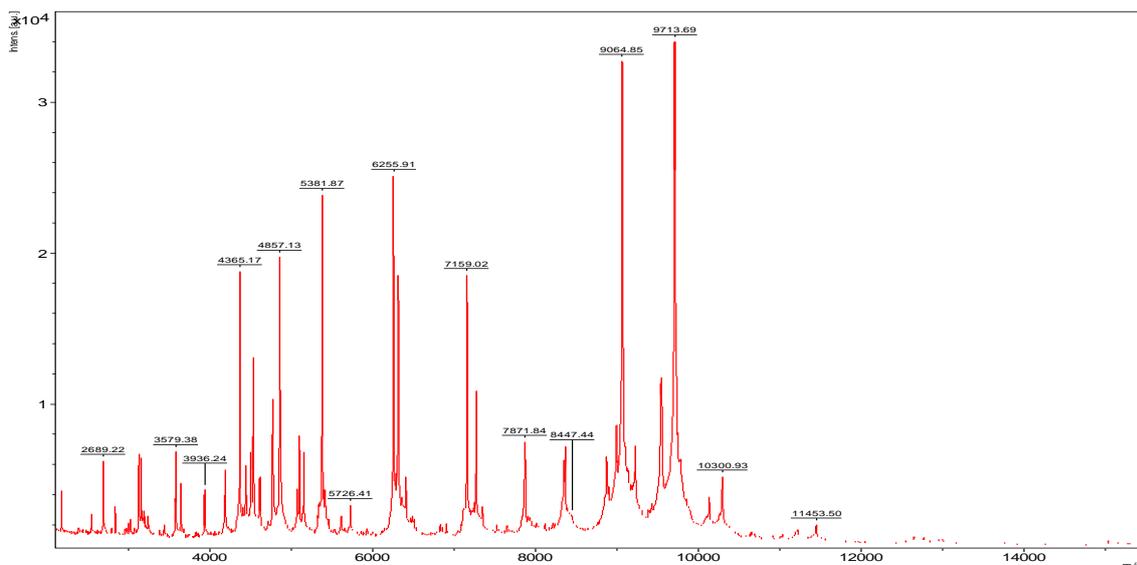
### 2.3. Identificación de especies y cepas de microorganismos mediante la utilización de MALDI-TOF y Campo Pulsado

Una vez analizada la composición cualitativa y cuantitativa de la microbiota intestinal de la familia del paciente con Colitis Ulcerosa mediante técnicas de pirosecuenciación, procedimos a caracterizar las bacterias cultivables más importantes. Para ello, una alícuota de las heces de cada uno de los 5 miembros de la familia se sembró en medios de cultivo, seleccionando varias colonias de cada morfología que pudiera crecer en las placas.

Para limitar el estudio nos centramos en *E. coli* y enterococos como las dos bacterias cultivables más importantes. El objetivo de este apartado fue conocer si los integrantes de la familia compartían clones genéticos de estas especies, o si por el contrario cada uno tenía cepas diferentes.

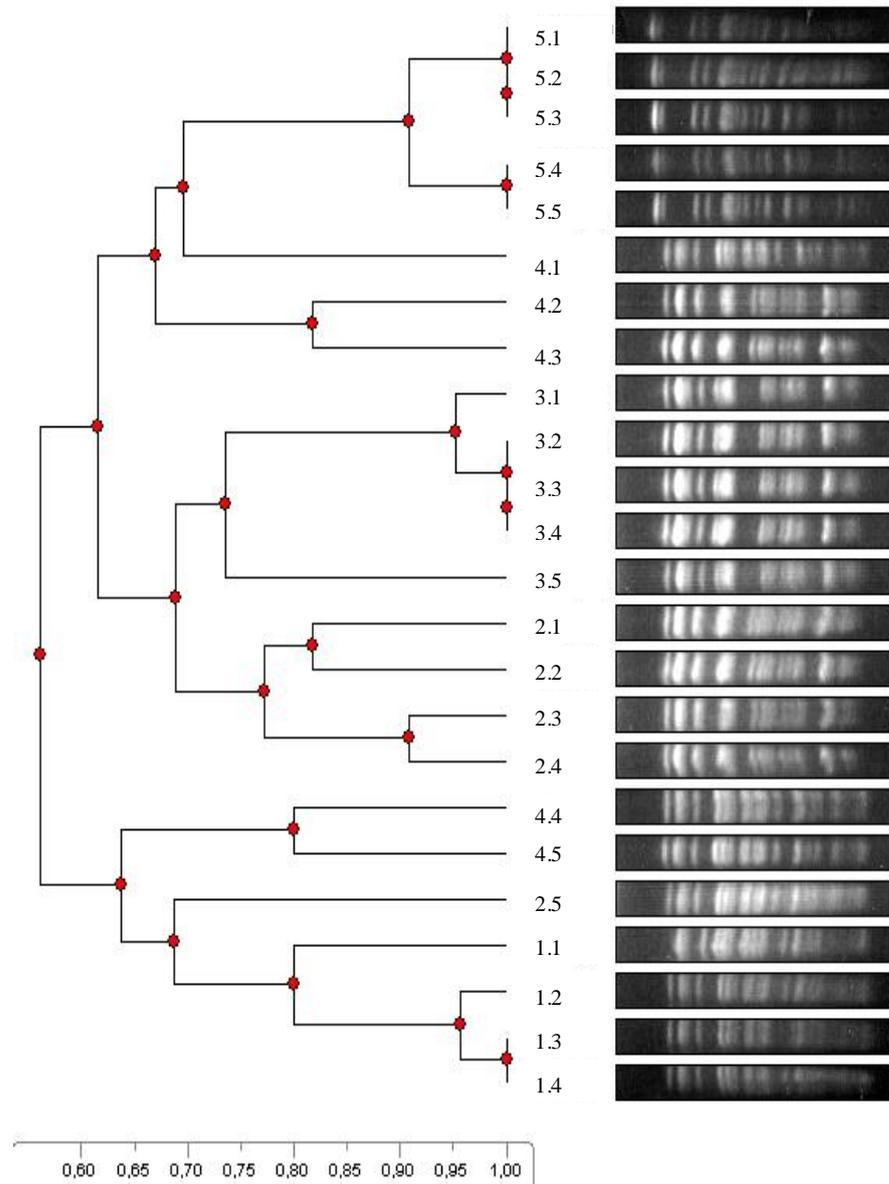
#### 2.3.1. *Escherichia coli*

En primer lugar, identificamos por MALDI-TOF de 4 a 5 colonias de *E. coli* crecidas en el medio MacConkey por cada una de las 5 muestras de heces (Figura 26). Posteriormente, se realizó un Campo Pulsado para comparar las colonias aisladas en cada persona y poder identificar diferentes clones genéticos.



**Figura 26.** Espectro de masas obtenido para un aislado de *E. coli* mediante el sistema MALDI-TOF.

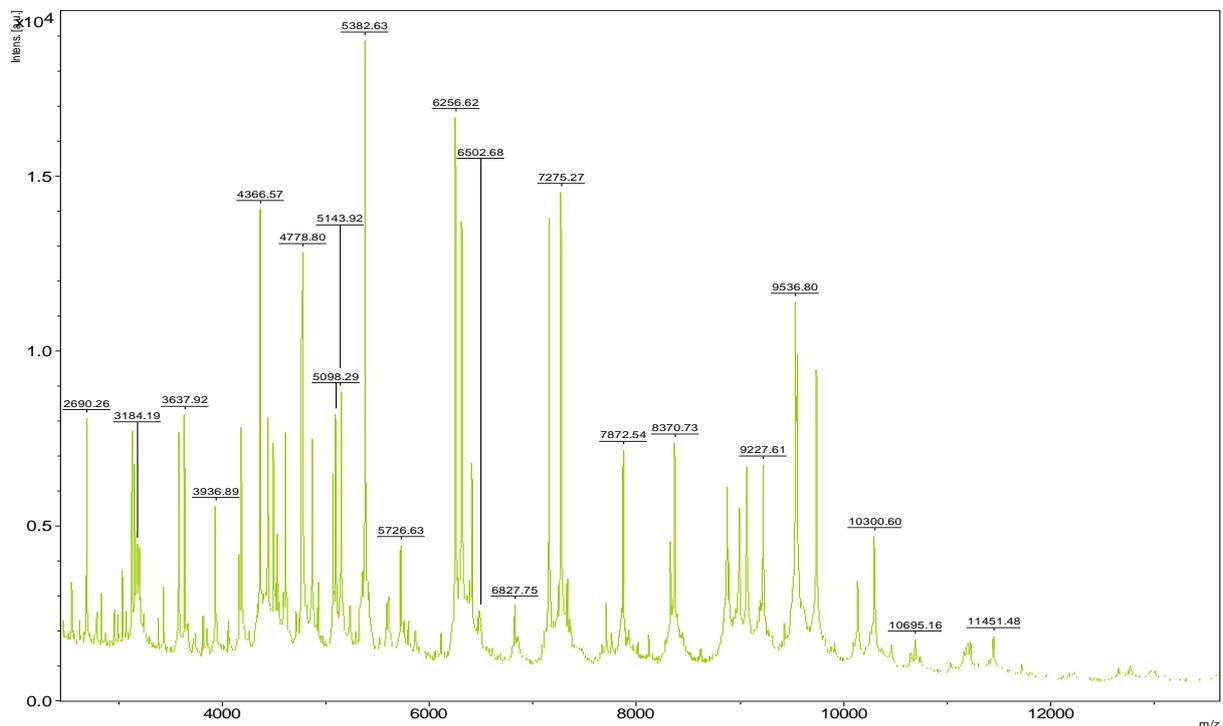
También estudiamos la relación existente entre las cepas detectadas en los distintos miembros de la familia. Los resultados mostraron que el paciente afecto, la madre y la hermana presentaban un único pulsotipo, mientras que en el padre y el hermano coexistían dos pulsotipos diferentes. Los aislados presentes en el sujeto afecto de Colitis Ulcerosa estaban relacionados genéticamente con los aislados del hermano y del padre (Figura 27).



**Figura 27.** Dendrograma obtenido mediante el coeficiente de similitud de Dice con los patrones de Campo Pulsado de las cepas de *E. coli*: 1, Afecto; 2, Hermano; 3, Hermana; 4, Padre; 5, Madre.

### 2.3.2. Enterococos

De forma similar a lo realizado para *E. coli*, en cada uno de los miembros de la familia se seleccionaron 6 colonias de enterococos crecidas en un medio de cultivo selectivo. Estas colonias se identificaron como enterococos mediante el sistema MALDI-TOF (Figura 28), detectando las especies *Enterococcus faecium* y *Enterococcus hirae*. La similitud genética de estas colonias se analizó mediante Campo pulsado (Figura 29).



**Figura 28.** Espectro de masas obtenido por el sistema MALDI-TOF con un aislado de *E. faecium*.

En la madre no se obtuvo ninguna colonia de enterococo, en concordancia con los resultados del análisis de pirosecuenciación, en el que tampoco se detectó presencia de *Enterococcaceae*. Respecto de la especie *E. faecium*, en el sujeto afecto se encontraron 3 pulsotipos, el hermano y el padre tenían dos pulsotipos, y la hermana uno. En el caso de *E. hirae*, el padre tenía dos aislados con patrones de bandas diferentes, mientras que la hermana presentó un único patrón. Curiosamente, no se aisló ninguna cepa de la especie de *Enterococcus faecalis*, la cual suele ser la más abundante dentro del género enterococo (Figura 29).





# Discusión



## V. DISCUSIÓN

El primer estudio en el que se implicó a un microorganismo como posible agente etiológico de la Colitis Ulcerosa, fue el llevado a cabo por Dragstedt y colaboradores en 1941. En este estudio se relacionó la presencia de la especie *Bacterium necrophorum*, actualmente conocido como *Fusobacterium necrophorum*, con la enfermedad. Además se sugirió que este microorganismo jugaba un papel importante en la etiología ya que era el organismo predominante durante los periodos de exacerbación de la enfermedad, mientras que tendía a desaparecer en los periodos de quiescencia. También demostraron que este microorganismo tenía un carácter patógeno, tanto en los conejos como en los seres humanos, debido al aislamiento de este en cultivo puro en una gran variedad de procesos patológicos. Sin embargo también se puede observar la presencia de este microorganismo en el tracto digestivo de monos y de sujetos sanos desde el punto de vista digestivo, por lo que se ha sugerido que añadido a las condiciones adecuadas para su crecimiento, también requiere una serie de factores adicionales para producir necrosis de la mucosa. Una vez iniciado el proceso, el microorganismo parece ser capaz de continuar más fácilmente el mismo (Dragstedt y cols., 1941).

Otros estudios que también han relacionado a este género con la etiología de la Colitis Ulcerosa fueron los llevados a cabo por Ohkusa en 2002 y Minami en 2009, los cuales encontraron que el 61% y el 41 % de los pacientes con Colitis Ulcerosa presentaban anticuerpos en suero frente a *Fusobacterium varium*, frente a un 29% y el 15% de los voluntarios sanos (Ohkusa y cols., 2002; Minami y cols., 2009). Un estudio reciente encontró en la mucosa de los pacientes con Colitis Ulcerosa una mayor cantidad de bacterias reductoras de sulfato con respecto a los sujetos sanos, siendo *Fusobacterium* uno de los géneros que posee esta capacidad (Verma y cols., 2010).

En nuestro caso, también encontramos una densidad elevada de estas bacterias en la mucosa afecta de los pacientes en comparación con la de los voluntarios sanos ( $p < 0,013$ ), lo que hace sospechar del posible papel patogénico que pueden desempeñar en esta enfermedad, en concreto en las zonas necróticas y edematosas donde se localiza el daño tisular. Curiosamente, cuando analizamos la mucosa preservada de estos pacientes encontramos niveles de estas bacterias parecidas a los detectados en sujetos sanos, lo que refuerza la sospecha de que *Fusobacterium* podría ser responsable de la necrosis de la mucosa.

Uno de los grupos de microorganismos más abundantes en la microbiota intestinal es *Bacteroides-Prevotella-Porphyromonas* (Poxton y cols., 1997), y por ello fue incluido en el esquema de PCR-RT. En el análisis se observó una mayor densidad de este grupo en los pacientes, tanto en la mucosa preservada ( $p < 0,014$ ) como en la mucosa afectada ( $p < 0,015$ ). Este resultado coincide con otros trabajos en los que se estudio únicamente la presencia de *Bacteroides*, tanto por cultivo (Ariake y cols., 2000; Matsuda y cols., 2000), hibridación fluorescente *in situ* en seres humanos (Kleessen y cols., 2002) y en animales (Swidsinski y cols., 2005a), como por métodos moleculares como PCR convencional (Lucke y cols., 2006; Wang y cols., 2007c), PCR en tiempo real (Bibiloni y cols., 2006) o mediante la elaboración de bibliotecas genómicas (Rehman y cols., 2010; Walker y cols., 2011). Sin embargo, cuando comparamos la densidad de estas bacterias en la zona de mucosa preservada y en la afectada, no encontramos diferencias. Este hecho había sido previamente descrito (Bibiloni y cols., 2006; Gophna y cols., 2006; Zhang y cols., 2007; Walker y cols., 2011), aunque un estudio basado en el aislamiento de los microorganismos en medios de cultivo si encontró un mayor número de *Bacteroides* en la mucosa inflamada (Fyderek y cols., 2009).

La gran concentración de estas bacterias en el colon podría contribuir al proceso inflamatorio de la enfermedad. En el caso particular de *B. vulgatus* se ha comprobado que produce efectos pro-inflamatorios en varios modelos animales de Colitis Ulcerosa (Onderdonk y cols., 1981; Rath y cols., 1996; Rath y cols., 1999a; Rath y cols., 1999b; Rath, 2002). Por el contrario, en modelos de ratones deficientes en IL-10 o en IL-2, *B. vulgatus* no induce la enfermedad e incluso presenta un carácter protector (Sellon y cols., 1998; Waidmann y cols., 2002; Waidmann y cols., 2003; Kim y cols., 2007). Otras especies de este grupo, como *B. fragilis*, pueden formar parte como componente principal del biofilm que se forma en la mucosa cólica de los pacientes con Enfermedad Inflamatoria Intestinal (Swidsinski y cols., 2005b).

Aunque *B. fragilis* representa solo el 0,1-0,5% de la microbiota del colon en sujetos sanos, este se identifica como el principal microorganismo anaerobio aislado en los coprocultivos de muestras clínicas (Holdeman y cols., 1976; Polk y Kasper, 1977; Doğan y Baysal, 2010; Nagy y Urbán, 2011). Este microorganismo produce una enterotoxina asociada con determinados procesos diarreicos, ya que estimula la producción de IL-8, y esta a su vez contribuye al proceso inflamatorio (Rabizadeh y cols., 2007). Actualmente existen estudios de

inducción de Colitis en ratones con la enterotoxina de *B. fragilis* (Rhee y cols., 2009). Además, el lipopolisacárido de esta especie es la toxina termoestable con mayor actividad (Poxton y Edmond, 1995).

Otros autores han propuesto que la capacidad que tienen los *Bacteroidetes* de producir ácidos grasos de cadena corta podría contribuir a la gravedad de la enfermedad (Wang y cols., 2007c), como puede ocurrir con otros microorganismos como las fusobacterias. Sin embargo, otros estudios encontraron una disminución de *Bacteroides* en la mucosa de los pacientes afectados de Colitis Ulcerosa (Conte y cols., 2006; Zhang y cols., 2007; Ott y cols., 2008; Verma y cols., 2010), aunque no estudiaron paralelamente *Prevotella* y *Porphyromonas*, dos de los principales géneros del filo *Bacteroidetes*, y que en el caso de *Prevotella* constituye el grupo mayoritario en el enterotipo 2 descrito por el grupo que lidera el consorcio Europeo MetaHit (Arumugam y cols., 2011). De hecho, *Porphyromonadaceae* fue encontrada en mayor proporción en pacientes afectados de Colitis Ulcerosa en el estudio realizado por Bibiloni (Bibiloni y cols., 2006), por lo que podría ser uno de los responsables de la mayor cantidad de *Bacteroidetes* en estos pacientes.

Finalmente, también se incluyeron las Bacterias Lácticas en el análisis por PCR-RT, ya que estas bacterias reducen la translocación bacteriana, la adhesión de bacterias patógenas a la mucosa y previene la aparición de Colitis (Madsen y cols., 1999; Caradonna y cols., 2000; Llopis y cols., 2005). En este grupo no encontramos ninguna diferencia en los tres grupos estudiados: voluntarios sanos, mucosa preservada y mucosa afectada de los pacientes, en concordancia con lo anteriormente publicado (Mylonaki y cols., 2005, Bibiloni y cols., 2006, Fyderek y cols., 2009). Por el contrario, otros estudios han descrito una menor población de Bacterias Lácticas en la mucosa cólica de los pacientes afectados de Colitis Ulcerosa, tanto por cultivo (Fabia y cols., 1993) como por PCR convencional (Zhang y cols., 2007) y PCR en tiempo real (Verma y cols., 2010).

La obtención de tejido mediante biopsia es un procedimiento invasivo, sin embargo las heces son una muestra mucho más fácil de obtener y que no implica ningún daño para el paciente. Con el objetivo de comparar si una muestra es equivalente a la otra, en esta tesis se han procesado de forma similar las biopsias y las heces de los sujetos sanos y de los pacientes. Si tratamos de extrapolar los resultados obtenidos en las biopsias con los llevados a cabo en las heces, observamos que no hay una relación clara entre los datos obtenidos en el género

*Fusobacterium*, que presenta niveles altos en las biopsias mientras que en las heces los valores eran similares a los de la población sana. Tampoco encontramos relación con los datos del grupo *Bacteroides-Prevotella-Porphyromonas* ni el grupo de Bacterias Lácticas.

Así pues, en nuestros pacientes no se pueden comparar los datos obtenidos en las biopsias y en las heces, lo que coincide con lo publicado previamente por otros autores (Zoetendal y cols., 2008, Petrosino y cols., 2009, Booijink y cols., 2010, van den Bogert y cols., 2011).

En el análisis de las heces, se pudo observar que la población de fusobacterias no varió entre los sujetos sanos y los individuos afectados de Colitis Ulcerosa. Un estudio basado en la identificación de fragmentos de restricción encontró una mayor cantidad de estos microorganismos en los sujetos afectados en fase activa que en los pacientes en remisión (Andoh y cols., 2007).

Con respecto a la población de *Bacteroidetes* en heces, esta fue mayor en los sujetos sanos que en los pacientes afectados de Colitis Ulcerosa, aunque no de manera significativa. Nuestros datos coinciden con los de otros estudios llevados a cabo para la identificación de *Bacteroides* en heces, tanto por hibridación fluorescente *in situ* (Swidsinski y cols., 2008a) como por técnicas de PCR y posterior electroforesis en gel por gradiente desnaturizante (Noor y cols., 2010). Otros autores no encontraron diferencias significativas en el recuento de *Bacteroides* cuando utilizaron técnicas de hibridación fluorescente *in situ* en pacientes con Colitis Ulcerosa activa (Sokol y cols., 2006a), o técnicas de aislamiento en medios de cultivo específicos (van der Wiel-Korstanje y Winkler, 1975; Giaffer y cols., 1991). Un estudio realizado en gemelos afectados de Colitis Ulcerosa tampoco encontró diferencias en la población de *Bacteroides* en heces analizadas por pirosecuenciación entre este grupo de pacientes y sujetos sanos (Willing y cols., 2010). Otros trabajos llevados a cabo mediante el análisis de las heces mediante PCR y posterior procesamiento mediante enzimas de restricción para la obtención de múltiples fragmentos de diferentes tamaños, tanto en pacientes con Colitis Ulcerosa activa como en remisión, encontraron un menor número de *Bacteroides* en los pacientes en fase activa que en los sujetos sanos, pero un mayor número de estos microorganismos en los sujetos afectados en remisión, aunque casi todos los pacientes estaban diagnosticados de colitis izquierda o pancolitis (Andoh y cols., 2007; Andoh y cols., 2011).

En las heces, la población de Bacterias Lácticas fue variable entre los sujetos sanos y afectados de Colitis Ulcerosa. Esto mismo encontraron otros autores cuando estudiaron las diferencias en la microbiota fecal entre estos dos grupos de individuos mediante el cultivo de las heces en medios específicos (van der Wiel-Korstanje y Winkler, 1975; Giaffer y cols., 1991). Otro estudio encontró mediante hibridación fluorescente *in situ* que los lactobacilos estaban disminuidos en los pacientes con Colitis Ulcerosa activa, mientras que los sujetos afectados en remisión tenían cantidades similares a los sujetos sanos (Bullock y cols., 2004). Andoh y colaboradores sugirieron que la mayor presencia de lactobacilos en las heces de los pacientes afectados en remisión puede ser debido a que el efecto probiótico de estos microorganismos puede ayudar a la inducción de la remisión (Andoh y cols., 2007).

A la hora de estudiar la relación entre la composición de la microbiota y diversos factores, solo tuvimos en cuenta los datos obtenidos mediante el estudio de las biopsias, ya que consideramos que eran mucho más representativos que los obtenidos en las heces. De esta forma se analizó la posible asociación de los tres principales grupos de bacterias estudiados mediante PCR-RT con el Índice Mayo, la localización de la enfermedad, los años de evolución de la enfermedad, el Índice de Geboes, el tratamiento y el consumo de tabaco.

La mayor densidad de fusobacterias se encontró en la mucosa afecta de los pacientes en fase activa ( $p < 0,007$ ), mientras que en remisión los niveles eran parecidos a los encontrados en los sujetos sanos. Esto podría ser debido a que algunas especies del género *Fusobacterium* invaden el moco y la capa mucosa, permaneciendo dentro de las criptas en la fase activa de la enfermedad. La producción de ácido butírico dentro de estas criptas podría tener un impacto directo sobre las células epiteliales (Ohkusa y cols., 2002), al igual que ocurre con *Helicobacter pylori*, el cual puede ser encontrado en la mucosa gástrica de la mayoría de los pacientes con gastritis crónica o úlceras pépticas (Marshall y Warren, 1984), colonizando las capas mucosas del epitelio o invadiendo el epitelio por sí mismo (Marshall y cols., 1985; Chen y cols., 1986). El ácido butírico, propiónico y acético son producidos por las bacterias anaerobias del colon (Cummings y cols., 1987) y es rápidamente absorbido para proporcionar energía al epitelio colorrectal (Scheppach, 1994). Sin embargo, el butirato, propionato y acetato son capaces de inducir apoptosis en algunas líneas celulares de tumores colorrectales (Heerdt y cols., 1994). Probablemente una alteración en el metabolismo del butirato podría estar involucrada en la patogénesis de la Colitis Ulcerosa, ya que los colonocitos de los

pacientes afectados de Colitis Ulcerosa oxidan menor cantidad de ácido butírico que los individuos sanos (Roediger, 1980). Es posible que elevadas concentraciones de ácido butírico no puedan ser del todo metabolizadas por el epitelio del colon, por lo que induzcan apoptosis en las células de la mucosa y causen ulceraciones (Ohkusa y cols., 2003). Además, el ácido butírico activa la apoptosis a través de un mecanismo dependiente de p53, mediante fosforilación. Esto se ha comprobado en pacientes con Colitis Ulcerosa en el foco de la inflamación (Yoshida y cols., 2006; Yoshida y cols., 2011).

Otro resultado interesante fue que en los pacientes con enfermedad activa ( $p < 0,025$ ) y en los que estaban en remisión ( $p < 0,049$ ) se encontró una mayor densidad de *Bacteroides-Prevotella-Porphyromonas* que en los voluntarios sanos. Sin embargo, otros estudios basados en técnicas de hibridación fluorescente *in situ* (Mylonaki y cols., 2005) o en técnicas de PCR convencional (Gophna y cols., 2006) no encontraron diferencias significativas. En un trabajo basado en la utilización de sondas Taqman mediante la tecnología de PCR en tiempo real, como el llevado a cabo por Ott y colaboradores en el 2004, se encontró una reducción del 76,99% de *Bacteroidetes* (*Bacteroides-Prevotella-Porphyromonas*) en la mucosa cólica de 31 pacientes con Colitis Ulcerosa activa en comparación con 46 sujetos sanos. Este estudio no tuvo en cuenta los pacientes afectados de Colitis Ulcerosa en remisión, ya que todos los sujetos tuvieron un índice de actividad clínico mayor de 4 (Ott y cols., 2004). Otro estudio basado en la construcción de librerías genómicas y PCR cuantitativa reveló que en los pacientes con Colitis Ulcerosa activa de mayor gravedad, el porcentaje de *Bacteroidetes* estaba disminuido en relación a los pacientes en remisión y a los sujetos sanos (Frank y cols., 2007). Esta discrepancia con respecto a nuestro estudio podría explicarse por los diferentes genotipos de la enfermedad, la dieta o las características medioambientales, así como por los efectos de las variaciones inter-individuales entre los pacientes, un número diferente de muestras estudiadas o por la profundidad de la secuencia utilizada.

Respecto de las Bacterias Lácticas no encontramos ninguna diferencia en la población de este grupo entre los sujetos sanos y los pacientes afectados con esta enfermedad.

Los pacientes con localización rectosigmoidea y de colon izquierdo (E2) presentaron una mayor densidad de población del género *Fusobacterium* que el resto ( $p < 0,003$ ). Verna y colaboradores en el año 2004, encontraron un caso de trombosis venosa portal por *Fusobacterium nucleatum* en un paciente afecto de Colitis Ulcerosa de localización

rectosigmoidea (E2). Este paciente no había sido sometido a ningún procedimiento dental en los meses previos, por lo que probablemente la trombosis venosa portal se debía a una translocación de este microorganismo desde el lumen intestinal al torrente sanguíneo, debido a la alteración que tiene lugar en la arquitectura de la mucosa intestinal en los pacientes con Colitis Ulcerosa (Verna y cols., 2004).

El grupo *Bacteroidetes* no se relacionó con ninguna localización específica, siendo mayor su población en los pacientes sin alteraciones visibles en la colonoscopia. Esto se correlaciona con lo anteriormente comentado, donde tanto los pacientes en remisión como aquellos con una puntuación en la Escala Mayo inferior a 4 ( $p < 0,012$ ) tenían niveles mayores que disminuían cuando la gravedad de la enfermedad era mayor. Nuestros resultados están en concordancia con lo previamente publicado (Fujita y cols., 2002). Esto apunta a que este grupo de bacterias podría estar implicado al comienzo de la enfermedad, para luego ir perdiendo importancia conforme aumenta la gravedad de esta.

En ninguno de los subtipos de la enfermedad encontramos ninguna relación con la cantidad de Bacterias Lácticas, siendo los niveles parecidos a los de los sujetos sanos.

La edad media de comienzo de la enfermedad en nuestros pacientes fue de 39 años ( $\pm 16,58$ ), similar a la encontrada en otros estudios (Roth y cols., 2010; Vahedi y cols., 2009; Lakatos y cols., 2011). Algunos estudios han confirmado que al comienzo de la Colitis Ulcerosa, los pacientes más jóvenes padecen un curso inicial más agresivo que las personas mayores de 65 años recién diagnosticadas (Louis y cols., 2010; Portela y cols., 2010). Roth y colaboradores realizaron un seguimiento a 102 pacientes diagnosticados de Colitis Ulcerosa y observaron, que en los primeros 5 años de la enfermedad los pacientes tenían una puntuación en el índice Mayo mayor que aquellos diagnosticados con más de 5 años de evolución, por lo que presentaban una mayor gravedad de la enfermedad y un peor pronóstico (Roth y cols., 2010). Esto se corresponde con los datos de nuestros pacientes, que durante los primeros 5 años, la gravedad de los brotes fue mayor que en los pacientes con más años de evolución. En relación con esto, se detectaron mayores niveles de *Fusobacterium* spp. en los pacientes con menor tiempo de evolución. Una de las teorías actuales que implican a los microorganismos como agentes etiológicos de la enfermedad, es la hipótesis de los dos componentes, propuesta por Maratka y Wagner en 1963. Esta hipótesis reforzaría nuestros resultados, ya que *Fusobacterium* spp. podría ser el segundo componente que aparece en las lesiones primarias,

produciendo las formas graves de Colitis Ulcerosa, y este podría ser el motivo de la aparición de complicaciones locales y sistémicas, así como de la naturaleza ulcerosa de las fases avanzadas de la enfermedad.

En nuestros pacientes, la población de fusobacterias disminuyó entre los 6 y 10 años desde el comienzo de la enfermedad, para volver a aumentar a partir de los 10 años, periodo que se correspondió con un aumento de las recaídas y un mayor riesgo de colostomía en los pacientes afectos (Louis y cols., 2010). Aunque este incremento no es estadísticamente significativo, probablemente por el bajo número de pacientes con más de 10 años de enfermedad (13 pacientes frente a 35 individuos sanos), indica una clara asociación.

La población de *Bacteroidetes* estuvo presente en un mayor número en los primeros años ( $p<0,042$ ;  $p<0,018$ ). Una vez transcurridos 10 años desde el comienzo de la enfermedad, este grupo de bacterias disminuyó. Esta disminución podría deberse a lo dicho anteriormente, aunque se ha descrito que la población de *Bacteroides* disminuye con la edad en todas las personas (Enck y cols., 2009; Rajilić-Stojanović y cols., 2009).

Tampoco encontramos ninguna variación en el grupo de Bacterias Lácticas con el transcurso de la enfermedad. Todos los pacientes estudiados tuvieron más o menos la misma proporción, independientemente de los años que llevaran diagnosticados con la enfermedad.

Cuando analizamos la relación entre *Fusobacterium* spp. y el Índice Geboes, se evidenció una mayor concentración de bacterias con un mayor grado de actividad inflamatoria, destacando la mayor presencia de este género cuando la actividad inflamatoria fue máxima (grado 5,  $p<0,013$ ). Esto podría ser debido al carácter invasivo y pro-inflamatorio en la mucosa que muestran algunas especies del género *Fusobacterium*, como *F. varium* y *F. nucleatum* (Ohkusa y cols., 2009; Strauss y cols., 2011).

Cuando relacionamos la actividad inflamatoria histológica con el tiempo de evolución de la enfermedad, observamos una mayor actividad inflamatoria en los pacientes con menos de 6 años de evolución, mientras que cuando la evolución de la enfermedad era entre 6 y 10 años existía una menor actividad inflamatoria. A partir de los 10 años de evolución, encontramos más pacientes con el máximo grado de actividad inflamatoria (3 pacientes con grado 5). Curiosamente, el único paciente con un grado 5 de actividad inflamatoria y con una duración de la enfermedad entre 6 y 10 años se encontraba en remisión clínica y presentaba

un elevado número de población de *Fusobacterium* spp. (9,74 Log número de copias del gen 16S ARNr/ $\mu$ l). Esto podría ser debido a que, en algunos sujetos, las características microscópicas de la enfermedad pueden persistir mientras que las características macroscópicas son de enfermedad inactiva (Powell-Tuck y cols., 1982; Gomes y cols., 1986; Florén y cols., 1987; Geboes y cols., 2000). Por lo general, hemos encontrado una buena correlación entre los índices histológicos y endoscópicos, especialmente cuando las muestras de biopsia fueron extraídas durante la fase de actividad inflamatoria (D'Haens y cols., 2007).

Por todo esto, podemos decir que existe un paralelismo entre una mayor densidad del género *Fusobacterium* y el comportamiento de la enfermedad a lo largo de los años cuando los índices endoscópicos e histológicos indican enfermedad grave. Sin embargo, en *Bacteroidetes* encontramos un comportamiento totalmente diferente, ya que la mayor densidad de bacterias tuvo lugar cuando no había actividad inflamatoria ( $p < 0,008$ ), de tal manera que su presencia disminuyó a medida que aumentó la actividad inflamatoria. En las Bacterias Lácticas no encontramos ningún dato que nos indique que estén implicadas en la inflamación histológica que tiene lugar durante los periodos de actividad de la enfermedad.

También analizamos la posible relación entre los fármacos prescritos y el número de microorganismos presentes en el colon. El pequeño número de pacientes en cada grupo no nos permitió establecer ninguna diferencia significativa entre ellos, aunque sí el posible efecto del fármaco sobre la población estudiada. De este modo, comprobamos que los pacientes que estaban siendo tratados con fármacos del tipo 5-ASA y azatioprina presentaban un menor número de fusobacterias. El trabajo llevado a cabo por Swidsinski y colaboradores en el año 2007 estudió el impacto de la mesalazina y la azatioprina sobre la concentración de las bacterias presentes en la mucosa cólica de pacientes afectos con Colitis Ulcerosa mediante hibridación fluorescente *in situ*, y observó que los pacientes tratados con azatioprina presentaban una concentración de bacterias en la mucosa cólica 28 veces mayor que en los pacientes tratados con 5-ASA, y estos a su vez, una concentración 1000 veces más baja que los sujetos sanos (Swidsinski y cols., 2007).

Los 5-ASA son fármacos que inhiben la producción de sulfuro de hidrógeno que a su vez es producido por la microbiota anaerobia intestinal después de la fermentación de aminoácidos sulfurados y de la reducción de sulfatos. Estos metabolitos, a elevadas concentraciones, son perjudiciales para las células e inhiben a la citocromo oxidasa, y por lo

tanto, el metabolismo aerobio, pudiendo producir una deficiencia en la energía celular en los pacientes con Colitis Ulcerosa (Roediger y cols., 1993), ya que además, inhiben la oxidación del butirato, principal fuente de energía de los colonocitos (Rowan y cols., 2009). Además, en la mucosa oral, producen un incremento reversible de la permeabilidad del epitelio y una pérdida de la función barrera (Ng y Tonzetich, 1984). La hipótesis de que ciertas toxinas bacterianas podrían ser las causantes de la Colitis Ulcerosa no está demostrada por el momento, pero el sulfuro de hidrógeno es uno de los principales candidatos (Pitcher y Cummings, 1996; Verma y cols., 2010; Fava y cols., 2011).

Las fusobacterias son microorganismos capaces de producir sulfuro de hidrógeno por reducción del sulfato del medio (Claesson y cols., 1990). En un estudio realizado por Edmond y colaboradores, demostraron que los 5-ASA reducían en un 50% los niveles de sulfuro de hidrógeno en heces producidos por *F. necrophorum* obtenido a partir de las heces de pacientes enfermos de Colitis Ulcerosa (Edmond y cols., 2003). Varios estudios demostraron que los 5-ASA también disminuyen el número de bacterias que reducen el sulfato (Edmond y cols., 2003; Swidsinski y cols., 2007), por lo que este podría ser el motivo por el que en nuestro estudio, cuando comparamos el efecto de los 5-ASA sobre *Fusobacterium* spp., los pacientes con Colitis Ulcerosa en remisión presentaron una menor población de fusobacterias que los individuos afectados con enfermedad activa.

Con respecto a la azatioprina, aunque no pudimos comparar el efecto entre los pacientes que estaban en remisión y en fase activa, debido al bajo número que se encontraban bajo este tratamiento (13 pacientes), lo cierto es que la mayoría de los sujetos se encontraban en remisión (10 pacientes) y presentaban valores ligeramente superiores a los encontrados en los pacientes en remisión tratados con 5-ASA (9,48 vs. 9,22 Log), coincidiendo con lo dicho por Swidsinski y colaboradores en el año 2007. En ninguno de los dos tratamientos se observó la disminución de la población de fusobacterias hasta los niveles encontrados en los sujetos sanos.

Los corticoides no inhiben la producción de sulfuros (Edmond y cols., 2003), por lo este fármaco parece no influir sobre la población de fusobacterias. De todos modos, el número de pacientes tratados con este fármaco es muy pequeño, por lo que es difícil tener una conclusión sólida al respecto, aunque si bien es cierto que tres de los cuatro pacientes se encontraban en

fase activa y el paciente que estaba en remisión presentaban un elevado número de fusobacterias (10,00 Log).

Un único paciente que estaba en fase activa, estaba siendo tratado con infliximab para la inducción de la remisión, y presentaba una población de *Fusobacterium* spp. (9,57 Log) similar a la encontrada en los pacientes tratados con 5-ASA y azatioprina. Con este único paciente no pudimos concluir nada, ya que para llegar a ser tratado con infliximab, previamente ha debido ser tratado con todo el arsenal terapéutico disponible para el tratamiento de la Colitis Ulcerosa, por lo que es muy difícil valorar el impacto de este anticuerpo monoclonal sobre la microbiota del colon, ya que sus efectos conocidos son la disminución del TNF- $\alpha$  y la inducción de la apoptosis de los linfocitos en el tejido inflamado (Wilhelm y cols., 2008), y se desconoce el efecto directo que podría ejercer sobre la microbiota intestinal.

Con respecto al efecto de los fármacos sobre la población de *Bacteroidetes*, solo en el grupo de pacientes tratados con corticoides encontramos un menor número de estos microorganismos. Esto podría ser debido a que los glucocorticoides estimulan la secreción de moco e incrementan la reabsorción de agua, aumentando el gradiente de viscosidad dentro de la capa de moco intestinal. Esto mejora la función barrera del moco intestinal, e impide que los microorganismos con capacidad de invasión y adherencia de la mucosa como algunas especies del género *Bacteroides*, puedan alcanzar fácilmente la mucosa. Esto fue demostrado por Swidsinski y colaboradores, los cuales estudiaron por hibridación fluorescente *in situ* el comportamiento de la microbiota intestinal en el colon. De esta manera, observaron, que en los sujetos sanos, las bacterias no estaban en contacto con la mucosa intestinal. De hecho, en el 84% de estos individuos, la pared intestinal estaba recubierta con moco desde el íleon hasta el colon, y este moco impedía que las bacterias estuvieran en contacto directo con la superficie mucosa del colon. Por el contrario, encontraron un denso recubrimiento de bacterias en la superficie intestinal en casi todos los pacientes con Enfermedad Inflamatoria Intestinal. Las bacterias adheridas a las células epiteliales entraron en las criptas y fueron encontradas esporádicamente dentro de las células. Las concentraciones de bacterias en la mucosa fueron mayores en las zonas no inflamadas macroscópicamente que en las regiones inflamadas del intestino, probablemente debido a que los leucocitos reducen el número de bacterias en el moco de las zonas inflamadas del intestino en los pacientes con Enfermedad

Inflamatoria Intestinal. Esto podría inducir que algunas de estas bacterias alcanzaran la pared intestinal, con la consecuente producción de úlceras, fisuras y abscesos (Swidsinski y cols., 2009).

El impacto del tratamiento de la Colitis Ulcerosa no parece tener influencia en la población de las Bacterias Lácticas, si bien es cierto que los pacientes tratados con corticoides fueron los que tenían un número más bajo de estos microorganismos, probablemente por el efecto estimulador de la secreción de moco, que impide que estas bacterias alcancen fácilmente la capa mucosa.

Por otro lado, quisimos ver si existía alguna relación entre el consumo de tabaco y la enfermedad. De los 6 pacientes que fumaban, 4 eran hombres y 2 mujeres, llevaban menos de 10 años diagnosticados de Colitis Ulcerosa y todos menos uno estaban en tratamiento. Tres pacientes se encontraban en fase activa y estaban siendo tratados con 5-ASA, mientras que los que se encontraban en remisión estaban con terapia corticoidea o con azatioprina. Lo más curioso era que todos los pacientes, excepto uno, no presentaban grados de actividad inflamatoria en las biopsias, a pesar de que uno de ellos estaba diagnosticado de un brote moderado con un Índice Mayo de 5. Esto parece evidenciar el efecto antiinflamatorio del tabaco y se corresponde con multitud de estudios que confirman el efecto beneficioso del tabaco en este tipo de pacientes (Kennedy, 1996; Cosnes, 2004; Cosnes y cols., 2004; Lakatos y cols., 2007; van der Heide y cols., 2009; Wahed y cols., 2011). Otro estudio, como el de Roth y colaboradores, encontró una relación negativa entre el consumo de tabaco y la escala de gravedad de la enfermedad (Roth y cols., 2010). El tabaco también estimula la producción de moco, pero no incrementa la viscosidad de este. Una barrera de moco más gruesa explicaría el efecto protector del tabaco (Swidsinski y cols., 2009).

El estudio de las heces por PCR en tiempo real es bastante complejo y se requiere el estudio de una mayor variedad de familias de microorganismos para poder establecer una relación fiable, ya que cambios en determinados grupos bacterianos van acompañados de variaciones bastante complejas en el resto de la microbiota intestinal. Por este motivo, y para poder establecer posibles relaciones entre la microbiota fecal de los individuos, realizamos mediante pirosecuenciación, por un lado, un seguimiento durante un año de la evolución de la microbiota fecal de un sujeto afecto de Colitis Ulcerosa, y por otro lado estudiamos las diferencias en la microbiota fecal entre este sujeto y el resto de miembros de su familia. El

presente trabajo es el único estudio en el que se ha analizado la evolución de la microbiota en un paciente de Colitis Ulcerosa a lo largo de un año.

Se eligió a este paciente para su seguimiento cuando debutó con un brote intenso, y por ello la primera muestra de heces correspondía con el brote. Sin embargo a lo largo del año de seguimiento, el paciente se mantuvo estable en remisión. Dentro del análisis de los datos de composición de la microbiota individual de este paciente, encontramos una relación inversa entre el filo *Bacteroidetes* y los filos *Firmicutes* y *Proteobacteria*. Esta relación se mantuvo constante durante todo el tiempo que duro el estudio. También encontramos una relación inversa entre las familias *Bacteroidaceae* y *Enterobacteriaceae*, *Eubacteriaceae* y *Oscillospiraceae*.

Posteriormente, decidimos analizar una muestra de heces de cada uno de los miembros de la familia con la que convivía el sujeto afecto. En el estudio analizamos los datos de pirosecuenciación y pudimos determinar la presencia o ausencia de 71 familias de microorganismos que pertenecían a 7 filos bacterianos, encontrando diferencias importantes entre los diferentes sujetos que la componían. Así, en los cuatro miembros sanos de la familia, el filo *Bacteroidetes* fue el más abundante. En el sujeto afecto, el filo *Bacteroidetes* también fue el más abundante, aunque en una proporción muy parecida al filo *Firmicutes*, a diferencia del resto de su familia, donde la relación *Firmicutes/Bacteroidetes* fue menor. Nuestros datos también coinciden con otro estudio realizado en gemelos sanos y enfermos de Colitis Ulcerosa por análisis metagenómico mediante pirosecuenciación (Willing y cols., 2010). Otro trabajo llevado a cabo en individuos adultos, también por pirosecuenciación, encontró una proporción del 57% de *Bacteroidetes* (Claesson y cols., 2011). Sin embargo, la mayoría de los trabajos encontrados en la literatura indican que *Bacteroidetes* es el segundo filo más prevalente. Así, un estudio basado en la utilización de microrrays para la determinación de la microbiota intestinal de sujetos sanos encontró en cuatro pacientes que *Bacteroidetes* era el segundo filo más prevalente, por debajo de *Firmicutes* (Paliy y cols., 2009). Otro trabajo basado en el análisis, mediante PCR, del 16S ARNr de las heces de 4 sujetos sanos, encontró un mayor porcentaje de *Firmicutes* que de *Bacteroidetes* (Walker y cols., 2008), aunque este estudio analizó por separado la fracción insoluble de las heces de la fracción líquida de las mismas. Mariat y colaboradores estudiaron la microbiota intestinal por PCR en tiempo real y encontraron que la relación *Firmicutes/Bacteroidetes* era superior a 1 en los adultos, mientras

que en los niños y en las personas mayores, esta relación disminuía a favor de *Bacteroidetes* (Mariat y cols., 2009). Otros autores también confirmaron por técnicas de microrrays (Rajilić-Stojanović y cols., 2009), PCR y clonación (Tap y cols., 2009) que *Bacteroidetes* es el segundo filo más abundante en la microbiota intestinal de los sujetos sanos. Todos estos trabajos fueron llevados a cabo en sujetos que no estaban relacionados genéticamente, y las técnicas usadas para la identificación de la microbiota intestinal no tienen la misma sensibilidad y especificidad que la moderna tecnología de pirosecuenciación. De todos modos, parece claro que los filos *Bacteroidetes* y *Firmicutes* son los grupos microbianos más abundantes (Ley y cols., 2006; Turnbaugh y cols., 2007; Wilson, 2008), aunque el predominio de un grupo sobre otro depende de numerosos factores como la edad, el medio ambiente, el género y el estado de salud de los individuos.

Además, teniendo en cuenta la nueva clasificación de los enterotipos de los sujetos sanos desde el punto de vista digestivo establecida por el consorcio Europeo MetaHit (Arumugam y cols., 2011), encontramos que el padre, el hermano, la hermana y el sujeto afecto presentan el enterotipo 1, ya que la familia *Bacteroidaceae* es la más abundante de su microbiota, en donde *Bacteroides* es su principal representante. En la madre predomina *Porphyromonadaceae*, seguida muy de cerca por *Bacteroidaceae*, y por ello también le atribuimos un enterotipo 1, ya que en el enterotipo 2 el género dominante es *Prevotella*, y en la madre *Prevotellaceae*, familia representada exclusivamente por *Prevotella*, constituye menos del 1 % del total de su microbiota. El enterotipo 3 tampoco parece ser posible, ya que su principal representante, *Ruminococcus*, perteneciente a la familia *Ruminococcaceae* no fue detectado en la microbiota de ninguno de estos individuos.

Nuestro trabajo es el primer estudio en el que se ha tipado la microbiota intestinal de una familia en la que uno de sus miembros es afecto de Colitis Ulcerosa, y hemos podido comprobar las similitudes en la composición cuali y cuantitativa de sus microbiotas. De la misma manera que los hijos de una familia comparten el mismo grupo sanguíneo con sus padres, lo mismo podríamos decir de la microbiota intestinal, aunque se necesitan estudios con un mayor número de familias para confirmar estos indicios (Arumugam y cols., 2011).

En nuestro estudio encontramos que los individuos jóvenes que componen la familia tienen un mayor porcentaje de *Bacteroidaceae* que los adultos. Esto se corresponde con otros estudios en los que los adultos jóvenes tienen un mayor porcentaje de *Bacteroidaceae*, que las

personas mayores, ya que estas bacterias disminuyen con la edad (Enck y cols., 2009; Rajilić-Stojanović y cols., 2009). El porcentaje que representa *Bacteroidaceae* en los individuos estudiados oscila entre el 24 y el 46%. Otros autores coinciden en que esta familia bacteriana es la más abundante en la microbiota intestinal, y está representado por más del 25 % de las bacterias en la microbiota fecal (Wilson y Blitchington, 1996; Wilson y cols., 1997; Franks y cols., 1998; Suau y cols., 1999; Sghir y cols., 2000; Rigottier-Gois y cols., 2003; Arumugam y cols., 2011). Sin embargo, Mueller y colaboradores encontraron que la familia *Clostridiaceae* era más abundante que el grupo *Bacteroides-Prevotella*, aunque no tuvo en cuenta a familias tan importantes en el filo *Bacteroidetes* como *Porphyromonadaceae* (Mueller y cols., 2006). Otro estudio basado en el cultivo de las heces encontró a la familia *Clostridiaceae* como la más abundante de la microbiota intestinal (Delgado y cols., 2006a), probablemente porque no tuvo en cuenta el 80% de la microbiota intestinal que solo es detectada por métodos moleculares. Este grupo de trabajo volvió a tener el mismo resultado cuando comparó el cultivo con técnicas de clonación y secuenciación (Delgado y cols., 2006b), aunque en esta ocasión, solo fueron estudiadas las heces de dos pacientes. Todos estos trabajos cayeron en el error de considerar un único tipo de microbiota intestinal. En nuestro estudio, el porcentaje de la familia *Clostridiaceae* osciló entre 3,89% y 16,42%. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por otros autores (Sghir y cols., 2000) aunque indican que *Clostridiaceae* es la segunda familia más prevalente en las heces de los sujetos sanos (Hayashi y cols., 2003), mientras que en nuestro estudio, familias como *Enterobacteriaceae* fueron encontradas en mayor proporción, desplazando a *Clostridiaceae* a la tercera o cuarta familia más abundante.

*Enterobacteriaceae* fue el principal representante de *Proteobacteria*, el cual fue el tercer filo más representativo de la microbiota intestinal. Aunque en la mayoría de los miembros de la familia en estudio, la presencia de *Enterobacteriaceae* fue mayor que en el sujeto afecto, y esto coincide con otros trabajos (Willing y cols., 2010), la mayor o menor presencia de esta familia, representada principalmente por *E. coli*, es muy controvertida. Mientras que algunos autores proponen un posible papel patógeno de este microorganismo, ya que encontraron una mayor cantidad de esta bacteria en la microbiota activa de pacientes con Colitis Ulcerosa (Sokol y cols., 2006b), otros estudios destacaron el papel beneficioso de la administración de probióticos basados en *E. coli* Nissle 1917 para el mantenimiento de la remisión (Kruis y cols., 2004; Henker y cols., 2008; Matthes y cols., 2010). Un reciente

trabajo que estudió la presencia de factores de virulencia en *E.coli* en 23 pacientes afectados de Colitis Ulcerosa encontró marcadores genéticos de virulencia en un 39,1% de estos individuos, mientras que en los sujetos sanos estos estuvieron ausentes (Thomazini y cols., 2011).

*Actinobacteria* suele encontrarse en la bibliografía entre los cuatro filos más abundante en la microbiota intestinal, con porcentajes que oscilan entre el 0,1% y el 7,6%, en función del sistema de detección utilizado (Li y cols., 2008; Claesson y cols., 2009; Mariat y cols., 2009; Lee y cols., 2011; van den Bogert y cols., 2011). Esto coincidió con nuestro estudio, donde el porcentaje de este filo no alcanzó el 1%.

En último lugar encontramos a los filos *Fusobacteria*, *Tenericutes* y *Lentisphaerae* que se pueden encontrar de manera discontinua entre los sujetos sanos. Es importante destacar que no encontramos más filos presentes en el hijo enfermo, lo que confirma que los sujetos afectados de Colitis Ulcerosa tienen una menor diversidad en su microbiota intestinal, lo que coincide con otros estudios (Lepage y cols., 2011; Michail y cols., 2011). Además, en el resto de los individuos aparecen 22 familias microbianas que no estuvieron presentes en el sujeto afecto.

*Eubacteriaceae* estuvo presente en todos los individuos, aunque en mayor proporción en el paciente afecto de Colitis Ulcerosa. La presencia de esta familia en la microbiota intestinal parece ser habitual, ya que varios estudios indican que este grupo de bacterias parecen formar parte del núcleo filogenético de la microbiota (Swidsinski y cols., 2008b; Claesson y cols., 2009; Tap y cols., 2009; Nam y cols., 2011) y es uno de los principales representantes del filo *Firmicutes* (Andersson y cols., 2008). No sabemos si la mayor presencia de estas bacterias en el paciente afecto de Colitis Ulcerosa podría tener algún efecto negativo o positivo sobre la microbiota intestinal del sujeto, aunque la mayoría de las especies de esta familia, como *Eubacterium hallii* tienen la capacidad de producir butirato a partir de lactato, el cual a su vez es un sustrato fundamental para las bacterias productoras de sulfuros (Belenguer y cols., 2007), por lo que podrían tener un papel beneficioso a través de la competición con estas bacterias por dicho sustrato. Otras especies como *Eubacterium limosum* han demostrado ser beneficiosas como probióticos, mediante la estimulación, en pacientes con Enfermedad Inflamatoria Intestinal, del crecimiento del epitelio intestinal y la inhibición de la producción de IL-6 (Kanauchi y cols., 2005).

*Acidaminococcaceae* estuvo presente en el hijo afecto de Colitis Ulcerosa en un porcentaje bastante alto en comparación con el resto de su familia. Esto podría ser debido a que en *Acidaminococcaceae* hay géneros que son capaces de inhibir la metanogénesis y la producción de sulfuros mediante la competición por el hidrógeno (H<sub>2</sub>), para así poder reducir determinadas isoflavonas (Bolca y Verstraete, 2010). No todos los sujetos tienen la propiedad de reducir estas isoflavonas, ya que las bacterias que tienen esta capacidad solo se encuentran en el 30-50% de la población (Lampe, 2009; Magee, 2011). Este podría ser uno de los motivos por el que esta familia de bacterias está incrementada en relación a los sujetos sanos, ya que estos microorganismos intentarían competir con las bacterias que reducen el sulfato, disminuyendo su número.

Otra familia de microorganismos que destacó en la microbiota intestinal del hijo afecto de Colitis Ulcerosa es *Lachnospiraceae*, la cual fue la tercera más abundante, con un porcentaje prácticamente idéntico al de *Enterobacteriaceae*. Willing y colaboradores también encontraron una mayor cantidad de estas bacterias en sujetos afectados de Colitis Ulcerosa (Willing y cols., 2010). También se ha encontrado elevada esta familia en otros procesos patológicos como el síndrome del intestino irritable (Krogius-Kurikka y cols., 2009). Turnbaugh y colaboradores detectaron un 5,7% de esta familia microbiana en gemelos idénticos sin enfermedad (Turnbaugh y cols., 2010), datos que se aproximan bastante a los encontrados en nuestro estudio (4,6%). Otro trabajo aportó un porcentaje de participación del 23,56% de estas bacterias en la microbiota fecal de los sujetos sanos (Gosalbes y cols., 2011). La presencia de esta familia bacteriana es beneficiosa, ya que participa en los procesos de degradación de celulosa y pectina, importante en la fermentación de la fibra a nivel del colon (Rode y cols., 1981). También se ha identificado una nueva especie de esta familia que es capaz de desglicosilar puerarina para formar daidzeína (Braune y Blaut, 2011), una isoflavona que es utilizada por otros grupos bacterianos para captar el H<sub>2</sub> del medio y producir equol, reduciendo la formación de sulfuro de hidrógeno, por lo que podría tener efectos beneficiosos para el ser humano.

La presencia, en mayor porcentaje, de la familia *Porphyromonadaceae* parece estar relacionada con el género femenino, y más especialmente en mujeres adultas, aunque se necesitan estudios en mujeres con un mayor número de individuos para confirmar este hallazgo. Por el contrario, *Prevotellaceae* estuvo en mayor proporción en los varones de la

familia, especialmente en el sujeto de mayor edad (el padre). Esto podría ser debido a que esta familia de microorganismos podría estar relacionada, en mayor número, con el sexo masculino, ya que son la madre y la hermana las dos personas que menor porcentaje tienen. En la hermana, incluso no se detectó su presencia. Un estudio observó que el grupo *Bacteroides-Prevotella* era más predominante en el sexo masculino que en el femenino (Mueller y cols., 2006). Además, estudió si las diferencias a nivel de sexo estaban relacionadas con determinadas especies de *Bacteroides* y no las encontró, por lo que podría ser *Prevotella* la responsable de esto (Mueller y cols., 2006).

La familia *Rikenellaceae* destacó de manera importante en la microbiota intestinal del sexo femenino. Hay muy pocos trabajos acerca de la presencia de esta familia. Apenas se han descrito media docena de especies de estos microorganismos que se han aislado del tracto digestivo y las heces de animales y seres humanos. Uno de los pocos estudios en que se menciona a esta familia en la microbiota intestinal es el llevado a cabo por Willing y colaboradores, en el que no encontraron diferencias significativas entre los sujetos sanos y los pacientes afectados de Colitis Ulcerosa, aunque esta familia de microorganismos fue ligeramente mayor en los sujetos sanos (Willing y cols., 2010).

*Syntrophomonadaceae* solo fue detectada en uno de los sujetos sanos de nuestra familia, y aunque esta familia engloba especies que están casi siempre presentes en una microbiota sana, su ausencia o presencia se debe a numerosos factores como la edad, género, raza, alimentación, medio ambiente o estado de salud.

A diferencia del resto de sus convivientes, en el paciente afecto se constató la presencia exclusiva de *Actinomycetaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Erysipelotrichaceae*, *Pasteurellaceae* y *Streptococcaceae*, aunque su proporción fue muy pequeña. Algunos de los microorganismos integrantes de *Actinomycetaceae*, *Pasteurellaceae* y *Streptococcaceae* pueden ser patógenos del hombre. Se necesitarían más estudios para poder demostrar si algunas de estas familias bacterianas aparecen antes o después del comienzo de la enfermedad, ya que se podrían establecer marcadores de la aparición de esta afección crónica.

En la última parte del trabajo nos centramos en investigar la relación genética de los aislados que colonizan a los integrantes de la familia. Para ello nos centramos en dos de los géneros más importantes de la microbiota cultivable: *E. coli* y enterococos. El sistema

MALDI-TOF identificó correctamente a todos los aislados, pero el patrón de picos observado no permitió comparar los aislados de cada individuo con el resto, y finalmente se realizaron técnicas de Campo Pulsado, que sigue siendo la técnica de referencia para conocer las relaciones genéticas de distintos aislados.

Dos de los sujetos portaban dos pulsotipos diferentes de *E. coli*, y los otros tres uno solo. Los aislados presentes en el sujeto afecto de Colitis Ulcerosa presentaron mayor similitud con los aislados del resto de los varones, mientras que las cepas de los miembros femeninos estuvieron más próximas filogenéticamente. En el análisis de los resultados de pirosecuenciación también se detectó una mayor similitud en las microbiotas de los varones por un lado y en la de las mujeres por otro.

Respecto de los pulsotipos de enterococos, nos pareció muy interesante la ausencia de la especie *E. faecalis*, que suele ser la más frecuente en las heces. La especie predominante fue *E. faecium*, que estuvo presente en todos los individuos excepto en la madre, ya que en esta no se aisló ninguna especie de enterococo. La otra especie que se aisló fue *E. hirae*. Dentro de los aislados de *E. faecium*, dos de los pulsotipos presentes en el sujeto afecto de Colitis Ulcerosa también estaban presentes en el padre y sus hermanos, mientras que estos tuvieron otras cepas distintas que no se identificaron en el paciente objeto de estudio. Además, en el sujeto diagnosticado de Colitis Ulcerosa solo se aisló una especie, mientras que en su hermana y su padre se aislaron dos especies distintas, lo que pone de manifiesto la menor diversidad encontrada en el sujeto afecto en comparación con el resto de los individuos sanos.

Con los resultados anteriores, podemos afirmar que existe una marcada individualidad en la composición de la microbiota intestinal (Hayashi y cols., 2002; Lee y cols., 2011), aunque en el caso de personas convivientes, y de la misma familia, podría existir una circulación de clones entre ellos.



**C**onclusiones



## VI. CONCLUSIONES

1. Se ha detectado de forma significativa una mayor densidad de población de fusobacterias y del grupo *Bacteroides-Prevotella-Porphyromonas* en las biopsias de mucosa cólica afecta en comparación con mucosa sana de pacientes o con mucosa de voluntarios sanos, lo que posiblemente relaciona a estos microorganismos con el daño tisular.
2. Utilizando las mismas técnicas no se han encontrado paralelismos entre la microbiota detectada en las muestras de biopsias y de heces. La realización de colonoscopias con toma de biopsias sigue siendo necesaria para poder estudiar la diversidad microbiana de estos pacientes.
3. En los pacientes en fase activa con brote moderado y proctosigmoiditis o colitis izquierda se ha demostrado una mayor concentración de fusobacterias, lo que sugiere que tienen un papel importante en el agravamiento de la enfermedad.
4. El grupo *Bacteroides-Prevotella-Porphyromonas* es mucho más abundante en periodos de remisión, en brotes leves sin actividad inflamatoria y en los primeros años de la enfermedad.
5. Los estudios de pirosecuenciación permiten conocer de una manera exacta la composición cualitativa y cuantitativa de la microbiota intestinal, detectando diferencias y similitudes entre los miembros de una misma familia.
6. El seguimiento de un paciente de Colitis Ulcerosa durante un año ha permitido conocer la estabilidad en la composición de su microbiota intestinal. Se ha detectado una relación inversa entre la proporción de las familias *Bacteroidaceae* y *Enterobacteriaceae/Eubacteriaceae/Oscillospiraceae*.

7. En relación a los integrantes de su familia, en el paciente afecto de Colitis Ulcerosa se ha observado una reducción de la diversidad de especies y una mayor similitud cualitativa con su padre y su hermano.
  
8. Existe una marcada diferencia individual en la composición de la microbiota intestinal que depende de cada individuo y de multitud de factores que lo rodean, aunque se ha demostrado la circulación de clones de *E. coli* y de enterococos entre familiares.

**B**ibliografía



## VII. BIBLIOGRAFÍA

- ❖ **Ahmadian A, Ehn M, Hober S.** Pyrosequencing: history, biochemistry and future. *Clin Chim Acta.* 2006; 363(1-2):83-94.
- ❖ **Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ.** Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 1990; 215(3):403-10.
- ❖ **Amaral-Zettler L, Peplies J, Ramette A, Fuchs B, Ludwig W, Glöckner FO.** Proceedings of the international workshop on Ribosomal RNA technology, April 7-9, 2008, Bremen, Germany. *Syst Appl Microbiol.* 2008; 31(4):258-68.
- ❖ **Andersson AF, Lindberg M, Jakobsson H, Bäckhed F, Nyrén P, Engstrand L.** Comparative analysis of human gut microbiota by barcoded pyrosequencing. *PLoS One.* 2008; 3(7):e2836.
- ❖ **Andoh A, Imaeda H, Aomatsu T, Inatomi O, Bamba S, Sasaki M, Saito Y, Tsujikawa T, Fujiyama Y.** Comparison of the fecal microbiota profiles between ulcerative Colitis and Crohn's disease using terminal restriction fragment length polymorphism analysis. *J Gastroenterol.* 2011; 46(4):479-86.
- ❖ **Andoh A, Sakata S, Koizumi Y, Mitsuyama K, Fujiyama Y, Benno Y.** Terminal restriction fragment length polymorphism analysis of the diversity of fecal microbiota in patients with ulcerative Colitis. *Inflamm Bowel Dis.* 2007; 13(8):955-62.
- ❖ **Ariake K, Ohkusa T, Sakurazawa T, Kumagai J, Eishi Y, Hoshi S, Yajima T.** Roles of mucosal bacteria and succinic acid in colitis caused by dextran sulfate sodium in mice. *J Med Dent Sci.* 2000; 47(4):233-41.
- ❖ **Arumugam M, Raes J, Pelletier E, Le Paslier D, Yamada T, Mende DR, Fernandes GR, Tap J, Bruls T, Batto JM, Bertalan M, Borruel N, Casellas F, Fernandez L, Gautier L, Hansen T, Hattori M, Hayashi T, Kleerebezem M, Kurokawa K, Leclerc M, Levenez F, Manichanh C, Nielsen HB, Nielsen T, Pons N, Poulain J, Qin J, Sicheritz-Ponten T, Tims S, Torrents D, Ugarte E, Zoetendal EG, Wang J, Guarner F, Pedersen O, de Vos WM, Brunak S, Doré J; MetaHIT Consortium, Antolín M, Artiguenave F, Blottiere HM, Almeida M, Brechot C, Cara C, Chervaux C, Cultrone A, Delorme C, Denariáz G, Dervyn R, Foerstner KU, Friss C, van de Guchte M, Guedon E, Haimet F, Huber W, van Hylckama-Vlieg J, Jamet A, Juste C, Kaci G, Knol J, Lakhdari O, Layec S, Le Roux K, Maguin E, Mérieux A, Melo Minardi R,**

- M'rini C, Muller J, Oozeer R, Parkhill J, Renault P, Rescigno M, Sanchez N, Sunagawa S, Torrejon A, Turner K, Vandemeulebrouck G, Varela E, Winogradsky Y, Zeller G, Weissenbach J, Ehrlich SD, Bork P.** Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*. 2011; 473(7346):174-80.
- ❖ **Bahrami B, Macfarlane S, Macfarlane GT.** Induction of cytokine formation by human intestinal bacteria in gut epithelial cell lines. *J Appl Microbiol*. 2011; 110(1):353-63.
- ❖ **Bambou JC, Giraud A, Menard S, Begue B, Rakotobe S, Heyman M, Taddei F, Cerf-Bensussan N, Gaboriau-Routhiau V.** In vitro and ex vivo activation of the TLR5 signaling pathway in intestinal epithelial cells by a commensal *Escherichia coli* strain. *J Biol Chem* 2004; 279(41):42984–92.
- ❖ **Bankowski MJ, Anderson SM.** Real-time nucleic acid amplification in clinical microbiology. *Clin. Microbiol. Newsl.* 2004; 26:9–15.
- ❖ **Bartlett JM, Stirling D.** A short history of the polymerase chain reaction. *Methods Mol Biol*. 2003; 226:3-6.
- ❖ **Bauer E, Williams BA, Smidt H, Verstegen MW, Mosenthin R.** Influence of the gastrointestinal microbiota on development of the immune system in young animals. *Curr Issues Intest Microbiol* 2006; 7(2):35–51.
- ❖ **Baumgart DC, Carding SR.** Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. *Lancet*. 2007; 369(9573):1627-40.
- ❖ **Belenguer A, Duncan SH, Holtrop G, Anderson SE, Lobley GE, Flint HJ.** Impact of pH on lactate formation and utilization by human fecal microbial communities. *Appl Environ Microbiol*. 2007; 73(20):6526-33.
- ❖ **Bengmark S.** Ecological control of the gastrointestinal tract. The role of probiotic flora. *Gut*. 1998; 42(1):2–7.
- ❖ **Bernstein CN, Singh S, Graff LA, Walker JR, Miller N, Cheang M.** A prospective population-based study of triggers of symptomatic flares in IBD. *Am J Gastroenterol*. 2010; 105(9):1994-2002.
- ❖ **Bianchi Porro G, Panza E.** Smoking, sugar, and inflammatory bowel disease. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1985; 291(6500): 971-972.
- ❖ **Bibiloni R, Mangold M, Madsen KL, Fedorak RN, Tannock GW.** The bacteriology of biopsies differs between newly diagnosed, untreated, Crohn's disease and ulcerative Colitis patients. *J Med Microbiol*. 2006; 55(Pt 8):1141-9.

- ❖ **Birkenfeld S, Zvidi I, Hazazi R, Niv Y.** The prevalence of ulcerative Colitis in Israel: a twenty-year survey. *J Clin Gastroenterol.* 2009; 43(8):743-6.
- ❖ **Bodger K, Halfvarson J, Dodson AR, Campbell F, Wilson S, Lee R, Lindberg E, Järnerot G, Tysk C, Rhodes JM.** Altered colonic glycoprotein expression in unaffected monozygotic twins of inflammatory bowel disease patients. *Gut* 2006; 55(7):973-977.
- ❖ **Bolca S, Verstraete W.** Microbial equol production attenuates colonic methanogenesis and sulphidogenesis in vitro. *Anaerobe.* 2010; 16(3):247-52.
- ❖ **Booijink CC, El-Aidy S, Rajilić-Stojanović M, Heilig HG, Troost FJ, Smidt H, Kleerebezem M, De Vos WM, Zoetendal EG.** High temporal and inter-individual variation detected in the human ileal microbiota. *Environ Microbiol.* 2010; 12(12):3213-27.
- ❖ **Borm ME, van Bodegraven AA, Mulder CJ, Kraal G, Bouma G.** A NFkB1 promoter polymorphism is involved in susceptibility to ulcerative Colitis. *Int J Immunogenet.* 2005; 32(6):401-5.
- ❖ **Brant SR.** Exposed: the genetic underpinnings of ulcerative Colitis relative to Crohn's disease. *Gastroenterology.* 2009; 136(2):396–399.
- ❖ **Brant SR, Shugart YY.** Inflammatory bowel disease gene hunting by linkage analysis: rationale, methodology, and present status of the field. *Inflamm Bowel Dis.* 2004; 10(3):300–311.
- ❖ **Braune A, Blaut M.** Deglycosylation of puerarin and other aromatic C-glucosides by a newly isolated human intestinal bacterium. *Environ Microbiol.* 2011; 13(2):482-94.
- ❖ **Brullet E, Bonfill X, Urrútia G, Ruiz Ochoa V, Cueto M, Clofent J, Martínez Salmerón JF, Riera J, Obrador A.** [Epidemiological study on the incidence of inflammatory bowel disease in 4 Spanish areas. Spanish Group on the Epidemiological Study of Inflammatory Bowel Disease]. *Med Clin (Barc).* 1998; 110(17):651-6.
- ❖ **Bullock NR, Booth JC, Gibson GR.** Comparative composition of bacteria in the human intestinal microflora during remission and active ulcerative Colitis. *Curr Issues Intest Microbiol.* 2004; 5(2):59-64.
- ❖ **Cahill RJ, Foltz CJ, Fox JG, Dangler CA, Powrie F, Schauer DB.** Inflammatory bowel disease: an immunity-mediated condition triggered by bacterial infection with *Helicobacter hepaticus*. *Infect Immunol.* 1997; 65(8):3126–31.

- ❖ **Cani PD, Possemiers S, Van de Wiele T, Guiot Y, Everard A, Rottier O, Geurts L, Naslain D, Neyrinck A, Lambert DM, Muccioli GG, Delzenne NM.** Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability. *Gut*. 2009; 58(8):1091-103.
- ❖ **Caradonna L, Amati L, Magrone T, Pellegrino NM, Jirillo E, Caccavo D.** Enteric bacteria, lipopolysaccharides and related cytokines in inflammatory bowel disease: biological and clinical significance. *J Endotoxin Res*. 2000; 6(3):205-14.
- ❖ **Carbonnel F, Jantchou P, Monnet E, Cosnes J.** Environmental risk factors in Crohn's disease and ulcerative Colitis: an update. *Gastroenterol Clin Biol*. 2009; 33(3):S145-57.
- ❖ **Carter MJ, Lobo AJ, Travis SP.,** for the IBD Section, British Society of Gastroenterology. Guidelines for the management of inflammatory bowel disease in adults. *Gut* 2004; 53(5):V1-16.
- ❖ **Chakravorty S, Helb D, Burday M, Connell N, Alland D.** A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. *J Microbiol Methods*. 2007; 69(2):330-9.
- ❖ **Chen XG, Correa P, Offerhaus J, Rodriguez E, Janney F, Hoffmann E, Fox J, Hunter F, Diavalitsis S.** Ultrastructure of the gastric mucosa harboring Campylobacter-like organisms. *Am J Clin Pathol*. 1986; 86(5):575-82.
- ❖ **Cima RR, Pemberton JH.** Medical and surgical management of chronic ulcerative Colitis. *Arch Surg* 2005; 140(3):300-10.
- ❖ **Citron DM.** Update on the taxonomy and clinical aspects of the genus *Fusobacterium*. *Clin Infect Dis*. 2002 Sep 1; 35(1):S22-7.
- ❖ **Claesson MJ, Cusack S, O'Sullivan O, Greene-Diniz R, de Weerd H, Flannery E, Marchesi JR, Falush D, Dinan T, Fitzgerald G, Stanton C, van Sinderen D, O'Connor M, Harnedy N, O'Connor K, Henry C, O'Mahony D, Fitzgerald AP, Shanahan F, Twomey C, Hill C, Ross RP, O'Toolea PW.** Composition, variability, and temporal stability of the intestinal microbiota of the elderly. *PNAS*. 2011. 108(1):4586-4591.
- ❖ **Claesson MJ, Wang Q, O'Sullivan O, Greene-Diniz R, Cole JR, Ross RP, O'Toole PW.** Comparison of two next-generation sequencing technologies for resolving highly complex microbiota composition using tandem variable 16S rRNA gene regions. *Nucleic Acids Res*. 2010; 38(22):e200.

- ❖ **Claesson MJ, O'Sullivan O, Wang Q, Nikkilä J, Marchesi JR, Smidt H, de Vos WM, Ross RP, O'Toole PW.** Comparative analysis of pyrosequencing and a phylogenetic microarray for exploring microbial community structures in the human distal intestine. *PLoS One*. 2009; 4(8):e6669.
- ❖ **Claesson R, Edlund MB, Persson S, Carlsson J.** Production of volatile sulfur compounds by various *Fusobacterium* species. *Oral Microbiol Immunol*. 1990; 5(3):137-42.
- ❖ **Cockerill FR 3rd.** Application of rapid-cycle real-time polymerase chain reaction for diagnostic testing in the clinical microbiology laboratory. *Arch Pathol Lab Med*. 2003; 127(9):1112-20.
- ❖ **Collins MD, Gibson GR.** Probiotics, prebiotics, and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. *Am J Clin Nutr* 1999; 69(5):1052S-1057S.
- ❖ **Conte MP, Schippa S, Zamboni I, Penta M, Chiarini F, Seganti L, Osborn J, Falconieri P, Borrelli O, Cucchiara S.** Gut-associated bacterial microbiota in paediatric patients with inflammatory bowel disease. *Gut*. 2006; 55:1760–1767.
- ❖ **Cornish J, Tan E, Teare J, Teoh TG, Rai R, Clark SK, Tekkis PP.** A meta-analysis on the influence of inflammatory bowel disease on pregnancy. *Gut*. 2007; 56(6):830-7.
- ❖ **Cosnes J.** Tobacco and IBD: relevance in the understanding of disease mechanisms and clinical practice. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2004; 18(3):481–96.
- ❖ **Cosnes J, Nion-Larmurier I, Afchain P, Beaugerie L, Gendre JP.** Gender differences in the response of Colitis to smoking. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2004; 2(1):41-8.
- ❖ **Cuchacovich R.** Clinical applications of the polymerase chain reaction: an update. *Infect Dis Clin North Am*. 2006; 20(4):735-58, v.
- ❖ **Cummings JH, Pomare EW, Branch WJ, Naylor CP, Macfarlane GT.** Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood. *Gut*. 1987; 28(10):1221-7.
- ❖ **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(a); 51(4):737-43.
- ❖ **Delgado S, Suárez A, Mayo B.** Identification of dominant bacteria in feces and colonic mucosa from healthy Spanish adults by culturing and by 16S rDNA sequence analysis. *Dig Dis Sci*. 2006(b); 51(4):744-51.

- ❖ **Dethlefsen L, Huse S, Sogin ML, Relman DA.** The pervasive effects of an antibiotic on the human gut microbiota, as revealed by deep 16S rRNA sequencing. *PLoS Biol.* 2008; 6(11):e280.
- ❖ **D'Haens G, Sandborn WJ, Feagan BG, Geboes K, Hanauer SB, Irvine EJ, Lémann M, Marteau P, Rutgeerts P, Schölmerich J, Sutherland LR.** A review of activity indices and efficacy end points for clinical trials of medical therapy in adults with ulcerative Colitis. *Gastroenterology.* 2007; 132(2):763-86.
- ❖ **Doğan M, Baysal B.** [Identification of anaerobic bacteria isolated from various clinical specimens and determination of antibiotic susceptibilities]. *Mikrobiyol Bul.* 2010; 44(2):211-9.
- ❖ **Dragstedt LR, Dack GM, Kirsner JB.** Chronic ulcerative colitis: a summary of evidence implicating *bacterium necrophorum* as an etiologic agent. *Ann Surg.* 1941; 114(4):653-62.
- ❖ **Droege M, Hill B.** The Genome Sequencer FLX System--longer reads, more applications, straight forward bioinformatics and more complete data sets. *J Biotechnol.* 2008; 136(1-2):3-10.
- ❖ **Ebeling W, Hennrich N, Klockow M, Metz H, Orth HD, Lang H.** Proteinase K from *Tritirachium album* Limber. *Eur J Biochem.* 1974; 47(1):91-7.
- ❖ **Edmond LM, Hopkins MJ, Magee EA, Cummings JH.** The effect of 5-aminosalicylic acid-containing drugs on sulfide production by sulfate-reducing and amino acid-fermenting bacteria. *Inflamm Bowel Dis.* 2003; 9(1):10-7.
- ❖ **Enck P, Zimmermann K, Rusch K, Schwiertz A, Klosterhalfen S, Frick JS.** The effects of ageing on the colonic bacterial microflora in adults. *Z Gastroenterol.* 2009; 47(7):653-8.
- ❖ **Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM, Buckwalter SP, Jones MF, Vetter EA, Yao JD, Wengenack NL, Rosenblatt JE, Cockerill FR 3rd, Smith TF.** Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clin Microbiol Rev.* 2006; 19(1):165-256.
- ❖ **Fabia R, Ar'Rajab A, Johansson ML, Andersson R, Willén R, Jeppsson B, Molin G, Bengmark S.** Impairment of bacterial flora in human ulcerative Colitis and experimental Colitis in the rat. *Digestion.* 1993; 54(4):248-55.

- ❖ **Falk PG, Hooper LV, Midtvedt T, Gordon JL.** Creating and maintaining the gastrointestinal ecosystem: what we know and need to know from gnotobiology. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1998; 62(4):1157–1170.
- ❖ **Farreras y Rozman.** Medicina Interna. Decimosexta Edición. Volumen 1. 2008.
- ❖ **Fava F, Danese S.** Intestinal microbiota in inflammatory bowel disease: friend of foe? *World J Gastroenterol.* 2011; 17(5):557-66.
- ❖ **Favier CF, Vaughan EE, De Vos WM, Akkermans AD.** Molecular monitoring of succession of bacterial communities in human neonates. *Appl Environ Microbiol.* 2002; 68(1):219-26.
- ❖ **Favier C, Neut C, Mizon C, Cortot A, Colombel JF, Mizon J.** Fecal beta-D-galactosidase production and Bifidobacteria are decreased in Crohn's disease. *Dig Dis Sci.* 1997; 42(4):817-22.
- ❖ **Fitzgerald JM, Marsh TD.** Mesalamine in ulcerative Colitis. *DICP* 1991; 25(2):140-5.
- ❖ **Florén CH, Benoni C, Willén R.** Histologic and colonoscopic assessment of disease extension in ulcerative Colitis. *Scand J Gastroenterol.* 1987; 22(4):459-62.
- ❖ **Fox JG.** *Helicobacter bilis*: bacterial provocateur orchestrates host immune responses to commensal flora in a model of inflammatory bowel disease. *Gut.* 2007; 56(7):898–900.
- ❖ **Frank DN, St Amand AL, Feldman RA, Boedeker EC, Harpaz N, Pace NR.** Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007; 104(34):13780-5.
- ❖ **Franks AH, Harmsen HJ, Raangs GC, Jansen GJ, Schut F, Welling GW.** Variations of bacterial populations in human feces measured by fluorescent *in situ* hybridization with group-specific 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Appl Environ Microbiol.* 1998; 64(9):3336-45.
- ❖ **Friswell M, Campbell B, Rhodes J.** The role of bacteria in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Gut Liver.* 2010; 4(3):295-306.
- ❖ **Fujita H, Eishi Y, Ishige I, Saitoh K, Takizawa T, Arima T, Koike M.** Quantitative analysis of bacterial DNA from *Mycobacteria* spp., *Bacteroides vulgatus*, and *Escherichia coli* in tissue samples from patients with inflammatory bowel diseases. *J Gastroenterol.* 2002; 37(7):509-16.

- ❖ **Furrie E, Macfarlane S, Cummings JH, Macfarlane GT.** Systemic antibodies towards mucosal bacteria in ulcerative Colitis and Crohn's disease differentially activate the innate immune response. *Gut* 2004; 53(1):91–8.
- ❖ **Fyderek K, Strus M, Kowalska-Duplaga K, Gosiewski T, Wedrychowicz A, Jedynek-Wasowicz U, Śladek M, Pieczarkowski S, Adamski P, Kochan P, Heczko PB.** Mucosal bacterial microflora and mucus layer thickness in adolescents with inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 2009; 15(42):5287-94.
- ❖ **Ganz T.** Antimicrobial polypeptides. *J Leukoc Biol.* 2004; 75(1):34-8.
- ❖ **Gassull MA, Gomollón F, Hinojosa J, Obrador A.** Enfermedad Inflamatoria Intestinal. Tercera Edición. 2007.
- ❖ **Geboes K, Riddell R, Ost A, Jensfelt B, Persson T, Löfberg R.** A reproducible grading scale for histological assessment of inflammation in ulcerative Colitis. *Gut.* 2000; 47(3):404-9.
- ❖ **Genta RM, Sonnenberg A.** Non-*Helicobacter pylori* gastritis is common among paediatric patients with inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2012; 35(11):1310-6.
- ❖ **Giaffer MH, Holdsworth CD, Duerden BI.** The assessment of faecal flora in patients with inflammatory bowel disease by a simplified bacteriological technique. *J Med Microbiol.* 1991; 35(4):238-43.
- ❖ **Giebel R, Worden C, Rust SM, Kleinheinz GT, Robbins M, Sandrin TR.** Microbial fingerprinting using matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) applications and challenges. *Adv Appl Microbiol.* 2010; 71:149-84.
- ❖ **Gitter AH, Wullstein F, Fromm M, Schulzke JD.** Epithelial barrier defects in ulcerative Colitis: characterization and quantification by electrophysiological imaging. *Gastroenterology* 2001; 121(6):1320-1328.
- ❖ **Gomes P, du Boulay C, Smith CL, Holdstock G.** Relationship between disease activity indices and colonoscopic findings in patients with colonic inflammatory bowel disease. *Gut.* 1986; 27(1):92-5.
- ❖ **Gophna U, Sommerfeld K, Gophna S, Doolittle WF, Veldhuyzen van Zanten SJ.** Differences between tissue-associated intestinal microfloras of patients with Crohn's disease and ulcerative Colitis. *J Clin Microbiol.* 2006; 44(11):4136-41.

- ❖ **Gosalbes MJ, Durbán A, Pignatelli M, Abellan JJ, Jiménez-Hernández N, Pérez-Cobas AE, Latorre A, Moya A.** Metatranscriptomic approach to analyze the functional human gut microbiota. *PLoS One*. 2011; 6(3):e17447.
- ❖ **Gentschew L, Ferguson LR.** Role of nutrition and microbiota in susceptibility to inflammatory bowel diseases. *Mol Nutr Food Res*. 2012; 56(4):524-35.
- ❖ **Guarner F, Malagelada JR.** Gut microbiota in health and disease. *Lancet*. 2003; 361:512–519.
- ❖ **Halfvarson J, Jess T, Magnuson A, Montgomery SM, Orholm M, Tysk C, Binder V, Järnerot G.** Environmental factors in inflammatory bowel disease: a co-twin control study of a Swedish-Danish twin population. *Inflamm Bowel Dis*. 2006; 12(10):925-33.
- ❖ **Hanauer SB, Sandborn WJ, Kornbluth A, Katz S, Safdi M, Woogen S, Regalli G, Yeh C, Smith-Hall N, Ajayi F.** Delayed-release oral mesalamine at 4.8 g/day (800 mg tablet) for the treatment of moderately active ulcerative Colitis: the ASCEND II trial. *Am J Gastroenterol*. 2005; 100(11):2478-85.
- ❖ **Hansen R, Thomson JM, El-Omar EM, Hold GL.** The role of infection in the aetiology of inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol*. 2010; 45(3):266-76.
- ❖ **Harris K, Kassis A, Major G, Chou CJ.** Is the gut microbiota a new factor contributing to obesity and its metabolic disorders? *J Obes*. 2012; 2012:879151.
- ❖ **Hattori M, Taylor TD.** The human intestinal microbiome: a new frontier of human biology. *DNA Res*. 2009; 16(1):1-12.
- ❖ **Hayashi H, Sakamoto M, Kitahara M, Benno Y.** Molecular analysis of fecal microbiota in elderly individuals using 16S rDNA library and T-RFLP. *Microbiol Immunol*. 2003; 47(8):557-70.
- ❖ **Hayashi H, Sakamoto M, Benno Y.** Phylogenetic analysis of the human gut microbiota using 16S rDNA clone libraries and strictly anaerobic culture-based methods. *Microbiol Immunol*. 2002; 46(8):535-48.
- ❖ **Heerdt BG, Houston MA, Augenlicht LH.** Potentiation by specific short-chain fatty acids of differentiation and apoptosis in human colonic carcinoma cell lines. *Cancer Res*. 1994; 54(12):3288-93.
- ❖ **Hegazy SK, El-Bedewy MM.** Effect of probiotics on pro-inflammatory cytokines and NF-kappaB activation in ulcerative Colitis. *World J Gastroenterol*. 2010; 16(33):4145-51.

- ❖ **Henker J, Müller S, Laass MW, Schreiner A, Schulze J.** Probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 (EcN) for successful remission maintenance of ulcerative Colitis in children and adolescents: an open-label pilot study. *Z Gastroenterol.* 2008; 46(9):874-5.
- ❖ **Herrerías-Gutiérrez JM, Argüelles Arias F, Moreno Gallego M, de Dios Vega J, Martín-Vivaldi Martínez R, Domínguez Macías A, Sánchez Cantos AM, Ferré Alamo A, Manteca R, Vega Sáenz JL, Romero Gómez M, Márquez Galán JL.** Results of survey about specific inflammatory bowel disease units in Andalusia. *Rev Esp Enferm Dig.* 2009; 101(3):187-94.
- ❖ **Ho GT, Moodie FM, Satsangi J.** Multidrug resistance 1 gene (P-glycoprotein 170): an important determinant in gastrointestinal disease? *Gut* 2003; 52(5):759–66.
- ❖ **Holdeman LV, Good IJ, Moore WE.** Human fecal flora: variation in bacterial composition within individuals and a possible effect of emotional stress. *Appl Environ Microbiol.* 1976; 31(3):359-75.
- ❖ **Huber JA, Mark Welch DB, Morrison HG, Huse SM, Neal PR, Butterfield DA, Sogin ML.** Microbial population structures in the deep marine biosphere. *Science.* 2007; 318(5847):97-100.
- ❖ **Husain A, Korzenik JR.** Nutritional issues and therapy in inflammatory bowel disease. *Semin Gastrointest Dis* 1998; 9(1): 21-30.
- ❖ **Hutchison CA 3rd.** DNA sequencing: bench to bedside and beyond. *Nucleic Acids Res.* 2007; 35(18):6227-37.
- ❖ **Hyman ED.** A new method of sequencing DNA. *Anal Biochem.* 1988; 174(2):423-36.
- ❖ **Imaoka A, Shima T, Kato K, Mizuno S, Uehara T, Matsumoto S, Setoyama H, Hara T, Umesaki Y.** Anti-inflammatory activity of probiotic *Bifidobacterium*: enhancement of IL-10 production in peripheral blood mononuclear cells from ulcerative Colitis patients and inhibition of IL-8 secretion in HT-29 cells. *World J Gastroenterol.* 2008; 14(16):2511-6.
- ❖ **Issa M, Vijayapal A, Graham MB, Beaulieu DB, Otterson MF, Lundeen S, Skaros S, Weber LR, Komorowski RA, Knox JF, Emmons J, Bajaj JS, Binion DG.** Impact of *Clostridium difficile* on inflammatory bowel disease. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2007; 5(3):345-51.
- ❖ **Jergens AE, Wilson-Welder JH, Dorn A, Henderson A, Liu Z, Evans RB, Hostetter J, Wannemuehler MJ.** *Helicobacter bilis* triggers persistent immune reactivity to

- antigens derived from the commensal bacteria in gnotobiotic C3H/HeN mice. *Gut*. 2007; 56(7):934–40.
- ❖ **Jousemies-Somer HR.** Recently described clinically important anaerobic bacteria: taxonomic aspects and update. *Clin Infect Dis* 1997; 25(2):S78–87.
  - ❖ **Kalischuk LD, Inglis GD, Buret AG.** *Campylobacter jejuni* induces transcellular translocation of commensal bacteria via lipid rafts. *Gut Pathog* 2009; 1(1):2.
  - ❖ **Kallus SJ, Brandt LJ.** The intestinal microbiota and obesity. *J Clin Gastroenterol*. 2012; 46(1):16-24.
  - ❖ **Kanauchi O, Matsumoto Y, Matsumura M, Fukuoka M, Bamba T.** The beneficial effects of microflora, especially obligate anaerobes, and their products on the colonic environment in inflammatory bowel disease. *Curr Pharm Des*. 2005; 11(8):1047-53.
  - ❖ **Karas M, Bachmann D, Bahr U, Hillenkamp F.** Matrix-assisted ultraviolet laser desorption of non-volatile compounds. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Process*. 1987; 78:53-68.
  - ❖ **Kennedy LD.** Nicotine therapy for ulcerative Colitis. *Ann Pharmacother*. 1996; 30(9):1022-3.
  - ❖ **Kim SC, Tonkonogy SL, Karrasch T, Jobin C, Sartor RB.** Dual-association of gnotobiotic IL-10<sup>-/-</sup> mice with 2 nonpathogenic commensal bacteria induces aggressive pancolitis. *Inflamm Bowel Dis*. 2007; 13(12):1457-66.
  - ❖ **Kim JM, Oh YK, Kim YJ, Oh HB, Cho YJ.** Polarized secretion of CXC chemokines by human intestinal epithelial cells in response to *Bacteroides fragilis* enterotoxin: NF-κB plays a major role in the regulation of IL-8 expression. *Clin Exp Immunol* 2001; 123(3):421–427.
  - ❖ **Kleessen B, Kroesen AJ, Buhr HJ, Blaut M.** Mucosal and invading bacteria in patients with inflammatory bowel disease compared with controls. *Scand J Gastroenterol* 2002; 37(9):1034-1041.
  - ❖ **Kleessen B, Bezirtzoglou E, Matto J.** Cultured-based knowledge on biodiversity, development and stability of human gastrointestinal microbiota. *Microb Ecol Health Dis*. 2000; 2:53–63.
  - ❖ **Koloski NA, Bret L, Radford-Smith G.** Hygiene hypothesis in inflammatory bowel disease: a critical review of the literature. *World J Gastroenterol*. 2008; 14(2):165-73.

- ❖ **Kornbluth A, Sachar DB**, for the Practice Parameters Committee of the American College of Gastroenterology. Ulcerative Colitis practice guidelines in adults (update): American College of Gastroenterology, Practice Parameters Committee. *Am J Gastroenterol* 2004; 99(7):1371-85.
- ❖ **Kotlowski R, Bernstein CN, Sepehri S, Krause DO**. High prevalence of *Escherichia coli* belonging to the B2 and D phylogenetic groups in inflammatory bowel disease. *Gut* 2007; 56(5):669–75.
- ❖ **Krishnan A, Korzenik J**. Inflammatory bowel disease and environmental influences. *Gastroenterol Clin North Am* 2002; 31: 21-40.
- ❖ **Krogius-Kurikka L, Lyra A, Malinen E, Aarnikunnas J, Tuimala J, Paulin L, Mäkivuokko H, Kajander K, Palva A**. Microbial community analysis reveals high level phylogenetic alterations in the overall gastrointestinal microbiota of diarrhoea-predominant irritable bowel syndrome sufferers. *BMC Gastroenterol*. 2009; 9:95.
- ❖ **Kruis W, Fric P, Pokrotnieks J, Lukás M, Fixa B, Kascák M, Kamm MA, Weismueller J, Beglinger C, Stolte M, Wolff C, Schulze J**. Maintaining remission of ulcerative Colitis with the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is as effective as with standard mesalazine. *Gut*. 2004; 53(11):1617-23.
- ❖ **Kuehl CJ, Wood HD, Marsh TL, Schmidt TM, Young VB**. Colonization of the cecal mucosa by *Helicobacter hepaticus* impacts the diversity of the indigenous microbiota. *Infect Immunol*. 2005; 73(10):6952–61.
- ❖ **Lakatos L, Kiss LS, David G, Pandur T, Erdelyi Z, Mester G, Balogh M, Szipocs I, Molnar C, Komaromi E, Laszlo Lakatos P**. Incidence, disease phenotype at diagnosis, and early disease course in inflammatory bowel diseases in Western Hungary, 2002-2006. *Inflamm Bowel Dis*. 2011; 17(12):2558-65.
- ❖ **Lakatos PL, Szamosi T, Lakatos L**. Smoking in inflammatory bowel diseases: good, bad or ugly? *World J Gastroenterol*. 2007; 13(46):6134-9.
- ❖ **Lakatos PL**. Recent trends in the epidemiology of inflammatory bowel diseases: up or down? *World J Gastroenterol*. 2006; 12(38):6102-8.
- ❖ **Lamb-Rosteski JM, Kalischuk LD, Inglis GD, Buret AG**. Epidermal growth factor inhibits *Campylobacter jejuni*-induced claudin-4 disruption, loss of epithelial barrier function, and *Escherichia coli* translocation. *Infect Immun* 2008; 76(8):3390-3398.

- ❖ **Lampe JW.** Is equol the key to the efficacy of soy foods? *Am J Clin Nutr.* 2009; 89(5):1664S-1667S.
- ❖ **Langan RC, Gotsch PB, Krafczyk MA, Skillinge DD.** Ulcerative Colitis: diagnosis and treatment. *Am Fam Physician.* 2007; 76(9):1323-30.
- ❖ **Larsen S, Bendtzen K, Nielsen OH.** Extraintestinal manifestations of inflammatory bowel disease: epidemiology, diagnosis, and management. *Ann Med.* 2010; 42(2):97-114.
- ❖ **Lazarevic V, Whiteson K, Huse S, Hernandez D, Farinelli L, Osterås M, Schrenzel J, François P.** Metagenomic study of the oral microbiota by Illumina high-throughput sequencing. *J Microbiol Methods.* 2009; 79(3):266-71.
- ❖ **Lee JE, Lee S, Sung J, Ko G.** Analysis of human and animal fecal microbiota for microbial source tracking. *ISME J.* 2011; 5(2):362-5.
- ❖ **Lennard-Jones JE.** Classification of inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol Suppl.* 1989; 170:2-6; discussion 16-9.
- ❖ **Lepage P, Häsler R, Spehlmann ME, Rehman A, Zvirbliene A, Begun A, Ott S, Kupcinskas L, Doré J, Raedler A, Schreiber S.** Twin study indicates loss of interaction between microbiota and mucosa of patients with ulcerative colitis. *Gastroenterology.* 2011; 141(1):227-36.
- ❖ **Lepage P, Seksik P, Sutren M, de la Cochetière MF, Jian R, Marteau P, Doré J.** Biodiversity of the mucosa-associated microbiota is stable along the distal digestive tract in healthy individuals and patients with IBD. *Inflamm Bowel Dis.* 2005; 11(5):473-480.
- ❖ **Lewis JD, Chuai S, Nessel L, Lichtenstein GR, Aberra FN, Ellenberg JH.** Use of the noninvasive components of the Mayo score to assess clinical response in ulcerative Colitis. *Inflamm Bowel Dis.* 2008; 14(12):1660-6.
- ❖ **Lewis JD, Aberra FN, Lichtenstein GR, Bilker WB, Brensinger C, Strom BL.** Seasonal variation in flares of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology.* 2004; 126(3):665-73.
- ❖ **Ley RE, Peterson DA, Gordon JI.** Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell.* 2006; 124(4):837-48.
- ❖ **Li X, Sundquist J, Sundquist K.** Educational level and occupation as risk factors for inflammatory bowel diseases: A nationwide study based on hospitalizations in Sweden. *Inflamm Bowel Dis.* 2009; 15(4):608-15.

- ❖ **Li M, Wang B, Zhang M, Rantalainen M, Wang S, Zhou H, Zhang Y, Shen J, Pang X, Zhang M, Wei H, Chen Y, Lu H, Zuo J, Su M, Qiu Y, Jia W, Xiao C, Smith LM, Yang S, Holmes E, Tang H, Zhao G, Nicholson JK, Li L, Zhao L.** Symbiotic gut microbes modulate human metabolic phenotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008; 105(6):2117-22.
- ❖ **Lichtenstein GR, Abreu MT, Cohen R, Tremaine W.** American Gastroenterological Association. American Gastroenterological Association Institute technical review on corticosteroids, immunomodulators, and infliximab in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology.* 2006; 130(3):940-87.
- ❖ **Liu Z, DeSantis TZ, Andersen GL, Knight R.** Accurate taxonomy assignments from 16S rRNA sequences produced by highly parallel pyrosequencers. *Nucleic Acids Res.* 2008; 36(18):e120.
- ❖ **Llopis M, Antolín M, Guarner F, Salas A, Malagelada JR.** Mucosal colonization with *Lactobacillus casei* mitigates barrier injury induced by exposure to trinitrobenzene sulphonic acid. *Gut.* 2005; 54(7):955-9.
- ❖ **López-Serrano P, Pérez-Calle JL, Pérez-Fernández MT, Fernández-Font JM, Boixeda de Miguel D, Fernández-Rodríguez CM.** Environmental risk factors in inflammatory bowel diseases. Investigating the hygiene hypothesis: a Spanish case-control study. *Scand J Gastroenterol.* 2010; 45(12):1464-71.
- ❖ **López-Serrano P, Pérez-Calle JL, Carrera-Alonso E, Pérez-Fernández T, Rodríguez-Caravaca G, Boixeda-de-Miguel D, Fernández-Rodríguez CM.** Epidemiologic study on the current incidence of inflammatory bowel disease in Madrid. *Rev Esp Enferm Dig.* 2009; 101(11):768-72.
- ❖ **Louis E, Belaiche J, Reenaers C.** Do clinical factors help to predict disease course in inflammatory bowel disease? *World J Gastroenterol.* 2010; 16(21):2600-3.
- ❖ **Lucendo AJ, De Rezende LC.** Importance of nutrition in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 2009; 15(17):2081-8.
- ❖ **Lucke K, Miehle S, Jacobs E, Schuppler M.** Prevalence of *Bacteroides* and *Prevotella* spp. in ulcerative Colitis. *J Med Microbiol.* 2006; 55(Pt 5):617-24.
- ❖ **Lukas M, Bortlik M, Maratka Z.** What is the origin of ulcerative Colitis? Still more questions than answers. *Postgrad Med J.* 2006; 82(972):620-5.

- ❖ **MacBeath JR, Harvey SS, Oldroyd NJ.** Automated fluorescent DNA sequencing on the ABI PRISM 377. *Methods Mol Biol.* 2001; 167:119-52.
- ❖ **Maccaferri S, Biagi E, Brigidi P.** Metagenomics: key to human gut microbiota. *Dig Dis.* 2011; 29(6):525-30.
- ❖ **Macfarlane GT, Macfarlane S.** Bacteria, colonic fermentation, and gastrointestinal health. *J AOAC Int.* 2012; 95(1):50-60.
- ❖ **Macfarlane S, Furrie E, Kennedy A, Cummings JH, Macfarlane GT.** Mucosal bacteria in ulcerative Colitis. *Br J Nutr.* 2005; 93 Suppl 1:S67-72.
- ❖ **Macfarlane S, Furrie E, Cummings JH, Macfarlane GT.** Chemotaxonomic analysis of bacterial populations colonizing the rectal mucosa in patients with ulcerative Colitis. *Clin Infect Dis* 2004; 38(12):1690–9.
- ❖ **Mackie RI, Sghir A, Gaskins HR.** Developmental microbial ecology of neonatal gastrointestinal tract. *Am J Clin Nutr.* 1999; 69:1035–1045.
- ❖ **Maconi G, Ardizzone S, Cucino C, Bezzio C, Russo AG, Bianchi Porro G.** Pre-illness changes in dietary habits and diet as a risk factor for inflammatory bowel disease: a case-control study. *World J Gastroenterol.* 2010; 16(34):4297-304.
- ❖ **Madsen KL, Doyle JS, Jewell LD, Tavernini MM, Fedorak RN.** *Lactobacillus* species prevents Colitis in interleukin 10 gene-deficient mice. *Gastroenterology.* 1999; 116(5):1107-14.
- ❖ **Magee PJ.** Is equol production beneficial to health? *Proc Nutr Soc.* 2011; 70(1):10-8.
- ❖ **Maratka Z.** Differential diagnosis of inflammatory bowel diseases and the problem of so called indeterminate Colitis. *Czech Slovak Gastroenterol Hepatol* 2003; 57:8–17.
- ❖ **Maratka Z, Wagner V.** On the role of the autoimmune mechanism in the genesis of ulcerative Colitis. *Acta Allerg* 1963; 18:100–9.
- ❖ **Maratka Z, Wagner V.** The treatment of non-specific ulcerative Colitis by autogenous vaccine. Correlated bacteriological and immunological studies. *Gastroenterology* 1948; 11(1):34–49.
- ❖ **Margulies M, Egholm M, Altman WE, Attiya S, Bader JS, Bembien LA, Berka J, Braverman MS, Chen YJ, Chen Z, Dewell SB, Du L, Fierro JM, Gomes XV, Godwin BC, He W, Helgesen S, Ho CH, Irzyk GP, Jando SC, Alenquer ML, Jarvie TP, Jirage KB, Kim JB, Knight JR, Lanza JR, Leamon JH, Lefkowitz SM, Lei M, Li J, Lohman KL, Lu H, Makhijani VB, McDade KE, McKenna MP, Myers EW,**

- Nickerson E, Nobile JR, Plant R, Puc BP, Ronan MT, Roth GT, Sarkis GJ, Simons JF, Simpson JW, Srinivasan M, Tartaro KR, Tomasz A, Vogt KA, Volkmer GA, Wang SH, Wang Y, Weiner MP, Yu P, Begley RF, Rothberg JM. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature*. 2005; 437(7057):376-80.
- ❖ **Mariat D, Firmesse O, Levenez F, Guimarães V, Sokol H, Doré J, Corthier G, Furet JP.** The *Firmicutes/Bacteroidetes* ratio of the human microbiota changes with age. *BMC Microbiol*. 2009; 9:123.
  - ❖ **Marshall BJ, Armstrong JA, McGeachie DB, Glancy RJ.** Attempt to fulfil Koch's postulates for pyloric *Campylobacter*. *Med J Aust*. 1985; 142(8):436-9.
  - ❖ **Marshall BJ, Warren JR.** Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet*. 1984; 1(8390):1311-5.
  - ❖ **Martin HM, Campbell BJ, Hart CA, Mpofu C, Nayar M, Singh R, Englyst H, Williams HF, Rhodes JM.** Enhanced *Escherichia coli* adherence and invasion in Crohn's disease and colon cancer. *Gastroenterology* 2004; 127(1):80–93.
  - ❖ **Matsuda H, Fujiyama Y, Andoh A, Ushijima T, Kajinami T, Bamba T.** Characterization of antibody responses against rectal mucosa-associated bacterial flora in patients with ulcerative Colitis. *J Gastroenterol Hepatol*. 2000; (1):61-8.
  - ❖ **Matthes H, Krummenerl T, Giensch M, Wolff C, Schulze J.** Clinical trial: probiotic treatment of acute distal ulcerative Colitis with rectally administered *Escherichia coli* Nissle 1917 (EcN). *BMC Complement Altern Med*. 2010; 10:13.
  - ❖ **Mawdsley JE, Rampton DS.** Psychological stress in IBD: new insights into pathogenic and therapeutic implications. *Gut* 2005; 54(10): 1481–91.
  - ❖ **Maxam AM, Gilbert W.** A new method for sequencing DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1977; 74(2):560-4.
  - ❖ **McCartney AL, Wenzhi W, Tannock GW.** Molecular analysis of the composition of the bifidobacterial and *lactobacillus* microflora of humans. *Appl Environ Microbiol*. 1996; 62(12):4608-13.
  - ❖ **McFarland LV.** Normal microbiota: diversity and functions. *Microb Ecol Health Dis*. 2000; 12:193–207.
  - ❖ **McKenna P, Hoffmann C, Minkah N, Aye PP, Lackner A, Liu Z, Lozupone CA, Hamady M, Knight R, Bushman FD.** The macaque gut microbiome in health, lentiviral infection, and chronic enterocolitis. *PLoS Pathog*. 2008; 4(2):e20.

- ❖ **Michail S, Durbin M, Turner D, Griffiths AM, Mack DR, Hyams J, Leleiko N, Kenche H, Stolfi A, Wine E.** Alterations in the gut microbiome of children with severe ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis.* 2011.
- ❖ **Minami M, Ando T, Okamoto A, Sasaki N, Ohkura T, Torii K, Hasegawa T, Ohta M, Goto H.** Seroprevalence of *Fusobacterium varium* in ulcerative colitis patients in Japan. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2009; 56(1):67-72.
- ❖ **Miron N, Cristea V.** Enterocytes: active cells in tolerance to food and microbial antigens in the gut. *Clin Exp Immunol.* 2012; 167(3):405-12.
- ❖ **Moore WEC, Holdeman LV.** Human fecal flora: The normal flora of 20 Japanese–Hawaiians. *Appl. Microbiol.* 1974; 27 (5):961–979.
- ❖ **Mueller S, Saunier K, Hanisch C, Norin E, Alm L, Midtvedt T, Cresci A, Silvi S, Orpianesi C, Verdenelli MC, Clavel T, Koebnick C, Zunft HJ, Doré J, Blaut M.** Differences in fecal microbiota in different European study populations in relation to age, gender, and country: a cross-sectional study. *Appl Environ Microbiol.* 2006; 72(2):1027-33.
- ❖ **Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA.** Manual of Clinical Microbiology. 9<sup>th</sup> Edition. Washington (DC): ASM Press. 2007; Volume 1: 218-44.
- ❖ **Mylonaki M, Rayment NB, Rampton DS, Hudspith BN, Brostoff J.** Molecular characterization of rectal mucosa-associated bacterial flora in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2005; 11(5):481-7.
- ❖ **Naber AH, de Jong DJ.** Assessment of disease activity in inflammatory bowel disease; relevance for clinical trials. *Neth J Med.* 2003; 61(4):105-10.
- ❖ **Nagano Y, Watabe M, Porter KG, Coulter WA, Millar BC, Elborn JS, Goldsmith CE, Rooney PJ, Loughrey A, Moore JE.** Development of a genus-specific PCR assay for the molecular detection, confirmation and identification of *Fusobacterium* spp. *Br J Biomed Sci.* 2007; 64(2):74-7.
- ❖ **Nagasaki A, Takahashi H, Iinuma M, Uchiyama T, Watanabe S, Koide T, Tokoro C, Inamori M, Abe Y, Nakajima A.** Ulcerative Colitis with multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection successfully treated with *Bifidobacterium*. *Digestion.* 2010; 81(3):204-5.
- ❖ **Nagalingam NA, Lynch SV.** Role of the microbiota in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis.* 2012; 18(5):968-84.

- ❖ **Nagy E, Urbán E.** Carl Erik Nord on behalf of the ESCMID Study Group on Antimicrobial Resistance in Anaerobic Bacteria. Antimicrobial susceptibility of *Bacteroides fragilis* group isolates in Europe: 20 years of experience. Clin Microbiol Infect. 2011; 17(3):371-9.
- ❖ **Nam YD, Jung MJ, Roh SW, Kim MS, Bae JW.** Comparative analysis of Korean human gut microbiota by barcoded pyrosequencing. PLoS One. 2011; 6(7):e22109.
- ❖ **Neefs JM, Van de Peer Y, Hendriks L, De Wachter R.** Compilation of small ribosomal subunit RNA sequences. Nucleic Acids Res. 1990; 18 Suppl: 2237-317.
- ❖ **Netea MG, Van der Meer JW, Suttmuller RP, Adema GJ, Kullberg BJ.** From the Th1/Th2 paradigm towards a Toll-like receptor/T-helper bias. Antimicrob Agents Chemother. 2005; 49(10):3991-6.
- ❖ **Ng W, Tonzetich J.** Effect of hydrogen sulfide and methyl mercaptan on the permeability of oral mucosa. J Dent Res. 1984; 63(7):994-7.
- ❖ **Niv Y, Abuksis G, Fraser GM.** Epidemiology of ulcerative Colitis in Israel: a survey of Israeli kibbutz settlements. Am J Gastroenterol. 2000; 95(3):693-8.
- ❖ **Noor SO, Ridgway K, Scovell L, Kemsley EK, Lund EK, Crawford J, Johnson IT, Narbad A.** Ulcerative Colitis and irritable bowel patients exhibit distinct abnormalities of the gut microbiota. BMC Gastroenterol. 2010; 10(1):134.
- ❖ **Nyrén P.** Enzymatic method for continuous monitoring of DNA polymerase activity. Anal Biochem. 1987 Dec; 167(2):235-8.
- ❖ **Nyrén P, Lundin A.** Enzymatic method for continuous monitoring of inorganic pyrophosphate synthesis. Anal Biochem. 1985; 151(2):504-9.
- ❖ **O'Hara AM, Shanahan F.** The gut flora as a forgotten organ. EMBO Rep. 2006; 7(7):688-93.
- ❖ **Ohkusa T, Yoshida T, Sato N, Watanabe S, Tajiri H, Okayasu I.** Commensal bacteria can enter colonic epithelial cells and induce proinflammatory cytokine secretion: a possible pathogenic mechanism of ulcerative Colitis. J Med Microbiol. 2009; 58(5):535-45.
- ❖ **Ohkusa T, Okayasu I, Ogiwara T, Morita K, Ogawa M, Sato N.** Induction of experimental ulcerative Colitis by *Fusobacterium varium* isolated from colonic mucosa of patients with ulcerative Colitis. Gut. 2003; 52(1):79-83.

- ❖ **Ohkusa T, Sato N, Ogihara T, Morita K, Ogawa M, Okayasu I.** *Fusobacterium varium* localized in the colonic mucosa of patients with ulcerative Colitis stimulates species-specific antibody. *J Gastro-Hepatol* 2002; 17(8):849–53.
- ❖ **Onderdonk AB, Franklin ML, Cisneros RL.** Production of experimental ulcerative Colitis in gnotobiotic guinea pigs with simplified microflora. *Infect Immun.* 1981; 32(1):225-31.
- ❖ **Ooi CJ, Fock KM, Makharia GK, Goh KL, Ling KL, Hilmi I, Lim WC, Kelvin T, Gibson PR, Garry RB, Ouyang Q, Sollano J, Manatsathit S, Rerknimitr R, Wei SC, Leung WK, de Silva HJ, Leong RW;** Asia Pacific Association of Gastroenterology Working Group on Inflammatory Bowel Disease. The Asia-Pacific consensus on ulcerative Colitis. *J Gastroenterol Hepatol.* 2010; 25(3):453-68.
- ❖ **Orholm M, Binder V, Sorensen TI, Rasmussen LP, Kyvik KO.** Concordance of inflammatory bowel disease among Danish twins. Results of a nationwide study. *Scand J Gastroenterol.* 2000; 35(10): 1075–1081.
- ❖ **Ott SJ, Plamondon S, Hart A, Begun A, Rehman A, Kamm MA, Schreiber S.** Dynamics of the mucosa-associated flora in ulcerative colitis patients during remission and clinical relapse. *J Clin Microbiol.* 2008; 46(10):3510-3.
- ❖ **Ott SJ, Musfeldt M, Timmis KN, Hampe J, Wenderoth DF, Schreiber S.** In vitro alterations of intestinal bacterial microbiota in fecal samples during storage. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2004; 50(4):237–245.
- ❖ **Ouwehand A, Vesterlund S.** Health aspects of probiotics. *IDrugs* 2003; 6(6):573–580.
- ❖ **Owczarzy R, Moreira BG, You Y, Behlke MA, Walder JA.** Predicting stability of DNA duplexes in solutions containing magnesium and monovalent cations. *Biochemistry.* 2008; 47(19):5336-53.
- ❖ **Pajares JM, Gisbert JP.** Epidemiología de la Enfermedad Inflamatoria Intestinal en España. Una revisión sistemática. *Rev Esp Enferm Dig* 2001; 93: 9-14.
- ❖ **Paliy O, Kenche H, Abernathy F, Michail S.** High-throughput quantitative analysis of the human intestinal microbiota with a phylogenetic microarray. *Appl Environ Microbiol.* 2009; 75(11):3572-9.
- ❖ **Panek JJ, Mazzarello R, Novič M, Jezierska-Mazzarello A.** Impact of Mercury(II) on proteinase K catalytic center: investigations via classical and Born-Oppenheimer molecular dynamics. *Mol Divers.* 2011; 15(1):215-26.

- ❖ **Pavlov AR, Pavlova NV, Kozyavkin SA, Slesarev AI.** Recent developments in the optimization of thermostable DNA polymerases for efficient applications. *Trends Biotechnol.* 2004; 22(5):253-60.
- ❖ **Peran L, Sierra S, Comalada M, Lara-Villoslada F, Bailón E, Nieto A, Concha A, Olivares M, Zarzuelo A, Xaus J, Gálvez J.** A comparative study of the preventative effects exerted by two probiotics, *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus fermentum*, in the trinitrobenzenesulfonic acid model of rat Colitis. *Br J Nutr* 2007; 97(1):96-103.
- ❖ **Perdigon G, de Jorrat WEB, de Petrino SF, Valerde de Budeguer M.** Effect of oral administration of *Lactobacillus casei* on various biological functions of the host. *Food Agric Immunol* 1991; 3:93-102.
- ❖ **Persson PG, Ahlbom A, Hellers G.** Diet and inflammatory bowel disease: a case-control study. *Epidemiology* 1992; 3(1): 47-52.
- ❖ **Petrosino JF, Highlander S, Luna RA, Gibbs RA, Versalovic J.** Metagenomic pyrosequencing and microbial identification. *Clin Chem.* 2009; 55(5):856-66.
- ❖ **Pitcher MC, Cummings JH.** Hydrogen sulphide: a bacterial toxin in ulcerative Colitis? *Gut.* 1996; 39(1):1-4.
- ❖ **Polk BF, Kasper DL.** *Bacteroides fragilis* subspecies in clinical isolates. *Ann Intern Med.* 1977; 86(5):569-71.
- ❖ **Portela F, Magro F, Lago P, Cotter J, Cremers I, de Deus J, Vieira A, Lopes H, Caldeira P, Barros L, Reis J, Carvalho L, Gonçalves R, Campos MJ, Ministro P, Duarte MA, Amil J, Rodrigues S, Azevedo L, Costa-Pereira A.** Ulcerative Colitis in a Southern European country: a national perspective. *Inflamm Bowel Dis.* 2010; 16(5):822-9.
- ❖ **Powell-Tuck J, Day DW, Buckell NA, Wadsworth J, Lennard-Jones JE.** Correlations between defined sigmoidoscopic appearances and other measures of disease activity in ulcerative Colitis. *Dig Dis Sci.* 1982; 27(6):533-7.
- ❖ **Poxton IR, Brown R, Sawyerr A, Ferguson A.** Mucosa-associated bacterial flora of the human colon. *J Med Microbiol.* 1997; 46(1):85-91.
- ❖ **Poxton IR, Edmond DM.** Biological activity of *Bacteroides* lipopolysaccharide--reappraisal. *Clin Infect Dis.* 1995; 20 Suppl 2:S149-53.
- ❖ **Prieto G, Friedman L.** Epidemiología y Evolución Natural de la Enfermedad Inflamatoria Intestinal. *Clínicas de Gastroenterología de Norte América* 1999: 275-308.

- ❖ **Prindiville TP, Sheikh RA, Cohen SH, Tang YJ, Cantrell MC, Silva Jr J.** *Bacteroides fragilis* enterotoxin gene sequences in patients with inflammatory bowel disease. *Emerg Infect Dis* 2000; 6(2):171–174.
- ❖ **Pryde SE, Duncan SH, Hold GL, Stewart CS, Flint HJ.** The microbiology of butyrate formation in the human colon. *FEMS Microbiol Lett.* 2002; 217(2):133–9.
- ❖ **Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, Nielsen T, Pons N, Levenez F, Yamada T, Mende DR, Li J, Xu J, Li S, Li D, Cao J, Wang B, Liang H, Zheng H, Xie Y, Tap J, Lepage P, Bertalan M, Batto JM, Hansen T, Le Paslier D, Linneberg A, Nielsen HB, Pelletier E, Renault P, Sicheritz-Ponten T, Turner K, Zhu H, Yu C, Li S, Jian M, Zhou Y, Li Y, Zhang X, Li S, Qin N, Yang H, Wang J, Brunak S, Doré J, Guarner F, Kristiansen K, Pedersen O, Parkhill J, Weissenbach J; MetaHIT Consortium, Bork P, Ehrlich SD, Wang J.** A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature.* 2010; 464(7285):59-65.
- ❖ **Rabizadeh S, Rhee KJ, Wu S, Huso D, Gan CM, Golub JE, Wu X, Zhang M, Sears CL.** Enterotoxigenic *bacteroides fragilis*: a potential instigator of Colitis. *Inflamm Bowel Dis.* 2007; 13(12):1475-83.
- ❖ **Rajilić-Stojanović M, Heilig HG, Molenaar D, Kajander K, Surakka A, Smidt H, de Vos WM.** Development and application of the human intestinal tract chip, a phylogenetic microarray: analysis of universally conserved phylotypes in the abundant microbiota of young and elderly adults. *Environ Microbiol.* 2009; 11(7):1736-51.
- ❖ **Rakoff-Nahoum S, Medzhitov R.** Role of the innate immune system and host-commensal mutualism. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2006; 308:1–18.
- ❖ **Rath HC.** Role of commensal bacteria in chronic experimental Colitis: lessons from the HLA-B27 transgenic rat. *Pathobiology.* 2002-2003; 70(3):131-8.
- ❖ **Rath HC, Ikeda JS, Linde HJ, Schölmerich J, Wilson KH, Sartor RB.** Varying cecal bacterial loads influences Colitis and gastritis in HLA-B27 transgenic rats. *Gastroenterology.* 1999(a); 116(2):310-9.
- ❖ **Rath HC, Wilson KH, Sartor RB.** Differential induction of Colitis and gastritis in HLA-B27 transgenic rats selectively colonized with *Bacteroides vulgatus* or *Escherichia coli*. *Infect Immun.* 1999(b); 67(6):2969-74.
- ❖ **Rath HC, Herfarth HH, Ikeda JS, Grenther WB, Hamm TE Jr, Balish E, Taurog JD, Hammer RE, Wilson KH, Sartor RB.** Normal luminal bacteria, especially

- Bacteroides* species, mediate chronic Colitis, gastritis, and arthritis in HLA-B27/human beta2 microglobulin transgenic rats. *J Clin Invest*. 1996; 98(4):945-53.
- ❖ **Rehman A, Lepage P, Nolte A, Hellmig S, Schreiber S, Ott SJ.** Transcriptional activity of the dominant gut mucosal microbiota in chronic inflammatory bowel disease patients. *J Med Microbiol*. 2010; 59(Pt 9):1114-22.
  - ❖ **Rhee KJ, Wu S, Wu X, Huso DL, Karim B, Franco AA, Rabizadeh S, Golub JE, Mathews LE, Shin J, Sartor RB, Golenbock D, Hamad AR, Gan CM, Housseau F, Sears CL.** Induction of persistent Colitis by a human commensal, enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*, in wild-type C57BL/6 mice. *Infect Immun*. 2009; 77(4):1708-18.
  - ❖ **Ricciardi R, Ogilvie JW Jr, Roberts PL, Marcello PW, Concannon TW, Baxter NN.** Epidemiology of *Clostridium difficile* Colitis in hospitalized patients with inflammatory bowel diseases. *Dis Colon Rectum* 2009; 52(1):40-45.
  - ❖ **Rigottier-Gois L, Rochet V, Garrec N, Suau A, Doré J.** Enumeration of *Bacteroides* species in human faeces by fluorescent *in situ* hybridisation combined with flow cytometry using 16S rRNA probes. *Syst Appl Microbiol*. 2003; 26(1):110-8.
  - ❖ **Rinttilä T, Kassinen A, Malinen E, Krogius L, Palva A.** Development of an extensive set of 16S rDNA-targeted primers for quantification of pathogenic and indigenous bacteria in faecal samples by real-time PCR. *J Appl Microbiol*. 2004; 97(6):1166-77.
  - ❖ **Rode LM, Genthner BR, Bryant MP.** Syntrophic Association by Cocultures of the Methanol- and CO<sub>2</sub>-H<sub>2</sub>-Utilizing Species *Eubacterium limosum* and Pectin-Fermenting *Lachnospira multiparus* During Growth in a Pectin Medium. *Appl Environ Microbiol*. 1981; 42(1):20-2.
  - ❖ **Rodrigo L, Riestra S, Niño P, Cadahía V, Tojo R, Fuentes D, Moreno M, González Ballina E, Fernández E.** A population-based study on the incidence of inflammatory bowel disease in Oviedo (Northern Spain). *Rev Esp Enferm Dig*. 2004; 96(5):296-305.
  - ❖ **Rodrigues da Cunha L, Ferreira CL, Durmaz E, Goh YJ, Sanozky-Dawes R, Klaenhammer T.** Characterization of *Lactobacillus gasseri* isolates from a breast-fed infant. *Gut Microbes*. 2012; 3(1):15-24.
  - ❖ **Roediger WE.** The colonic epithelium in ulcerative Colitis: an energy-deficiency disease? *Lancet*. 1980; 2(8197):712-5.

- ❖ **Roediger WE, Duncan A, Kapaniris O, Millard S.** Sulphide impairment of substrate oxidation in rat colonocytes: a biochemical basis for ulcerative Colitis? *Clin Sci (Lond)*. 1993; 85(5):623-7.
- ❖ **Roesch LF, Fulthorpe RR, Riva A, Casella G, Hadwin AK, Kent AD, Daroub SH, Camargo FA, Farmerie WG, Triplett EW.** Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. *ISME J*. 2007; 1(4):283-90.
- ❖ **Rogler G.** Medical management of ulcerative Colitis. *Dig Dis*. 2009; 27(4):542-9.
- ❖ **Ronaghi M, Uhlén M, Nyrén P.** A sequencing method based on real-time pyrophosphate. *Science*. 1998; 281(5375):363, 365.
- ❖ **Ronaghi M, Karamohamed S, Pettersson B, Uhlén M, Nyrén P.** Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release. *Anal Biochem*. 1996; 242(1):84-9.
- ❖ **Rook GA.** 99th Dahlem conference on infection, inflammation and chronic inflammatory disorders: darwinian medicine and the 'hygiene' or 'old friends' hypothesis. *Clin Exp Immunol*. 2010; 160(1):70-9.
- ❖ **Rook GA.** Review series on helminths, immune modulation and the hygiene hypothesis: the broader implications of the hygiene hypothesis. *Immunology*. 2009; 126(1):3-11.
- ❖ **Rook GA, Brunet LR.** Chronic inflammatory disorders, the gut and “Old Friends” hypothesis. In: Colombel JF, Gashe C, Scholmerich J, Vucelic B, eds. *Inflammatory bowel disease: translation from basic research to clinical practice*. Falk Symposium. Vol 140. Berlin: Springer, 2005:43–58.
- ❖ **Roth LS, Chande N, Ponich T, Roth ML, Gregor J.** Predictors of disease severity in ulcerative Colitis patients from Southwestern Ontario. *World J Gastroenterol*. 2010; 16(2):232-6.
- ❖ **Rowan FE, Docherty NG, Coffey JC, O'Connell PR.** Sulphate-reducing bacteria and hydrogen sulphide in the aetiology of ulcerative Colitis. *Br J Surg*. 2009, 96(2):151-8.
- ❖ **Royero H.** Enfermedad Inflamatoria Intestinal. *Rev Col Gastroenterol* 2003; 18(1): 24-41.
- ❖ **Russel MG, Dorant E, Brummer RJ, van de Kruijs MA, Muris JW, Bergers JM, Goedhard J, Stockbrugger RW.** Appendectomy an the risk of developing ulcerative Colitis or Crohn's disease: results of a large case- control study South Limburg inflammatory bowel disease study group. *Gastroenterology* 1997; 113(2): 377-382.
- ❖ **Sachar DB.** Maintenance therapy in ulcerative Colitis and Crohn's disease. *J Clin Gastroenterol* 1995; 20(2):117-22.

- ❖ **Sakamoto N, Kono S, Wakai K, Fukuda Y, Satomi M, Shimoyama T, Inaba Y, Miyake Y, Sasaki S, Okamoto K, Kobashi G, Washio M, Yokoyama T, Date C, Tanaka H.** Dietary risk factors for inflammatory bowel disease: a multicenter case-control study in Japan. *Inflamm Bowel Dis* 2005; 11(2): 154-163.
- ❖ **Salyers A.A.** *Bacteroides* of the Human Lower Intestinal-Tract. *Annual Review of Microbiology*, 1984; 38:293-313.
- ❖ **Sanfilippo L, Li CKF, Seth R, Balwin TJ, Menozzi MG, Mahida YR.** *Bacteroides fragilis* enterotoxin induces the expression of IL-8 and transforming growth factor-beta (TFG- $\beta$ ) by human colonic epithelial cells. *Clin Exp Immunol* 2000; 119(3):456-463.
- ❖ **Sang LX, Chang B, Zhang WL, Wu XM, Li XH, Jiang M.** Remission induction and maintenance effect of probiotics on ulcerative Colitis: a meta-analysis. *World J Gastroenterol*. 2010; 16(15):1908-15.
- ❖ **Sanger F, Nicklen S, Coulson AR.** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1977; 74(12):5463-7.
- ❖ **Savage DC.** Gastrointestinal microflora in mammalian nutrition. *Annu Rev Nutr*. 1986; 6:155-78.
- ❖ **Scheppach W.** Effects of short chain fatty acids on gut morphology and function. *Gut*. 1994; 35(1 Suppl):S35-8.
- ❖ **Schwab M, Schaeffeler E, Marx C, Fromm MF, Kaskas B, Metzler J, Stange E, Herfarth H, Schoelmerich J, Gregor M, Walker S, Cascorbi I, Roots I, Brinkmann U, Zanger UM, Eichelbaum M.** Association between the C3435T MDR1 gene polymorphism and susceptibility for ulcerative Colitis. *Gastroenterology*. 2003; 124(1):26-33.
- ❖ **Seksik P, Rigottier-Gois L, Gramet G, Sutren M, Pochart P, Marteau P, Jian R, Doré J.** Alterations of the dominant faecal bacterial groups in patients with Crohn's disease of the colon. *Gut*. 2003; 52(2):237-242.
- ❖ **Sellon RK, Tonkonogy S, Schultz M, Dieleman LA, Grenther W, Balish E, Rennick DM, Sartor RB.** Resident enteric bacteria are necessary for development of spontaneous Colitis and immune system activation in interleukin-10-deficient mice. *Infect Immun*. 1998; 66(11):5224-31.
- ❖ **Sepehri S, Khafipour E, Bernstein CN, Coombes BK, Pilar AV, Karmali M, Ziebell K, Krause DO.** Characterization of *Escherichia coli* isolated from gut biopsies of newly

- diagnosed patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2011; 17(7):1451-63.
- ❖ **Sghir A, Gramet G, Suau A, Rochet V, Pochart P, Dore J.** Quantification of bacterial groups within human fecal flora by oligonucleotide probe hybridization. *Appl Environ Microbiol.* 2000; 66(5):2263-6.
  - ❖ **Shomer NH, Dangler CA, Schrenzel MD, Fox JG.** *Helicobacter bilis*-induced inflammatory bowel disease in scid mice with defined flora. *Infect Immunol.* 1997; 65(11):4858-64.
  - ❖ **Silverberg MS, Satsangi J, Ahmad T, Arnott ID, Bernstein CN, Brant SR, Caprilli R, Colombel JF, Gasche C, Geboes K, Jewell DP, Karban A, Loftus Jr EV, Peña AS, Riddell RH, Sachar DB, Schreiber S, Steinhart AH, Targan SR, Vermeire S, Warren BF.** 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:5-36.
  - ❖ **Singhal S, Dian D, Keshavarzian A, Fogg L, Fields JZ, Farhadi A.** The role of oral hygiene in inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci.* 2011; 56(1):170-5.
  - ❖ **Sogin ML, Morrison HG, Huber JA, Mark Welch D, Huse SM, Neal PR, Arrieta JM, Herndl GJ.** Microbial diversity in the deep sea and the underexplored "rare biosphere". *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006; 103(32):12115-20.
  - ❖ **Sokol H, Seksik P, Furet JP, Firmesse O, Nion-Larmurier I, Beaugerie L, Cosnes J, Corthier G, Marteau P, Doré J.** Low counts of *Faecalibacterium prausnitzii* in Colitis microbiota. *Inflamm Bowel Dis.* 2009; 15(8):1183-9.
  - ❖ **Sokol H, Seksik P, Rigottier-Gois L, Lay C, Lepage P, Podglajen I, Marteau P, Doré J.** Specificities of the fecal microbiota in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2006(a); 12(2):106-11.
  - ❖ **Sokol H, Lepage P, Seksik P, Doré J, Marteau P.** Temperature gradient gel electrophoresis of fecal 16S rRNA reveals active *Escherichia coli* in the microbiota of patients with ulcerative Colitis. *J Clin Microbiol.* 2006(b); 44(9):3172-7.
  - ❖ **Soncini M, Triossi O, Leo P, Magni G, Giglio LA, Mosca PG, Bertelè AM, Pompeo F, Pietrini L, Muratori R, Marone GP, Belfiori V, Sciampa G, Tanzilli A, Azzola E, Ferraris L, Grasso T, Caruso S, Bonocco S, Casanova B, Brambilla G, Frulloni L,**

- D'Offizi V.** Seasonal patterns of hospital treatment for inflammatory bowel disease in Italy. *Digestion*. 2006; 73(1):1-8.
- ❖ **Stellwagen NC, Stellwagen E.** Effect of the matrix on DNA electrophoretic mobility. *J Chromatogr A*. 2009; 1216(10):1917-29.
  - ❖ **Stephansson O, Larsson H, Pedersen L, Kieler H, Granath F, Ludvigsson JF, Falconer H, Ekblom A, Sørensen HT, Nørgaard M.** Congenital abnormalities and other birth outcomes in children born to women with ulcerative Colitis in Denmark and Sweden. *Inflamm Bowel Dis*. 2011; 17(3):795-801.
  - ❖ **Strauss J, Kaplan GG, Beck PL, Rioux K, Panaccione R, Devinney R, Lynch T, Allen-Vercoe E.** Invasive potential of gut mucosa-derived *Fusobacterium nucleatum* positively correlates with IBD status of the host. *Inflamm Bowel Dis*. 2011; 17(9):1971-8.
  - ❖ **Suau A, Bonnet R, Sutren M, Godon JJ, Gibson GR, Collins MD, Doré J.** Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut. *Appl Environ Microbiol*. 1999; 65(11):4799-807.
  - ❖ **Sundquist A, Bigdeli S, Jalili R, Druzin ML, Waller S, Pullen KM, El-Sayed YY, Taslimi MM, Batzoglou S, Ronaghi M.** Bacterial flora-typing with targeted, chip-based Pyrosequencing. *BMC Microbiol*. 2007; 7:108.
  - ❖ **Swidsinski A, Loening-Baucke V, Herber A.** Mucosal flora in Crohn's disease and ulcerative Colitis - an overview. *J Physiol Pharmacol*. 2009; 60(6):61-71.
  - ❖ **Swidsinski A, Loening-Baucke V, Vanechoutte M, Doerffel Y.** Active Crohn's disease and ulcerative Colitis can be specifically diagnosed and monitored based on the biostructure of the fecal flora. *Inflamm Bowel Dis*. 2008(a); 14(2):147-61.
  - ❖ **Swidsinski A, Loening-Baucke V, Verstraelen H, Osowska S, Doerffel Y.** Biostructure of fecal microbiota in healthy subjects and patients with chronic idiopathic diarrhea. *Gastroenterology*. 2008(b); 135(2):568-79.
  - ❖ **Swidsinski A, Loening-Baucke V, Bengmark S, Lochs H, Dörffel Y.** Azathioprine and mesalazine-induced effects on the mucosal flora in patients with IBD Colitis. *Inflamm Bowel Dis*. 2007; 13(1):51-6.
  - ❖ **Swidsinski A, Loening-Baucke V, Lochs H, Hale LP.** Spatial organization of bacterial flora in normal and inflamed intestine: a fluorescence *in situ* hybridization study in mice. *World J Gastroenterol*. 2005(a); 11(8):1131-40.

- ❖ **Swidsinski A, Weber J, Loening-Baucke V, Hale LP, Lochs H.** Spatial organization and composition of the mucosal flora in patients with inflammatory bowel disease. *J Clin Microbiol.* 2005(b); 43(7):3380-9.
- ❖ **Swidsinski A, Ladhoff A, Pernthaler A, Swidsinski S, Loening-Baucke V, Ortner M, Weber J, Hoffmann U, Schreiber S, Dietel M, Lochs H.** Mucosal flora in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology.* 2002; 122(1):44-54.
- ❖ **Tabaqchali S, O'Donoghue DP, Bettelheim KA.** *Escherichia coli* antibodies in patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 1978; 19(2):108-113.
- ❖ **Tabuchi M, Ozaki M, Tamura A, Yamada N, Ishida T, Hosoda M, Hosono A.** Antidiabetic effect of *Lactobacillus* GG in streptozotocin-induced diabetic rats. *Biosci Biotechnol Biochem* 2003; 67(6):1421-1424.
- ❖ **Tamboli CP, Neut C, Desreumaux P, Colombel JF.** Dysbiosis in inflammatory bowel disease. *Gut* 2004; 53(1):1-4.
- ❖ **Tancrède C.** Role of human microflora in health and disease. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1992; 11(11):1012-5.
- ❖ **Tannock GW.** Analysis of the intestinal microflora using molecular methods. *Eur J Clin Nutr.* 2002; 56(4):S44-9.
- ❖ **Tap J, Mondot S, Levenez F, Pelletier E, Caron C, Furet JP, Ugarte E, Muñoz-Tamayo R, Paslier DL, Nalin R, Dore J, Leclerc M.** Towards the human intestinal microbiota phylogenetic core. *Environ Microbiol.* 2009; 11(10):2574-84.
- ❖ **Tappenden KA, Deutsch AS.** The physiological relevance of the intestinal microbiota-contributions to human health. *J Am Coll Nutr.* 2007; 26(6):679S-83S.
- ❖ **Taranto MP, Medici M, Perdigon G, Ruiz Holgado AP, Valdez GF.** Evidence for hypocholesterolemic effect of *Lactobacillus reuteri* in hypercholesterolemic mice. *J Dairy Sci* 1998; 81(9):2336-2340.
- ❖ **Thibault R, Blachier F, Darcy-Vrillon B, de Coppet P, Bourreille A, Segain JP.** Butyrate utilization by the colonic mucosa in inflammatory bowel diseases: a transport deficiency. *Inflamm Bowel Dis.* 2010; 16(4):684-95.
- ❖ **Thiel R, Blaut M.** An improved method for the automated enumeration of fluorescently labelled bacteria in human faeces. *J Microbiol Methods.* 2005; 61(3):369-79.
- ❖ **Thompson AI, Lees CW.** Genetics of ulcerative Colitis. *Inflamm Bowel Dis.* 2011; 17(3):831-48.

- ❖ **Thompson-Chagoyán OC, Maldonado J, Gil A.** La microbiota intestinal en el niño y la influencia de la dieta sobre su composición. *Alim Nutr Salud* 2004; 11:37–48.
- ❖ **Thornton JR, Emmett PM, Heaton KW.** Smoking, sugar, and inflammatory bowel disease. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1985; 290(6484): 1786-1787.
- ❖ **Thukkani N, Williams JL, Sonnenberg A.** Epidemiologic characteristics of patients with inflammatory bowel disease undergoing colonoscopy. *Inflamm Bowel Dis.* 2011; 17(6):1333-7.
- ❖ **Tiihonen K, Ouwehand AC, Rautonen N.** Human intestinal microbiota and healthy ageing. *Ageing Res Rev.* 2010; 9(2):107-16.
- ❖ **Tilg H.** Obesity, metabolic syndrome, and microbiota: multiple interactions. *J Clin Gastroenterol.* 2010; 44 Suppl 1:S16-8.
- ❖ **Thomazini CM, Samegima DA, Rodrigues MA, Victoria CR, Rodrigues J.** High prevalence of aggregative adherent *Escherichia coli* strains in the mucosa-associated microbiota of patients with inflammatory bowel diseases. *Int J Med Microbiol.* 2011; 301(6):475-9.
- ❖ **Torres MI, Rios A.** Current view of the immunopathogenesis in inflammatory bowel disease and its implications for therapy. *World J Gastroenterol.* 2008; 14(13):1972-80.
- ❖ **Tremaroli V, Kovatcheva-Datchary P, Bäckhed F.** A role for the gut microbiota in energy harvesting? *Gut.* 2010; 59(12):1589-90.
- ❖ **Tsai F, Coyle WJ.** The microbiome and obesity: is obesity linked to our gut flora? *Curr Gastroenterol Rep.* 2009; 11(4):307-13.
- ❖ **Turnbaugh PJ, Quince C, Faith JJ, McHardy AC, Yatsunenko T, Niaz F, Affourtit J, Egholm M, Henrissat B, Knight R, Gordon JI.** Organismal, genetic, and transcriptional variation in the deeply sequenced gut microbiomes of identical twins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010; 107(16):7503-8.
- ❖ **Turnbaugh PJ, Hamady M, Yatsunenko T, Cantarel BL, Duncan A, Ley RE, Sogin ML, Jones WJ, Roe BA, Affourtit JP, Egholm M, Henrissat B, Heath AC, Knight R, Gordon JI.** A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature.* 2009; 457(7228):480-4.
- ❖ **Turnbaugh PJ, Ley RE, Hamady M, Fraser-Liggett CM, Knight R, Gordon JI.** The human microbiome project. *Nature.* 2007; 449(7164):804-10.

- ❖ **Tysk C, Järnerot G.** Has smoking changed the epidemiology of ulcerative Colitis? *Scand J Gastroenterol* 1992; 27(6):508-12.
- ❖ **Vahedi H, Merat S, Momtahn S, Olfati G, Kazzazi AS, Tabrizian T, Rashtak S, Khaleghnejad R, Khademi H, Malekzadeh F, Nasseri-Moghaddam S, Malekzadeh R.** Epidemiologic characteristics of 500 patients with inflammatory bowel disease in Iran studied from 2004 through 2007. *Arch Iran Med.* 2009; 12(5):454-60.
- ❖ **Van Cott EM, Wilson GG.** Cloning the *FnuDI*, *NaeI*, *NcoI* and *XbaI* restriction-modification systems. *Gene.* 1988; 74(1):55-9.
- ❖ **van den Bogert B, de Vos WM, Zoetendal EG, Kleerebezem M.** Microarray analysis and barcoded pyrosequencing provide consistent microbial profiles depending on the source of human intestinal samples. *Appl Environ Microbiol.* 2011; 77(6):2071-80.
- ❖ **van der Heide F, Dijkstra A, Weersma RK, Albersnagel FA, van der Logt EM, Faber KN, Sluiter WJ, Kleibeuker JH, Dijkstra G.** Effects of active and passive smoking on disease course of Crohn's disease and ulcerative Colitis. *Inflamm Bowel Dis.* 2009; 15(8):1199-207.
- ❖ **van der Wiel-Korstanje JA, Winkler KC.** The faecal flora in ulcerative Colitis. *J Med Microbiol.* 1975; 8(4):491-501.
- ❖ **VanGuilder HD, Vrana KE, Freeman WM.** Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *Biotechniques.* 2008; 44(5):619-26.
- ❖ **Veiga P, Gallini CA, Beal C, Michaud M, Delaney ML, DuBois A, Khlebnikov A, van Hylckama Vlieg JE, Punit S, Glickman JN, Onderdonk A, Glimcher LH, Garrett WS.** *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* fermented milk product reduces inflammation by altering a niche for colitogenic microbes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010; 107(42):18132-7.
- ❖ **Verna EC, Larghi A, Faddoul SG, Stein JA, Worman HJ.** Portal vein thrombosis associated with *Fusobacterium nucleatum* septicemia in a patient with ulcerative Colitis. *J Clin Gastroenterol.* 2004; 38(7):611-2.
- ❖ **Verma R, Verma AK, Ahuja V.** Real-time analysis of mucosal flora in patients with inflammatory bowel disease in India. *J Clin Microbiol.* 2010; 48:4279-4282.
- ❖ **Waidmann M, Bechtold O, Frick JS, Lehr HA, Schubert S, Dobrindt U, Loeffler J, Bohn E, Autenrieth IB.** *Bacteroides vulgatus* protects against *Escherichia coli*-induced

- Colitis in gnotobiotic interleukin-2-deficient mice. *Gastroenterology*. 2003; 125(1):162-77.
- ❖ **Waidmann M, Allemand Y, Lehmann J, di Genaro S, Bücheler N, Hamann A, Autenrieth IB.** Microflora reactive IL-10 producing regulatory T cells are present in the colon of IL-2 deficient mice but lack efficacious inhibition of IFN-gamma and TNF-alpha production. *Gut*. 2002; 50(2):170-9.
  - ❖ **Walker AW, Sanderson JD, Churcher C, Parkes GC, Hudspith BN, Rayment N, Brostoff J, Parkhill J, Dougan G, Petrovska L.** High-throughput clone library analysis of the mucosa-associated microbiota reveals dysbiosis and differences between inflamed and non-inflamed regions of the intestine in inflammatory bowel disease. *BMC Microbiol*. 2011; 11:7.
  - ❖ **Walker AW, Duncan SH, Harmsen HJ, Holtrop G, Welling GW, Flint HJ.** The species composition of the human intestinal microbiota differs between particle-associated and liquid phase communities. *Environ Microbiol*. 2008; 10(12):3275-83.
  - ❖ **Walter J, Hertel C, Tannock GW, Lis CM, Munro K, Hammes WP.** Detection of *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, and *Weissella* species in human feces by using group-specific PCR primers and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol*. 2001; 67(6):2578-85.
  - ❖ **Wang T, Cai G, Qiu Y, Fei N, Zhang M, Pang X, Jia W, Cai S, Zhao L.** Structural segregation of gut microbiota between colorectal cancer patients and healthy volunteers. *ISME J*. 2012; 6(2):320-9.
  - ❖ **Wang G, Becker E, Mesa C.** Optimization of 6-carboxy-X-rhodamine concentration for real-time polymerase chain reaction using molecular beacon chemistry. *Can J Microbiol*. 2007(a); 53(3):391-7.
  - ❖ **Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, Cole JR.** Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl Environ Microbiol*. 2007(b); 73(16):5261-7.
  - ❖ **Wang M, Molin G, Ahrné S, Adawi D, Jeppsson B.** High proportions of proinflammatory bacteria on the colonic mucosa in a young patient with ulcerative Colitis as revealed by cloning and sequencing of 16S rRNA genes. *Dig Dis Sci*. 2007(c); 52(3):620-7.

- ❖ **Wahed M, Goodhand JR, West O, McDermott A, Hajek P, Rampton DS.** Tobacco dependence and awareness of health risks of smoking in patients with inflammatory bowel disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2011; 23(1):90-4.
- ❖ **Whary MT, Danon SJ, Feng Y, Ge Z, Sundina N, Ng V, Taylor NS, Rogers AB, Fox JG.** Rapid onset of ulcerative typhlocolitis in B6. 129P2-IL-10 tmlCgn (IL-10-/-) mice infected with *Helicobacter troglodytes* is associated with decreased colonization by altered Schaedler's Flora. *Infect Immunol.* 2006; 74(12):6615–23.
- ❖ **Wilhelm SM, McKenney KA, Rivait KN, Kale-Pradhan PB.** A review of infliximab use in ulcerative Colitis. *Clin Ther.* 2008; 30(2):223-30.
- ❖ **Willing BP, Dicksved J, Halfvarson J, Andersson AF, Lucio M, Zheng Z, Järnerot G, Tysk C, Jansson JK, Engstrand L.** A pyrosequencing study in twins shows that gastrointestinal microbial profiles vary with inflammatory bowel disease phenotypes. *Gastroenterology.* 2010; 139(6):1844-1854.e1.
- ❖ **Wilson M.** *Bacteriology of Humans: An Ecological Perspective.* Malden, MA: Blackwell Publishing; 2008. p. 266-326.
- ❖ **Wilson KH, Ikeda JS, Blichington RB.** Phylogenetic placement of community members of human colonic biota. *Clin Infect Dis.* 1997; 25 Suppl 2:S114-6.
- ❖ **Wilson KH, Blichington RB.** Human colonic biota studied by ribosomal DNA sequence analysis. *Appl Environ Microbiol.* 1996; 62(7):2273-8.
- ❖ **Woese CR, Kandler O, Wheelis ML.** Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1990; 87(12):4576-9.
- ❖ **Woese CR.** Bacterial evolution. *Microbiol Rev.* 1987; 51(2):221-71.
- ❖ **Woese CR, Stackebrandt E, Macke TJ, Fox GE.** A phylogenetic definition of the major eubacterial taxa. *Syst Appl Microbiol.* 1985; 6:143-51.
- ❖ **Xavier RJ, Podolsky DK.** Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature.* 2007; 448(7152):427-34.
- ❖ **Yoshida T, Sekine T, Aisaki KI, Mikami T, Kanno J, Okayasu I.** CITED2 is activated in ulcerative Colitis and induces p53-dependent apoptosis in response to butyric acid. *J Gastroenterol.* 2011; 46(3):339-49.

- ❖ **Yoshida T, Haga S, Numata Y, Yamashita K, Mikami T, Ogawa T, Ohkusa T & Okayasu I.** Disruption of p53-p53R2 DNA repair system in ulcerative Colitis contributes to colon tumorigenesis. *Int J Cancer* 2006; 118(6):1395-403.
- ❖ **Zhang H, DiBaise JK, Zuccolo A, Kudrna D, Braidotti M, Yu Y, Parameswaran P, Crowell MD, Wing R, Rittmann BE, Krajmalnik-Brown R.** Human gut microbiota in obesity and after gastric bypass. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009; 106(7):2365-70.
- ❖ **Zhang M, Liu B, Zhang Y, Wei H, Lei Y, Zhao L.** Structural shifts of mucosa-associated lactobacilli and *Clostridium leptum* subgroup in patients with ulcerative Colitis. *J Clin Microbiol.* 2007; 45(2):496-500.
- ❖ **Zhang L, Day A, McKenzie G, Mitchell H.** Nongastric *Helicobacter* species detected in the intestinal tract of children. *J Clin Microbiol.* 2006; 44(6):2276-9.
- ❖ **Zhu B, Wang X, Li L.** Human gut microbiome: the second genome of human body. *Protein Cell.* 2010; 1(8):718-25.
- ❖ **Zoetendal EG, Rajilic-Stojanovic M, de Vos WM.** High-throughput diversity and functionality analysis of the gastrointestinal tract microbiota. *Gut.* 2008; 57(11):1605-15.
- ❖ **Zoetendal EG, von Wright A, Vilpponen-Salmela T, Ben-Amor K, Akkermans AD, de Vos WM.** Mucosa-associated bacteria in the human gastrointestinal tract are uniformly distributed along the colon and differ from the community recovered from feces. *Appl Environ Microbiol.* 2002 Jul; 68(7):3401-7.
- ❖ **Zuckerkindl E, Pauling L.** Molecules as documents of evolutionary history. *J Theor Biol.* 1965; 8(2):357-66.
- ❖ **Zwolinska-Wcislo M, Brzozowski T, Budak A, Kwiecien S, Sliwowski Z, Drozdowicz D, Trojanowska D, Rudnicka-Sosin L, Mach T, Konturek SJ, Pawlik WW.** Effect of *Candida* colonization on human ulcerative Colitis and the healing of inflammatory changes of the colon in the experimental model of Colitis ulcerative. *J Physiol Pharmacol.* 2009; 60(1):107-18.

**F**iguras y Tablas



## FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Tipos de Colitis ulcerosas en función de su localización.....	<b>10</b>
<b>Figura 2.</b> Esquema del modelo actual de la etiopatogenia de la Colitis Ulcerosa .....	<b>15</b>
<b>Figura 3.</b> Algoritmo terapéutico de Colitis Ulcerosa según su gravedad.....	<b>21</b>
<b>Figura 4.</b> Representación del gen 16S ARNr con sus regiones variables (v) y conservadas (c).....	<b>36</b>
<b>Figura 5.</b> Funciones del ADN polimerasa .....	<b>38</b>
<b>Figura 6.</b> Funcionamiento del sistema MALDI-TOF MS y espectro generado por el sistema informático acoplado.....	<b>44</b>
<b>Figura 7.</b> Esquema de las reacciones que tienen lugar en el proceso de pirosecuenciación .....	<b>48</b>
<b>Figura 8.</b> Esquema del diseño experimental del estudio de la microbiota intestinal en voluntarios sanos y en pacientes diagnosticados de Colitis Ulcerosa.....	<b>56</b>
<b>Figura 9.</b> Esquema del diseño experimental del estudio familiar de las variaciones de la microbiota intestinal..	<b>56</b>
<b>Figura 10.</b> Rectas de calibrado obtenidas para cada uno de los grupos estudiados .....	<b>72</b>
<b>Figura 11.</b> Curvas de fusión obtenidas para cada uno de los grupos estudiados.....	<b>73</b>
<b>Figura 12.</b> Diferencias en la densidad de bacterias en biopsias de <i>Fusobacterium</i> , Bacterias Lácticas y <i>Bacteroides-Prevotella-Porphyromonas</i> entre los sujetos sanos y los pacientes diagnosticados de Colitis Ulcerosa.....	<b>75</b>
<b>Figura 13.</b> Diferencias en la densidad de bacterias en la microbiota fecal del grupo <i>Fusobacterium</i> , Bacterias Lácticas y <i>Bacteroides-Prevotella-Porphyromonas</i> entre los sujetos sanos y los pacientes diagnosticados de Colitis Ulcerosa.....	<b>77</b>
<b>Figura 14.</b> Diferencias en la densidad bacteriana del grupo <i>Fusobacterium</i> , Bacterias Lácticas y <i>Bacteroides-Prevotella-Porphyromonas</i> en función del diagnóstico por colonoscopia. E1, (Colitis limitada al recto); E2, (Colitis hasta el ángulo esplénico); E3, (Colitis que sobrepasa el ángulo esplénico).....	<b>80</b>
<b>Figura 15.</b> Diferencias en la densidad del grupo <i>Fusobacterium</i> , Bacterias Lácticas y <i>Bacteroides-Prevotella-Porphyromonas</i> según la actividad de la enfermedad .....	<b>82</b>
<b>Figura 16.</b> Diferencias en la densidad del grupo <i>Fusobacterium</i> , Bacterias Lácticas y <i>Bacteroides-Prevotella-Porphyromonas</i> entre sujetos sanos sin enfermedad y los pacientes afectados con y fuera de brotes de Colitis Ulcerosa.....	<b>83</b>
<b>Figura 17.</b> Diferencias en la densidad del grupo <i>Fusobacterium</i> , Bacterias Lácticas y <i>Bacteroides-Prevotella-Porphyromonas</i> en función del grado de actividad inflamatoria en la Colitis Ulcerosa .....	<b>85</b>
<b>Figura 18.</b> Diferencias en la densidad poblacional de <i>Fusobacterium</i> , Bacterias Lácticas y <i>Bacteroides-Prevotella-Porphyromonas</i> de acuerdo a los años de evolución de la enfermedad.....	<b>87</b>
<b>Figura 19.</b> Diferencias en la densidad del grupo <i>Fusobacterium</i> , Bacterias Lácticas y <i>Bacteroides-Prevotella-Porphyromonas</i> según el tratamiento .....	<b>89</b>
<b>Figura 20.</b> Diferencias en la densidad del grupo <i>Fusobacterium</i> , Bacterias Lácticas y <i>Bacteroides-Prevotella-Porphyromonas</i> en pacientes tratados con 5-ASA con Colitis Ulcerosa en remisión y en fase activa.....	<b>90</b>

<b>Figura 21.</b> Diferencias en la densidad del grupo <i>Fusobacterium</i> , Bacterias Lácticas y <i>Bacteroides-Prevotella-Porphyrromonas</i> entre sujetos fumadores y no fumadores diagnosticados de Colitis Ulcerosa .....	<b>91</b>
<b>Figura 22.</b> Variación de los principales filos bacterianos en heces en un paciente afecto de Colitis Ulcerosa a lo largo de un año .....	<b>93</b>
<b>Figura 23.</b> Variación de la microbiota intestinal en un paciente afecto de Colitis Ulcerosa a lo largo de un año	<b>96</b>
<b>Figura 24.</b> Distribución de los principales filos en una familia de cinco miembros con un hijo afecto de Colitis Ulcerosa.....	<b>99</b>
<b>Figura 25.</b> Composición de la microbiota intestinal en todos los miembros de una familia .....	<b>101</b>
<b>Figura 26.</b> Espectro de masas obtenido para un aislado de <i>E. coli</i> mediante el sistema MALDI-TOF .....	<b>102</b>
<b>Figura 27.</b> Dendograma obtenido mediante el coeficiente de similitud de Dice con los patrones de Campo Pulsado de las cepas de <i>E. coli</i> : 1, Afecto; 2, Hermano; 3, Hermana; 4, Padre; 5, Madre .....	<b>103</b>
<b>Figura 28.</b> Espectro de masas obtenido por el sistema MALDI-TOF con un aislado de <i>E. faecium</i> .....	<b>104</b>
<b>Figura 29.</b> Dendograma obtenido mediante el coeficiente de similitud de Dice con los patrones de Campo Pulsado de las cepas de enterococos : 1, Afecto; 2, Hermano; 3, Hermana; 4, Padre; 5, Madre .....	<b>105</b>

## TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Índice de actividad de Colitis Ulcerosa: Índice Mayo .....	<b>19</b>
<b>Tabla 2.</b> Clasificación de gravedad de Colitis Ulcerosa en función de las características histopatológicas .....	<b>19</b>
<b>Tabla 3.</b> Sitio de reconocimiento de <i>SmaI</i> .....	<b>42</b>
<b>Tabla 4.</b> Sitio de reconocimiento de <i>XbaI</i> .....	<b>43</b>
<b>Tabla 5.</b> Cebadores específicos y condiciones de PCR para la amplificación e identificación de las bacterias utilizadas como control .....	<b>60</b>
<b>Tabla 6.</b> Cebadores específicos y condiciones de PCR cuantitativa para la amplificación y cuantificación de los diferentes grupos bacterianos .....	<b>61</b>
<b>Tabla 7.</b> Valores obtenidos en las rectas de calibrado para cada una de las cepas patrón de los diferentes grupos de estudio .....	<b>71</b>
<b>Tabla 8.</b> Características de los pacientes afectados de Colitis Ulcerosa sometidos a estudio. E1, (Colitis limitada al recto); E2, (Colitis hasta el ángulo esplénico); E3, (Colitis que sobrepasa el ángulo esplénico); R, remisión; A, activa; G, grado; ASA, aminosalicilatos; AZA, azatioprina; Sin, sin tratamiento .....	<b>78</b>
<b>Tabla 9.</b> Porcentaje representado por cada familia de bacterias presentes en las heces de un paciente afecto de Colitis Ulcerosa a lo largo de un año .....	<b>95</b>
<b>Tabla 10.</b> Familias de microorganismos identificadas por pirosecuenciación .....	<b>97</b>



**A** breviaturas y Siglas



## ABREVIATURAS Y SIGLAS

<b>A</b>				<b>M</b>	
ABC	Área bajo la curva	Mb	Megabase		
ADN	Ácido desoxirribonucleico	ml	Mililitro		
APS	Adenosina 5-fosfosulfato	MDR	Resistencia multidro gas		
ARN	Ácido ribonucleico	MRS	Man rocosa sharpe		
ASA	Ácido aminosalicílico				
AZA	Ázatioprina				
<b>B</b>				<b>N</b>	
BHI	Brain hearth infusion	NFkB	Factor nuclear kappa beta		
BSA	Albumina de suero bovino	NOD	Dominio de oligomerización de nucleótidos		
		Nt	Nucleótido		
<b>C</b>				<b>P</b>	
c.s.p.	Cantidad suficiente para	pb	Pares de bases		
Ct	Ciclo umbral	PCR-Q	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa		
CU	Colitis Ulcerosa	PFGE	Electroforesis en gel de campo pulsado		
<b>D</b>				<b>R</b>	
ddNTP	Didesoxinucleótidos trifosfato	PPi	Pirofosfato inorgánico		
dNMP	Desoxinucleótidos monofosfato				
dNTP	Desoxinucleótidos trifosfato	R	Reverse		
DGGE	Electroforesis en gel por gradiente desnaturalizante	RDP	Ribosomal database project		
		ROX	6-carboxi-X-rodamina		
		rpm	Revoluciones por minuto		
<b>E</b>				<b>S</b>	
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético	<i>Sma</i> I	Enzima de restricción de <i>Serratia marcescens</i>		
EII	Enfermedad inflamatoria intestinal	SSU	Small subunit		
EPS	EDTA Proteinasa K Sarcosil	SYBR	Synergy brand		
<b>F</b>				<b>T</b>	
F	Forward	<i>Taq</i>	<i>Termus aquaticus</i>		
FISH	Hibridación fluorescente <i>in situ</i>	TBE	Tris Borato EDTA		
		TE	Tris-HCl EDTA		
		TGF	Factor de crecimiento transformante		
		<i>Tgo</i>	<i>Thermococcus gorgonarius</i>		
		TLR	Toll-like receptor		
		Tm	Temperatura de fusión del producto		
		TNF	Factor de necrosis tumoral		
<b>G</b>				<b>U</b>	
g	Gramo	U	Unidad de enzima		
		UFC	Unidades formadoras de colonias		
		UV	Ultravioleta		
<b>H</b>				<b>V</b>	
HLA	Antígenos de los leucocitos humanos	v	Voltio		
		vs	Versus		
<b>I</b>				<b>X</b>	
IL	Interleuquina	<i>Xba</i> I	Enzima de restricción de <i>Xanthomonas badri</i>		
<b>K</b>					
Kb	Kilobase				
KDa	KiloDalton				
<b>L</b>					
LPS	Lipopolisacárido				









