



FUNDACIÓN H. A.
BARCELÓ
FACULTAD DE MEDICINA



**TÍTULO: METAGENÓMICA EN ENFERMEDADES INFLAMATORIAS
INTESTINALES CRÓNICAS.**

DIRECTOR: Alberto Penas Steinhardt

INVESTIGADORES COLABORADORES: Gustavo D Frechtel

SEDE-LUGAR: Sede Larrea / Hospital de Clínicas (UBA)

PERIODO: 2018-2019

CONTACTO DEL AUTOR: pufo_@hotmail.com

Índice

I.	Resumen /Abstract	pag. 3
II.	Introducción	pag. 6
	a. Planteamiento del Problema (pregunta problema) y su contextualización	
	b. Justificación y Relevancia	
	c. Objetivos: General y Especifico	
	d. Marco conceptual	
III.	Metodología	pag. 9
	a. Tipo de estudio	
	b. Muestra	
	c. Ámbito de estudio	
	d. Fuentes e instrumento de recolección de datos	
	e. Procesamiento y Análisis de la información	
IV.	Resultados	pag. 13
V.	Discusión y Conclusión	pag. 18
VI.	Bibliografía	pag. 20

I. Resumen

La microbiota intestinal está implicada en diversas patologías humanas. La colitis ulcerosa (CU) es una enfermedad inflamatoria intestinal crónica. Aunque se desconoce la causa específica, se han definido algunos factores genéticos y ambientales. El propósito de este estudio fue investigar si había diferencias en la microbiota intestinal en pacientes argentinos con CU versus controles sin UC. En este sentido, se incluyeron 23 pacientes con CU y 27 controles sanos sin CU, emparejados por sexo, edad e IMC. La extracción de ADN se realizó a partir de 200 mg de heces usando el kit PowerFecalDNAIsolation (Qiagen). Las regiones hipervariables V3-V4 del gen bacteriano 16S se secuenciaron usando el sistema MiSeq-Illumina. Las secuencias generadas se analizaron utilizando el conocimiento cuantitativo de la ecología microbiana (QIIME) versión 1.9.1 del paquete de software. Para comparar la abundancia relativa de taxones entre grupos, realizamos un efecto de análisis discriminante lineal (LDA) implementado en LEfSe. La diversidad alfa no difirió entre los pacientes con CU y los controles sin CU. Sin embargo, encontramos que los pacientes con CU difieren de los controles sin CU en la estructura comunitaria observada. En pacientes con CU, los filamentos dominantes fueron Bacteroidetes ($43.49 \pm 20.18\%$), Firmicutes ($48.94 \pm 18.61\%$), Proteobacterias ($4.13 \pm 7.12\%$), Actinobacterias ($2.12 \pm 1.97\%$) y Verrucomicrobia ($0.38 \pm 1.01\%$), mientras que las principales Los phyla encontrados en los controles fueron Bacteroidetes ($60.06 \pm 13.540\%$), Firmicutes ($32.82 \pm 13.51\%$), Proteobacterias ($4.27 \pm 3.32\%$), Verrucomicrobia ($1.45 \pm 3.18\%$) y Actinobacterias ($0.81 \pm 1.46\%$). El análisis discriminante lineal (El método de tamaño del efecto LDA (LEfSe) reveló que los géneros Bacteroides y Akkermansia fueron más altos en el control sin CU y Bifidobacterium, Eubacterium, Lactobacillus, Collinsella, Peptostreptococcus, Actinomyces, Streptococcus, Slackia y Dialister en pacientes con CU ($p < 0.05$, puntaje LDA > 2). Nuestros resultados demostraron que había diferencias en la microbiota intestinal en pacientes con CU. Estos hallazgos podrían proporcionar las bases para comprender mejor la relación causa-efecto entre comunidades microbianas y CU en la población argentina.

I. Abstract

Gut microbiota is implicated in many human disorders. Ulcerative colitis (UC) is a chronic inflammatory bowel disease. Although the specific cause is unknown, some genetic and environmental factors have been defined. The purpose of this study was to investigate whether there were differences in gut microbiota in Argentine UC patients vs non-UC controls. In this sense, 23 UC patients and 27 non-UC healthy controls matched by sex, age and BMI were included. DNA extraction was performed from 200mg of feces using PowerFecalDNAIsolation Kit (Qiagen). The hypervariable regions V3-V4 of the bacterial 16S gene was sequenced using MiSeq-Illumina system. Sequences generated were analyzed using quantitative insights into microbial ecology (QIIME) version 1.9.1 software package. To compare taxa relative abundance between groups, we performed linear discriminant analysis (LDA) effect implemented in LEfSe. Alfa diversity did not differ between CU patients and non-CU controls. However, we found that CU patients differ from non-CU controls in the observed community structure. In CU patients, the dominant phyla were Bacteroidetes (43.49 ± 20.18%), Firmicutes (48.94 ± 18.61%), Proteobacteria (4.13 ± 7.12%), Actinobacteria (2.12 ± 1.97%) and Verrucomicrobia (0.38 ± 1.01%) while the principal phyla found in Controls were Bacteroidetes (60.06 ± 13.540%), Firmicutes (32.82 ± 13.51%), Proteobacteria (4.27 ± 3.32%), Verrucomicrobia (1.45 ± 3.18%) and Actinobacteria (0.81 ± 1.46%). The linear discriminant analysis (LDA) effect size (LEfSe) method revealed that the genus Bacteroides and Akkermansia were higher in non-CU control and Bifidobacterium, Eubacterium, Lactobacillus, Collinsella, Peptostreptococcus, Actinomyces, Streptococcus, Slackia and Dialister in CU patients ($p < 0.05$, LDA score > 2). Our results demonstrated that there were differences in gut microbiota in UC patients. These findings could provide the bases for further understand cause-effect relationship between microbial communities and CU in Argentine population.

II. Introducción:

a. Planteamiento del Problema (pregunta problema) y su contextualización

Se propone identificar y caracterizar nuevos biomarcadores Metagenómicos en Enfermedades Inflamatorias Intestinales en población Argentina, con el fin de desarrollar estrategias diagnósticas, pronósticas de seguimiento e intervenciones nutrigenómicas innovadoras. Es el objetivo del presente proyecto estudiar la microbiota mediante la caracterización de la misma en sujetos sanos y pacientes que hayan desarrollado EII. Antecedentes: La EII representan un trastorno crónico complejo, poligénico y de etiología desconocida, que comprende dos tipos principales: la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa. Se cree que la EII podría ser resultado de una respuesta desregulada del sistema inmune a la microbiota comensal en un huésped genéticamente susceptible. En los últimos años se ha demostrado una directa relación entre disbiosis de las comunidades microbianas intestinales y numerosas enfermedades, incluyendo EII. El microbioma se ve afectado por diversos factores ambientales, en este sentido es importante destacar que es muy poco lo que se conoce sobre el microbioma de los pueblos sudamericanos. Actividades: Se estudiará la microbiota fecal en individuos sanos y pacientes que desarrollaron EII. Las secuencias generadas serán analizadas para la identificación de unidades taxonómicas operacionales asignándose a cada lectura a un phylum, clase, familia y género, de acuerdo a los datos almacenados en bases de datos específicas

b. Justificación y Relevancia

Las enfermedades inflamatorias intestinales (EII) representan un trastorno crónico complejo, poligénico y de etiología desconocida, que comprende dos tipos principales: la enfermedad de Crohn (CD) y la colitis ulcerosa (CU). Se cree que la EII podría ser resultado de una respuesta desregulada del sistema inmune a la microbiota comensal en un huésped genéticamente susceptible. El diagnóstico de la EII es a menudo diagnosticada luego de meses o años después de

la primera aparición de los síntomas y aún requiere de una gran cantidad de información clínica, radiológicas, endoscópica y pruebas histológicas. La contribución exacta de la respuesta inmune adaptativa e innata no se ha dilucidado aún. Sin embargo, los recientes avances en los tratamientos dirigidos a mediadores inflamatorios clave como factor de necrosis tumoral (terapias anti-TNF) destacan el papel crucial del sistema inmune innato en la EII. La etiología de la EII se ha estudiado ampliamente en las últimas décadas y si bien aún es poco lo que se sabe, se observa una mayor incidencia en países industrializados.

Luego de la finalización del Proyecto Genoma Humano (HGP), fue de notable decepción el anuncio de que el genoma humano sólo contenía alrededor de 20.000 genes en lugar de los 100.000 estimados originalmente. En este sentido, en el año 2007 se inició el proyecto microbioma Humano (HMP) para llenar la brecha entre nuestro actual conocimiento derivado del HGP y el fenómeno fisiológico real no regulado sólo por genes humanos, sino por otros de origen microbiano, creando una nueva visión de nosotros mismos como un "super-organismo" consistente de un huésped humano y muchos simbioses microbianos.

c. Objetivos: General y Especifico

-Generales

Se propone identificar y caracterizar nuevos biomarcadores Metagenómicos en Enfermedades Inflamatorias Intestinales Crónicas en población Argentina, con el fin de desarrollar estrategias diagnósticas, pronósticas y de seguimiento innovadoras para este complejo conjunto de patologías de creciente detección en nuestro país. Es el objetivo principal del presente proyecto es estudiar la microbiota intestinal y proveniente de sangre periférica (prevalencia, diversidad y abundancia) mediante la caracterización de la misma en sujetos sanos y pacientes que hayan desarrollado EII, permitiendo no solo la asociación de cambios en la misma con la progresión de la patología sino también desarrollar terapias nutricionales y farmacológicas personalizadas (nutri-metagenómica/farmaco-metagenómica) mediante el empleo estrategias ómicas que describan los perfiles microbióticos de la población argentina.

-Específicos

- 1.a. Estudio de la microbiota fecal y presente en sangre periférica tanto de individuos control de nuestra comunidad como de pacientes asistentes a los Servicios de Gastroenterología del Hospital Posadas. Describir el microbioma característico y cuantificar la microbiota presente en los distintos grupos de estudio, de manera de determinar si existen diferencias en la prevalencia, diversidad y abundancia de la microbiota entre sujetos sanos y pacientes.
- 1.b. Identificación de los cambios en la composición de la microbiota intestinal asociados a situaciones de inflamación crónica clínica y subclínica, valorando la función de componentes específicos de la microbiota y las alteraciones inmunológicas asociadas.

d. Marco conceptual

Hoy sabemos que los microbios intestinales desempeñan un papel fundamental en el mantenimiento de la salud humana. El tracto gastrointestinal humano contiene una diversa colección de microorganismos, quienes desarrollan funciones biológicas del intestino como el suministro de nutrientes esenciales, la digestión, la detoxificación, así como en la defensa contra los patógenos, la modulación del sistema inmunitario y el impedir el asentamiento de microorganismos foráneos potencialmente patógenos. En los últimos años se ha demostrado una directa relación entre disbiosis de las comunidades microbianas intestinales y numerosas enfermedades. Debido a la importancia de la flora intestinal para la salud humana, estas poblaciones han sido analizadas intensamente en los últimos tiempos con la llegada de la nueva generación de técnicas de secuenciación masiva (Next Generation Sequencing, o NGS) ha sido posible la secuenciación directa de los microorganismos, evitando así la necesidad de cultivarlos.

El microbioma humano se ve afectado por diversos factores ambientales, como el estilo de vida, la dieta, el uso de antibióticos, y el genotipo de acogida. En este sentido es importante destacar que la mayor parte de los trabajos donde se estudiaron microbiomas han estudiado poblaciones europeas, asiáticas y norteamericanas que difieren tanto en el background genético como en diversos factores ambientales con nuestra población. Por el contrario, es muy poco lo que se conoce

sobre el microbioma de los pueblos sudamericanos. Se hace entonces indispensable conocer en profundidad el metagenoma característico de la población que habita nuestro país.

Partiendo de la hipótesis de que la disbiosis intestinal sería responsable del establecimiento y sostenimiento de desórdenes metabólicos e inflamatorios y que existen diferencias entre el Microbioma/Viroma intestinal entre sujetos sanos y enfermos; proponemos su caracterización en sujetos sanos y pacientes con EII. Esto pretende no solo asociar cambios en el microbioma con la progresión de la patología, sino también desarrollar terapias nutricionales y farmacológicas personalizadas (nutri-metagenómica/ farmaco-metagenómica) mediante el empleo estrategias ómicas que describan los perfiles microbióticos de la población argentina.

III. Metodología

e. Tipo de estudio

Estudio observacional caso-control de tipo transversal

f. Muestra y Ámbito de estudio

Selección de Participantes.

Se estudiarán individuos mayores de 18 años de edad, asistentes al Servicio de Gastroenterología del Hospital Posadas. Todos los participantes firmarán el consentimiento informado por escrito aprobado por el Comité de Ética del Hospital Posadas (de acuerdo a los principios bioéticos de la Declaración de Helsinki), correspondiente al presente protocolo de estudio aprobado por el Comité de Docencia e Investigación y de Bioética de dicho Hospital. Se tomarán muestras de suero y de sangre anticoagulada con EDTA 5% en el Hospital Posadas, y se recibirán muestras de materia fecal en tubos de recolección entregado por los investigadores responsables del proyecto, para su recolección domiciliaria. Se estudiará un total de 30 individuos de cada grupo para el estudio de la microbiota intestinal.

- **Selección de individuos para Grupo Control:**

Criterio de inclusión: individuos voluntarios sanos, normopeso, sin historia de enfermedades inflamatorias asistentes al Servicio de Gastroenterología. Dichos voluntarios serán reclutados por el equipo médico, pudiendo tratarse de familiares o amigos no convivientes con el paciente del servicio que deseen participar el proyecto.

Criterio de exclusión: Haber recibido terapia con antibióticos en el último mes, dietas extremas (ej. Macrobióticos, veganos), consumo regular de Probióticos, intervención quirúrgica en tracto gastrointestinal (gastrectomía, cirugía bariátrica, colostomía), embarazo, neoplasia, pacientes en terapia de reemplazo renal, trasplantados y HIV.

- **Selección de Casos de EII (grupos CU):**

Criterio de inclusión: Se incluirán 30 individuos con historia o curso de enfermedades inflamatorias Intestinales (Colitis Ulcerosa (CU)); De acuerdo con la clasificación de Montreal, adoptada en 2005, la CU se clasifica en tres grandes grupos según su extensión. El conocimiento de la extensión es de gran importancia por las implicaciones terapéuticas y pronósticas que conlleva: Colitis extensa, Colitis distal o izquierda y Proctitis.

Criterio de exclusión: Haber recibido terapia con antibióticos en el último mes, dietas extremas (ej. Macrobióticos, veganos), actual consumo regular de Probióticos, intervención quirúrgica en el tracto gastrointestinal (gastrectomía, cirugía bariátrica, colostomía), embarazo, neoplasia, pacientes en terapia de reemplazo renal, trasplantados y HIV.

g. Procesamiento y Análisis de la información

Datos fenotípicos y medio ambientales

Se evaluaron datos clínicos y bioquímicos de los distintos grupos de pacientes según registro de Historia Clínica del Servicio de Gastroenterología del Hospital Posadas, así como también de los controles voluntarios asistentes al servicio. Así mismo, se estableció por interrogatorio características demográficas, la presencia de factores medio ambientales determinantes (alimentación, uso de alcohol, cigarrillo, actividad física), medicación utilizada para tratamiento según el caso y antecedentes familiares de patologías inflamatorias crónicas.

Análisis estadístico:

Las diferencias univariadas entre datos cualitativos (fenotípicos y ambientales) se estudiaron a través del test de Chi² o del test exacto de Fisher. Las diferencias entre los datos cuantitativos (fenotípicos y ambientales) se estudiaron aplicando el ANOVA de Kruskal-Wallis o el ANOVA de una vía (en ambos casos, prueba post hoc de Student-Newman-Keuls). El análisis de la covarianza se aplicó a efectos de verificar la influencia de potenciales variables confusoras. Para el

análisis multivariable se empleó regresión logística múltiple. En los contrastes estadísticos se rechazará la hipótesis nula si el nivel de significación es $p < 0,05$, dos colas.

Obtención de muestras y extracción de DNA.

Las muestras de heces fueron colectadas en un frasco estéril de boca ancha, aproximadamente 5 g serán alicuotadas y congeladas a -80°C hasta su uso. La extracción del DNA se realizó a partir de 200 mg de heces mediante el kit QIAamp DNA Stool Mini Kit, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Determinación de la concentración y pureza de los ácidos nucleicos

La concentración y pureza de los ácidos nucleicos se determinó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% y espectrofotometría en un NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA).

Secuenciación de fragmentos de rRNA 16S bacteriano

Para amplificar los fragmentos de gen 16S rRNA, se utilizaron 30 ng de ADN purificado. Las regiones hipervariables V3 y V4 del gen 16S bacteriano.

Para la construcción de la biblioteca se utilizó el Kit de Preparación Nextera XT DNA Library (Illumina, San Diego, CA) siguiendo el protocolo del fabricante. En este caso, cada muestra de ADN se amplificó marcó con adaptadores que permitan el multiplexado de 96 muestras mediante la incorporación de secuencias de índice de Nextera XT v2 Kit índice A (Illumina, San Diego, CA). Todos los segmentos de las regiones variables del gen 16S rRNA fueron normalizados y multiplexados en un solo tubo. La secuenciación se llevó a cabo utilizando un secuenciador MiSeq (Macrogen-Korea). De esta manera, las bibliotecas se secuenciaron en las direcciones 5' y 3', garantizando secuencias de 300-500 bp de largo y $\sim 150x$ cobertura promedio para la identificación taxonómica.

Procesamiento de secuencias

Las secuencias generadas a partir de secuenciación fueron analizadas mediante el software QIIME para la identificación de unidades taxonómicas operativas (OTUs), así como la asignación taxonómica y el análisis estadístico. Con este fin se contrastaron las secuencias obtenidas con aquellas depositadas en bases de datos específicas (Greengenes) De esta manera, se asignó a cada lectura a un phylum, clase, familia y género, siempre y cuando la asignación taxonómica fuera inequívoca dentro de un umbral de confianza del 80%. Las secuencias obtenidas en este estudio serán remitidas y puestos a disposición en NCBI SRA database.

Comparación de comunidades microbianas

Se determinó si las comunidades microbianas en diferentes muestras eran significativamente diferentes por grupos, en concreto sujetos sanos vs enfermos, mediante Análisis de Coordenadas Principales (Principal Coordinates Analysis, PCoA), para mostrar si la composición de especies presentaba diferencias entre dichos grupos. Para ello se utilizó el algoritmo Unifrac, especialmente diseñado para describir y comparar comunidades microbianas en base a secuenciación masiva de genes marcadores filogenéticos.

IV. Resultados

Descripción de las poblaciones CU y Controles

Se estudiaron un total de 55 individuos, 23 de ellos corresponden a pacientes con CU asistentes al Servicio de Gastroenterología del Hospital Posadas, y 27 controles voluntarios sin antecedentes de EII seleccionados de las de muestras disponibles en el Laboratorio. En la Tabla 1 se resumen las características de la población estudiada junto a sus medidas antropométricas, observándose que no existen diferencias significativas (NS) entre casos y controles en variables previamente asociadas a cambios en la diversidad microbiana intestinal.

Tabla 1 Características de la población del estudio caso-control

	CU	CONTROLES	p
Total de individuos	n=23	n=27	-
Edad promedio, años \pm (DS)	47.09 \pm (16.69)	47.04 \pm (17.18)	0.88
F %	56.52	59.26	0.84
M %	43.48	40.74	
Peso promedio, Kg \pm (DS)	70.80 \pm (12.19)	75.64 \pm (15.01)	0.16
IMC \pm (DS)	26.99 \pm (4.20)	28.13 \pm (5.29)	0.53

IMC= Índice de Masa Corporal,

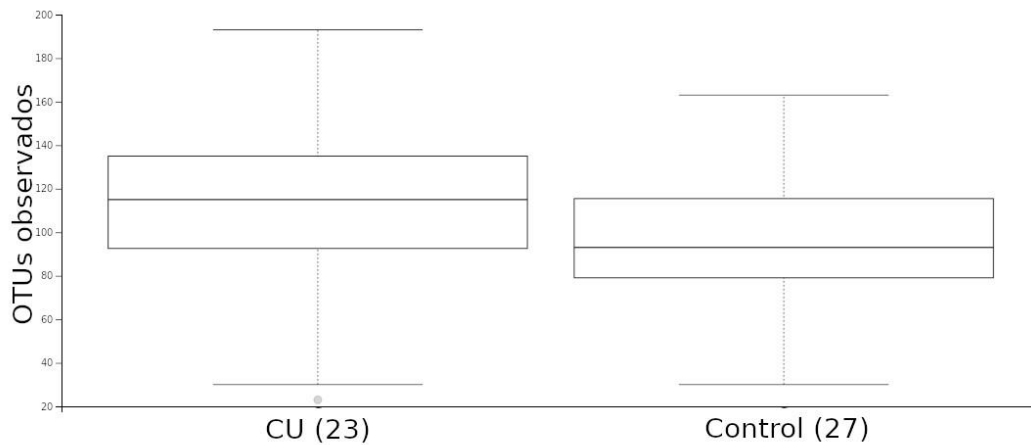
Análisis metagenómico de las secuencias obtenidas

Las regiones hipervariables V3-V4 del gen bacteriano 16S se secuenciaron utilizando el sistema MiSeq-Illumina, y se obtuvieron un promedio de (152036 \pm 18744) secuencias por muestra.

Las gráficas de rarefacción obtenidas alcanzan un estado asintótico, lo que indica que la profundidad de la secuenciación fue suficiente para representar la riqueza y

diversidad de la comunidad bacteriana por ambos métodos. En este sentido no se encontraron diferencias significativas en en la diversidad alfa entre las población CU y los controles (otus observados, $p = 0.090$). El estadístico usado fue Kruskal-Wallis (pairwise) (Figura 1).

Figura 4.9: Diversidad alfa de las poblaciones de CU y controles



El estudio de la diversidad beta mediante el método *weighted Unifrac* entre las poblaciones de CU vs Controles demostró la existencia de diferencias significativas ($p=0.004$). Sin embargo dicha característica (CU vs Controles) explica solamente el 3,8% de la diversidad total de las muestras, $R^2=0.038$ (Figura 4.10).

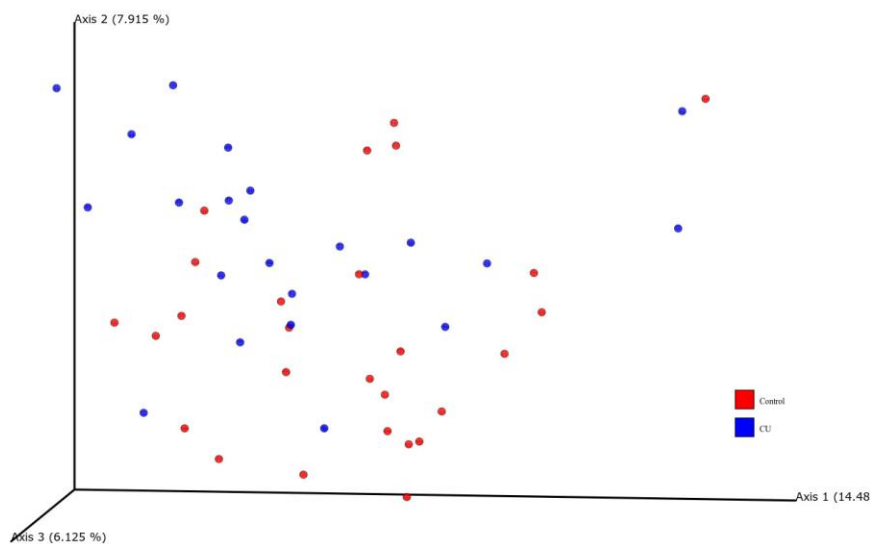


Figura 1: Diversidad beta ponderada Unifrac

Para la diversidad beta unweighted Unifrac, también las diferencias fueron significativa ($p=0.001$). Sin embargo la variable "Descripción" (CU vs Controles) explica solamente el 13,1% de la diversidad $R^2=0.131$ (Figura 2)

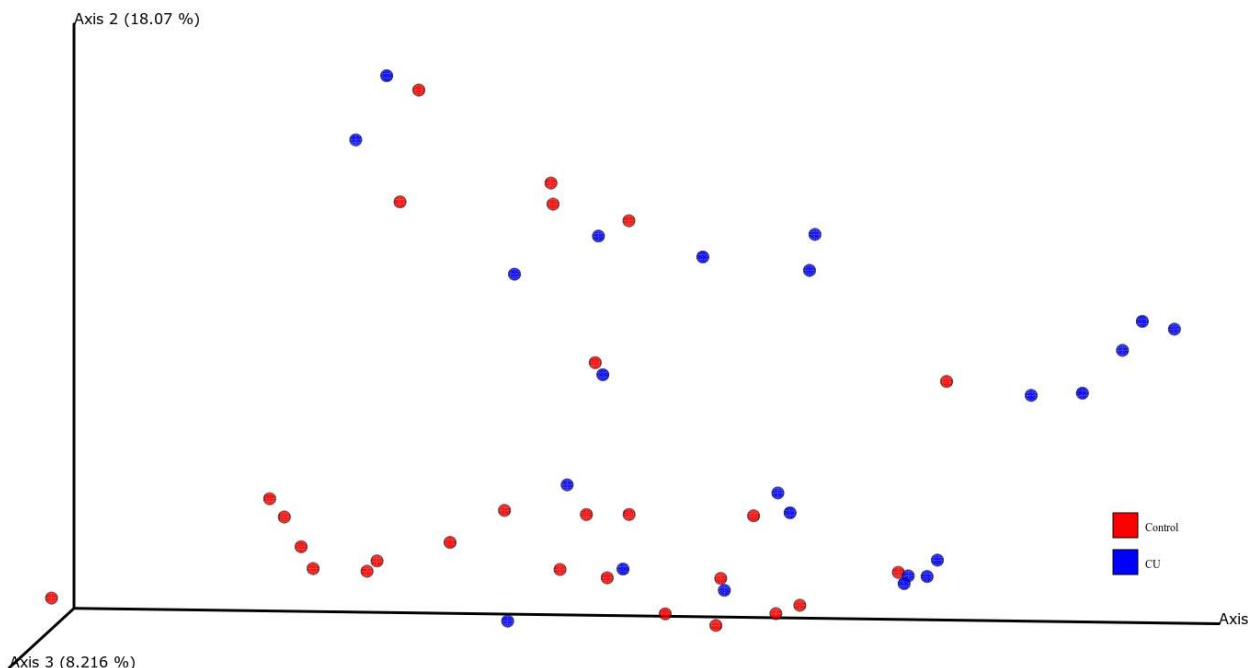
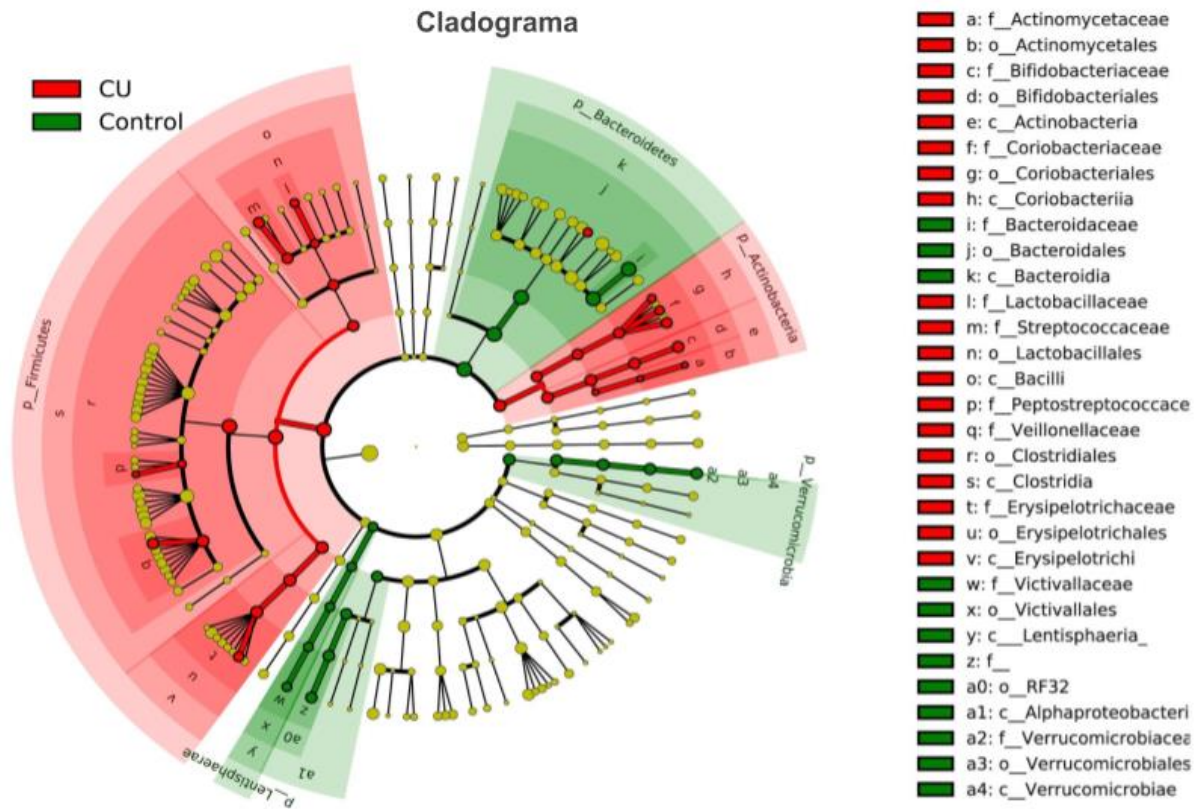


Figura 2: Diversidad beta no ponderada Unifrac

Encontramos que los pacientes con CU difieren de los controles sin CU en la estructura comunitaria observada. En pacientes con CU, los filamentos dominantes fueron Bacteroidetes ($43.49 \pm 20.18\%$), Firmicutes ($48.94 \pm 18.61\%$), Proteobacterias ($4.13 \pm 7.12\%$), Actinobacterias ($2.12 \pm 1.97\%$) y Verrucomicrobia ($0.38 \pm 1.01\%$), mientras que las principales Los phyla encontrados en los controles fueron Bacteroidetes ($60.06 \pm 13.540\%$), Firmicutes ($32.82 \pm 13.51\%$), Proteobacterias ($4.27 \pm 3.32\%$), Verrucomicrobia ($1.45 \pm 3.18\%$) y Actinobacterias ($0.81 \pm 1.46\%$).

Finalmente, mediante un estudio de análisis de discriminante lineal LDA (LEfSe) (Figura 3) se determinó que los géneros Bacteroides y Akkermansia fueron más altos en los controles y Bifidobacterium, Eubacterium, Lactobacillus, Collinsella, Peptostreptococcus, Actinomyces, Streptococcus, Slackia y Dialister en pacientes con CU ($p < 0.05$, LDA score > 2)



V. Discusión y Conclusión

El intestino alberga un ecosistema sofisticado de comunidades microbianas, ejerciendo funciones metabólicas vitales que contribuyen a la recuperación de nutrientes y energía de sustratos no digeribles. La colonización microbiana es esencial para el desarrollo normal del sistema inmune, regulando la homeostasis entre la carga antigénica ambiental y la respuesta inmune. En individuos susceptibles, el desequilibrio podría dar lugar a patologías de desregulación inmune, incluidas las enfermedades inflamatorias intestinales crónicas y el síndrome metabólico, en las que el sistema inmunitario reacciona de forma exagerada a los antígenos microbianos no dañinos. Aunque existen nuevas tecnologías moleculares, la composición normal de la microbiota del intestino humano aún está en debate. Muchos factores ambientales, como la localización geográfica, las características del hogar y las circunstancias como método de entrega, uso de antibióticos, lactancia materna o dieta en la vida temprana, son factores condicionantes para la colonización microbiana del intestino. En entornos genéticos permisivos, la reprogramación ambiental de la microbiota puede desencadenar condiciones para el establecimiento de una respuesta inmune desequilibrada .

La diversidad alfa no difirió entre los pacientes con CU y los controles sin CU. Sin embargo, encontramos que los pacientes con CU difieren de los controles sin CU en la estructura comunitaria observada. En pacientes con CU, los filamentos dominantes fueron Bacteroidetes ($43.49 \pm 20.18\%$), Firmicutes ($48.94 \pm 18.61\%$), Proteobacterias ($4.13 \pm 7.12\%$), Actinobacterias ($2.12 \pm 1.97\%$) y Verrucomicrobia ($0.38 \pm 1.01\%$), mientras que las principales Los phyla encontrados en los controles fueron Bacteroidetes ($60.06 \pm 13.540\%$), Firmicutes ($32.82 \pm 13.51\%$), Proteobacterias ($4.27 \pm 3.32\%$), Verrucomicrobia ($1.45 \pm 3.18\%$) y Actinobacterias ($0.81 \pm 1.46\%$). El análisis discriminante lineal (El método de tamaño del efecto LDA (LEfSe) reveló que los géneros Bacteroides y Akkermansia fueron más altos en el grupo control. En este sentido, la microbiota de los individuos controles se destaca por la presencia de la bacteria de degradación mucosa Akkermansia muciniphila, el único miembro identificado de su género. Este microorganismo, también encontrado en la población chilena, se ha propuesto como sello distintivo de un intestino sano debido a sus

propiedades antiinflamatorias e inmunoestimulantes y su capacidad para mejorar la función de barrera intestinal, la sensibilidad a la insulina y la endotoxemia.

Nuestros resultados demostraron que existen diferencias en la microbiota intestinal en pacientes con CU. Estos hallazgos podrían proporcionar las bases para comprender mejor la relación causa-efecto entre comunidades microbianas y CU en la población argentina.

VI. Bibliografía

- Palmer C, Bik EM, DiGiulio DB, Relman DA, Brown PO. Development of the Human Infant Intestinal Microbiota. *PLoS Biology*. 2007. p. e177. doi:10.1371/journal.pbio.0050177
- Dieguez TS, Galvan M, López Rodríguez G, Olivo D, Nájera MO. EFECTO DE LA DIETA SOBRE LA MODULACIÓN DE LA MICROBIOTA EN EL DESARROLLO DE LA OBESIDAD. *RESPYN Revista de Salud Pública y Nutrición*. 2018. doi:10.29105/respyn17.1-5
- Bäckhed F, Roswall J, Peng Y, Feng Q, Jia H, Kovatcheva-Datchary P, et al. Dynamics and Stabilization of the Human Gut Microbiome during the First Year of Life. *Cell Host Microbe*. 2015;17: 690–703.
- Castillo DJ, Rifkin RF, Cowan DA, Potgieter M. The Healthy Human Blood Microbiome: Fact or Fiction? *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2019. doi:10.3389/fcimb.2019.00148
- Whittle E, Leonard MO, Harrison R, Gant TW, Tonge DP. Multi-Method Characterization of the Human Circulating Microbiome. *Front Microbiol*. 2018;9: 3266.
- Païssé S, Valle C, Servant F, Courtney M, Burcelin R, Amar J, et al. Comprehensive description of blood microbiome from healthy donors assessed by 16S targeted metagenomic sequencing. *Transfusion*. 2016;56: 1138–1147.
- Qiu J, Zhou H, Jing Y, Dong C. Association between blood microbiome and type 2 diabetes mellitus: A nested case-control study. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. 2019. p. e22842. doi:10.1002/jcla.22842
- Olde Loohuis LM, Mangul S, Ori APS, Jospin G, Koslicki D, Yang HT, et al. Transcriptome analysis in whole blood reveals increased microbial diversity in schizophrenia. *Transl Psychiatry*. 2018;8: 96.
- Lynch SV, Pedersen O. The Human Intestinal Microbiome in Health and Disease. *New England Journal of Medicine*. 2016. pp. 2369–2379. doi:10.1056/nejmra1600266
- Guarner F, Khan AG, Garisch J, Eliakim R, Gangl A, Thomson A, et al. World Gastroenterology Organisation Global Guidelines. *Journal of Clinical Gastroenterology*. 2012. pp. 468–481. doi:10.1097/mcg.0b013e3182549092
- Stearns JC, Lynch MDJ, Senadheera DB, Tenenbaum HC, Goldberg MB, Cvitkovitch DG, et al. Bacterial biogeography of the human digestive tract. *Sci Rep*. 2011;1: 170.
- Bik EM. Composition and function of the human-associated microbiota. *Nutrition Reviews*. 2009. pp. S164–S171. doi:10.1111/j.1753-4887.2009.00237.x
- Saffouri GB, Shields-Cutler RR, Chen J, Yang Y, Lekatz HR, Hale VL, et al. Small intestinal microbial dysbiosis underlies symptoms associated with functional gastrointestinal disorders. *Nat Commun*. 2019;10: 2012.
- Lopetuso LR, Giorgio ME, Saviano A, Scaldaferrri F, Gasbarrini A, Cammarota G. Bacteriocins and Bacteriophages: Therapeutic Weapons for Gastrointestinal Diseases? *Int J Mol Sci*. 2019;20. doi:10.3390/ijms20010183
- Etayash H, Azmi S, Dangeti R, Kaur K. Peptide Bacteriocins--Structure Activity Relationships. *Curr Top Med Chem*. 2015;16: 220–241.

- Chikindas ML, Weeks R, Drider D, Chistyakov VA, Dicks LM. Functions and emerging applications of bacteriocins. *Curr Opin Biotechnol.* 2018;49: 23–28.
- Kaur S, Kaur S. Bacteriocins as Potential Anticancer Agents. *Frontiers in Pharmacology.* 2015. doi:10.3389/fphar.2015.00272
- Young VB. The role of the microbiome in human health and disease: an introduction for clinicians. *BMJ.* 2017. p. j831. doi:10.1136/bmj.j831
- Torres J, Hu J, Seki A, Eisele C, Nair N, Huang R, et al. Infants born to mothers with IBD present with altered gut microbiome that transfers abnormalities of the adaptive immune system to germ-free mice. *Gut.* 2019. p. gutjnl–2018. doi:10.1136/gutjnl-2018-317855
- Fainboim L, Geffner J. *Introduccion a la inmunologia humana / Introduction to human immunology.* Ed. Médica Panamericana; 2011.
- Killinger B, Labrie V. The Appendix in Parkinson’s Disease: From Vestigial Remnant to Vital Organ? *Journal of Parkinson’s Disease.* 2019. pp. S345–S358. doi:10.3233/jpd-191703
- Vitetta L, Chen J, Clarke S. The vermiform appendix: an immunological organ sustaining a microbiome inoculum. *Clin Sci.* 2019;133: 1–8. D’Haens GR, Balfour Sartor R, Silverberg MS, Petersson J, Rutgeerts P. Future directions in inflammatory bowel disease management. *Journal of Crohn’s and Colitis.* 2014. pp. 726–734. doi:10.1016/j.crohns.2014.02.025
- Dotan I, Fishman S, Dgani Y, Schwartz M, Karban A, Lerner A, et al. Antibodies Against Laminaribioside and Chitobioside Are Novel Serologic Markers in Crohn’s Disease. *Gastroenterology.* 2006;131: 366–378.
- Iskandar HN, Ciorba MA. Biomarkers in inflammatory bowel disease: current practices and recent advances. *Transl Res.* 2012;159: 313–325.
- Kuhnen A. Genetic and Environmental Considerations for Inflammatory Bowel Disease. *Surgical Clinics of North America.* 2019. pp. 1197–1207. doi:10.1016/j.suc.2019.08.014
- Nemeth ZH, Bogdanovski DA, Barratt-Stopper P, Paglinco SR, Antonioli L, Rolandelli RH. Crohn’s Disease and Ulcerative Colitis Show Unique Cytokine Profiles. *Cureus.* 2017. doi:10.7759/cureus.1177
- Williams MR, Stedtfeld RD, Tiedje JM, Hashsham SA. MicroRNAs-Based Inter-Domain Communication between the Host and Members of the Gut Microbiome. *Front Microbiol.* 2017;8: 1896.
- Tarallo S, Ferrero G, Gallo G, Francavilla A, Clerico G, Realis Luc A, et al. Altered Fecal Small RNA Profiles in Colorectal Cancer Reflect Gut Microbiome Composition in Stool Samples. *mSystems.* 2019;4. doi:10.1128/mSystems.00289-19
- Ungaro R, Mehandru S, Allen PB, Peyrin-Biroulet L, Colombel J-F. Ulcerative colitis. *The Lancet.* 2017. pp. 1756–1770. doi:10.1016/s0140-6736(16)32126-2
- Yu YR, Ruben Rodriguez J. Clinical presentation of Crohn’s, ulcerative colitis, and indeterminate colitis: Symptoms, extraintestinal manifestations, and disease phenotypes. *Seminars in Pediatric Surgery.* 2017. pp. 349–355. doi:10.1053/j.sempedsurg.2017.10.003
- Larsen S, Bendtzen K, Nielsen OH. Extraintestinal manifestations of inflammatory bowel disease: epidemiology, diagnosis, and management. *Ann Med.* 2010;42: 97–114.

- Rogler G. Medical management of ulcerative colitis. *Dig Dis*. 2009;27: 542–549.
- Grez C, Ossa JC. ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL EN PEDIATRÍA, UNA REVISIÓN. *Revista Médica Clínica Las Condes*. 2019. pp. 372–382. doi:10.1016/j.rmclc.2019.06.009
- Langan RC, Gotsch PB, Krafczyk MA, Skillinge DD. Ulcerative colitis: diagnosis and treatment. *Am Fam Physician*. 2007;76: 1323–1330.
- Tung J, Loftus EV, Freese DK, El-Youssef M, Zinsmeister AR, Melton JL, et al. A population-based study of the frequency of corticosteroid resistance and dependence in pediatric patients with Crohn’s disease and ulcerative colitis. *Inflammatory Bowel Diseases*. 2006. pp. 1093–1100. doi:10.1097/01.mib.0000235835.32176.85
- Dulai PS, Thompson KD, Blunt HB, Dubinsky MC, Siegel CA. Risks of serious infection or lymphoma with anti-tumor necrosis factor therapy for pediatric inflammatory bowel disease: a systematic review. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2014;12: 1443–51; quiz e88–9.
- Domènech E, Esteve M, Gomollón F, Hinojosa J, Panés J, Obrador A, et al. Recomendaciones GETECCU-2005 para el uso de infliximab (Remicade®) en la enfermedad inflamatoria intestinal. *Gastroenterología y Hepatología*. 2005. pp. 126–134. doi:10.1157/13072012
- 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: 1660–1666.
- Pakarinen MP, Natunen J, Ashorn M, Koivusalo A, Turunen P, Rintala RJ, et al. Long-term Outcomes of Restorative Proctocolectomy in Children With Ulcerative Colitis. *PEDIATRICS*. 2009. pp. 1377–1382. doi:10.1542/peds.2008-2086