

Papel de la microbiota intestinal en diferentes estrategias de bajada de peso

Isabel Moreno Indias

Máster en Bioinformática y Bioestadística
Área 31 de análisis ómicos

Guillem Ylla Bou

David Merino Arranz

05/06/2018

© (Isabel Moreno Indias)

Reservados todos los derechos. Está prohibido la reproducción total o parcial de esta obra por cualquier medio o procedimiento, comprendidos la impresión, la reprografía, el microfilme, el tratamiento informático o cualquier otro sistema, así como la distribución de ejemplares mediante alquiler y préstamo, sin la autorización escrita del autor o de los límites que autorice la Ley de Propiedad Intelectual.

FICHA DEL TRABAJO FINAL

| | |
|--|--|
| Título del trabajo: | <i>Papel de la microbiota intestinal en diferentes estrategias de bajada de peso</i> |
| Nombre del autor: | <i>Isabel Moreno Indias</i> |
| Nombre del consultor/a: | <i>Guillem Ylla Bou</i> |
| Nombre del PRA: | <i>David Merino Arranz</i> |
| Fecha de entrega (mm/aaaa): | 06/2018 |
| Titulación:: | <i>Máster en Bioinformática y Bioestadística</i> |
| Área del Trabajo Final: | <i>Área 31 de análisis ómicos</i> |
| Idioma del trabajo: | <i>Castellano</i> |
| Palabras clave | <i>Microbiota, obesidad</i> |
| Resumen del Trabajo (máximo 250 palabras): <i>Con la finalidad, contexto de aplicación, metodología, resultados y conclusiones del trabajo.</i> | |
| <p>La microbiota intestinal es un factor determinante en las enfermedades metabólicas como la obesidad. La microbiota intestinal tiene un papel en la bajada de peso. Se piensa que diferentes intervenciones para la pérdida de peso, tendrán una respuesta diferente en la población de microbiota intestinal. Así, el objetivo del presente estudio será el estudiar tres tipos diferentes de intervenciones para la disminución de peso de pacientes con diferente grado de obesidad: cirugía bariátrica, dieta mediterránea y dieta cetogénica. Para ello se recogieron muestras fecales de pacientes obesos antes y después de las intervenciones para su posterior secuenciación del gen bacteriano 16S rRNA mediante un secuenciador NGS (Ion S5, Thermofisher), así como muestras de sangre para la medición de las variables bioquímicas de rutina. Las secuencias fueron traducidas en las poblaciones microbianas con QIIME2, PICRUSt para su análisis funcional y analizado estadísticamente con las plataformas MicrobiomeAnalyst and STAMP, respectivamente. Se han encontrado interesantes diferencias entre los tres métodos estudiados. La cirugía bariátrica, que consiguió las mayores pérdidas de peso, si bien no produjo un cambio radical del perfil de la microbiota intestinal, cambió la funcionalidad de esta. La dieta mediterránea, que produjo el menor cambio en términos de peso corporal, registró un aumento significativo de la diversidad y de las bacterias productoras de SCFAs. La dieta cetogénica que se situó en un punto intermedio entre los otros dos procedimientos en cuanto a la bajada de peso, produjo un cambio drástico en la microbiota intestinal y cambios en la capacidad funcional de la población bacteriana. Este estudio abre las puertas a nuevas terapias para la obesidad basadas en la microbiota intestinal.</p> | |

Abstract (in English, 250 words or less):

Gut microbiota is a key factor in metabolic diseases like obesity. Gut microbiota has a role in weight loss. Different interventions for weight loss could have a different response in the gut microbiota profile. Thus, the aim of the current study is to study different interventions for weight loss in patients with a different degree of obesity: bariatric surgery, Mediterranean diet and ketogenic diet. Stool and blood were sampled before and after the interventions for the bacterial 16 rRNA sequencing by NGS (Ion S5, ThermoFisher) of the stool samples and the measurement of biochemical variables in blood. QIIME2 was used for the sequences analysis and translation into bacteria, PICRUSt for their functional inference and MicrobiomeAnalyst and STAMP, respectively, for their statistical analysis. There were interesting differences between the analyzed procedures. Bariatric surgery, which obtained the highest weight loss, although it did not radically change the gut microbiota profile, it changed its functionality. Mediterranean diet, which obtained the least weight losses, registered a significant increase of the diversity and SCFAs producers. The ketogenic diet, which was in an intermediate point about the weight loss, produced a drastic change in the gut microbiota profile and its potential functionality. This study could open new research in obesity therapies targeting gut microbiota.

Índice

| | |
|--|----|
| 1. Introducción..... | 1 |
| 1.1 Contexto y justificación del Trabajo | 1 |
| 1.2 Objetivos del Trabajo | 1 |
| 1.3 Enfoque y método seguido..... | 2 |
| 1.4 Planificación del Trabajo | 2 |
| 1.5 Breve resumen de productos obtenidos | 3 |
| 1.6 Breve descripción de los otros capítulos de la memoria | 3 |
| 2. Memoria del estudio | 4 |
| 3. Autoevaluación | 54 |
| 4. Glosario..... | 56 |
| 5. Bibliografía..... | 57 |
| 6. Anexos | 68 |

1. Introducción

1.1 Contexto y justificación del Trabajo

El punto de partida del trabajo ha sido desarrollar la línea de investigación en la que actualmente trabajo. Se necesitaba desarrollar un workflow de la nueva plataforma de secuenciación usada en el laboratorio, un Ion S5 (ThermoFisher), para el estudio de la microbiota intestinal usando el kit Ion 16S Metagenomics (ThermoFisher). Mi aportación se ha centrado en la búsqueda de un protocolo para poder analizar las secuencias generadas mediante dicha tecnología, analizar su información y poder generar figuras de calidad que puedan presentarse en los trabajos científicos.

1.2 Objetivos del Trabajo

Objetivos generales:

OC: Estudiar los diferentes perfiles de microbiota intestinal con tres estrategias de bajada de peso: cirugía bariátrica, dieta mediterránea y dieta cetogénica.

OT: Desarrollar un pipeline de análisis desde secuencias crudas hasta la generación de figuras de calidad para publicaciones.

Objetivos específicos:

OC1: Estudiar las variaciones de la microbiota intestinal con tres estrategias de bajada de peso: cirugía bariátrica, dieta mediterránea y dieta cetogénica.

OC2: Estudiar las relaciones de la microbiota intestinal con los cambios en las variables bioquímicas y antropométricas de los pacientes.

OC3: Estudiar el metabolismo de la microbiota intestinal en relación a las diferentes estrategias en la bajada de peso.

OC4: Intentar establecer bacterias clave en cada estrategia de pérdida de peso.

Por su lado, los objetivos técnicos se centrarán en encontrar la mejor manera de analizar y presentar los datos:

OT1: Pasar del software para el estudio de la microbiota QIIME 1.9.1 a QIIME2.

OT2: Utilizar el software de predicción génica PICRUST.

OT3: Analizar los datos en R mediante paquetes especialmente diseñados para el análisis de microbiota como Phyloseq.

1.3 Enfoque y método seguido

Se ha querido adaptar la forma de trabajar anteriormente con las secuencias de los secuenciados GS Junior (Roche) aplicando lo conocido. Sin embargo, debido a que la plataforma informática qiime se ha actualizado a QIIME2 y se ha cambiado por completo la forma de analizar, esta tarea se ha complicado. De todas formas el enfoque seguido ha sido conseguir una manera fácil y dinámica de analizar los datos que provienen del secuenciador Ion S5 (Thermofisher) de microbiota intestinal y poder presentar los datos en un trabajo científico.

1.4 Planificación del Trabajo

| Objetivos | Objetivos secundarios | Semana1 (19-26/04) | Semana2 (26-03/02-04) | Semana3 (02-09/04) | Semana4 (09-16/04) | Semana5 (16-23/04) | Semana6 (23-30/04) | Semana7 (30-04/07-05) | Semana8 (07-14/05) | Semana9 (14-21/05) | (21/05-05/06) |
|--|--|--|-----------------------|--|--------------------|--------------------|---|---|--------------------|--|---------------|
| <p>OC: Estudiar los diferentes perfiles de microbiota intestinal con tres estrategias de bajada de peso: cirugía bariátrica, dieta mediterránea y dieta cetogénica.</p> <p>OT: Desarrollar un pipeline de análisis desde secuencias crudas hasta la generación de figuras de calidad para publicaciones.</p> | <p>OC1: Estudiar las variaciones de la microbiota intestinal con tres estrategias de bajada de peso: cirugía bariátrica, dieta mediterránea y dieta cetogénica.</p> <p>OC2: Estudiar las relaciones de la microbiota intestinal con los cambios en las variables bioquímicas y antropométricas de los pacientes.</p> <p>OC3: Estudiar el metabolismo de la microbiota intestinal en relación a las diferentes estrategias en la bajada de peso.</p> <p>OC4: Intentar establecer bacterias clave en cada estrategia de pérdida de peso.</p> | <p>Recopilación de las variables antropométricas y bioquímicas de los pacientes</p> | | <p>Fusión de los datos de las bacterias con las variables de los pacientes</p> | <p>PICRUST</p> | | <p>Uso de todas las herramientas disponibles para el análisis de QIIME2, PICRUST y Phyloseq o cualquier otro paquete encontrado</p> | <p>Análisis estadístico de los resultados</p> | | <p>Interpretación de los resultados</p> <p>Redacción de la memoria</p> | |
| | <p>OT1: Pasar del software para el estudio de la microbiota QIIME 1.9.1 a QIIME2.</p> <p>OT2: Utilizar el software de predicción génica PICRUST.</p> <p>OT3: Analizar los datos en R mediante paquetes especialmente diseñados para el análisis de microbiota como Phyloseq.</p> | <p>Uso de QIIME2: generación de las tablas con la</p> <p>Predicción génica con PICRUST</p> <p>Estudiar paquete Phyloseq y/o otros paquetes para análisis de datos en R</p> | | | | | | <p>Análisis múltiple multivariante</p> | | | |

Hito1: El principal hito a conseguir es aprender a utilizar la herramienta QIIME2 que nos proporcionarán las distintas bacterias presentes en las muestras biológicas. De no conseguir implementar este paso, no se podría continuar con los demás (final semana2).

Hito2: Utilizar PICRUST para inferir los genes presentes en nuestra microbiota y poder analizar las rutas metabólicas de éstas. Esto nos permitirá realizar el OC3 (final semana4).

Hito3: Análisis de los datos con R (Phyloseq o cualquier otro paquete disponible para el análisis de datos de metagenómica dirigida). Este hito nos permitirá implementar nuevos análisis de los datos y sobre todo preparar gráficas de calidad que incluyan todos los datos disponibles, tanto de bacterias como de variables bioquímicas y antropométricas (final semana6).

Hito4: Análisis multivariante y búsqueda de bacterias clave en cada grupo (final semana8).

Hito5: Redacción de la memoria.

1.5 Breve resumen de productos obtenidos

Se presentan los resultados provenientes del análisis de datos reales orientado a la escritura del posterior trabajo científico: introducción, material y métodos, resultados, discusión y conclusiones extendidas. Los workflow de análisis se presentan como anexos.

1.6 Breve descripción de los otros capítulos de la memoria

La memoria se ha establecido como si se tratara de un trabajo científico cualquiera. Se han analizado datos de pacientes reales con tres intervenciones diferentes de bajada de peso.

2. Memoria del estudio

1. INTRODUCCIÓN

La obesidad humana es una pandemia que ha ido aumentando en los últimos treinta años. Este incremento es alarmante debido al amplio espectro de complicaciones derivadas (como por ejemplo la diabetes tipo 2 o enfermedades cardiovasculares). Existe un consenso acerca de que tanto los factores genéticos como ambientales juegan un importante papel, de tal forma que no solo el aumento de la ingesta calórica ni la disminución de la actividad física, son los únicos determinantes de la enfermedad.

La microbiota intestinal ha recibido una especial atención en los últimos años. El ser humano puede entenderse como un “superorganismo” debido a que hospeda cerca de 10^{14} microorganismos de entre 500 y 1000 especies distintas (1), los cuales han establecido una relación simbiótica con el hospedador totalmente necesaria para la correcta homeostasis intestinal. De hecho, hoy día se considera como un nuevo órgano cuyas funciones específicas son claves en el mantenimiento de nuestra salud, sin embargo, recién estamos comenzando a entender cómo funciona e interactúa con los demás órganos.

En la literatura científica podemos encontrar mucha información acerca de la relación entre la microbiota intestinal y la obesidad y sus comorbilidades asociadas, como la diabetes *mellitus* tipo 2 o el síndrome metabólico (2). Si bien es incuestionable que la microbiota intestinal desempeña un papel importante en el metabolismo del hospedador, la inmunidad e incluso el comportamiento, nunca hay que olvidar que el estudio de la microbiota intestinal es una ciencia nueva, de apenas veinte años, en continuo cambio. Algunas suposiciones tomadas en los primeros momentos se han refutado.

Desde un punto de vista evolutivo, la microbiota intestinal y su hospedador han evolucionado de manera conjunta. Esta microbiota nos ha acompañado a lo largo de nuestra evolución (3), de esta manera nuestra microbiota intestinal se ha adaptado a los cambios ambientales y culturales. De hecho, elementos ambientales, como la dieta o los antibióticos, provocan alteraciones rápidas en la microbiota, que trata de adaptarse al huésped y a sus propias necesidades (4,5). La microbiota y sus modificaciones en

respuesta a factores ambientales tales como el tipo de dieta, el consumo de fibra y antibióticos es dependiente de la susceptibilidad genética del hospedador y de las condiciones ambientales (6) Pero las continuas modificaciones culturales han dado lugar a cambios importantes en el estilo de vida (cocina, agricultura, industrialización) que han estado acompañados de cambios fundamentales en la composición microbiana y su funcionalidad (7), y posiblemente, de una disminución en la riqueza y diversidad de la microbiota intestinal. Esta suposición puede inferirse de los datos recopilados de antiguas culturas (8), o incluso de las diferencias entre poblaciones rurales y urbanas (9).

Aunque existe una gran variación entre los diferentes individuos de una población, se ha sugerido que existe un microbiota basal (10) el cual ha sido ampliamente estudiado. Sin embargo, las relaciones complejas y, sobre todo, la dificultad para establecer el estado saludable de un sujeto, dificultan el consenso sobre cuál es realmente esta microbiota basal.

En lo que sí hay consenso es en que las poblaciones sanas además de presentar este microbiota basal, deberían presentar una amplia diversidad, ya que se sabe que una mayor diversidad de especies está correlacionada con una mayor estabilidad en la composición general de la microbiota (11). Esta mayor diversidad promueve una redundancia funcional y asegura que la pérdida de una especie bacteriana no conlleve la pérdida de la función lograda por la especie desaparecida. De esta manera, la microbiota intestinal entre las personas es muy variable y está influenciada por numerosos factores, que incluyen, entre otros, el modo de nacimiento, tipo de lactancia, los hábitos alimenticios, el estado de salud y las condiciones sanitarias (12-15). Algunos grupos han establecido que la microbiota basal está compuesto por nueve géneros predominantes, formados por productores de ácidos grasos de cadena corta (SCFAs) y aparecen en todos los individuos estudiados (16), otros establecieron que la microbiota basal estaba formada por 14 géneros (10). De hecho, parece ser que la funcionalidad es el punto clave. Esta estrategia fue seguida en la teoría de los enterotipos en la cual las poblaciones se clasificaron en tres grupos diferentes (enterotipos) (17). Estos enterotipos se caracterizan por presentar un grupo determinado de especies. Cada enterotipo tiene propiedades únicas, pero tienen una serie de funciones comunes esenciales, que probablemente representen las funciones necesarias para sobrevivir en el hábitat intestinal.

La disbiosis microbiana se entiende como una desviación en cuanto a la diversidad o proporción de un determinado conjunto microbiano que va a dar como resultado un cambio en la microbiota establecido para una población sana. De esta manera, la disbiosis se ha considerado como responsable del desarrollo de ciertas enfermedades, ya que un cambio en la composición de la microbiota intestinal podría inducir alteraciones en la homeostasis del hospedador; aunque no hay que olvidar que en esta simbiosis las alteraciones de salud del hospedador también inducirían cambios en las condiciones ambientales de esos microorganismos, favoreciendo o perjudicando a los diferentes grupos, por lo que también se llegaría a una disbiosis.

Sin embargo, volviendo a la historia evolutiva del ser humano, debemos tener en cuenta que es posible que lo que entendemos actualmente como la microbiota de una persona sana, en relación con lo que fue en el pasado sea disbiótica, debido a los cambios ambientales, sociales o de estilo de vida a los que hemos estado sometidos, lo que aumentaría significativamente el riesgo de desarrollar enfermedades metabólicas. Por lo tanto, la instauración de un equilibrio en la microbiota intestinal es esencial para numerosos aspectos de la salud humana, sin embargo, este proceso es complejo y muy variable.

Alteraciones metabólicas

Las enfermedades metabólicas han aumentado su prevalencia en los países desarrollados. El aumento en la ingesta alimentos energéticos y la disminución en la actividad física se consideran como las causas más comunes de este espectacular aumento. Sin embargo, incluso cuando estos factores están controlados, la prevalencia continúa creciendo exponencialmente, por lo que otros factores ambientales deben estar influyendo. Dentro de estos factores debemos incluir los cambios en la microbiota intestinal. De esta forma, las alteraciones en la microbiota intestinal se han relacionado con la prevalencia creciente de trastornos metabólicos que incluyen obesidad, resistencia a la insulina y diabetes *mellitus* tipo 2. Esta relación quedó patente cuando se comprobó que la ecología microbiana intestinal estaba alterada en la obesidad (18); que la microbiota intestinal de pacientes obesos se caracterizaba por una mayor capacidad para la obtención de energía (19); y que la microbiota intestinal podría contribuir a alteraciones en el metabolismo de la glucosa (20). Este fue el comienzo del estudio del papel de la microbiota intestinal en enfermedades metabólicas.

Posteriormente Cani y colaboradores identificaron la endotoxemia metabólica, causada por el lipopolisacárido bacteriano (LPS), como el factor desencadenante de la obesidad y la resistencia a la insulina (21). Se describió un aumento en la permeabilidad intestinal después de una dieta alta en grasas (22) y que el péptido similar al glucagón-1 y 2 (GLP-1 y GLP-2, respectivamente) y el péptido YY (PYY) se asociaron con una mejora de la barrera intestinal después de un consumo prebiótico (23).

Los ácidos grasos de cadena corta aparecieron como metabolitos clave de la microbiota intestinal, y especialmente el butirato, ya que la disminución en las bacterias productoras de butirato se han identificado como una pauta característica en los pacientes metabólicos (24,25). Aunque en última instancia, el acetato está atrayendo una atención especial, debido a que un aumento en la producción de este ácido graso de cadena corta por una microbiota intestinal alterada promovería el síndrome metabólico(26).

Los carbohidratos son una fuente importante de energía tanto para los humanos como para la microbiota la cual es capaz de producir ácidos grasos de cadena corta a partir de la fermentación de carbohidratos de la dieta que el ser humano no puede digerir por sí mismo. Entre los ácidos grasos de cadena corta, butirato, propionato y acetato son los más estudiados. El butirato es la fuente principal de energía de los colonitos, favorece la función de la barrera intestinal y reduce la inflamación (27). El propionato es metabolizado en el hígado y disminuye la lipogénesis hepática y los niveles de colesterol en suero y es un potente activador de las células L enteroendocrinas para la señalización de la respuesta de saciedad (28). El acetato se usa principalmente como fuente de energía pero también tiene un efecto periférico en el núcleo arqueado del hipotálamo para reducir el apetito (29).

Pero los ácidos biliares también se han introducido en esta intrincada red, debido al papel de la microbiota intestinal en el metabolismo de los ácidos biliares secundarios y la síntesis de ácidos biliares en el hígado por los mecanismos dependientes del receptor X farnesoide (FXR) (30), además de que los ácidos biliares pueden modular la composición microbiana intestinal mediante la activación de la inmunidad innata (31). Además, una reconstitución de la microbiota intestinal restaura los niveles de ácidos biliares (32).

Los ácidos biliares tienen un papel en la digestión de los lípidos pero también actúan como moléculas de señalización. Los ácidos biliares primarios activan preferentemente a FXR mientras que TGR5 es activado por los ácidos biliares secundarios (33). Estos receptores tienen un papel importante en la regulación de numerosos procesos metabólicos incluyendo la homeostasis de la glucosa y lipídica. La activación en el intestino de FXR conduce al incremento de los niveles circulantes del factor de crecimiento de fibroblastos 19 (FGF19) el cual atenúa la conversión hepática de colesterol a ácidos biliares (34). Además, parece ser que la activación de FXR juega un papel muy importante en la regulación hepática del metabolismo de la glucosa (35).

Pérdida de peso

De esta manera, son numerosos los estudios que han asociado la obesidad con cambios en la composición y la función metabólica de la microbiota intestinal (36,37). Los desequilibrios de la microbiota intestinal se han reconocido como centrales en la patogénesis de la obesidad (38). De una manera interesante, la pérdida de peso también induce cambios importantes en la composición de la microbiota intestinal. Sin embargo, si los cambios observados en la composición de la microbiota intestinal contribuyen a la pérdida de peso o si es tan solo una consecuencia, no está tan claro. La asociación entre la microbiota intestinal y la obesidad existe, pero la relación causal o la consecuencia y la magnitud de su contribución en humanos, aún tiene que ser dilucidada.

El interés creciente de los estudios de microbiota intestinal en el campo de la obesidad están motivados por la posibilidad de manipulación de la microbiota intestinal y que esto sirva para ayudar a alcanzar y mantener la pérdida de peso.

Cualquier tipo de intervención para la pérdida de peso va a cambiar la microbiota intestinal, aunque su impacto no siempre va a estar correlacionado con la cantidad de peso perdida (39). El tratamiento que primero se le recomienda al pacientes combina la dieta y la actividad física. Otros procedimientos incluyen medicación, pero los procedimientos quirúrgicos son los más exitosos controlando el peso a largo plazo y reduciendo la incidencia de otras comorbilidades (40,41).

Tratamiento dietético

Un gran número de estudios han revelado que la dieta es la principal fuente de energía de la microbiota intestinal, de esta manera tiene un impacto alto en su composición y funcionalidad (42,43). En modelos animales se ha llegado a explicar el 57% de la

variabilidad de la composición de la microbiota intestinal con la dieta, mientras que la genética explicaba un valor pequeño (44). La microbiota intestinal también es capaz de responder rápidamente a los cambios específicos en la dieta, haciendo falta tan solo diez días o incluso solo uno para cambiar su perfil (42). Sin embargo, las pautas dietéticas a largo plazo es lo que mayor impacto tiene sobre la composición de la microbiota intestinal (45).

La diversidad microbiana (riqueza y diversidad u homogeneidad) juega un papel clave en la respuesta a las intervenciones dietéticas. Los cambios en la microbiota intestinal inducidos por la dieta parecen contribuir al incremento de las epidemias de enfermedades metabólicas de la actualidad, como la obesidad o la diabetes tipo 2, las cuales muestran una característica común que es un desequilibrio en sus microbiotas intestinales o disbiosis (46). Una baja diversidad indica una respuesta pobre a la intervención (39). Este hecho podría explicar la baja efectividad (en porcentaje de pérdida de peso) de los pacientes obesos con dieta.

Por otra parte, diferentes estrategias dietéticas van a desencadenar en diferentes resultados. Esta disbiosis asociada a la obesidad y a la diabetes tipo 2 podría estar mediada por la pautas dietéticas tan pobres características de la dieta occidental, que poseen un alto contenido en grasas saturadas y azúcares. De hecho, esta dieta se ha asociado a una gran disbiosis microbiana (47). Además, muchos otros procedimientos usados debido a su gran eficacia en la pérdida de peso como las dietas restrictivas parecen que promueven una reducción de la diversidad microbiana, que es correlacionada con la deficiencia del macronutriente más que con la pérdida de peso (39).

La dieta mediterránea es el modelo dietético que provee una mayor protección frente a los eventos cardiovasculares (48). La dieta mediterránea se caracteriza por una gran proporción de consumo de verduras y una baja proporción de consumo carne, y está asociada con perfiles metabólicamente beneficiosos de microbiota intestinal (49). Estos beneficios están asociados con una mejora de la diversidad microbiana de los pacientes (50). El consumo de una dieta compleja tiene como resultado un incremento en los niveles de ácidos grasos de cadena corta y ayudan a reclutar una mayor diversidad de la microbiota intestinal (51). Así pues, la dieta como la principal fuente de energía para la microbiota intestinal tendrá un gran impacto sobre la composición de microbiota

intestinal y su funcionalidad (52), lo que implica que una intervención dietética podría aliviar las enfermedades metabólicas que causan disbiosis.

Cirugía bariátrica

Actualmente el método más exitoso para el tratamiento de la obesidad, cuando se tiene en cuenta la pérdida de peso, es la cirugía bariátrica. La cirugía bariátrica también es altamente exitosa en la mejora de la salud comparado con los métodos dietéticos convencionales, de hecho, la cirugía metabólica se ha incluido entre los tratamientos antidiabéticos disponibles para los pacientes con diabetes tipo 2 y obesidad (53). Después de un bypass gástrico, la diabetes se puede resolver incluso antes de que los pacientes comiencen a perder peso, sugiriendo que este tipo de cirugía tiene un efecto antidiabético directo. No se sabe exactamente cómo ocurre, pero el cambio de la composición microbiana sugiere que la microbiota intestinal contribuye a la mejora metabólica después del bypass gástrico (54). La reducción de peso a través de la cirugía bariátrica afecta a la composición de la microbiota intestinal, pero la pérdida de peso podría no ser el único factor responsable de estas modificaciones. La cirugía bariátrica induce unos grandes cambios como resultado de la dieta, el ambiente, cambios sistémicos y anatómicos. El cambio del tracto gastrointestinal debido a la cirugía tiene como resultado una enteroplasticidad causada por la alta tasa de nutrientes y un pH alterado en el intestino delgado que contribuyen a los efectos fisiológicos (55).

El incremento de la abundancia relativa del filo *Proteobacteria* es una de las alteraciones más altas después de la cirugía bariátrica, y está asociado al incremento en la clase *Gammaproteobacteria* y a los géneros *Escherichia*, *Klebsiella* y *Enterobacter* en las muestras de los pacientes después de una cirugía bariátrica y en modelos animales (36,37). Además, se ha sugerido que la microbiota intestinal es un factor relevante en el mantenimiento de la pérdida de peso en el largo plazo tras la intervención bariátrica (37).

Considerando que diferentes procedimientos de cirugía bariátrica tienen como resultado diferentes recolocaciones del tracto digestivo, es posible que tengan efectos diferentes sobre la microbiota intestinal. Algunos estudios han comparado la microbiota intestinal de dos grupos de pacientes obesos después de diferentes procedimientos y han encontrado que poseen diferentes perfiles (37). Además, cuando la cirugía bariátrica se

acompaña con una intervención dietética, los cambios en la microbiota intestinal son más pronunciados en los pacientes que se han realizado una cirugía bariátrica, observando un crecimiento en la abundancia de las *Proteobacteria* y los *Bacteroidetes*; estos resultados indicarían que distintos procedimientos alteran la microbiota de una manera diferente, y que los cambios en la microbiota intestinal podrían contribuir a la mejora de la salud encontrada (56).

Así pues el objetivo del presente estudio será estudiar cómo cambian los diferentes perfiles de microbiota intestinal con tres estrategias de bajada de peso: cirugía bariátrica, dieta mediterránea y dieta cetogénica.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

Pacientes

Todos los estudios fueron realizados en los hospitales Virgen de la Victoria u Hospital Regional de Málaga (Málaga, España), con la aprobación del comité de ética de Andalucía (CCEIBA) y bajo las directrices de la declaración de Helsinki (2008) de la asociación médica mundial. Los participantes no recibieron ningún incentivo monetario.

Cirugía bariátrica (BS)

El estudio incluyó 21 pacientes con obesidad mórbida que sufrieron una cirugía bariátrica por laparoscopia del tipo manga gástrica. Fueron evaluados previamente a la cirugía y tras tres meses durante un examen rutinario. Los criterios de inclusión fueron presentar obesidad al menos durante 5 años, con un índice de masa corporal $> 35 \text{ kg/m}^2$. Los criterios de exclusión fueron: diabetes mellitus tipo 2 con tratamiento de insulina o cualquier otro tratamiento antidiabético diferente de la metformina, pacientes con cualquier otra patología grave (cardiovascular, inflamatoria aguda, artritis o enfermedad infecciosa), consumo de antibióticos o probióticos o cualquier otra sustancia que cambie la microbiota intestinal durante los tres meses previos a la cirugía, los pacientes que no siguiesen la dieta recomendada por su médico el mes anterior a la cirugía, y que no firmase el consentimiento informado del estudio.

Dieta mediterránea (MD)

21 pacientes de entre 55 y 75 años fueron reclutados por la unidad de Endocrinología. Los criterios de inclusión fueron: edad comprendida entre los 55 y 75 años, con un IMC de entre $27\text{-}40 \text{ kg/m}^2$, que cumplan con al menos 3 criterios de síndrome metabólico

según Aberti et al (57). El objetivo de la intervención dietética fue conseguir una pérdida de peso corporal > 5%. Se recomendó una Dieta Mediterránea, basada en el uso de aceite de oliva como principal fuente de grasa visible y el consumo regular de verduras y hortalizas (2 raciones/día), frutas (3 porciones/día), legumbres (3 raciones/semana) y pescado (3 veces en semana), reduciendo el consumo de carnes rojas o embutidos (<2 veces en semana) y eliminando (o reduciendo a <1 vez/semana) el consumo de lácteos, bebidas azucaradas y repostería o bollería industrial. La dieta recomendada aportó un déficit calórico de 600 Kcal/día, calculado según la ecuación de Harris-Benedict. La distribución calórica fue: 45 % Hidratos de carbono, 35% grasas y 20 % proteínas y se recomendaron al menos cuatro ingestas al día (Desayuno, Almuerzo, Merienda y Cena). Además, se les recomendó un programa de actividad física.

Dieta cetogénica (CD)

Los 19 pacientes de este estudio pertenecen a un ensayo clínico de intervención nutricional, aleatorizado, controlado y ciego que se desarrolló en un solo centro, el Hospital Universitario Virgen de la Victoria de Málaga. Los criterios de inclusión fueron: edades comprendidas entre los 18 y los 65 años, un índice de masa corporal $\geq 30 \text{ kg/m}^2$ y un peso estable en los tres meses previos. Los principales criterios de exclusión fueron: diabetes mellitus, obesidad inducida por cualquier otro desorden endocrino o por medicamentos. Los criterios de exclusión secundarios fueron: desórdenes gastrointestinales, cualquier uso de antibióticos, probióticos o prebióticos que puedan alterar la microbiota intestinal en los 3 meses previos, depresión severa o cualquier otra enfermedad psiquiátrica, abuso de narcóticos o de alcohol, insuficiencia hepática severa, cualquier tipo de insuficiencia renal o episodios de gota, neoplasia, eventos previos de enfermedad cardiovascular o cerebrovascular, litiasis renal, hipertensión incontrolada y alteraciones electrolíticas. Las mujeres embarazadas, en lactancia, intentando quedarse embarazadas o no usando un método adecuado contraceptivo, fueron excluidas.

Todos los participantes siguieron una dieta muy baja en hidratos de carbono de acuerdo al programa comercial de pérdida de peso PnK (PnK method by Pronokal Group; <http://www.pronokalgroup.com>), que incluye apoyo en la modificación de los hábitos de vida y comportamentales de los pacientes. La intervención incluye una evaluación por el especialista médico que desarrolla el estudio y la valoración por un experto

dietista. El programa de pérdida de peso consta de dos fases. Una primera fase que consiste en la dieta cetogénica muy baja en hidratos de carbono con 600-800 Kcal/día, baja en hidratos de carbono y en grasa, que conlleva una suplementación de vitaminas y minerales como potasio, sodio, magnesio, calcio y ácidos grasos ómega-3. En este estudio esta fase se mantuvo durante dos meses. Este método se basa en preparaciones proteicas con una muy alta calidad proteica que contienen 15 g de proteína, 4 g de carbohidratos, 3 g de grasa y 50 mg de ácido docosahexaenoico, que provee 90-110 Kcal. Luego los pacientes comienzan una dieta baja en carbohidratos de 800-1500 Kcal/día, que dura otros dos meses. Sin embargo, para este TFM solo se tuvo en cuenta la primera fase, la fase estrictamente cetogénica.

Medidas antropométricas y bioquímicas

Todos los pacientes entregaron una muestra fecal previa al comienzo del estudio (basal) y tras el período de tratamiento: 2 meses en el caso de la dieta cetogénica, 3 meses para la cirugía bariátrica y 6 meses para el caso de la dieta mediterránea. Asimismo, se les realizaron las medidas antropométricas: peso y altura, con lo que se calculó el índice de masa corporal (IMC) como el peso (kg) entre la altura al cuadrado (m^2), así como la circunferencia de cintura, un estimador de la grasa visceral. También se les extrajo una muestra de sangre tras un ayuno de 12 horas para la medida de las variables bioquímicas de rutina: las concentraciones glucosa, colesterol total, colesterol HDL (lipoproteína de alta densidad) y triglicéridos se midieron en un Dimension autoanalyzer (Dade Behring Inc., Deerfield, Ill) por métodos enzimáticos (Randox Laboratories Ltd., UK). La concentración de colesterol LDL (proteína de baja densidad) se calculó mediante la fórmula de Friedewald. Además, se les tomó la presión sanguínea sistólica y diastólica. Toda esta información se introdujo en una base de datos usando el paquete estadístico SPSS version 22.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Extracción de ADN de las muestras fecales

Las muestras fecales que se recogieron en el punto basal y tras la correspondiente intervención se congelaron inmediatamente a -80°C hasta su análisis. La extracción se realizó con 200 mg de heces usando el QIAamp DNA stool minikit (QIAGEN) siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración de ADN y su pureza se determinaron mediante un espectrofotómetro Nanodrop (Nanodrop Technologies).

Análisis de la microbiota intestinal

El ADN fecal se amplificó para la región 16S del rDNA bacteriano con el Ion 16S Metagenomics Kit (ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA). Este kit incluye dos sets de primers que amplifican selectivamente las regiones hipervariables del 16S rDNA bacteriano: el juego de primers V2-4-8 y el V3-6-7-9. Los productos de PCR obtenidos se purificaron con las Agencourt AMPure XP DNA purification beads (Beckman Coulter Inc., Ma, USA). Tras la verificación de los amplificados mediante gel de agarosa, la concentración de ADN obtenida de las secuencias amplificadas se estimaron con el sistema Qubit siguiendo las instrucciones del fabricante (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Las librerías se crearon usando el Ion Plus Fragment Library kit (ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA). Se usaron códigos de barras para diferenciar cada muestra con el Ion Xpress Barcode Adapters (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA). La PCR en emulsión se realizó en el sistema automatizado Ion Chef System (ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. La secuenciación de las librerías se llevó a cabo en un Ion 520 chip usando el Ion Torrent S5 (ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Procesamiento de las secuencias

El preprocesamiento de las secuencias se realizó con el Torrent Suite™ server software (thermofisher), versión 5.4.0 con los parámetros por defecto para el 16S Target Sequencing (bead loading ≤ 30 , key signal ≤ 30 y usable sequences ≤ 30). Se obtuvieron secuencias con 239 pares de bases de media, 255 pb de mediana y una moda de 261 pb. Tras esto, se utilizó el plugin del mismo software “fastq creator” para crear un archivo fastq demultiplexado por muestra con el que continuar trabajando externamente.

Alineamiento y clasificación taxonómica de las secuencias

Las secuencias de alta calidad que pasaron los filtros anteriores se utilizaron para su posterior análisis en el software gratuito QIIME2 (<https://qiime2.org>). La información completa se puede encontrar en el anexo 1, pero someramente: los archivos fastq generados por el Torrent Suite™ server software (thermofisher) se importaron en QIIME2 en forma de artefacto así como sus metadatos asociados. Se construyó la “FeatureTable” que contiene las frecuencias de cada secuencia individual encontrada en cada muestra utilizando DADA2 (58) que integra un filtrado de secuencias quiméricas. Para los siguientes pasos de diversidad filogenética, se construyó un árbol con todas las

interrelaciones existentes entre las secuencias únicas encontradas anteriormente. Se calcularon la alfa y beta diversidades de nuestras comunidades, previa rarefacción de las muestras a 22.273 secuencias, que es el menor número de secuencias que presentan nuestras muestras. Se utilizaron las distancias UniFrac para calcular la similitud entre poblaciones (59). Para clasificar las secuencias de acuerdo a su información taxonómica se utilizó la extensión qiime feature-classifier utilizando el método de alineamiento por consenso vsearch (60), utilizando la base de datos Greengenes 16S rRNA gene al 99% de identidad.

Para el análisis de los datos obtenidos, se dio paso su traducción al formato biom compatible con las mayoría de los programas disponibles, mediante la herramienta qiime tools exports. Con esto, se obtuvo una otu_table.biom que es totalmente comparable a las FeatureTable con la que hemos trabajado.

Se utilizó la plataforma Microbiome Analyst (<http://www.microbiomeanalyst.ca>), en su versión Marker Data Profiler (MDP) (61) que provee de una gran variedad de análisis para la explotación de los resultados de metagenómica dirigida. En el anexo 2 se presentan las características del programa.

Análisis funcional

Para estudiar la potencialidad de nuestra microbiota, inferimos la funcionalidad de los genes presentes en nuestras muestras mediante el programa PICRUSt (Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States) (62). Para el uso de esta herramienta se necesita que nuestra otu_table.biom se haya construido bajo un régimen de enfrentar nuestras secuencias a las secuencias referencia de la base de datos Greengenes 13_5 al 97% de identidad en un pick_closed_reference_otus. Para ello se utilizó la antigua versión de qiime (63) debido a su mayor velocidad. Para su análisis se utilizó el software STAMP (64), previa adaptación de los formatos con la plataforma Microbiome Helper (65) (Anexo 3).

3. RESULTADOS

a) Características de los pacientes

Las características antropométricas y bioquímicas de los diferentes pacientes a tiempo basal y post-tratamiento se observan en la tabla 1. En términos generales se observan diferencias entre las características de los pacientes a tiempo basal, algo esperable ya que se tratan de tres cohortes independientes. Los pacientes que se sometieron a la dieta

mediterránea presentan una edad mayor que el resto de tratamientos. De igual manera, el IMC de los pacientes sometidos a cirugía bariátrica fue mayor que la de los pacientes del resto de tratamientos, situándose en valores de obesidad mórbida ($IMC > 40 \text{ kg/m}^2$), mientras que el resto de pacientes eran obesos ($30 \leq IMC \leq 40 \text{ kg/m}^2$). Con respecto al resto de variables metabólicas se observa que el metabolismo glucídico de los pacientes que iban a someterse a MD y a BS estaba en peor estado que el de CD (mayores niveles de glucosa y hemoglobina glucosilada, aunque esta última solo mostró una tendencia). Sin embargo, el metabolismo lipídico establecido con los valores de triglicéridos y de colesterol, no mostraba grandes diferencias entre los grupos, si bien los pacientes de CD y MD obtuvieron unos mayores niveles de LDL colesterol con respecto al grupo BS.

Tabla 1. Tabla de variables antropométricas y bioquímicas principales de los grupos de estudio antes y después de la intervención de bajada de peso. Se ha analizado estadísticamente con una t de student de muestras relacionadas dentro de cada grupo. * Indica $P > 0.05$ del tiempo postratamiento con respecto al tiempo basal. ^s Indica diferencias entre los tres grupos a tiempo basal (ANOVA, $P > 0.05$). [&] Indica diferencias entre los tres grupos a tiempo post-tratamiento (ANOVA, $P > 0.05$).

| | MD | | CD | | BS | |
|---------------------------|--------------|---------------|--------------|---------------|-----------------|---------------|
| | Basal | 6M | Basal | 2M | Basal | 3M |
| | 21 | | 18 | | 22 | |
| SEXO (H/M) | 10/11 | | 8/10 | | 9/13 | |
| EDAD (años) | 64.70±2.40 | | 42.61±10.86 | | 47.54±5.52 | |
| GLUCOSA ^{s&} | 106.85±19.19 | 100.9±10.39 | 87.22±9.43 | 83.17±9.26 | 113.42.00±34.51 | 89.38±12.13* |
| CINTURA ^{s&} | 112.03±8.15 | 104.28±8.18* | 110.44±6.57 | 97.89±6.69* | 132.15±11.59 | 116.20±8.93* |
| IMC ^{s&} | 33.41±3.30 | 30.66±3.35* | 33.06±5.02 | 28.53±1.34* | 45.27±4.97 | 37.30±4.40* |
| COLESTEROL TOTAL | 210.45±30.61 | 199.75±35.93 | 203.94±31.63 | 185.89±30.08* | 190.38±22.43 | 187.00±24.04 |
| HDL-COL ^{&} | 50.90±12.96 | 56.25±13.56* | 53.53±13.15 | 53.22±12.77 | 46.10±10.19 | 46.29±9.89 |
| LDL-COL ^s | 129.00±30.85 | 119.30±33.99 | 125.41±30.55 | 116.03±27.40 | 107.73±22.51 | 116.19±22.60 |
| TAS ^{&} | 138.24±12.41 | 132.19±13.01 | 129.44±16.52 | 118.39±11.99* | 139.40±22.67 | 132.65±22.31 |
| TADIAS ^{s&} | 75.76±10.26 | 131.90±14.84* | 79.56±7.41 | 74.39±8.72* | 86.35±11.23 | 82.15±13.30 |
| TG ^{&} | 153.60±45.82 | 120.85±47.30* | 137.17±63.26 | 83.17±23.92* | 208.76±185.53 | 123.33±39.65* |
| PESO ^{s&} | 88.11±11.22 | 80.30±10.93* | 93.16±10.21 | 80.23±7.42* | 128.55±17.42 | 104.63±13.26* |
| hbac1 ^{&} | 5.90±0.57 | 5.58±0.29* | 5.45±0.21 | 5.13±0.34* | 5.99±1.01 | 5.39±0.29* |

En la tabla 2 se pueden observar las diferencias medias que cada grupo sufrió con respecto a las variables bioquímicas y antropométricas anteriores. De esta manera se

pueden observar mejor los resultados de los tratamientos. Se observa que los mayores cambios como era de esperar debido a ser una técnica más agresiva. La dieta cetogénica se encuadraría en un tratamiento intermedio, mientras que la dieta mediterránea, si bien ha sido el periodo más largo, sería el tratamiento que unos menores cambios reportaría.

Tabla 2. Tabla de variables antropométricas y variables bioquímicas de los cambios establecidos en estas variables durante el periodo de estudio. Se ha analizado estadísticamente mediante una ANOVA con un post-hoc de Bonferroni. Letras diferentes significan diferencias entre grupos ($P < 0.05$).

| | MD | CD | BS |
|-------------------------|---------------|----------------|----------------|
| | Basal | Basal | Basal |
| n | 21 | 18 | 22 |
| GLUCOSA | -5.95±17.47 b | -4.05±10.87 b | -24.05±27.59 a |
| CINTURA | -7.75±2.57 b | -12.56±4.46 a | -15.95±5.61 a |
| IMC | -2.74±0.91 c | -4.52±0.70 b | -7.97±2.09 a |
| COLESTEROL TOTAL | -10.70±25.96 | -18.06±29.37 | -3.38±20.74 |
| HDL-COL | 5.35±9.34 | 0.70±7.46 | 0.19±8.50 |
| LDL-COL | -9.70±21.80 a | -7.20±24.35 ab | 8.46±23.50 b |
| TAS | -6.05±13.60 | -11.06±10.80 | -6.75±20.91 |
| TADIAS | 6.14±13.31 | -5.17±7.76 | -4.2±14.37 |
| TG | -32.75±37.41 | -54.00±59.23 | -85.42±170.53 |
| PESO | -7.81±1.96 c | -12.92±3.07 b | -23.92±7,51 a |
| hba1c | -0.32±0.38 | -0.32±0.26 | -0.60±0.90 |

b)

Características de las secuencias analizadas

En total se han recopilado y secuenciado 124 muestras: 21 pacientes con dieta mediterránea, 19 con dieta cetogénica y 22 pacientes con cirugía bariátrica. En total tenemos 17.133.859 de secuencias con un mínimo de 21.870 y un máximo de 369.393. Mediana de 114.323,5 secuencias.

En el proceso de los análisis de calidad de las muestras, se ha observado que si bien las secuencias tienen una mediana de 255 pb, las muestras que poseen un tamaño mayor a las 300 pb pierden estabilidad (Figura 1):

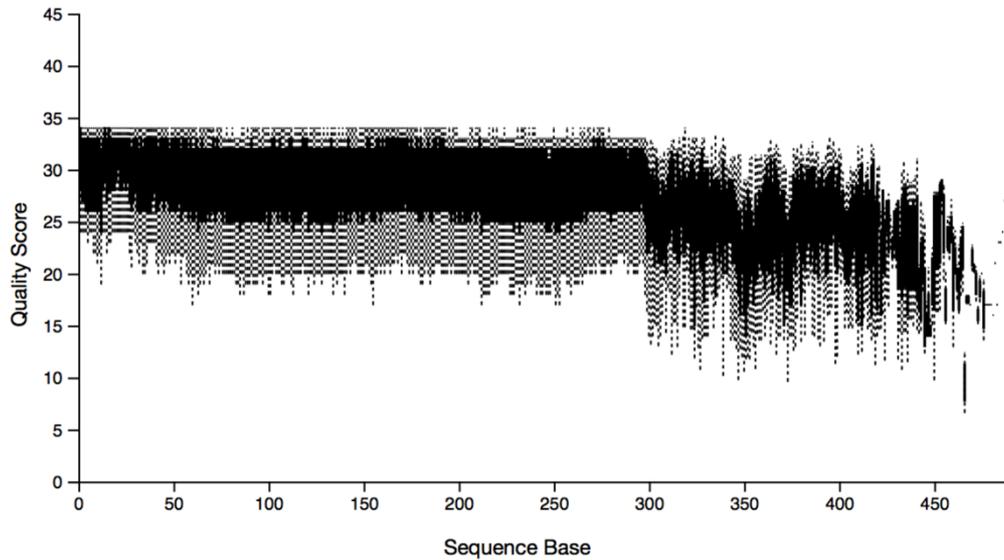


Figura 1. Análisis de calidad de las muestras. Se representa el nivel de calidad (que se espera sea >30) en relación a la longitud de la secuencia.

Adentrándonos en las muestras, observamos que tras realizar la asignación de las diferentes unidades de observación (features) las muestras presentan principalmente unas 70.000-80.000 unidades observación.

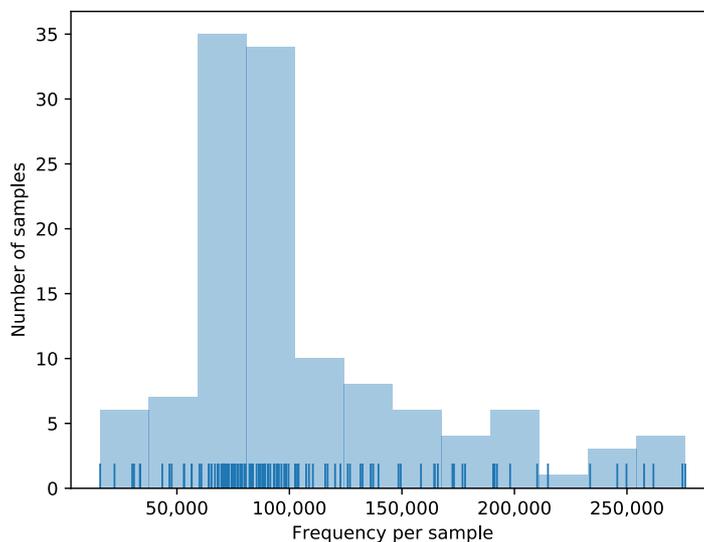


Figura 2. Histograma de la frecuencia de unidades de observación por muestra.

c) Microbiota intestinal

En un primer acercamiento a los resultados de la microbiota intestinal, se estableció el análisis de la beta diversidad. En la figura 3 se observan las distancias unweighted

Unifrac en un análisis de coordenadas principales las poblaciones microbianas de los tres tratamientos antes y después de la intervención. Si bien aparentemente no hay una diferencia, en un análisis PERMANOVA posterior, se estableció que existían diferencias entre ellas:

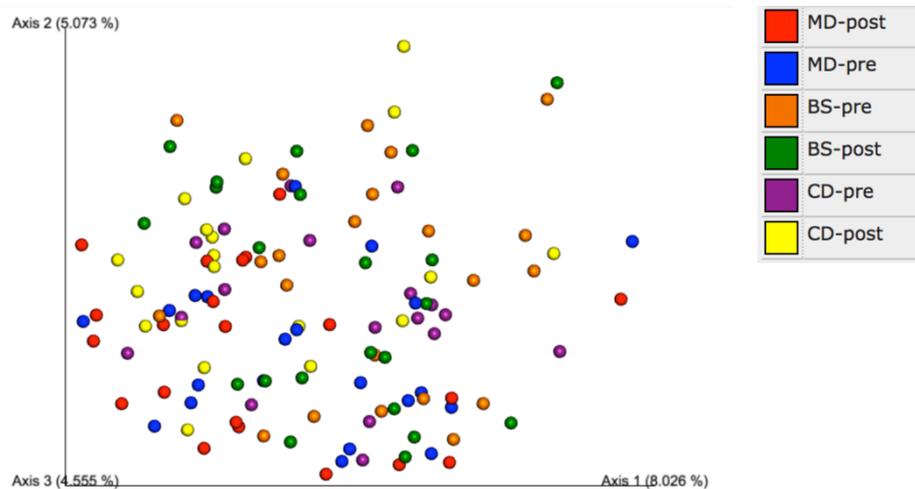


Figura 3. Análisis de coordenadas principales entre las poblaciones microbianas estudiadas. El análisis PERMANOVA establece que hay diferencias entre las poblaciones estudiadas ($P=0,001$).

En cuanto a la alfa diversidad, con la que podemos estimar la riqueza y diversidad de los tratamientos, observamos en la Figura 4 que teniendo en cuenta diferentes índices que si bien hay diferencias entre diferentes poblaciones, con la dieta mediterránea difiriendo claramente de las demás, hay unos pequeños cambios en las intervenciones que deben ser estudiadas para los casos particulares ya que de manera general se pierden:

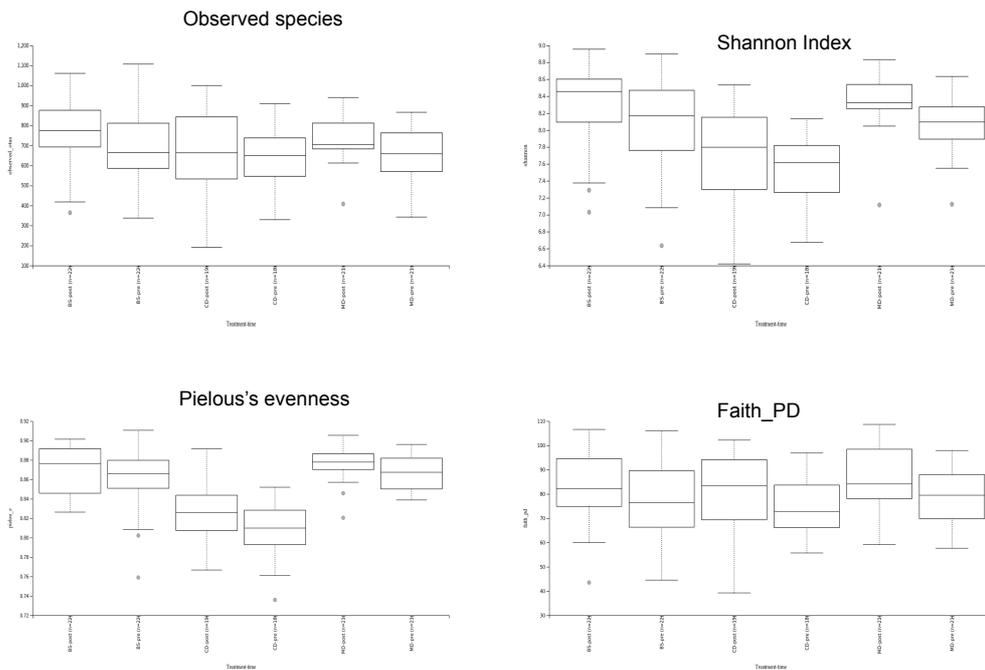


Figura 4. Alfa diversidad de los diferentes tratamientos estudiados. BS: cirugía bariátrica, CD: dieta cetogénica y MD: dieta mediterránea.

Así una vez explorados los datos de una manera general, pasamos a lo que es central en el estudio, los cambios que se encuentran dentro de cada tratamiento.

Cirugía bariátrica

Pacientes

Observando la tabla 1 encontramos que la cirugía bariátrica va a cambiar significativamente los siguientes parámetros: peso, glucosa, cintura, IMC, triglicéridos y hemoglobina glicosilada. Sin embargo no se observan diferencias en las variables de colesterol y presión arterial, indicativo de su procedimiento de cirugía, la manga gástrica.

Microbiota intestinal

Diversidad

Cuando atendemos a los análisis de beta diversidad para encontrar las relaciones de las poblaciones bacterianas no se llegan a observar diferencias significativas atendiendo al análisis de PERMANOVA ($p=0,407$) (figura 5a).

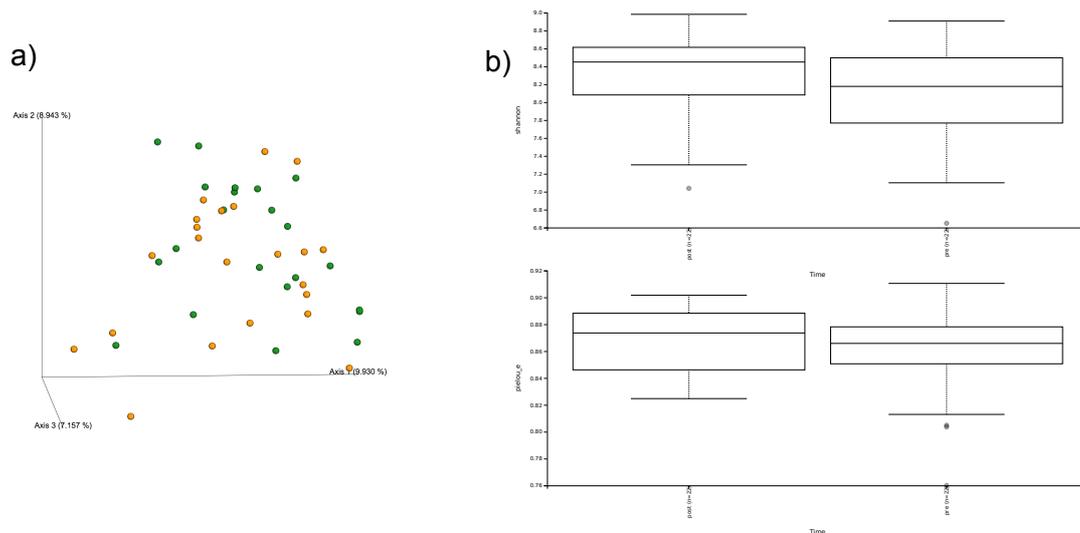
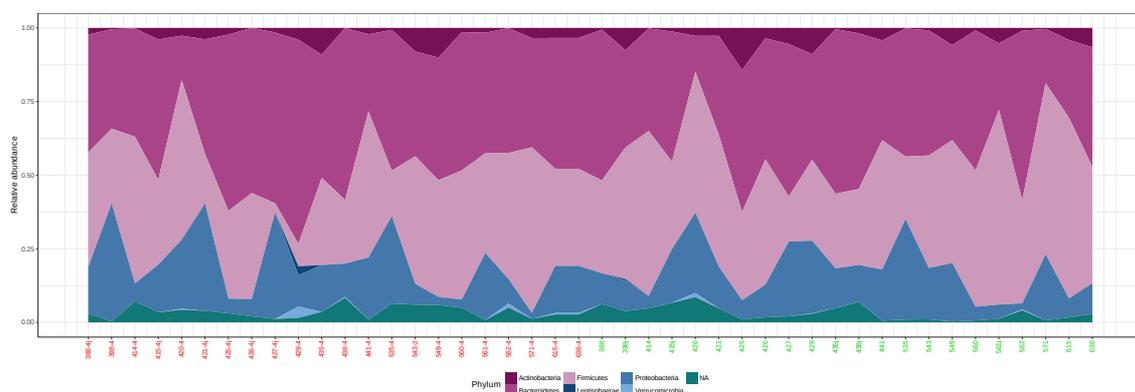


Figura 5. a) PCoA de la intervención de cirugía bariátrica para la pérdida de peso. Los puntos naranjas corresponden al tiempo basal, mientras que los verdes al punto post-intervención. b) Medidas de la Riqueza (índice de Shannon) y la diversidad (índice de Pielou) de las poblaciones bacterianas antes y después de la intervención quirúrgica.

En cuanto a la diversidad observamos un ligero aumento de la riqueza y de la diversidad, pero sin llegar a ser significativo (Figura 5b)

Poblaciones microbianas

Para observar la homogeneidad de las muestras en cuanto a la filogenia de sus poblaciones, realizamos un gráfico de áreas atendiendo a los filos, familias y géneros de las poblaciones, vemos que si bien se observan los mismos filos, se observa una gran variabilidad entre los diferentes individuos (figura 6):



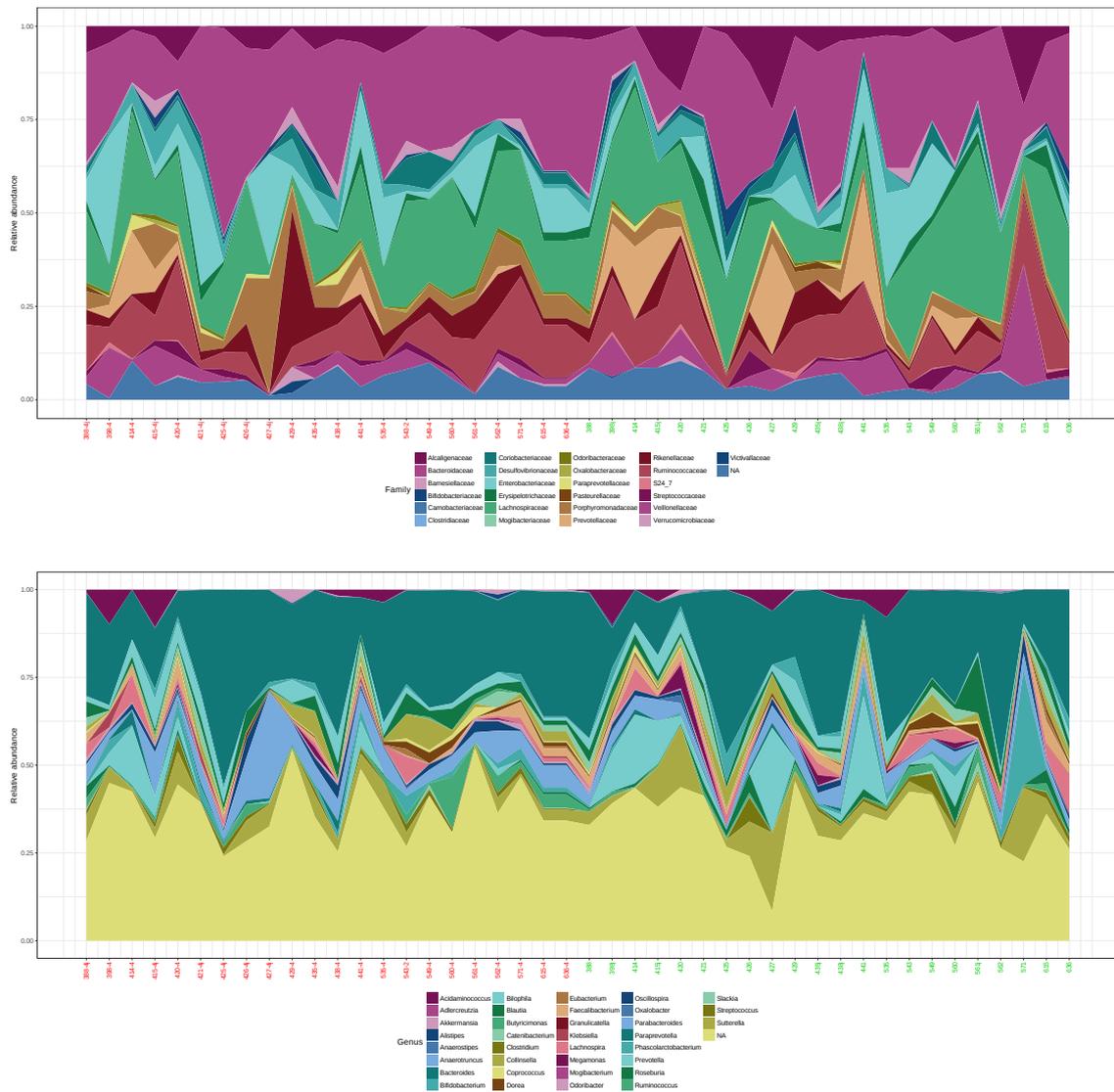
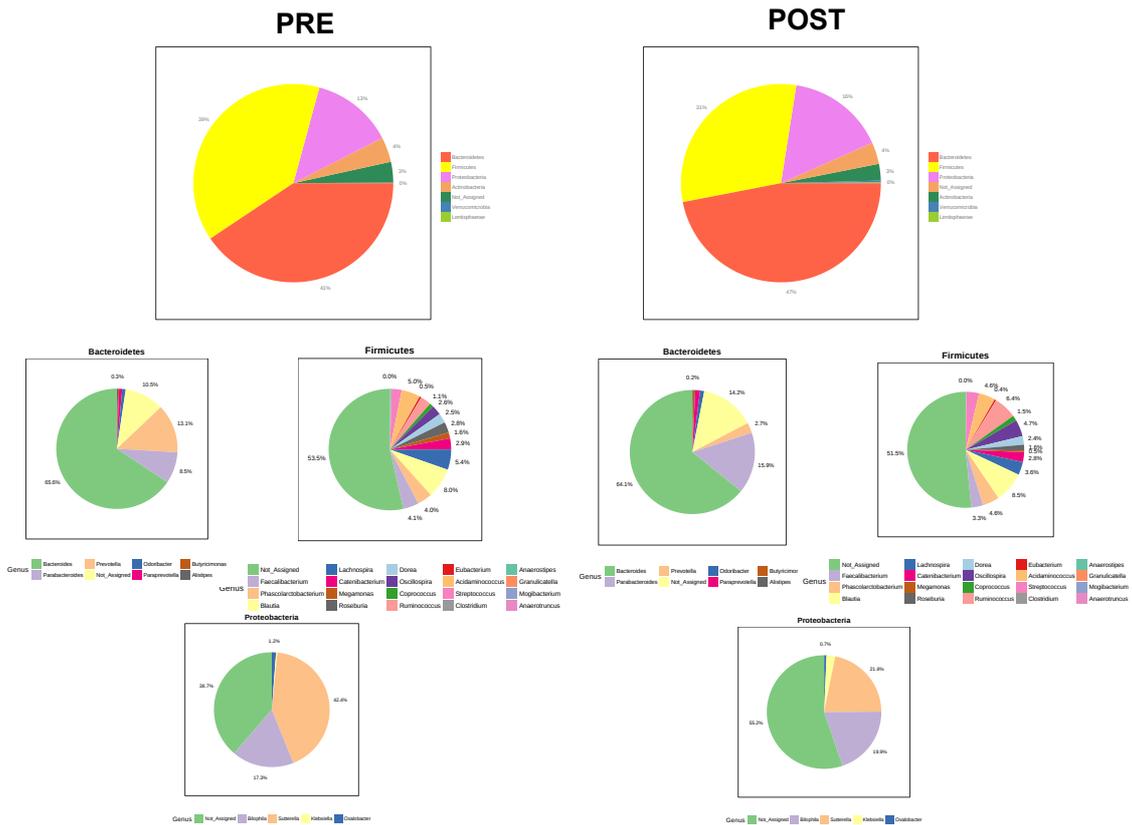


Figura 6. Gráficos de área de las poblaciones bacterianas de los pacientes sometidos a una cirugía bariátrica para la bajada de peso: a) nivel de filo, b) nivel de familia, c) nivel de género.

Para poder observar los resultados consenso de los diferentes puntos de análisis, vamos a observar un gráfico circular donde se van a representar las poblaciones consenso de los diferentes puntos de muestreo. En este caso mostramos los resultados para el nivel de filo y género.



Lo primero que observamos es un aumento de los *Bacteroidetes* y de las *Proteobacterias* en detrimento de los *Firmicutes*. Algo que llama la atención también es el alto número de bacterias que no se han podido clasificar. Sin embargo, poco se puede decir sin realizar una estadística de los datos de su abundancia diferencial. En el estudio de la microbiota intestinal se han establecido diferentes aproximaciones, si bien, no hay ninguna estandarización, por lo que muchas veces lo correcto es aplicar diferentes aproximaciones y observar cómo de homogéneas son entre ellas: análisis univariante, el más estricto; análisis usando MetagenomeSeq ideado para las plataformas de secuenciación masiva; y estrategias RNAseq. En la siguiente tabla (Tabla 3) observamos los diferentes taxones para los que encontramos diferencias significativas atendiendo a la abundancia diferencial antes y después del tratamiento:

Tabla 3. Taxones con la abundancia estadísticamente significativa diferente antes y después de la cirugía bariátrica atendiendo a tres estrategias estadísticas diferentes: análisis univariante (U-MannWhitney), MetagenomeSeq (Ajuste gaussiano) o RNAseq (algoritmo EdgeR basado en una distribución negativa binomial). Se muestran aquellos

taxones estadísticamente significativos después de corregirse para comparaciones múltiples (FDR).

| Univariante | MetagenomeSeq | RNaseq |
|--------------------------|------------------------------------|----------------------------------|
| <i>Carnobacteriaceae</i> | <i>Lentisphaerae</i> | <i>Lentisphaerae</i> (0.05215) |
| | <i>Bacteroidetes</i> | <i>Verrucomicrobia</i> (0.05215) |
| | <i>Carnobacteriaceae</i> | <i>Porphyromonadaceae</i> |
| | <i>S24 7</i> | <i>Victivallaceae</i> |
| | <i>Victivallaceae</i> | <i>Parabacteroides</i> |
| | <i>Mogibacteriaceae</i> | <i>Klebsiella</i> |
| | <i>Odoribacteraceae</i> | <i>Clostridium</i> |
| | <i>Prevotellaceae</i> (0.053044) | <i>Anaerotruncus</i> |
| | <i>Granulicatella</i> | <i>Anaerostipes</i> |
| | <i>Anaerostipes</i> | <i>Granulicatella</i> |
| | <i>Klebsiella</i> | <i>Megamonas</i> |
| | <i>Megamonas</i> | <i>Roseburia</i> |
| | <i>Mogibacterium</i> | <i>Ruminococcus</i> |
| | <i>Faecalibacterium</i> (0.055054) | <i>Akkermansia</i> |

En la siguiente figura (Figura 7) se pueden observar los taxones diferentes por el método RNaseq:

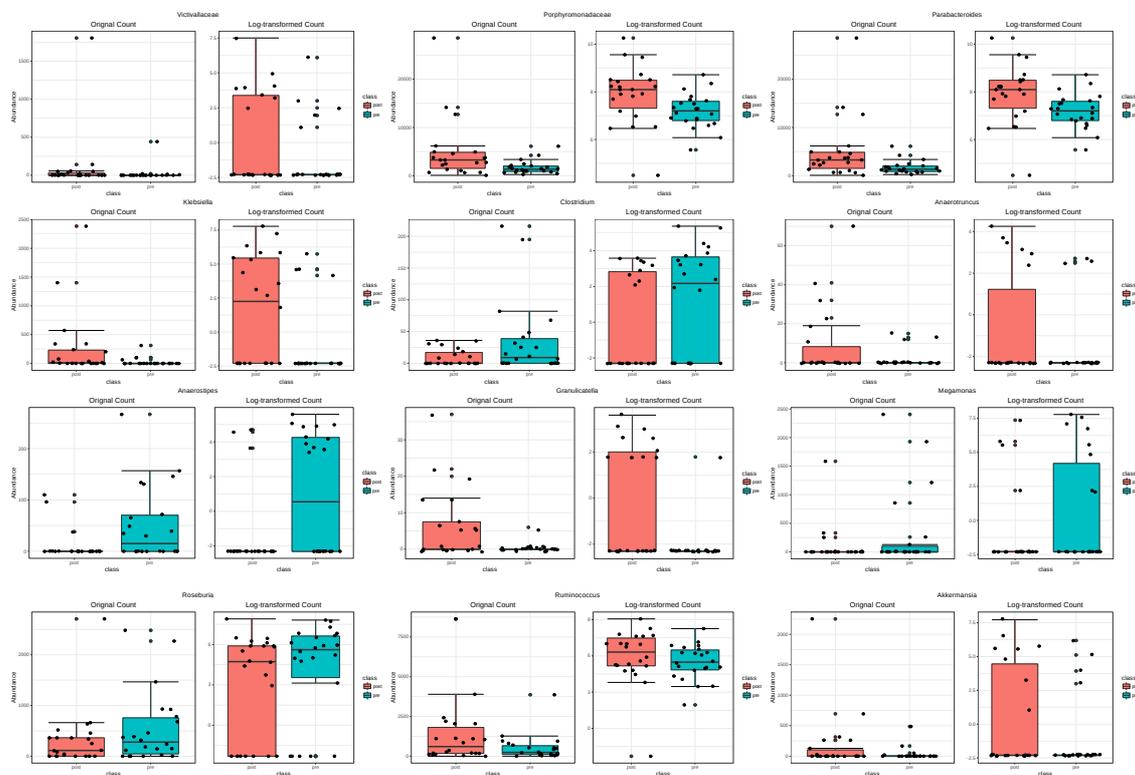


Figura 7. Poblaciones bacterianas atendiendo al nivel de filo, familia y género estadísticamente significativas comparando las poblaciones de la microbiota intestinal tras someterse a una cirugía bariátrica.

Búsqueda de marcadores

Uno de los análisis más importantes en el estudio de la microbiota intestinal es la búsqueda de marcadores de bacterias que sean clave para un tratamiento. De esta manera se han desarrollado dos estrategias: una basada en el algoritmo LEFse (Análisis linear discriminante basado en el efecto del tamaño) y un Random Forest. No se han encontrado diferencias significativas después de la corrección por comparaciones múltiples en el análisis con LEFSE, aunque se han observado diferentes tendencias. En cuanto al test de Random Forest se han observado grupos minoritarios que podrían establecer algún tipo de importancia, aunque hay que decir que parece que son varias las poblaciones que podrían tener un papel en ello: *Actinobacteriaceae*, *Carnobacteriaceae* y *Granulicatella* (Figura 8).

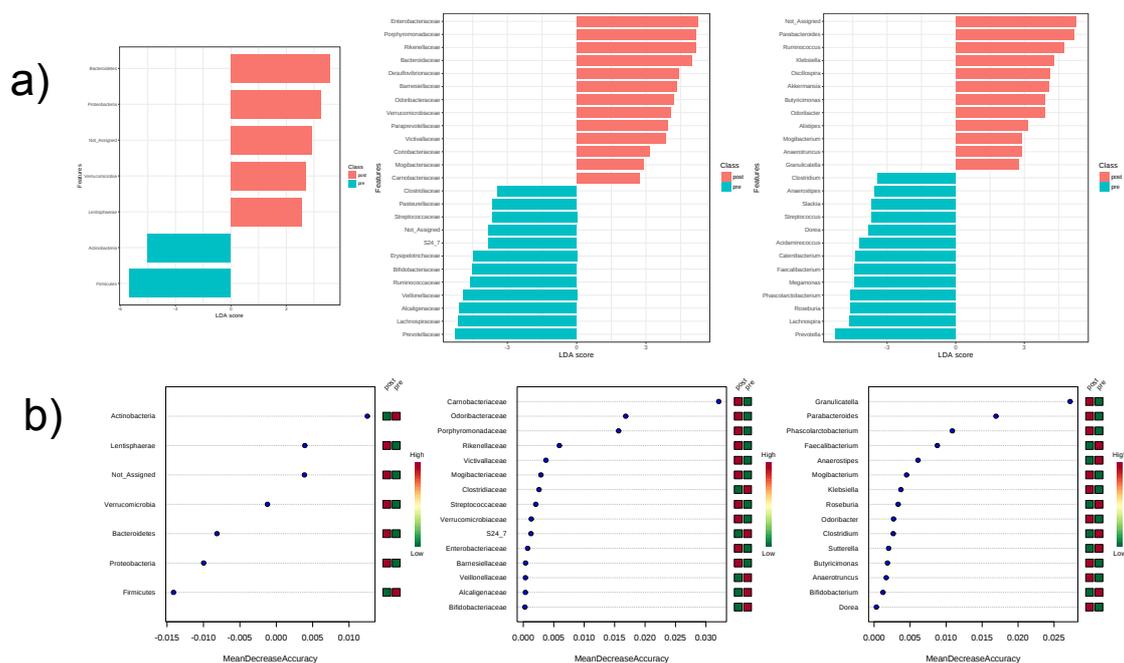


Figura 8. Búsqueda de marcadores mediante a) LEFse y b) Random Forest asociados a la cirugía bariátrica.

Dieta Mediterránea

Pacientes

Los pacientes que han sido sometidos a una intervención dietética con dieta mediterránea se observa que han perdido una media de 8 kg, por lo que su peso, IMC y perímetro de la cintura ha mejorado considerablemente. Otros parámetros se han visto igualmente beneficiados, como: el aumento del HDL-colesterol, una disminución de los triglicéridos y de la hemoglobina glicosilada.

Microbiota intestinal

Diversidad

Atendiendo a los datos de diversidad, en el caso de la dieta mediterránea observamos (Figura 9) que si bien en el PCoA no se observa una separación de las poblaciones bacterianas antes y después de la intervención dietética (PERMANOVA, $p=0,948$), en el caso de la alfa diversidad se observa un claro aumento de la riqueza (índice de Shannon, $p=0,012$) y de la diversidad (evenness, $p=0,054$).

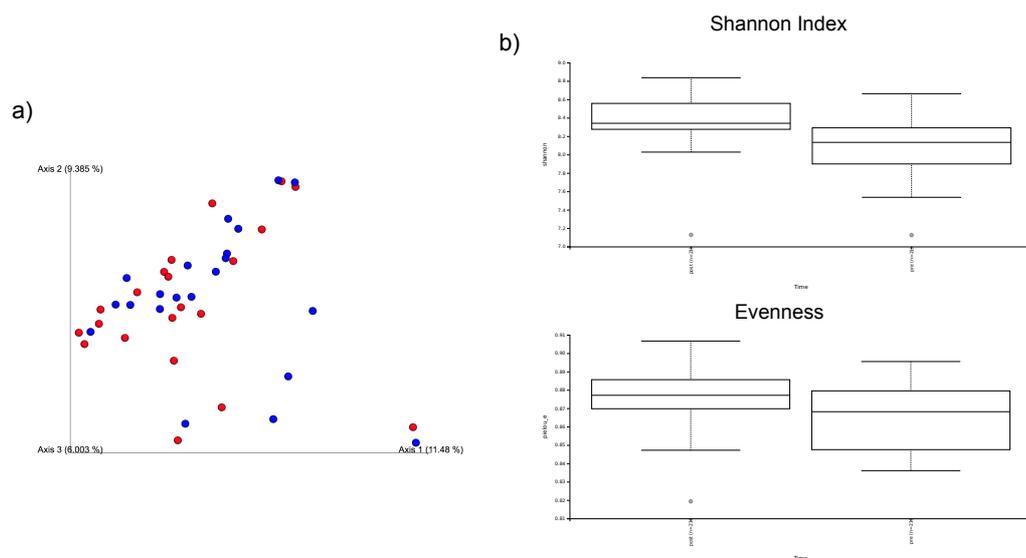
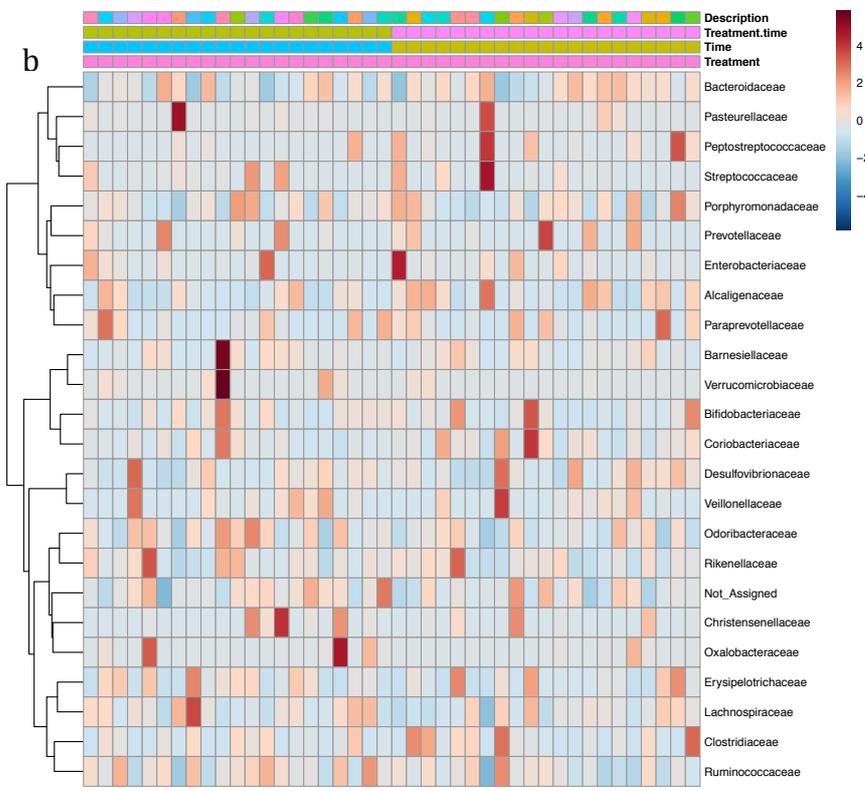
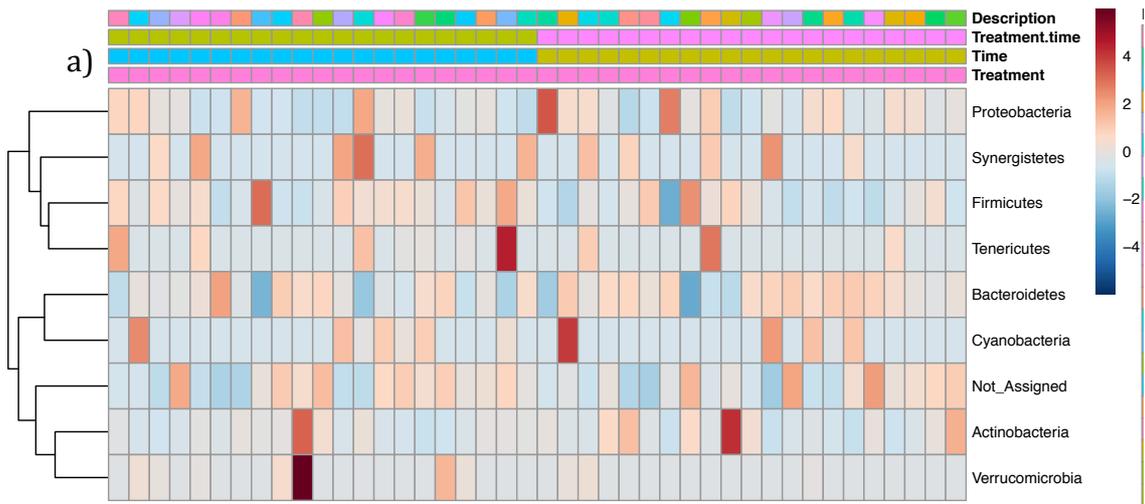


Figura 9. Diversidad microbiana de los pacientes sometidos a dieta mediterránea. a) Beta diversidad, Distancias Unweighted Unifrac, b) alfa diversidad medida con la riqueza (índice de Shannon) y de diversidad (evenness, índice de Pielou).

Observando las pautas individuales de los pacientes sometidos a MD observamos de nuevo que hay una gran heterogeneidad entre pacientes en todos los órdenes. Esta vez lo estudiamos gracias a los heatmaps (Figura 10)



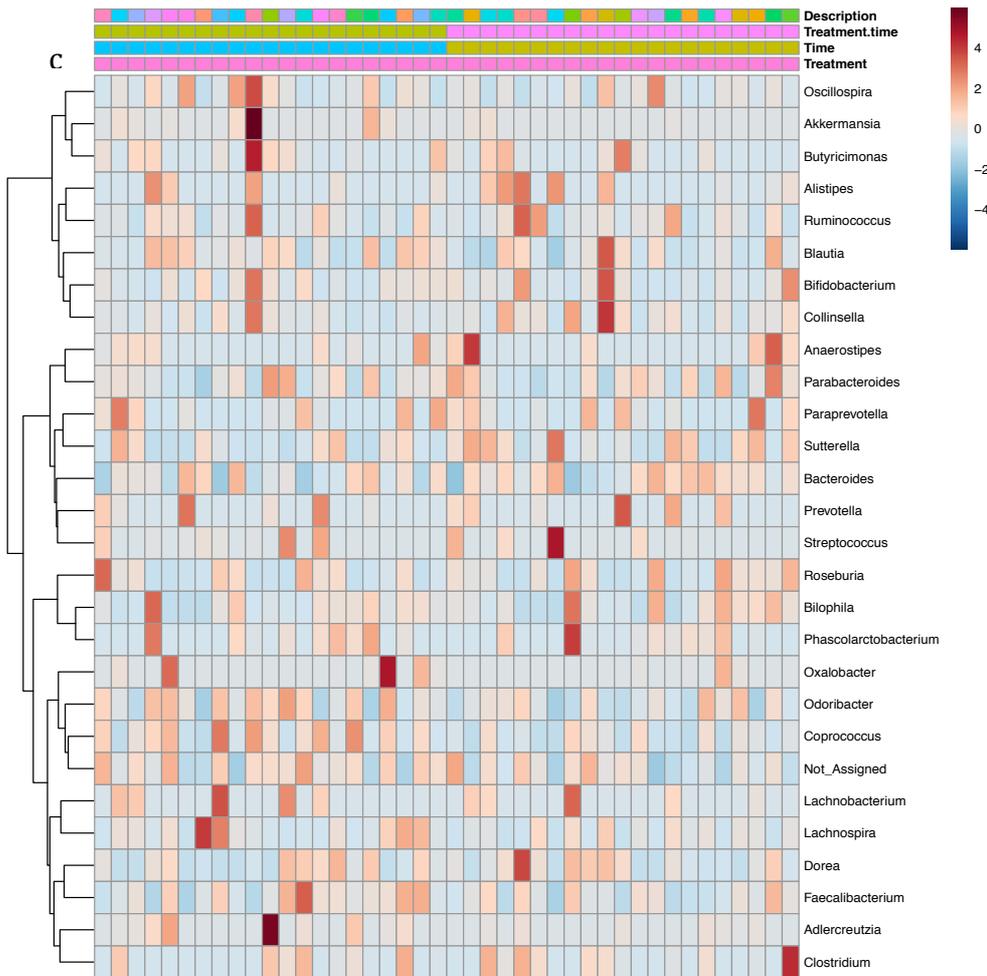


Figura 10. Heatmaps de las poblaciones bacterianas de los pacientes sometidos a dieta mediterránea. a) Nivel de filo, b) nivel de familia, c) nivel de género.

Pero lo que más nos interesa es observar las poblaciones a los diferentes tiempos (Figura 11):

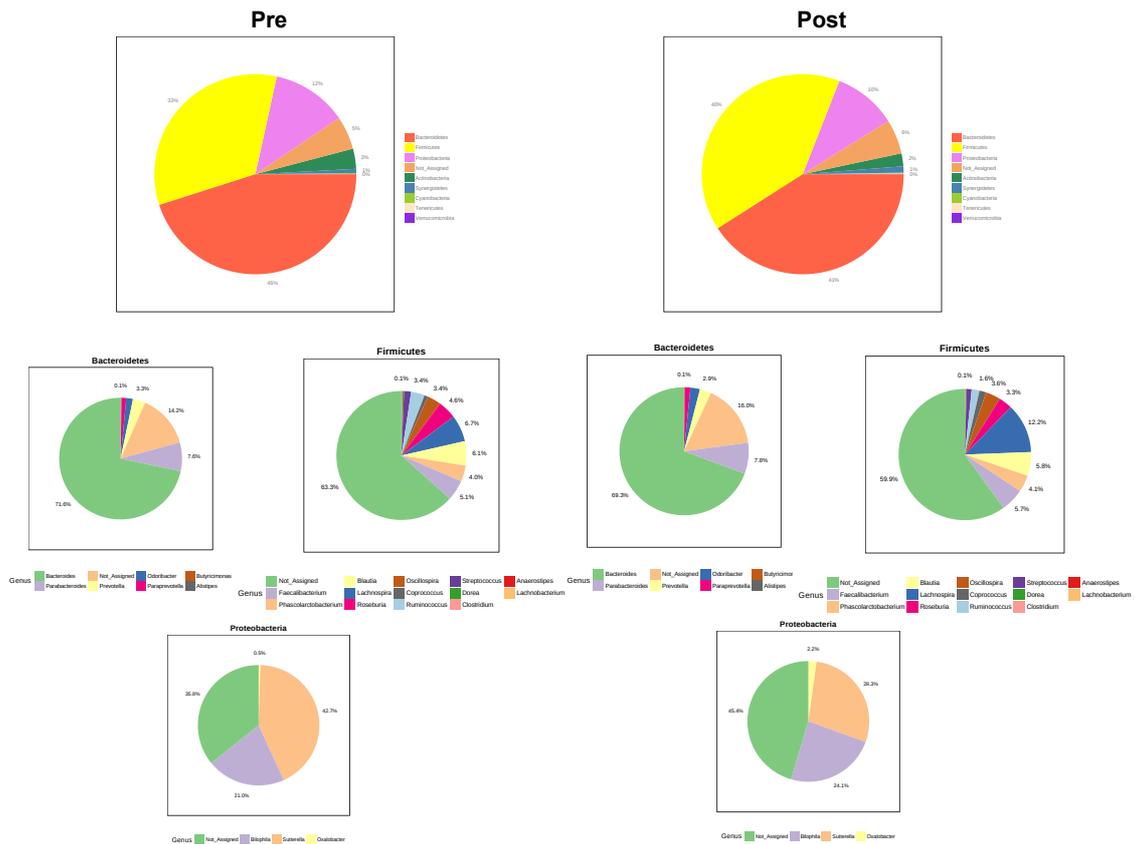


Figura 11. Gráficos circulares de las poblaciones bacterianas antes y después de la intervención de dieta mediterránea a nivel de filo y de los géneros pertenecientes a los principales filos encontrados.

Con los gráficos circulares podemos hacernos una mejor idea de lo que está ocurriendo. Tras el período de dieta mediterránea observamos principalmente una disminución de los *Bacteroidetes* con un aumento de los *Firmicutes*. Vemos que en el nivel de género muchas de las secuencias no se han podido identificar, pero esta pauta parece constante entre los dos tiempos medidos. Observamos un aumento bastante pronunciado de *Lachnospira* y una disminución de *Sutterella*. Así, nos adentramos en los buscar abundancias diferentes estadísticamente significativas entre los dos tiempos, siguiendo con la anterior estrategia de usar diferentes aproximaciones estadísticas. Los taxones diferentemente abundantes y estadísticamente significativos entre ambos tiempos se ven reflejados en la siguiente tabla (Tabla 4):

Tabla 4. Taxones estadísticamente significativos atendiendo a los diferentes test estadísticos: test univariante, MetagenomeSeq y RNAseq entre los dos tiempos de la intervención con dieta mediterránea.

| Univariante | MetagenomeSeq | RNAseq |
|-------------|--------------------------------------|------------------------------|
| | <i>Verrucomicrobia</i> (0.051179) | <i>Verrucomicrobia</i> |
| | <i>Oxalobacteraceae</i> | <i>Verrucomicrobiaceae</i> |
| | <i>Verrucomicrobiaceae</i> | <i>Peptostreptococcaceae</i> |
| | <i>Peptostreptococcaceae</i> | <i>Akkermansia</i> |
| | <i>Akkermansia</i> | <i>Lachnospira</i> |
| | | <i>Adlercreutzia</i> |
| | | <i>Oxalobacter</i> |

Se observa que los taxones afectados por la dieta son menores que en el caso de la cirugía bariátrica, prueba de una intervención no tan agresiva como la anterior técnica de pérdida de peso. Atendiendo a las variaciones se observa un aumento de las *Verrucomicrobiaceae* y *Oxalobacteriaceae*, así como de la bacteria beneficiosa *Akkermansia*, y una disminución de las *Peptostreptococcaceae*, cuando se analiza mediante MetagenomeSeq y con la aproximación RNAseq, se muestra un aumento de las *Verrucomicrobia*, su familia *Verrucomicrobiaceae* y su género *Akkermansia*, así como de *Lachnospira*, *Adlercreutzia* y *Oxalobacter*, y una disminución de las *Peptostreptococcaceae* (Figura 12).

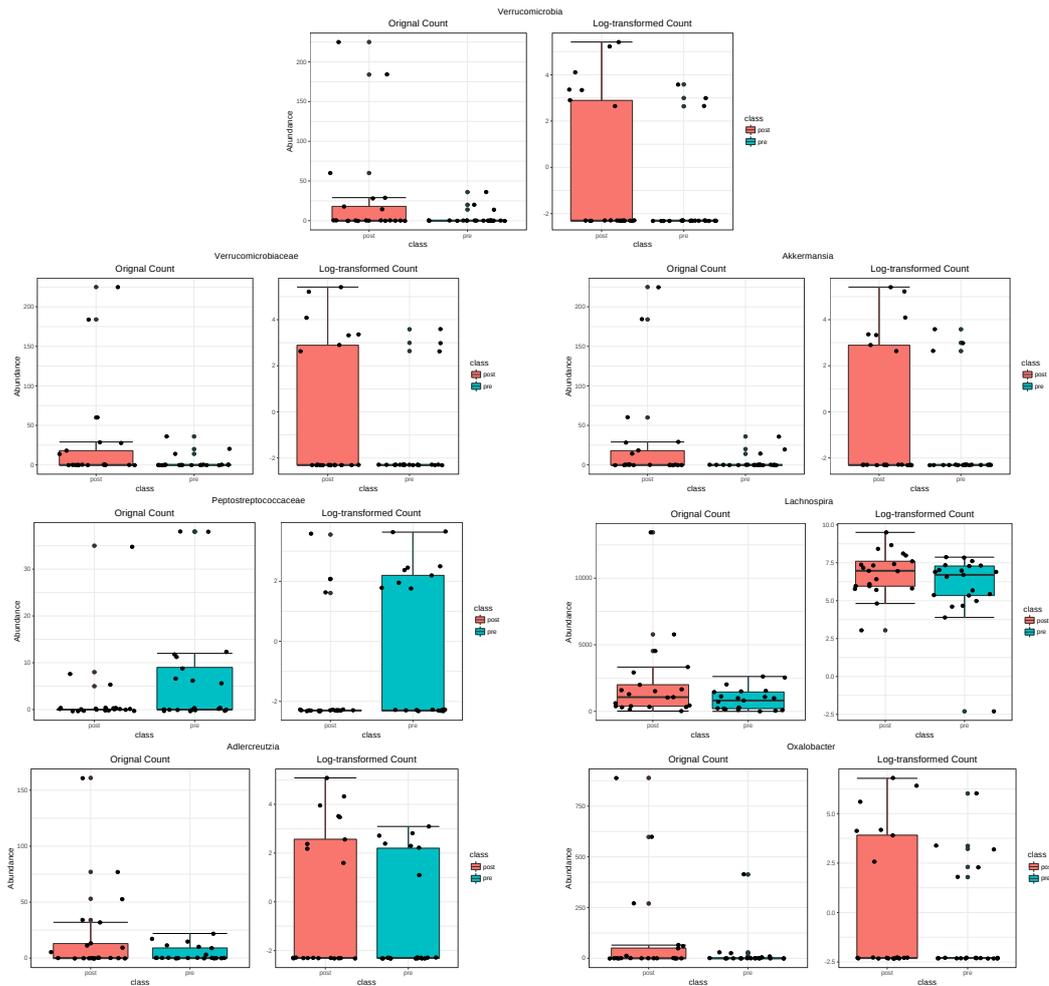


Figura 12. Taxones diferentemente abundantes a los dos tiempos medidos de la intervención con dieta mediterránea atendiendo a la estrategia estadística seguida por RNAseq.

Búsqueda de marcadores

Utilizando la estrategia anterior de buscar marcadores mediante la herramienta estadística LEFse y Random Forest, podemos decir que si bien sigue sin haber ningún grupo bacteriano claro por la herramienta LEFse estadísticamente significativa, en el Random Forest se han encontrado unos taxones que tienen algo más de poder que en la cirugía bariátrica. Así, podemos ver que los *Firmicutes* aumentan, disminuyendo las *Actinobacteria* y las *Proteobacteria*. Aumentan las *Verrucomicrobiaceae* y las *Bifidobacteriaceae*, así como *Coprococcus* (Figura 13):

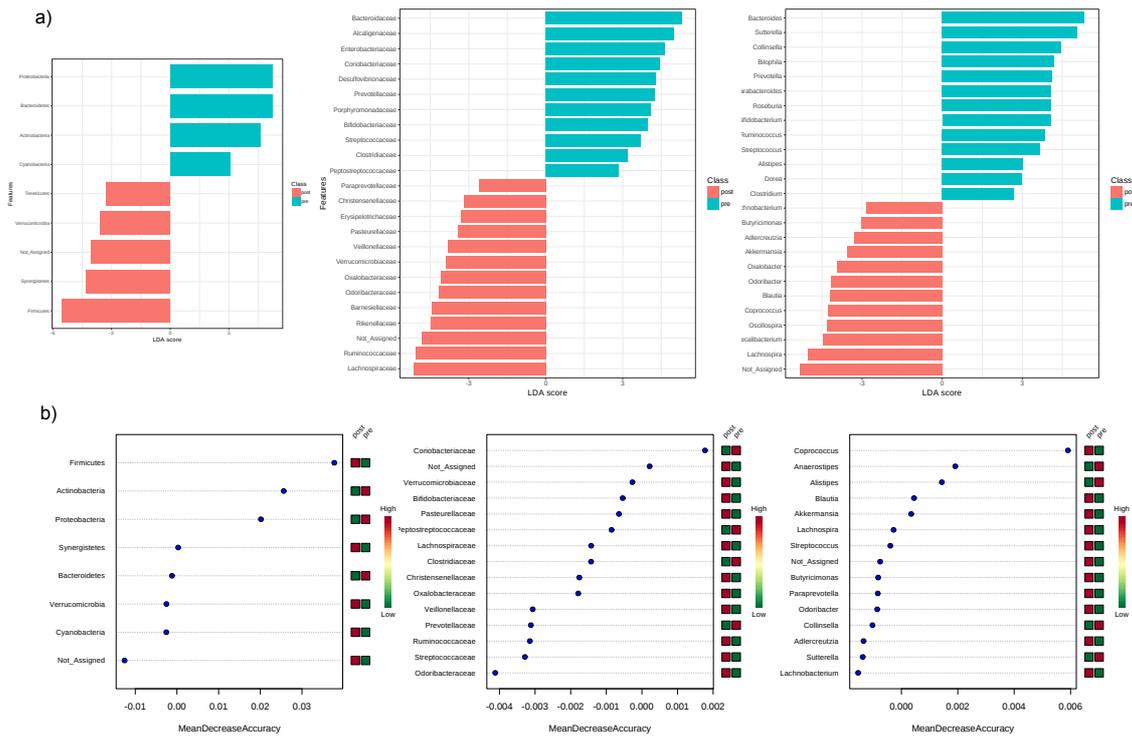


Figura 13. Búsqueda de marcadores mediante a) LEFSe y b) Random Forest asociados a la dieta mediterránea.

Dieta cetogénica

Pacientes

En cuanto a la pérdida de peso, la dieta cetogénica se encuentra en un nivel intermedio entre la MD y la BS, de igual manera que en muchas de las mejoras metabólicas que se han registrado tras la intervención cetogénica: una bajada de los niveles de colesterol total, triglicéridos y de la presión arterial diastólica, así como de la hemoglobina glicosilada.

Microbiota intestinal

Diversidad

La dieta cetogénica va a transformar completamente la microbiota intestinal, como se observa en el análisis de su beta diversidad en el que un análisis de PERMANOVA nos da diferencias estadísticamente significativas entre la población microbiana a tiempo basal y tras dos meses sometidos a dieta cetogénica ($P=0,017$). Sin embargo, la riqueza y la diversidad, si bien se observa un pequeño incremento, no llega a ser

estadísticamente significativo (Shannon index, $p=0,204$, Pielou index, $p=0,193$). Estos datos se pueden observar en la Figura 14:

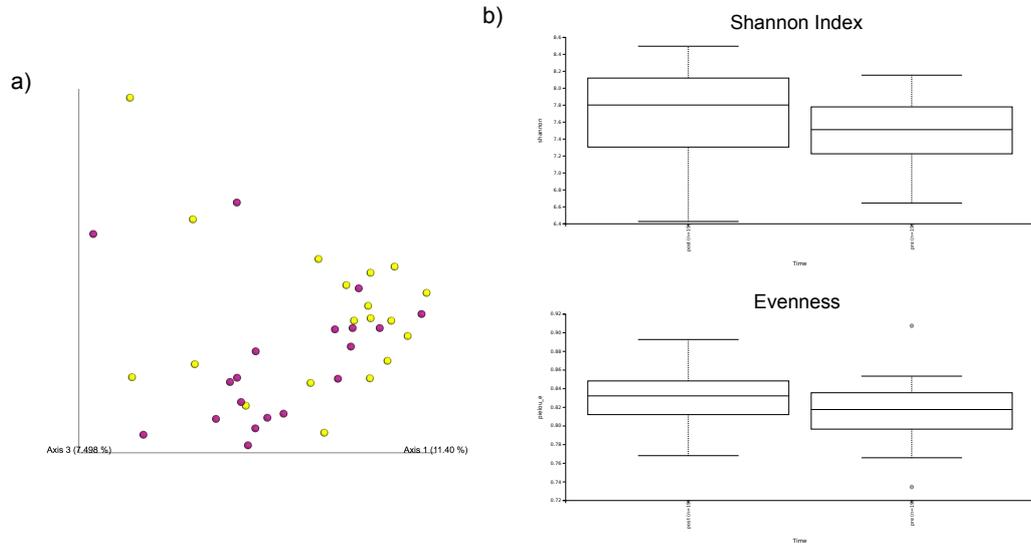
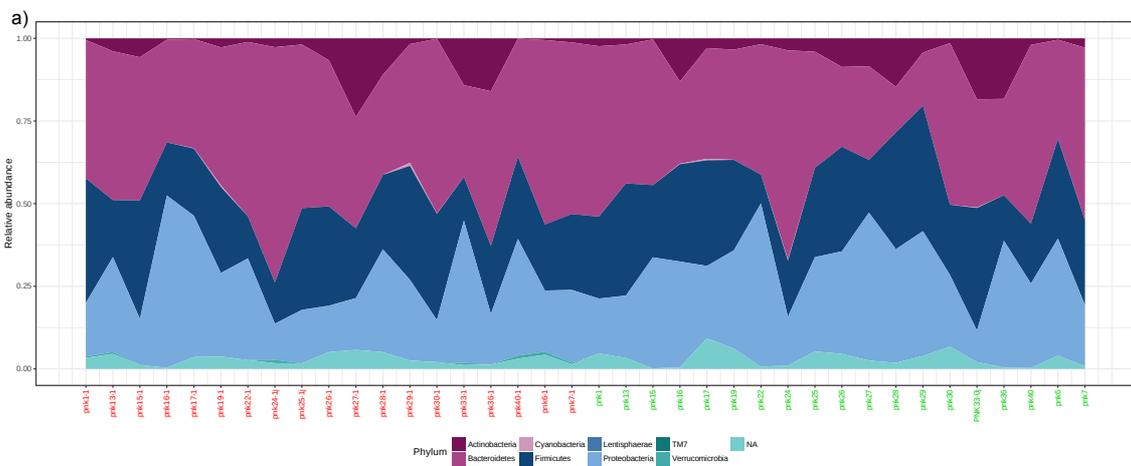


Figura 14. Diversidad microbiana de los pacientes sometidos a dieta cetogénica. a) Beta diversidad, Distancias Unweighted UniFrac, b) alfa diversidad medida con la riqueza (índice de Shannon) y de diversidad (evenness, índice de Pielou).

Poblaciones microbianas

Observamos de nuevo en los gráficos de áreas una gran variación interindividual. Pero en este caso se observan claras diferencias entre el pre-tratamiento y el post-tratamiento, sobre todo al nivel de familia y género, con la aparición y desaparición de bacterias (Figura 15):



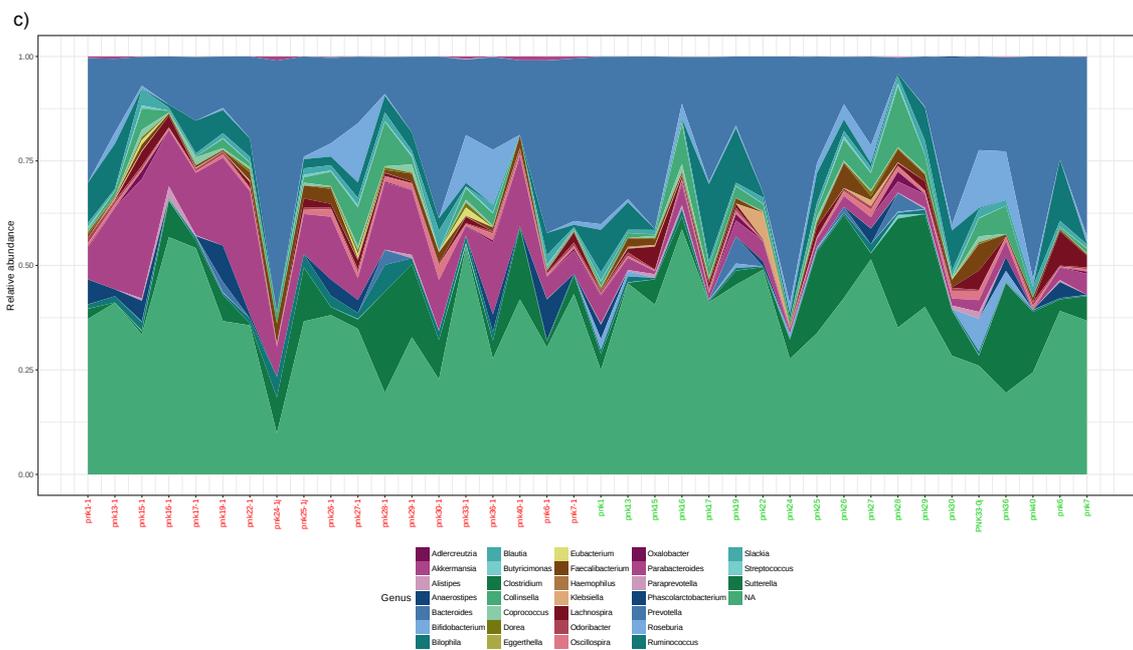
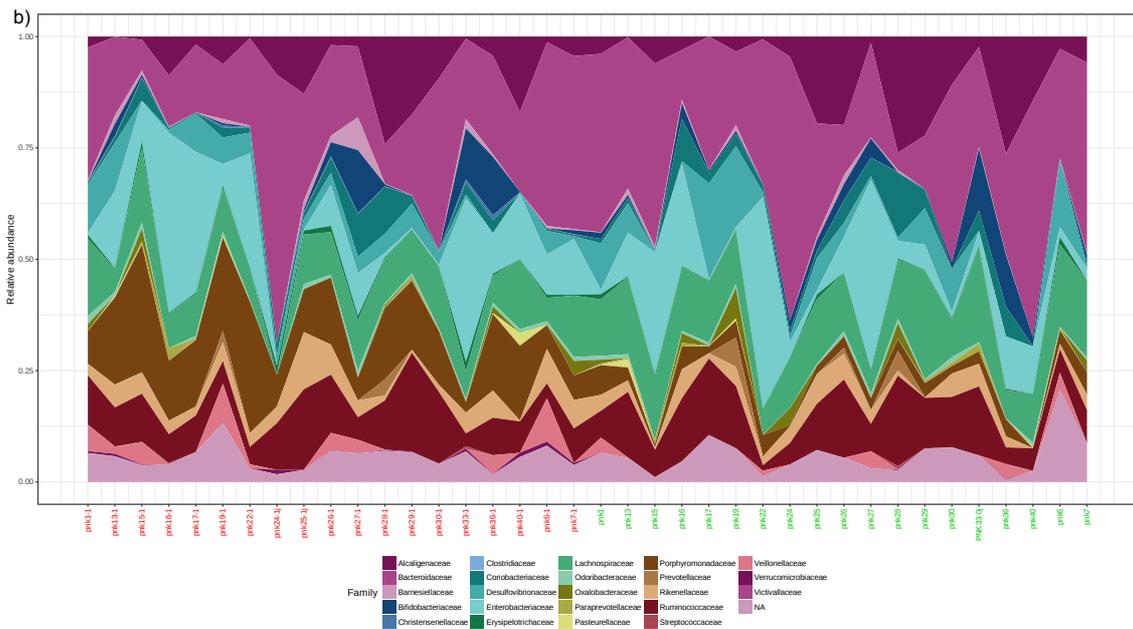


Figura 15. Gráficos de área de las poblaciones bacterianas de los pacientes sometidos a una dieta cetogénica para la bajada de peso: a) nivel de filo, b) nivel de familia, c) nivel de género.

En los gráficos circulares (Figura 16), observamos un aumento de la variedad de bacterias. *Parabacteroides* y *Phascolabacterium* sufrieron un gran incremento, como decrecieron *Lachnospira*, *Sutterella* y *Klebsiella*.

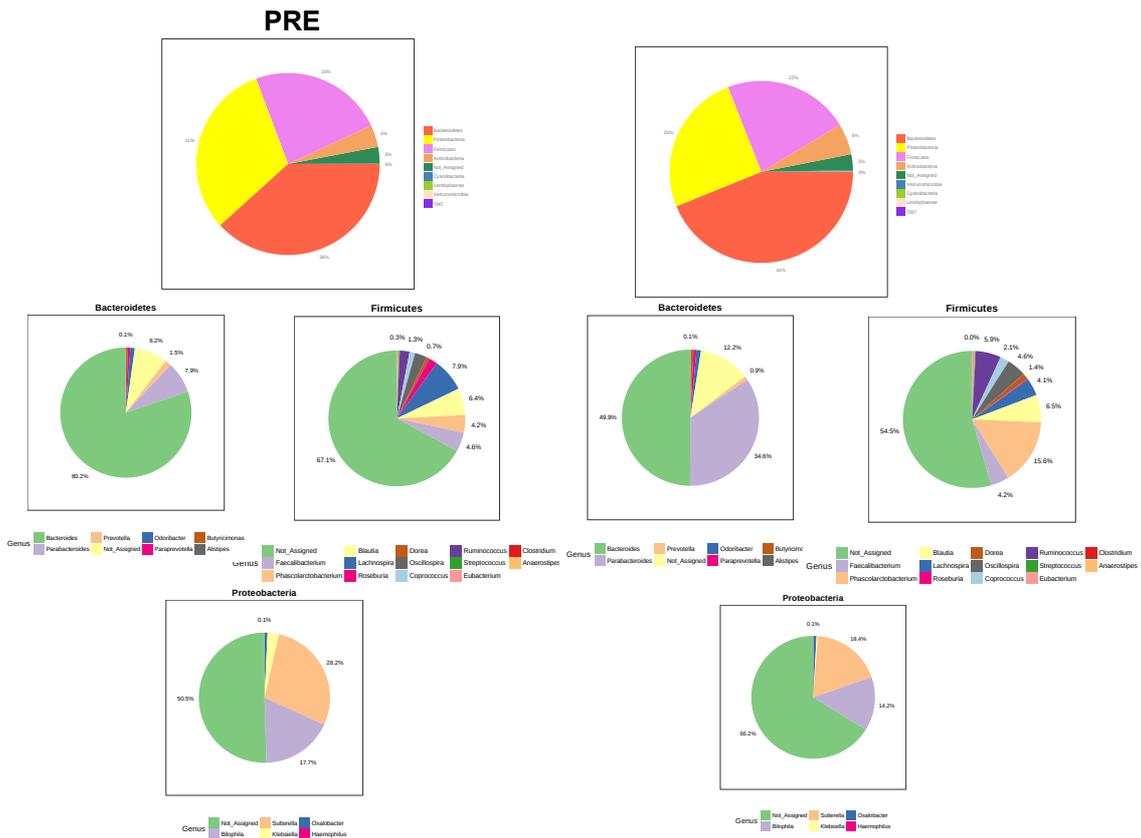


Figura 16. Gráficos circulares de las poblaciones bacterianas antes y después de la intervención de dieta cetogénica a nivel de filo y de los géneros pertenecientes a los principales filos encontrados.

Tabla 5. Taxones estadísticamente significativos atendiendo a los diferentes test estadísticos: test univariante, MetagenomeSeq y RNaseq entre los dos tiempos de la intervención con dieta cetogénica.

| Univariante | MetagenomeSeq | RNaseq |
|-------------------------------|------------------------------|----------------------------|
| <i>Porphyromonadaceae</i> | <i>Verrucomicrobia</i> | <i>Verrucomicrobia</i> |
| <i>Christensenellaceae</i> | <i>Porphyromonadaceae</i> | <i>Porphyromonadaceae</i> |
| <i>Parabacteroides</i> | <i>Christensenellaceae</i> | <i>Verrucomicrobiaceae</i> |
| <i>Roseburia</i> | <i>Verrucomicrobiaceae</i> | <i>Parabacteroides</i> |
| <i>Ruminococcus</i> | <i>Parabacteroides</i> | <i>Roseburia</i> |
| <i>Akkermansia</i> (0.058383) | <i>Akkermansia</i> | <i>Akkermansia</i> |
| | <i>Adlercreutzia</i> | <i>Ruminococcus</i> |
| | <i>Roseburia</i> | <i>Klebsiella</i> |
| | <i>Ruminococcus</i> | |
| | <i>Phascolarctobacterium</i> | |
| | <i>Eggerthella</i> | |
| | <i>Clostridium</i> | |

Esta tendencia observada de grandes cambios en las poblaciones bacterianas, se ve reflejada en el análisis de abundancia diferencial, ya que se observan grandes cambios en las bacterias con la intervención dietética, incluso con el análisis univariante (Tabla 5):

Así, se observan muchos cambios con todas las aproximaciones, pero con MetagenomeSeq se han reportado una mayor cantidad: aumento de la mayoría de los taxones que se ven a continuación (Figura 17), a excepción de *Roseburia* y *Clostridium* que se vieron mermados.

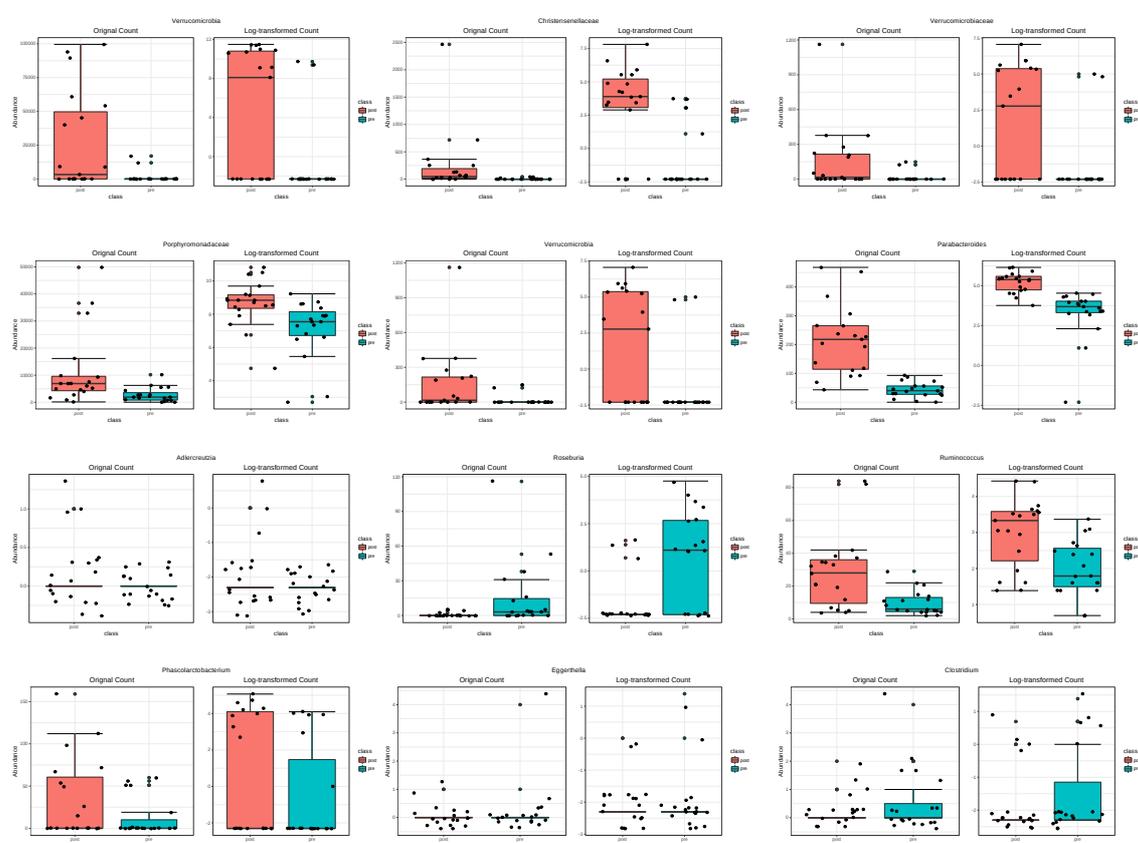


Figura 17. Taxones diferentemente abundantes a los dos tiempos medidos de la intervención con dieta cetogénica atendiendo a la estrategia estadística seguida por Metagenomeseq.

Búsqueda de biomarcadores

En este caso, se han encontrado diferencias significativas incluso por la herramienta LEFse por lo que podrían servir como biomarcadores en los siguientes grupos: *Porphyromonadaceae* y *Christensenellaceae*, así como en *Parabacteroides*, *Roseburia*

y *Ruminococcus*. Atendiendo al análisis por Random Forest, también se han encontrado los siguientes grupos: aumento de *Verrucomicrobia* es indicador del post-tratamiento, así como las *Porphyromonadaceae* y *Parabacteroides* (Figura 18):

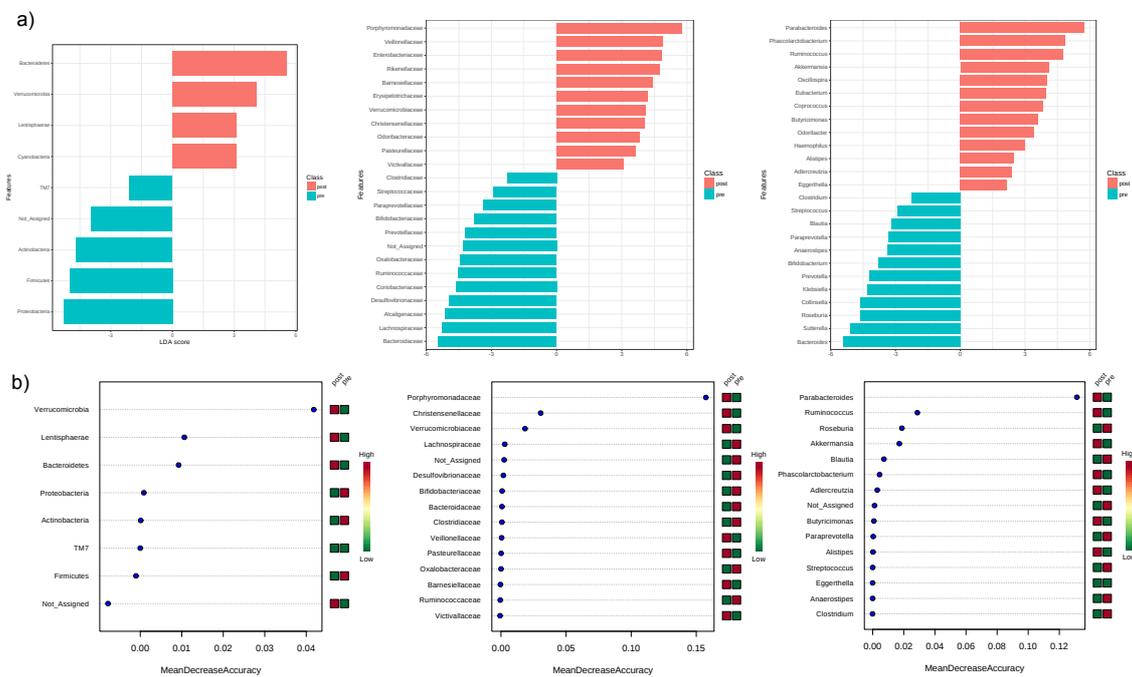


Figura 18. Búsqueda de marcadores mediante a) LEfSe y b) Random Forest asociados a la dieta cetogénica.

Microbiota intestinal a tiempo final

Diversidad

Para poder hacer una valoración conjunta de las diferentes estrategias de pérdida de peso, vamos a analizar las tres poblaciones a tiempo final. Observamos que hay diferencias claras entre las tres poblaciones bacterianas en el análisis de PERMANOVA con las tres poblaciones ($P=0,001$) y también cuando se estudiaban apareadas ($P=0,001$). En cuanto a los análisis de riqueza se observa que hay diferencias claras ($P=0,0002$), pero al ahondar en las relaciones se observa que las diferencias se encuentran entre la cirugía bariátrica y la dieta cetogénica ($P=0,0009$) y la dieta cetogénica y la mediterránea ($P=0,0004$), no encontrándose entre la cirugía bariátrica y la dieta mediterránea. Por su parte en la diversidad, se observan exactamente las mismas relaciones: entre los grupos ($P=0,00003$), entre la cirugía bariátrica y la dieta cetogénica ($P=0,0003$), y la dieta cetogénica y la dieta mediterránea ($P=0,00009$), no encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre la dieta mediterránea y la cirugía

bariátrica (P=0,610). Estos resultados se pueden observar de manera gráfica en la figura 19:

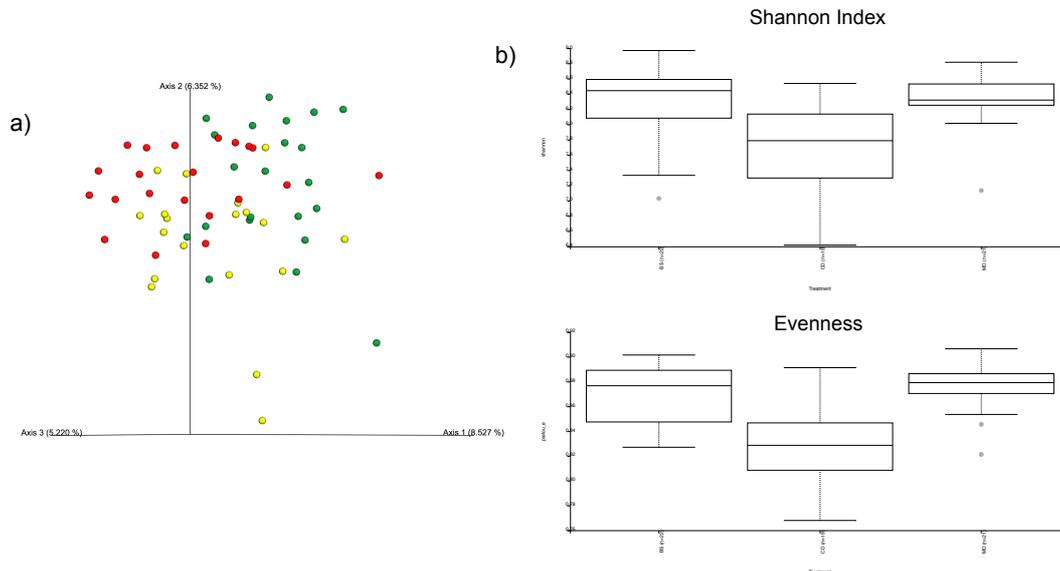


Figura 19. Diversidad microbiana de los pacientes sometidos a las diferentes intervenciones para la pérdida de peso. a) Beta diversidad, Distancias Unweighted UniFrac, b) alfa diversidad medida con la riqueza (índice de Shannon) y de diversidad (evenness, índice de Pielou). BS: cirugía bariátrica, CD: dieta cetogénica y MD: dieta mediterránea.

Búsqueda de biomarcadores

Si directamente nos vamos a la búsqueda de biomarcadores con las tres poblaciones, encontramos grupos bacterianos claros atendiendo a las dos estrategias seguidas: LEFse y Random Forest. En la primera observamos

En la dieta cetogénica observamos un aumento considerable de *Proteobacteria*, mientras que en la dieta mediterránea de *Firmicutes*. Estos dos resultados se observan en ambas estrategias. A nivel de familia, y teniendo en cuenta las dos estrategias, nos quedamos con que la familia *Porphyromonadaceae* está aumentada en la dieta cetogénica, mientras que las *Streptococcaceae* en la cirugía bariátrica y las *Ruminococcaceae* en la dieta mediterránea. A su vez, a nivel de género, nos quedamos con *Parabacteroides* en la dieta cetogénica, *Streptococcus* y *Dorea* en la cirugía bariátrica y *Roseburia*, *Lachnospira* y *Odoribacter* en la dieta mediterránea (Figura 20):

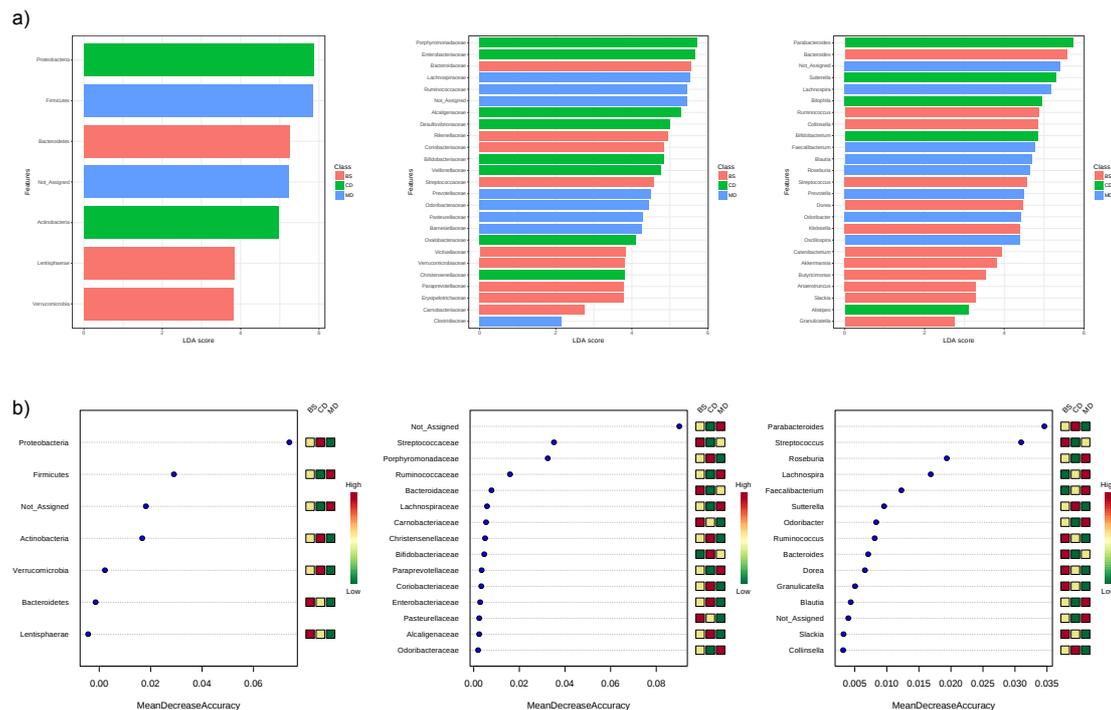


Figura 20. Búsqueda de marcadores mediante a) LEFSe y b) Random Forest asociados a la cada tipo de intervención para la pérdida de peso. BS: cirugía bariátrica, CD: dieta cetogénica y MD: dieta mediterránea.

d) Análisis funcional

Tras conocer el perfil de la microbiota intestinal, es el momento de conocer qué es lo que potencialmente puede hacer, de manera que podamos entender mejor cómo la microbiota intestinal está interviniendo en la pérdida de peso en cada tipo de intervención. Para ello, se analizaron nuestras poblaciones con el programa PICRUST, que utilizando las secuencias del 16S rRNA, es capaz de inferir los genes de esas bacterias.

Cirugía bariátrica

El efecto de la cirugía bariátrica en la intensificación del metabolismo se puede observar en la potencialidad de la funcionalidad de la microbiota de los pacientes. En la figura 21 se pueden observar las rutas que se vieron afectadas por el tratamiento. Llama la atención la mejora del metabolismo hidrocarbonado y lipídico. Por otro lado parece que se pierde actividad en el metabolismo de los nucleótidos, aminoácidos y vitaminas, y de una forma general, en el metabolismo energético, al disminuir la cantidad de energía a metabolizar.

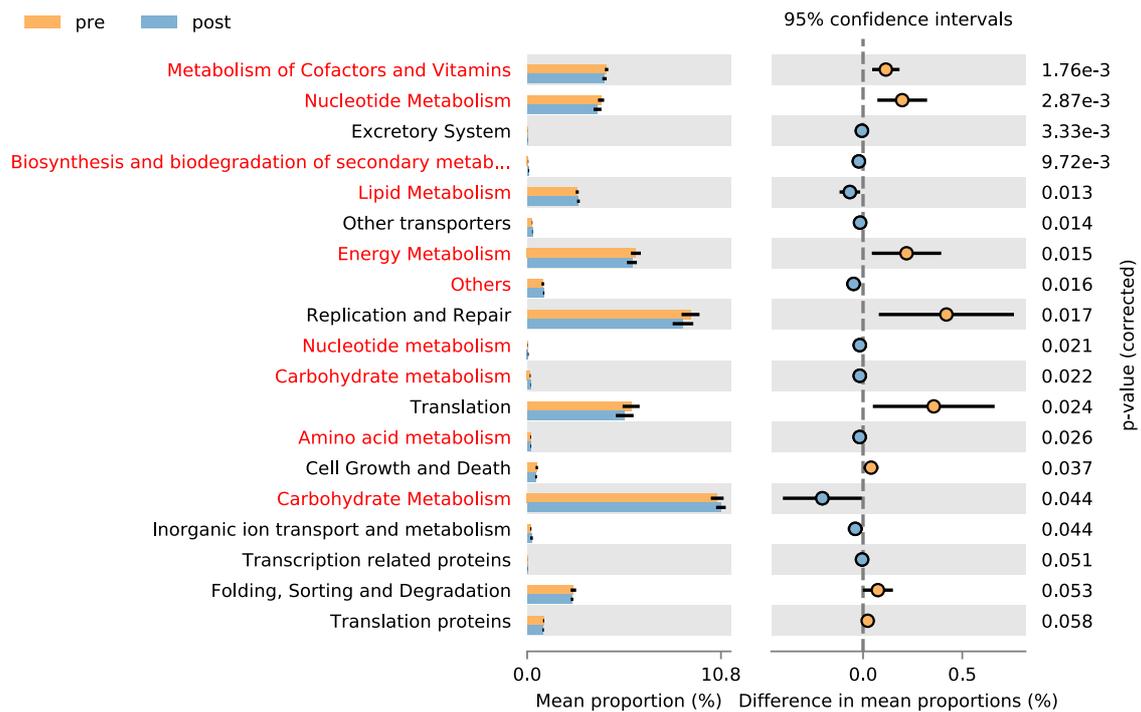


Figura 21. Rutas KEGG de las contribuciones predichas de los datos metagenómicos de cirugía bariátrica en el nivel 2. En rojo se han resaltado las rutas implicadas en el metabolismo.

Adentrándonos más concretamente en lo que significan estas rutas metabólicas, observamos en la figura 22 como todas las rutas implicadas en el metabolismo aminoacídico se han visto altamente mermadas con la intervención, si bien algunas se han visto incrementadas como la degradación de la lisina o el metabolismo de la beta-alanina. Sin embargo, el metabolismo de los ácidos grasos se ha visto incrementado

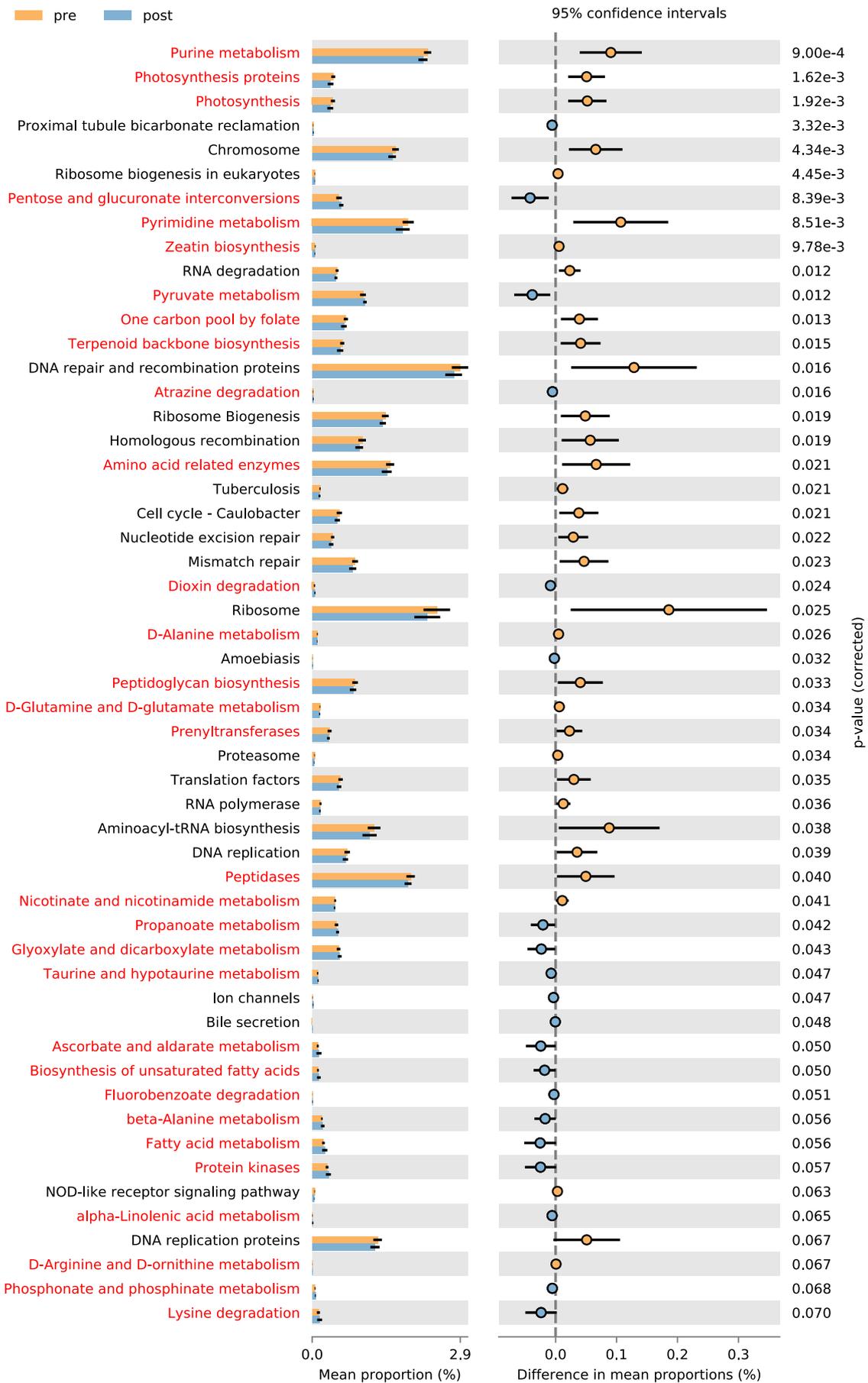


Figura 22. Rutas KEGG de las contribuciones predichas de los datos metagenómicos de cirugía bariátrica en el nivel 3. En rojo se han resaltado las rutas implicadas en el metabolismo.

Dieta Mediterránea

Como en el caso del perfil de microbiota intestinal, en el caso de la funcionalidad de sus genes también se han observado pocas variaciones con la intervención dietética de tipo mediterráneo. Como se observa en la figura 23, no hay grandes rutas implicadas en el metabolismo, si no que las rutas más afectadas pertenecen a procesos regulatorios del propio sistema

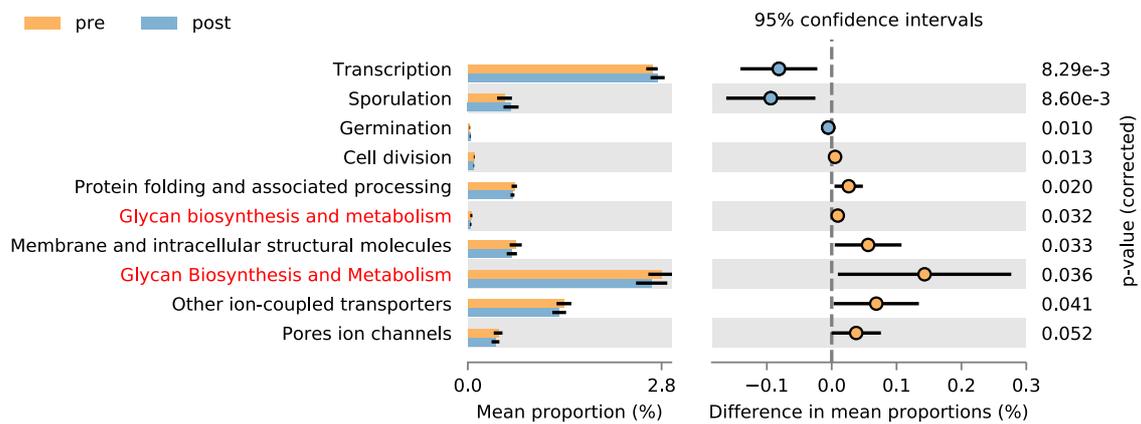


Figura 23. Rutas KEGG de las contribuciones predichas de los datos metagenómicos de dieta mediterránea en el nivel 2. En rojo se han resaltado las rutas implicadas en el metabolismo.

Yendo un poco más lejos para entender mejor las rutas encontramos en la Figura 24 que ha habido una disminución de la biosíntesis de lipopolisacáridos y un aumento en la síntesis y degradación de los cuerpos cetónicos.

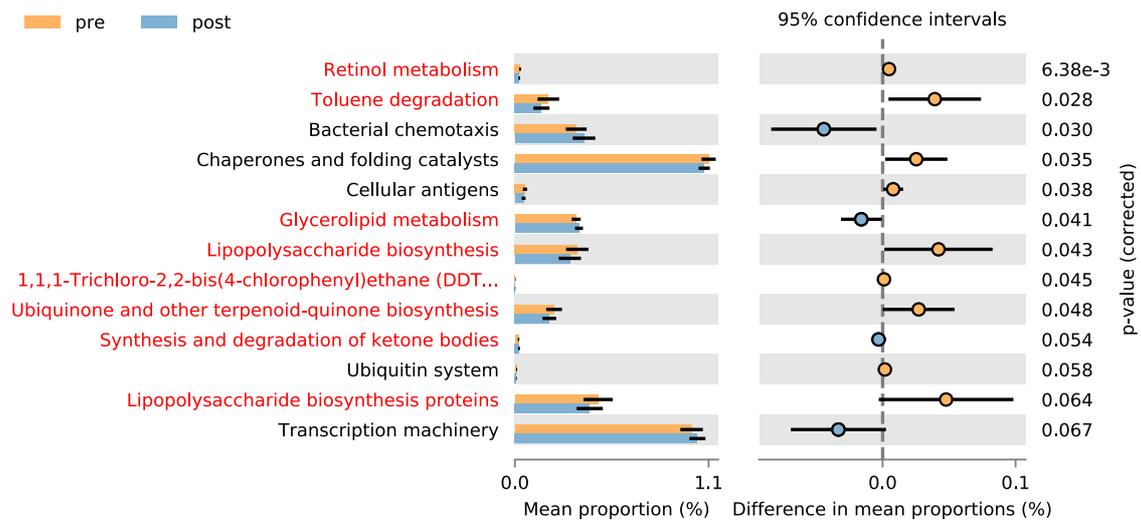


Figura 24. Rutas KEGG de las contribuciones predichas de los datos metagenómicos de dieta mediterránea en el nivel 3. En rojo se han resaltado las rutas implicadas en el metabolismo.

Dieta cetogénica

La dieta cetogénica supone un aumento de la funcionalidad del sistema excretor y de las enfermedades metabólicas, siendo estas las dos estadísticamente más relevantes ya que superan hasta la corrección múltiple por FDR. Pero de especial interés es el hecho de que aumente el metabolismo de carbohidratos y lipídico, entendiendo que con esto la microbiota intestinal está altamente involucrada en el metabolismo de esta dieta (Figura 25).

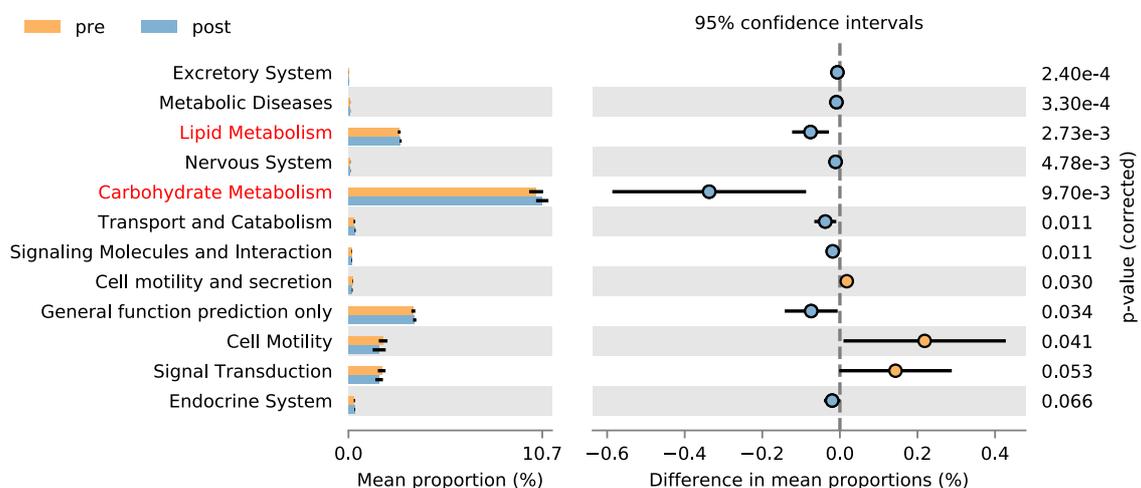


Figura 25. Rutas KEGG de las contribuciones predichas de los datos metagenómicos de dieta cetogénica en el nivel 2. En rojo se han resaltado las rutas implicadas en el metabolismo.

Cuando ahondamos en lo que esto supone, observamos que si bien se han encontrado más de 50 funciones que se ven cambiadas estadísticamente, en la Figura 26 se muestran tan solo aquellas que son más fuertes y que son capaces de pasar la corrección múltiple FDR. De especial mención es el aumento del metabolismo del piruvato y de los azúcares aminoacídicos y nucleotídicos.

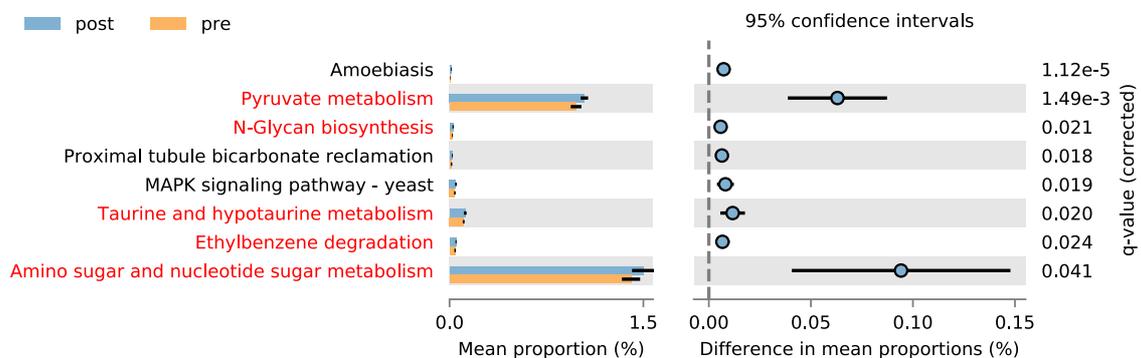


Figura 26. Rutas KEGG de las contribuciones predichas de los datos metagenómicos de dieta cetogénica en el nivel 3. En rojo se han resaltado las rutas implicadas en el metabolismo.

Comparación entre los tres tratamientos

Al analizar las relaciones entre la cirugía bariátrica y la dieta mediterránea, observamos que esta última incrementa el metabolismo energético y nucleotídico de las purinas y pirimidinas. Sin embargo, no se observan unas grandes diferencias, de hecho ninguna de las relaciones aguanta la corrección múltiple por FDR.

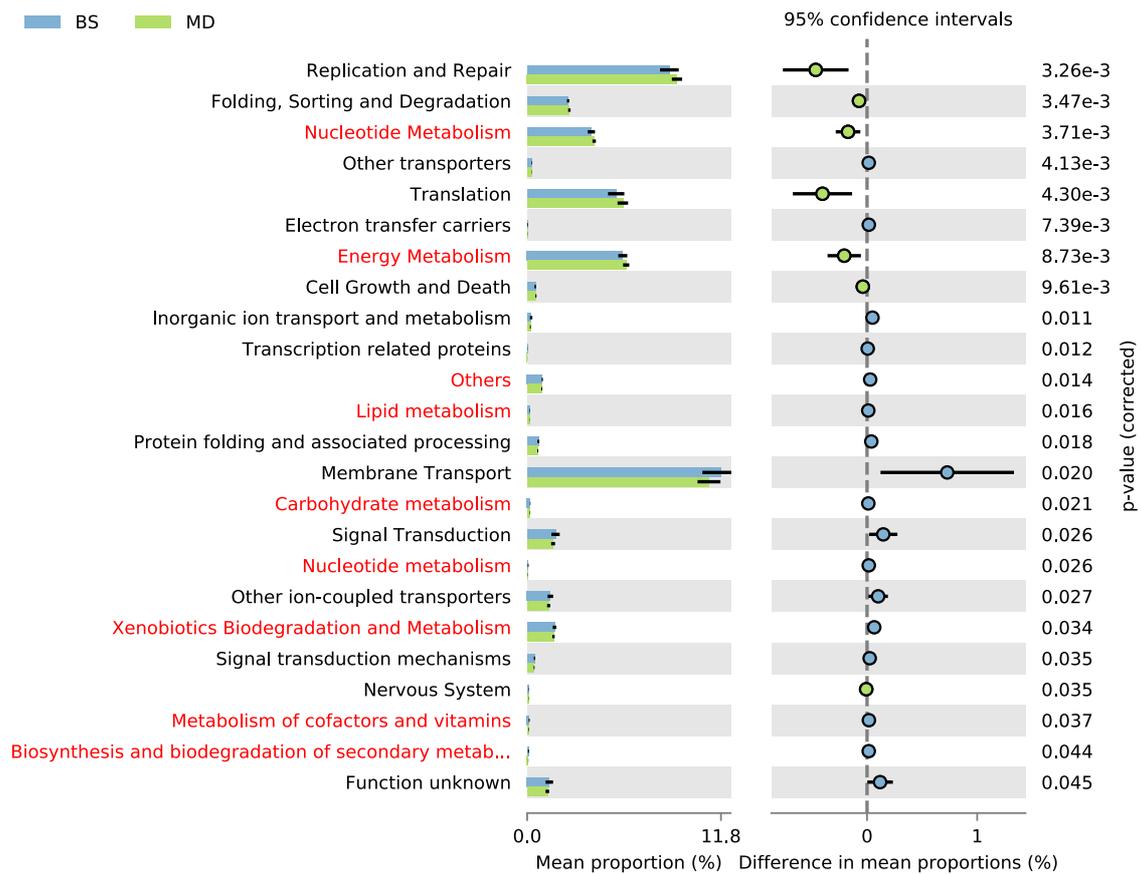
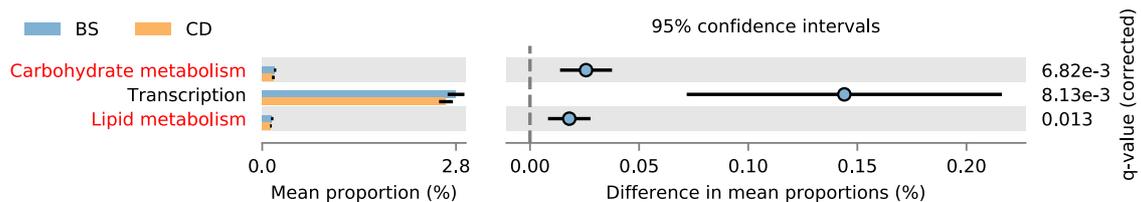


Figura 27. Rutas KEGG de las contribuciones predichas de los datos metagenómicos post-intervención de la cirugía bariátrica (BS) y la dieta mediterránea (MD) en el nivel 2. En rojo se han resaltado las rutas implicadas en el metabolismo.

Cuando comparamos la cirugía bariátrica con la dieta cetogénica, se observa que la microbiota intestinal que se obtiene tras la cirugía bariátrica tiene una mejora de la capacidad de metabolizar los carbohidratos y los lípidos. Sin embargo, la dieta cetogénica ve aumentada la ruta de la señal de PPAR y de señalización de las adipokinas, viéndose su relación con el tejido adiposo de los pacientes y con la vía de síntesis y degradación de los cuerpos cetónicos.



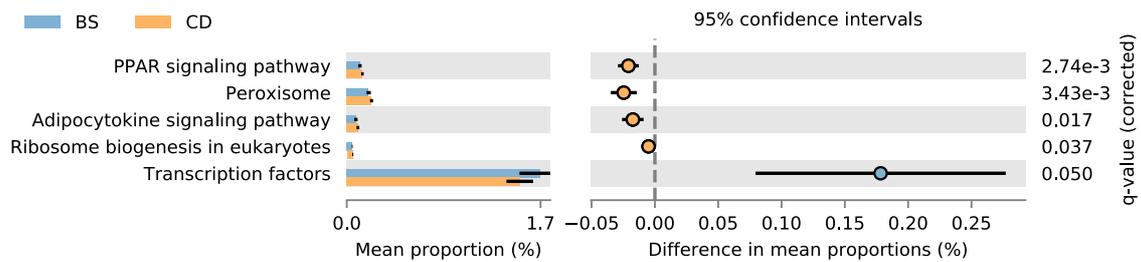
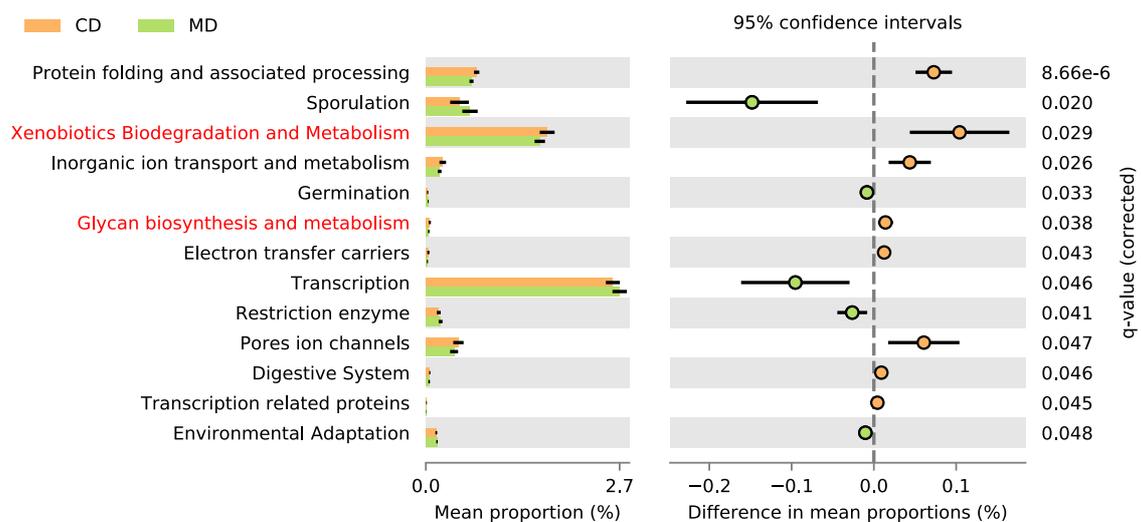


Figura 28. Figura 27. Rutas KEGG de las contribuciones predichas de los datos metagenómicos post-intervención de la cirugía bariátrica (BS) y la dieta cetogénica (CD) en los niveles 2 y 3. En rojo se han resaltado las rutas implicadas en el metabolismo.

Cuando comparamos las dos intervenciones dietéticas, observamos las diferencias entre ambas y cómo la distinta disponibilidad de nutrientes afecta a la funcionalidad de la microbiota intestinal. Así, la dieta cetogénica aumenta lo relativo al metabolismo de los ácidos grasos, mientras que la dieta mediterránea mejora la adaptación del ambiente. En la Figura 29 observamos tan solo aquellas rutas que han pasado la corrección múltiple por FDR, pero en el anexo observamos todas las relaciones significativas con el p-valor corregido. Así se puede ver cómo aumenta la maquinaria para la degradación de las fibras alimentarias por parte de la dieta mediterránea o un aumento de los lipopolisacáridos en la dieta cetogénica.



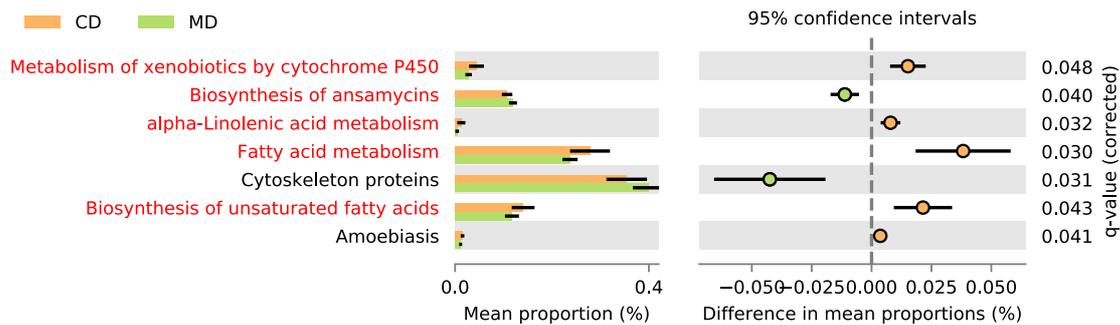


Figura 29. Figura 27. Rutas KEGG de las contribuciones predichas de los datos metagenómicos post-intervención de la dieta mediterránea (MD) y la dieta cetogénica (CD) en los niveles 2 y 3. En rojo se han resaltado las rutas implicadas en el metabolismo.

e) IMC y microbiota

Utilizando el antiguo formato de qiime, ya que en QIIME2 esta herramienta no está disponible, se han desarrollado análisis de correlación con las bacterias y la variable IMC y se han encontrado las siguientes pautas:

En la cirugía bariátrica se han encontrado diferentes bacterias que han correlacionado con el IMC, sin embargo una vez que se corregían por comparaciones múltiples mediante el método FDR, muchas de ellas se han perdido. En el nivel de familia hemos encontrado una asociación negativa con las *Rikenellaceae* ($R = -0,506$, $FDR-p = 0,037$).

En la dieta cetogénica por su parte encontramos una correlación estadísticamente significativa entre el IMC y las *Verrucomicrobia* ($R = -0,515$, $FDR-P = 0,019$) y los *TM7* ($R = 0,463$, $FDR-P = 0,034$). A nivel de familia con las *Christensenellaceae* ($R = -0,640$, $FDR-P = 0,002$), *Verrucomicrobiaceae* ($R = -0,557$, $FDR-P = 0,020$); y a nivel de género con *Anaerostipes* ($R = 0,665$, $FDR-P = 0,001$), un género de la familia *Christensenellaceae* ($R = -0,640$, $FDR-P = 0,002$), *Roseburia* ($R = 0,562$, $FDR-P = 0,022$) y *Akkermansia* ($R = -0,557$, $FDR-P = 0,022$).

Sin embargo, en la dieta mediterránea no se observa ninguna relación estadísticamente significativa con el IMC después de corregir por comparaciones múltiples.

4. DISCUSIÓN

En el presente estudio se han puesto de manifiesto los grandes cambios que pueden producirse en los perfiles de microbiota intestinal debido a las diferentes técnicas de

reducción de peso. Además, se ha observado que diferentes estrategias dietéticas van a desencadenar unos cambios diferentes en los perfiles de microbiota intestinal. De las tres estrategias que se han estudiado: cirugía bariátrica, dieta mediterránea y dieta cetogénica, se ha observado que como era de esperar, la técnica que ha proporcionado una mayor bajada de peso ha sido la cirugía bariátrica, mientras que la que menor bajada de peso ha demostrado ha sido la dieta mediterránea a pesar de que ha sido el tratamiento más largo. La dieta cetogénica se ha colocado en un lugar intermedio con unos grandes resultados tanto en pérdida de peso como en mejora de los parámetros metabólicos.

La relación entre la cirugía bariátrica y la microbiota intestinal se ha estudiado en los últimos años de una manera extensiva. Los principales cambios que se han reportado en la microbiota intestinal tras la cirugía bariátrica han sido el aumento de las Proteobacterias, y muy especialmente su clase Gammaproteobacterias (66), sin embargo parece que en nuestro estudio estas pautas no se han seguido. Nuestros pacientes se habían sometido al procedimiento de manga gástrica, la cual es una técnica restrictiva que lo que hace es disminuir al mínimo el tamaño del estómago y que actualmente es la técnica de elección debido a sus grandes resultados (67). La mayoría de los resultados encontrados por otros investigadores se han centrado en la técnica del bypass gástrico, debido principalmente a que anteriormente era la técnica de elección. El bypass gástrico es una técnica tanto malabsortiva como restrictiva que implica una reestructuración del tracto digestivo, desembocando en cambios drásticos debido a cambios en la disponibilidad de ácidos biliares y el cambio del pH ambiental (68). De esta manera, el procedimiento quirúrgico debe de ser tenido en cuenta. Nosotros hemos encontrado que la familia *Carnobacteriaceae* se encuentra aumentada tras la operación. Esta familia es típica de la microbiota oral y no suele ser tan típica en la intestinal (69), así que podría ser que debido al menor tamaño del estómago pueda traspasar esa barrera y encontrarse en las heces de los pacientes. Lo mismo ocurre con *Granulicatella* que es también un residente normal de la microbiota oral (70). De tal manera que los cambios producidos en la cirugía bariátrica parecen estar mediados principalmente por ese cambio en el medio gastrointestinal.

La cirugía bariátrica se ha relacionado con un aumento del metabolismo hidrocarbonado y lipídico, especialmente el de los hidratos de carbono y en particular la ruta del piruvato, la molécula final de la glicólisis y clave en el metabolismo humano (71). Por

otro lado se ha observado una disminución en el metabolismo de algunos aminoácidos, que puede ser debido a la menor disponibilidad en el medio de estos aminoácidos, ya que se ha reportado anteriormente una disminución de algunos aminoácidos tras una cirugía bariátrica (72).

La dieta mediterránea se ha asociado con un aumento de la diversidad microbiana anteriormente (50). Este resultado se ha visto corroborado en este trabajo, siendo la única intervención que ha sido capaz de mejorar la diversidad de una manera estadísticamente significativa. Sin embargo, esta dieta no ha interferido drásticamente en los perfiles. Los resultados apuntan a que debido a que la dieta mediterránea es una dieta rica en vegetales, se necesitan más bacterias capaces de reducir la fibra asociada, y por eso se ha visto un aumento de los *Firmicutes*, los cuales se sabe que tienen varios componentes capaces de reducir la fibra alimentaria (73). Estas bacterias son capaces de producir los tan preciados ácidos grasos de cadena corta a partir de esta fibra, como *Faecalibacterium* y *Roseburia*, ambos aumentados en esta intervención dietética. Estos ácidos grasos de cadena corta tienen unos grandes efectos sobre la salud como fuente de energía, moduladores inflamatorios, vasodilatadores, y en la movilidad y la curación de las heridas. Entre los SCFAs los más estudiados son el butirato, el propionato y el acetato. Estos SCFAs son importantes biológicamente en cantidad y en proporción. Y entre ellos el butirato es la fuente de energía preferida por los colonocitos, lo que mejora su función como barrera protectora y reduce la inflamación (74). Por otro lado, atendiendo a la potencialidad de los genes de la microbiota intestinal se ha observado en este estudio que la dieta mediterránea disminuye la funcionalidad de la producción de lipopolisacáridos. Los lipopolisacáridos presentes en la pared bacteriana de las bacterias Gram (-) se han relacionado con la endotoxemia metabólica a nivel sistémico (21). De esta manera la dieta mediterránea aumentaría la diversidad, aumentaría la cantidad de bacterias beneficiosas, como aquellas productoras de butirato, y disminuiría las bacterias perjudiciales, como aquellas productoras de lipopolisacáridos, disminuyendo la endotoxemia metabólica.

Por su parte, los pacientes que se sometieron a la dieta cetogénica mostraron una bajada de peso mayor que la dieta mediterránea y en un tiempo mucho menor que esta otra intervención. Además, los parámetros bioquímicos de colesterol y triglicéridos, es decir, las variables relativas al metabolismo lipídico se vieron claramente reducidos

Así, la dieta cetogénica se postula como una herramienta en la pérdida de peso altamente eficaz, que se sitúa en un término intermedio entre la cirugía bariátrica y la dieta mediterránea en cuanto a sus resultados, pero que no es un método tan drástico como la cirugía al tratarse de una intervención dietética. La microbiota intestinal por su parte, se ha visto claramente influenciada por esta pauta dietética, como se ha observado en el análisis de PERMANOVA. Aquí hay que resaltar que las dietas cetogénicas se habían asociado históricamente con una disminución de la diversidad (75). Sin embargo en este estudio esta merma no se ha observado, incluso se podría decir que ha aumentado, aunque sin llegar a alcanzar significación estadística.

De especial interés es el hecho de que las *Verrucomicrobiaceae* con su integrante *Akkermansia* y en particular *A. muciniphila* (único integrante de este género) se hayan visto aumentadas. *A. muciniphila* se ha asociado en varios estudios con una mejora de la permeabilidad intestinal (76) y con una mejora de la endotoxemia (77). Además se ha relacionado con la familia *Porphyomonadaceae* la cual posee varios individuos que son capaces de producir butirato (78). Por su parte, *Parabacteroides* es un productor de propionato y además son capaces de eliminar del medio sulfatos (79). El propionato podría ser uno de los responsables de la bajada del colesterol ya que el propionato es metabolizado en el hígado y decrece la lipogénesis hepática reduciendo el colesterol sérico, además de desencadenar una respuesta de saciedad (80). En este caso de la dieta cetogénica, también se observa un aumento del metabolismo del piruvato, que como hemos observado anteriormente es un metabolito clave del ciclo de Krebs (71) y por lo tanto de la oxidación de los ácidos grasos.

En cuanto a la funcionalidad se ha visto que una dieta cetogénica aumenta el metabolismo de carbohidratos y lípidos. Además, la glucosidación se ha visto aumentada tras la intervención. Esto podría estar relacionado con la formación del moco intestinal (81), así como con el aumento de *A. muciniphila* ya que esta bacteria es mucolítica (82). Una función interesante es la de la ruta de la señal de PPAR, que está aumentada tras la intervención e interviene en la producción y degradación de los cuerpos cetónicos.

Una vez que se han encontrado las relaciones existentes entre las bacterias intestinales con cada una de las intervenciones de bajada de peso, se establecieron una serie de análisis correlacionales para tratar de encontrar bacterias clave en la bajada de peso de cada intervención. De esta manera, en la cirugía bariátrica se encontró una fuerte

relación negativa de la familia *Rikenellaceae* con el IMC. Las *Rikenellaceae* son una familia que son resistentes a los ácidos biliares (83). Si bien, en la cirugía bariátrica estudiada no es característica el incremento de los ácidos biliares como en otros tipos, sí que está relacionada con cambios en los ácidos biliares (84) que podrían favorecer la supervivencia de esta familia. Por otro lado, la dieta cetogénica se ha relacionado negativamente con el IMC y principalmente con el filo *Verrucomicrobia*, su familia *Verrucomicrobiaceae* y su género *Akkermansia*, seguramente con *A. muciniphila*. Esta bacteria ya se ha relacionado previamente con promover la reducción de peso y podría estar relacionado con la mejora de la permeabilidad intestinal y la posterior corrección de la disbiosis intestinal de los pacientes (85). Christensellaceae también se ha relacionado negativamente con el IMC. Estas bacterias ya se habían descrito anteriormente con un fenotipo delgado que parece promover cambios en las demás bacterias del ambiente para mejorar la disbiosis previa (86) También es de remarcar la asociación que se ha encontrado con *Roseburia*, relacionándola con un aumento del IMC. *Roseburia* es una bacteria asociada con beneficios para la salud principalmente por ser productora de butirato (87), sin embargo necesita de hidratos de carbono complejos para poder realizar su función. La reducción producida en este tipo de dietas principalmente es debida a la bajada en la disponibilidad de estos nutrientes. De hecho, esta bacteria se ha incrementado en la dieta mediterránea, la cual posee un alto aporte de estos nutrientes (88). Si bien hay que decir que no hemos encontrado ninguna bacteria altamente relacionada con la dieta Mediterránea, creyendo que sus beneficios podrían estar mediados por el aumento de la diversidad reportado con esta intervención dietética (50).

5. CONCLUSIONES

- La pérdida de peso sufrida por los pacientes es superior con la cirugía bariátrica, siendo la dieta mediterránea la intervención que más lentamente hace bajar de peso. La dieta cetogénica produce una bajada de peso intermedia a las otras intervenciones.
- Los tres tipos de intervenciones para la pérdida de peso producen mejoras metabólicas en los pacientes, con especial mención de los metabolismos glucídico y lipídico.
- Las intervenciones de pérdida de peso producen cambios en los perfiles de microbiota intestinal, siendo los cambios producidos por la dieta cetogénica los más drásticos.
- La cirugía bariátrica produce un aumento de las bacterias características *Actinobacteriaceae*, *Carnobacteriaceae* y *Granulicatella*. Mejora el metabolismo glucídico y lipídico, disminuyendo el de los aminoácidos.
- La dieta mediterránea produce un aumento de la diversidad bacteriana. La intervención dietética con pauta mediterránea cambia el perfil de microbiota, aumentando los *Firmicutes*, *Verrucomicrobiaceae*, *Bifidobacteriaceae*, así como *Coprococcus*, y disminuyendo las *Actinobacterias* y las *Proteobacterias*.
- La dieta cetogénica cambia drásticamente el perfil de microbiota. Las *Verrunomicrobias* con su especie característica *Akkermansia muciniphila*, además de *Porphyromonaceas* y *Parabacteroides* presentaron un incremento en este tratamiento. Estas bacterias productoras de ácidos grasos como el butirato y el propionato, podrían estar detrás de las mejoras encontradas en relación con el colesterol.
- La pérdida de peso se ha relacionado en cada intervención con unas poblaciones bacterianas características. La cirugía bariátrica se ha relacionado negativamente con las *Rikenellaceae* y la dieta cetogénica con las *Verrunomicrobia* y las *Christensellaceae*. Sin embargo, la dieta mediterránea no correlacionó significativamente con ninguna bacteria particular, pudiendo indicar que depende más de la población completa que de cambios particulares en la microbiota intestinal.

- La microbiota intestinal interviene en la bajada de peso en las diferentes estrategias utilizadas adaptándose a los cambios producidos por las intervenciones y adecuando su metabolismo a las necesidades del hospedador.

3. Autoevaluación

Podemos dividir las conclusiones del presente trabajo en dos tipos, al igual que los objetivos: unos científicos y otros técnicos.

Dentro de las conclusiones científicas podemos decir que diferentes intervenciones de pérdida de peso, influyen de manera diferente en la microbiota intestinal, por lo que el cambio de la microbiota intestinal no es debido al cambio de peso persé. Se ha encontrado que la microbiota intestinal se adapta a los cambios que su medio, el hospedador, está sufriendo. Se han encontrado diferentes bacterias claves en la pérdida de peso para la cirugía bariátrica y la dieta cetogénica, si bien no se ha conseguido en la dieta mediterránea, donde el aumento de la diversidad intestinal en su conjunto podría ser la vía.

En cuanto a la conclusión técnica se puede decir que no hay un proceso estandarizado para el análisis de los datos de metagenómica dirigida. Se están desarrollando continuamente muchas herramientas para su análisis, la mayoría de ellas teniendo como base otros programas como qiime y ahora QIIME2, que sigue siendo de los más ampliamente utilizados. Hay muchos paquetes desarrollados para el análisis, muchos en R, pero también es cierto que se han desarrollado una infinidad de webs e interfaces gráficas que facilitan el análisis de los datos. De esta manera Microbiome Analyst se ha encontrado que es una herramienta muy fácil y versátil, con análisis muy potentes que facilitan enormemente el trabajo. Lo que sí hay que tener claro es que el bioinformático tiene que estar siempre pendiente de las últimas herramientas disponibles para siempre poder obtener el mejor aprovechamiento de los datos.

De una manera crítica, si bien el trabajo ha salido adelante de una manera creo que satisfactoria, lo que se propuso en un principio fue demasiado optimista. Y si bien se comenzó a utilizar los paquetes de R disponibles, con especial hincapié en Phyloseq, este paquete es demasiado complejo para dominarlo en este corto periodo de tiempo. De esta manera, se buscaron herramientas que facilitasen el trabajo emergiendo Microbiome Analyst el cual está basado en paquetes como Phyloseq o vegan implementados para R. El estudio de QIIME2 ha sido complejo, sobre todo por lo costoso en los recursos que consume y por el hecho de que está implementado principalmente para otras tecnologías, por lo que la adaptación a la tecnología Torrent

ha sido difícil. Por otro lado, el enfoque científico fue demasiado optimista, ya que el entender las tres intervenciones y los cambios que producían ha consumido mucho tiempo y recursos. Posiblemente podría haber elegido un solo procedimiento.

De esta manera, la planificación no se ha seguido completamente y se han tenido que buscar alternativas para la correcta consecución de la parte científica. Si bien, personalmente creo que esta versatilidad es la que se busca en el profesional bioinformático debido a la complejidad de su actividad.

Por lo tanto, en los próximos meses se seguirá profundizando en lo aprendido en este estudio. Se adaptarán mejor los análisis con QIIME2 a la tecnología Ion Torrent para poder sacar ventajas de las nuevas implementaciones y se seguirá tratando de introducir los análisis con Phyloseq y vegan de forma nativa.

4. Glosario

SCFAs: short chain fatty acids. Ácidos grasos de cadena corta.

OTUs: Operational Taxonomic Units.

Feature: secuencias únicas. Por la forma de analizar los datos, semejante a los OTUs.

Alfa diversidad: riqueza de especies que hay en una comunidad.

Beta diversidad: diversidad entre diferentes hábitats.

Disbiosis: pérdida del equilibrio entre la población de la microbiota intestinal.

5. Bibliografia

1. Sommer F, Backhed F. The gut microbiota--masters of host development and physiology. *Nature reviews Microbiology* 2013; 11:227-238
2. Moreno-Indias I, Cardona F, Tinahones FJ, Queipo-Ortuno MI. Impact of the gut microbiota on the development of obesity and type 2 diabetes mellitus. *Frontiers in microbiology* 2014; 5:190
3. Moeller AH, Li Y, Mpoudi Ngole E, Ahuka-Mundeke S, Lonsdorf EV, Pusey AE, Peeters M, Hahn BH, Ochman H. Rapid changes in the gut microbiome during human evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2014; 111:16431-16435
4. David LA, Maurice CF, Carmody RN, Gootenberg DB, Button JE, Wolfe BE, Ling AV, Devlin AS, Varma Y, Fischbach MA, Biddinger SB, Dutton RJ, Turnbaugh PJ. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature* 2014; 505:559-563
5. 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 biology* 2008; 6:e280
6. Ussar S, Griffin NW, Bezy O, Fujisaka S, Vienberg S, Softic S, Deng L, Bry L, Gordon JI, Kahn CR. Interactions between Gut Microbiota, Host Genetics and Diet Modulate the Predisposition to Obesity and Metabolic Syndrome. *Cell metabolism* 2015; 22:516-530
7. Sonnenburg Erica D, Sonnenburg Justin L. Starving our Microbial Self: The Deleterious Consequences of a Diet Deficient in Microbiota-Accessible Carbohydrates. *Cell metabolism* 20:779-786
8. De Filippo C, Cavalieri D, Di Paola M, Ramazzotti M, Poullet JB, Massart S, Collini S, Pieraccini G, Lionetti P. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2010; 107:14691-14696

9. Tyakht AV, Kostryukova ES, Popenko AS, Belenikin MS, Pavlenko AV, Larin AK, Karpova IY, Selezneva OV, Semashko TA, Ospanova EA, Babenko VV, Maev IV, Cheremushkin SV, Kucheryavyy YA, Shcherbakov PL, Grinevich VB, Efimov OI, Sas EI, Abdulkhakov RA, Abdulkhakov SR, Lyalyukova EA, Livzan MA, Vlassov VV, Sagdeev RZ, Tsukanov VV, Osipenko MF, Kozlova IV, Tkachev AV, Sergienko VI, Alexeev DG, Govorun VM. Human gut microbiota community structures in urban and rural populations in Russia. *Nature communications* 2013; 4:2469
10. Falony G, Joossens M, Vieira-Silva S, Wang J, Darzi Y, Faust K, Kurilshikov A, Bonder MJ, Valles-Colomer M, Vandeputte D, Tito RY, Chaffron S, Rymenans L, Verspecht C, De Sutter L, Lima-Mendez G, D'Hoe K, Jonckheere K, Homola D, Garcia R, Tigchelaar EF, Eeckhaut L, Fu J, Henckaerts L, Zhernakova A, Wijmenga C, Raes J. Population-level analysis of gut microbiome variation. *Science (New York, NY)* 2016; 352:560-564
11. de Meij TG, Budding AE, de Groot EF, Jansen FM, Frank Kneepkens CM, Benninga MA, Penders J, van Bodegraven AA, Savelkoul PH. Composition and stability of intestinal microbiota of healthy children within a Dutch population. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2016; 30:1512-1522
12. Backhed F, Roswall J, Peng Y, Feng Q, Jia H, Kovatcheva-Datchary P, Li Y, Xia Y, Xie H, Zhong H, Khan MT, Zhang J, Li J, Xiao L, Al-Aama J, Zhang D, Lee YS, Kotowska D, Colding C, Tremaroli V, Yin Y, Bergman S, Xu X, Madsen L, Kristiansen K, Dahlgren J, Wang J. Dynamics and Stabilization of the Human Gut Microbiome during the First Year of Life. *Cell host & microbe* 2015; 17:690-703
13. Dogra S, Sakwinska O, Soh SE, Ngom-Bru C, Bruck WM, Berger B, Brussow H, Lee YS, Yap F, Chong YS, Godfrey KM, Holbrook JD. Dynamics of infant gut microbiota are influenced by delivery mode and gestational duration and are associated with subsequent adiposity. *mBio* 2015; 6
14. Wu GD, Compher C, Chen EZ, Smith SA, Shah RD, Bittinger K, Chehoud C, Albenberg LG, Nessel L, Gilroy E, Star J, Weljie AM, Flint HJ, Metz DC, Bennett MJ, Li H, Bushman FD, Lewis JD. Comparative metabolomics in vegans and omnivores reveal constraints on diet-dependent gut microbiota metabolite production. *Gut* 2016; 65:63-72

15. Morton ER, Lynch J, Froment A, Lafosse S, Heyer E, Przeworski M, Blekhman R, Segurel L. Variation in Rural African Gut Microbiota Is Strongly Correlated with Colonization by *Entamoeba* and Subsistence. *PLoS genetics* 2015; 11:e1005658
16. Zhang J, Guo Z, Xue Z, Sun Z, Zhang M, Wang L, Wang G, Wang F, Xu J, Cao H, Xu H, Lv Q, Zhong Z, Chen Y, Qimuge S, Menghe B, Zheng Y, Zhao L, Chen W, Zhang H. A phylo-functional core of gut microbiota in healthy young Chinese cohorts across lifestyles, geography and ethnicities. *The ISME journal* 2015; 9:1979-1990
17. 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, Dore J, Antolin M, Artiguenave F, Blottiere HM, Almeida M, Brechot C, Cara C, Chervaux C, Cultrone A, Delorme C, Denariatz 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, Merieux 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; 473:174-180
18. Ley RE, Backhed F, Turnbaugh P, Lozupone CA, Knight RD, Gordon JI. Obesity alters gut microbial ecology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005; 102:11070-11075
19. Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JI. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* 2006; 444:1027-1031
20. Backhed F, Ding H, Wang T, Hooper LV, Koh GY, Nagy A, Semenkovich CF, Gordon JI. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004; 101:15718-15723

21. Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, Bastelica D, Neyrinck AM, Fava F, Tuohy KM, Chabo C, Waget A, Delmee E, Cousin B, Sulpice T, Chamontin B, Ferrieres J, Tanti JF, Gibson GR, Casteilla L, Delzenne NM, Alessi MC, Burcelin R. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes* 2007; 56:1761-1772
22. Cani PD, Bibiloni R, Knauf C, Waget A, Neyrinck AM, Delzenne NM, Burcelin R. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes* 2008; 57:1470-1481
23. 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; 58:1091-1103
24. Qin J, Li Y, Cai Z, Li S, Zhu J, Zhang F, Liang S, Zhang W, Guan Y, Shen D, Peng Y, Zhang D, Jie Z, Wu W, Qin Y, Xue W, Li J, Han L, Lu D, Wu P, Dai Y, Sun X, Li Z, Tang A, Zhong S, Li X, Chen W, Xu R, Wang M, Feng Q, Gong M, Yu J, Zhang Y, Zhang M, Hansen T, Sanchez G, Raes J, Falony G, Okuda S, Almeida M, LeChatelier E, Renault P, Pons N, Batto J-M, Zhang Z, Chen H, Yang R, Zheng W, Li S, Yang H, Wang J, Ehrlich SD, Nielsen R, Pedersen O, Kristiansen K, Wang J. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature* 2012; 490:55-60
25. Karlsson FH, Tremaroli V, Nookaew I, Bergstrom G, Behre CJ, Fagerberg B, Nielsen J, Backhed F. Gut metagenome in European women with normal, impaired and diabetic glucose control. *Nature* 2013; 498:99-103
26. Perry RJ, Peng L, Barry NA, Cline GW, Zhang D, Cardone RL, Petersen KF, Kibbey RG, Goodman AL, Shulman GI. Acetate mediates a microbiome-brain-beta-cell axis to promote metabolic syndrome. *Nature* 2016; 534:213-217
27. Wong JM, de Souza R, Kendall CW, Emam A, Jenkins DJ. Colonic health: fermentation and short chain fatty acids. *Journal of clinical gastroenterology* 2006; 40:235-243
28. Chambers ES, Viardot A, Psichas A, Morrison DJ, Murphy KG, Zac-Varghese SE, MacDougall K, Preston T, Tedford C, Finlayson GS, Blundell JE, Bell JD, Thomas EL, Mt-Isa S, Ashby D, Gibson GR, Kolida S, Dhillo WS, Bloom SR,

- Morley W, Clegg S, Frost G. Effects of targeted delivery of propionate to the human colon on appetite regulation, body weight maintenance and adiposity in overweight adults. *Gut* 2015; 64:1744-1754
29. Frost G, Sleeth ML, Sahuri-Arisoylu M, Lizarbe B, Cerdan S, Brody L, Anastasovska J, Ghourab S, Hankir M, Zhang S, Carling D, Swann JR, Gibson G, Viardot A, Morrison D, Louise Thomas E, Bell JD. The short-chain fatty acid acetate reduces appetite via a central homeostatic mechanism. *Nature communications* 2014; 5:3611
 30. Sayin SI, Wahlstrom A, Felin J, Jantti S, Marschall HU, Bamberg K, Angelin B, Hyotylainen T, Oresic M, Backhed F. Gut microbiota regulates bile acid metabolism by reducing the levels of tauro-beta-muricholic acid, a naturally occurring FXR antagonist. *Cell metabolism* 2013; 17:225-235
 31. Wahlstrom A, Sayin SI, Marschall HU, Backhed F. Intestinal Crosstalk between Bile Acids and Microbiota and Its Impact on Host Metabolism. *Cell metabolism* 2016; 24:41-50
 32. Buffie CG, Bucci V, Stein RR, McKenney PT, Ling L, Gobourne A, No D, Liu H, Kinnebrew M, Viale A, Littmann E, van den Brink MR, Jenq RR, Taur Y, Sander C, Cross JR, Toussaint NC, Xavier JB, Pamer EG. Precision microbiome reconstitution restores bile acid mediated resistance to *Clostridium difficile*. *Nature* 2015; 517:205-208
 33. Sagar NM, Cree IA, Covington JA, Arasaradnam RP. The Interplay of the Gut Microbiome, Bile Acids, and Volatile Organic Compounds. *Gastroenterology Research and Practice* 2015; 2015:6
 34. Noel OF, Still CD, Argyropoulos G, Edwards M, Gerhard GS. Bile Acids, FXR, and Metabolic Effects of Bariatric Surgery. *Journal of Obesity* 2016; 2016:4390254
 35. Hylemon PB, Zhou H, Pandak WM, Ren S, Gil G, Dent P. Bile acids as regulatory molecules. *Journal of lipid research* 2009; 50:1509-1520
 36. Palleja A, Kashani A, Allin KH, Nielsen T, Zhang C, Li Y, Brach T, Liang S, Feng Q, Jorgensen NB, Bojsen-Moller KN, Dirksen C, Burgdorf KS, Holst JJ, Madsbad S, Wang J, Pedersen O, Hansen T, Arumugam M. Roux-en-Y gastric bypass surgery of morbidly obese patients induces swift and persistent changes of the individual gut microbiota. *Genome medicine* 2016; 8:67

37. Tremaroli V, Karlsson F, Werling M, Stahlman M, Kovatcheva-Datchary P, Olbers T, Fandriks L, le Roux CW, Nielsen J, Backhed F. Roux-en-Y Gastric Bypass and Vertical Banded Gastroplasty Induce Long-Term Changes on the Human Gut Microbiome Contributing to Fat Mass Regulation. *Cell metabolism* 2015; 22:228-238
38. Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JI. Human gut microbes associated with obesity. *Nature* 2006; 444:1022
39. Seganfredo FB, Blume CA, Moehlecke M, Giongo A, Casagrande DS, Spolidoro JVN, Padoin AV, Schaun BD, Mottin CC. Weight-loss interventions and gut microbiota changes in overweight and obese patients: a systematic review. *Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity* 2017; 18:832-851
40. Sjöström L. Bariatric surgery and reduction in morbidity and mortality: experiences from the SOS study. *International Journal Of Obesity* 2009; 32:S93
41. Sjöström L, Narbro K, Sjöström CD, Karason K, Larsson B, Wedel H, Lystig T, Sullivan M, Bouchard C, Carlsson B, Bengtsson C, Dahlgren S, Gummesson A, Jacobson P, Karlsson J, Lindroos A-K, Lönroth H, Näslund I, Olbers T, Stenlöf K, Torgerson J, Ågren G, Carlsson LMS. Effects of Bariatric Surgery on Mortality in Swedish Obese Subjects. *New England Journal of Medicine* 2007; 357:741-752
42. David LA, Maurice CF, Carmody RN, Gootenberg DB, Button JE, Wolfe BE, Ling AV, Devlin AS, Varma Y, Fischbach MA, Biddinger SB, Dutton RJ, Turnbaugh PJ. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature* 2014; 505:559-563
43. Wu GD, Chen J, Hoffmann C, Bittinger K, Chen Y-Y, Keilbaugh SA, Bewtra M, Knights D, Walters WA, Knight R, Sinha R, Gilroy E, Gupta K, Baldassano R, Nessel L, Li H, Bushman FD, Lewis JD. Linking Long-Term Dietary Patterns with Gut Microbial Enterotypes. *Science (New York, Ny)* 2011; 334:105-108
44. Zhang C, Zhang M, Wang S, Han R, Cao Y, Hua W, Mao Y, Zhang X, Pang X, Wei C, Zhao G, Chen Y, Zhao L. Interactions between gut microbiota, host genetics and diet relevant to development of metabolic syndromes in mice. *The ISME journal* 2009; 4:232
45. Ursell LK, Clemente JC, Rideout JR, Gevers D, Caporaso JG, Knight R. The interpersonal and intrapersonal diversity of human-associated microbiota in key

- body sites. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2012; 129:1204-1208
46. Festi D, Schiumerini R, Eusebi LH, Marasco G, Taddia M, Colecchia A. Gut microbiota and metabolic syndrome. *World Journal of Gastroenterology : WJG* 2014; 20:16079-16094
 47. Li J, Riaz Rajoka MS, Shao D, Jiang C, Jin M, Huang Q, Yang H, Shi J. Strategies to increase the efficacy of using gut microbiota for the modulation of obesity. *Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity* 2017; 18:1260-1271
 48. Estruch R, Ros E, Salas-Salvadó J, Covas M-I, Corella D, Arós F, Gómez-Gracia E, Ruiz-Gutiérrez V, Fiol M, Lapetra J, Lamuela-Raventos RM, Serra-Majem L, Pintó X, Basora J, Muñoz MA, Sorlí JV, Martínez JA, Martínez-González MA. Primary Prevention of Cardiovascular Disease with a Mediterranean Diet. *New England Journal of Medicine* 2013; 368:1279-1290
 49. De Filippis F, Pellegrini N, Vannini L, Jeffery IB, La Storia A, Laghi L, Serrazanetti DI, Di Cagno R, Ferrocino I, Lazzi C, Turrone S, Cocolin L, Brigidi P, Neviani E, Gobbetti M, O'Toole PW, Ercolini D. High-level adherence to a Mediterranean diet beneficially impacts the gut microbiota and associated metabolome. *Gut* 2015;
 50. Del Chierico F, Vernocchi P, Dallapiccola B, Putignani L. Mediterranean Diet and Health: Food Effects on Gut Microbiota and Disease Control. *International Journal of Molecular Sciences* 2014; 15:11678
 51. Sonnenburg JL, Bäckhed F. Diet–microbiota interactions as moderators of human metabolism. *Nature* 2016; 535:56
 52. Graf D, Di Cagno R, Fåk F, Flint HJ, Nyman M, Saarela M, Watzl B. Contribution of diet to the composition of the human gut microbiota. *Microbial Ecology in Health and Disease* 2015; 26:26164
 53. Rubino F, Nathan DM, Eckel RH, Schauer PR, Alberti KGMM, Zimmet PZ, Del Prato S, Ji L, Sadikot SM, Herman WH, Amiel SA, Kaplan LM, Taroncher-Oldenburg G, Cummings DE. Metabolic Surgery in the Treatment Algorithm for Type 2 Diabetes: A Joint Statement by International Diabetes Organizations. *Diabetes Care* 2016; 39:861-877
 54. Li JV, Ashrafian H, Bueter M, Kinross J, Sands C, le Roux CW, Bloom SR, Darzi A, Athanasiou T, Marchesi JR, Nicholson JK, Holmes E. Metabolic

- Surgery Profoundly Influences Gut Microbial-Host Metabolic Crosstalk. *Gut* 2011; 60:1214-1223
55. Seeley RJ, Chambers AP, Sandoval DA. The role of gut adaptation in the potent effects of multiple bariatric surgeries on obesity and diabetes. *Cell metabolism* 2015; 21:369-378
 56. Medina DA, Pedreros JP, Turiel D, Quezada N, Pimentel F, Escalona A, Garrido D. Distinct patterns in the gut microbiota after surgical or medical therapy in obese patients. *PeerJ* 2017; 5:e3443
 57. Alberti KG, Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ, Cleeman JI, Donato KA, Fruchart JC, James WP, Loria CM, Smith SC, Jr. Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation* 2009; 120:1640-1645
 58. Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ, Han AW, Johnson AJ, Holmes SP. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature methods* 2016; 13:581-583
 59. Lozupone C, Knight R. UniFrac: a New Phylogenetic Method for Comparing Microbial Communities. *Applied and Environmental Microbiology* 2005; 71:8228-8235
 60. Bokulich NA, Kaehler BD, Rideout JR, Dillon M, Bolyen E, Knight R, Huttley GA, Gregory Caporaso J. Optimizing taxonomic classification of marker-gene amplicon sequences with QIIME 2's q2-feature-classifier plugin. *Microbiome* 2018; 6:90
 61. Dhariwal A, Chong J, Habib S, King IL, Agellon LB, Xia J. MicrobiomeAnalyst: a web-based tool for comprehensive statistical, visual and meta-analysis of microbiome data. *Nucleic acids research* 2017; 45:W180-w188
 62. Langille MGI, Zaneveld J, Caporaso JG, McDonald D, Knights D, Reyes JA, Clemente JC, Burkepille DE, Vega Thurber RL, Knight R, Beiko RG, Huttenhower C. Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. *Nature Biotechnology* 2013; 31:814
 63. Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, Fierer N, Peña AG, Goodrich JK, Gordon JI, Huttley GA, Kelley ST,

- Knights D, Koenig JE, Ley RE, Lozupone CA, McDonald D, Muegge BD, Pirrung M, Reeder J, Sevinsky JR, Turnbaugh PJ, Walters WA, Widmann J, Yatsunenko T, Zaneveld J, Knight R. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature methods* 2010; 7:335
64. Parks DH, Tyson GW, Hugenholtz P, Beiko RG. STAMP: statistical analysis of taxonomic and functional profiles. *Bioinformatics (Oxford, England)* 2014; 30:3123-3124
 65. Comeau AM, Douglas GM, Langille MGI. Microbiome Helper: a Custom and Streamlined Workflow for Microbiome Research. *mSystems* 2017; 2
 66. Tremaroli V, Karlsson F, Werling M, Ståhlman M, Kovatcheva-Datchary P, Olbers T, Fändriks L, le Roux Carel W, Nielsen J, Bäckhed F. Roux-en-Y Gastric Bypass and Vertical Banded Gastroplasty Induce Long-Term Changes on the Human Gut Microbiome Contributing to Fat Mass Regulation. *Cell metabolism* 2015; 22:228-238
 67. Baltasar A, Serra C, Pérez N, Bou R, Bengochea M, Ferri L. Laparoscopic Sleeve Gastrectomy: A Multi-purpose Bariatric Operation. *Obesity Surgery* 2005; 15:1124-1128
 68. Zhang Y, Ju W, Sun X, Cao Z, Xinsheng X, Daquan L, Xiangyang X, Qin M. Laparoscopic Sleeve Gastrectomy Versus Laparoscopic Roux-En-Y Gastric Bypass for Morbid Obesity and Related Comorbidities: A Meta-Analysis of 21 Studies. *Obesity Surgery* 2015; 25:19-26
 69. Koren O, Spor A, Felin J, Fåk F, Stombaugh J, Tremaroli V, Behre CJ, Knight R, Fagerberg B, Ley RE, Bäckhed F. Human oral, gut, and plaque microbiota in patients with atherosclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2011; 108:4592-4598
 70. Aweid O, Sundararajan S, Teferi A. *Granulicatella adiacens* prosthetic hip joint infection after dental treatment. *JMM Case Reports* 2016; 3:e005044
 71. Gray LR, Tompkins SC, Taylor EB. Regulation of pyruvate metabolism and human disease. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2014; 71:2577-2604
 72. Tan HC, Khoo CM, Tan MZ, Kovalik JP, Ng AC, Eng AK, Lai OF, Ching JH, Tham KW, Pasupathy S. The Effects of Sleeve Gastrectomy and Gastric Bypass on Branched-Chain Amino Acid Metabolism 1 Year After Bariatric Surgery. *Obes Surg* 2016; 26:1830-1835

73. Simpson HL, Campbell BJ. Review article: dietary fibre-microbiota interactions. *Alimentary pharmacology & therapeutics* 2015; 42:158-179
74. Wong JMW, de Souza R, Kendall CWC, Emam A, Jenkins DJA. Colonic Health: Fermentation and Short Chain Fatty Acids. *Journal of Clinical Gastroenterology* 2006; 40:235-243
75. Newell C, Bomhof MR, Reimer RA, Hittel DS, Rho JM, Shearer J. Ketogenic diet modifies the gut microbiota in a murine model of autism spectrum disorder. *Molecular autism* 2016; 7:37
76. Everard A, Belzer C, Geurts L, Ouwerkerk JP, Druart C, Bindels LB, Guiot Y, Derrien M, Muccioli GG, Delzenne NM, de Vos WM, Cani PD. Cross-talk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2013; 110:9066-9071
77. Li J, Lin S, Vanhoutte PM, Woo CW, Xu A. *Akkermansia Muciniphila* Protects Against Atherosclerosis by Preventing Metabolic Endotoxemia-Induced Inflammation in *ApoE*^{-/-} Mice. *Circulation* 2016; 133:2434-2446
78. Vital M, Howe AC, Tiedje JM. Revealing the Bacterial Butyrate Synthesis Pathways by Analyzing (Meta)genomic Data. *mBio* 2014; 5
79. Polansky O, Sekelova Z, Faldynova M, Sebkova A, Sisak F, Rychlik I. Important Metabolic Pathways and Biological Processes Expressed by Chicken Cecal Microbiota. *Applied and Environmental Microbiology* 2016; 82:1569-1576
80. Chambers ES, Viardot A, Psichas A, Morrison DJ, Murphy KG, Zac-Varghese SEK, MacDougall K, Preston T, Tedford C, Finlayson GS, Blundell JE, Bell JD, Thomas EL, Mt-Isa S, Ashby D, Gibson GR, Kolida S, Dhillo WS, Bloom SR, Morley W, Clegg S, Frost G. Effects of targeted delivery of propionate to the human colon on appetite regulation, body weight maintenance and adiposity in overweight adults. *Gut* 2015; 64:1744-1754
81. Arike L, Holmén-Larsson J, Hansson GC. Intestinal Muc2 mucin O-glycosylation is affected by microbiota and regulated by differential expression of glycosyltransferases. *Glycobiology* 2017; 27:318-328
82. Wang L, Christophersen CT, Sorich MJ, Gerber JP, Angley MT, Conlon MA. Low Relative Abundances of the Mucolytic Bacterium *Akkermansia*

- muciniphila and *Bifidobacterium* spp. in Feces of Children with Autism. *Applied and Environmental Microbiology* 2011; 77:6718-6721
83. Graf J. The Family Rikenellaceae. In: Rosenberg E, DeLong EF, Lory S, Stackebrandt E, Thompson F, eds. *The Prokaryotes: Other Major Lineages of Bacteria and The Archaea*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2014:857-859.
 84. Belgaumkar AP, Vincent RP, Carswell KA, Hughes RD, Alaghband-Zadeh J, Mitry RR, le Roux CW, Patel AG. Changes in Bile Acid Profile After Laparoscopic Sleeve Gastrectomy are Associated with Improvements in Metabolic Profile and Fatty Liver Disease. *Obes Surg* 2016; 26:1195-1202
 85. Plovier H, Everard A, Druart C, Depommier C, Van Hul M, Geurts L, Chilloux J, Ottman N, Duparc T, Lichtenstein L, Myridakis A, Delzenne NM, Klievink J, Bhattacharjee A, van der Ark KC, Aalvink S, Martinez LO, Dumas ME, Maiter D, Loumaye A, Hermans MP, Thissen JP, Belzer C, de Vos WM, Cani PD. A purified membrane protein from *Akkermansia muciniphila* or the pasteurized bacterium improves metabolism in obese and diabetic mice. *Nature medicine* 2017; 23:107-113
 86. Goodrich JK, Waters JL, Poole AC, Sutter JL, Koren O, Blekhman R, Beaumont M, Van Treuren W, Knight R, Bell JT, Spector TD, Clark AG, Ley RE. Human genetics shape the gut microbiome. *Cell* 2014; 159:789-799
 87. Machiels K, Joossens M, Sabino J, De Preter V, Arijs I, Eeckhaut V, Ballet V, Claes K, Van Immerseel F, Verbeke K, Ferrante M, Verhaegen J, Rutgeerts P, Vermeire S. A decrease of the butyrate-producing species *Roseburia hominis* and *Faecalibacterium prausnitzii* defines dysbiosis in patients with ulcerative colitis. *Gut* 2014; 63:1275-1283
 88. Haro C, Montes-Borrego M, Rangel-Zuniga OA, Alcala-Diaz JF, Gomez-Delgado F, Perez-Martinez P, Delgado-Lista J, Quintana-Navarro GM, Tinahones FJ, Landa BB, Lopez-Miranda J, Camargo A, Perez-Jimenez F. Two Healthy Diets Modulate Gut Microbial Community Improving Insulin Sensitivity in a Human Obese Population. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 2016; 101:233-242

6. Anexos

ANEXO1. QIIME2 workflow

Para analizar las muestras fecales secuenciadas se utilizó el software gratuito QIIME2 (<https://qiime2.org>).

La última implementación ha permitido que haya varias interfaces que hace que sea más fácil de manejar para personas que no están acostumbradas. Sin embargo, se utilizó la versión nativa en terminal.

Activamos la sesión:

```
source activate qiime2-2018.2
```

Importación de secuencias. Tras la creación del manifiesto con todas las muestras que van a estar incluidas en el proyecto, se procede a la importación de las secuencias demultiplexadas.

Ejemplo de manifiesto:

```
# single-end PHRED 33 fastq manifest file for forward reads
sample-id,absolute-filepath,direction
sample.18014-
6M,/Volumes/Elements/dieta_vs_BSFfinal/grupo_dieta_med/fastq/18014_6M.fastq,forward
sample.18014B,/Volumes/Elements/dieta_vs_BSFfinal/grupo_dieta_med/fastq/18014B.fastq,forward
```

Nota: en el nombre de las muestras se deben de utilizar solo "." o "-", no utilizar "_"

Comando de importación en la terminal:

```
qiime tools import --type 'SampleData[SequencesWithQuality]' --input-path se-33-manifest-dieta-CB-completo2.txt --output-path single-end-demux.qza --source-format SingleEndFastqManifestPhred33
```

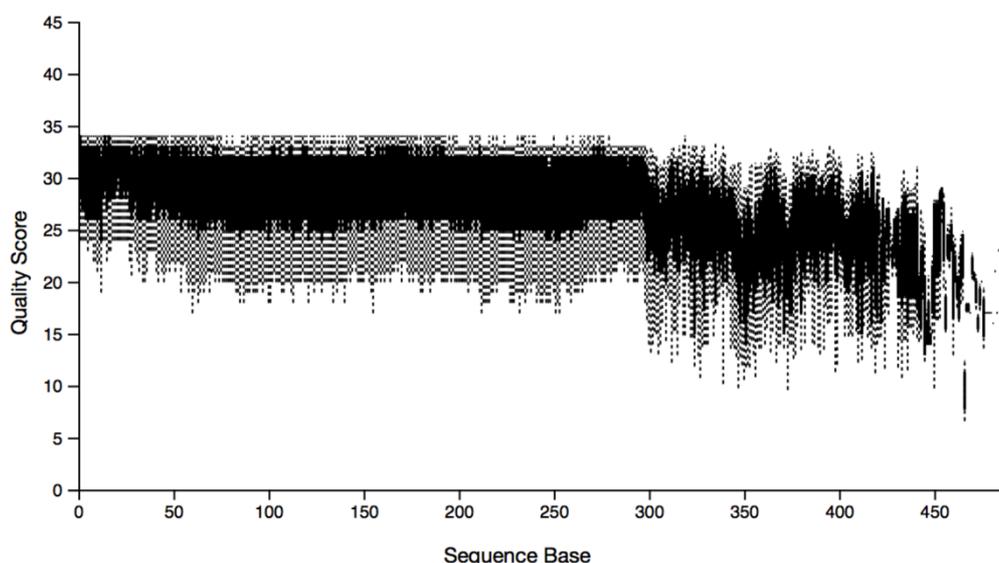
Creación de un sample_metadata en el que todas las muestras tengan asociada su información. Se valida con el complemento para chrome "Keemei". Seguir las instrucciones.

Control de calidad y creación de la FeatureTable: QIIME2 nos permite realizar diferentes controles de calidad basados en diferentes métodos, la mayoría implementados principalmente para Illumina. Utilizaremos DADA2 con los cambios necesarios para usar con la tecnología Ion Torrent. DADA2 es capaz de detectar y corregir errores de secuenciación en los amplicones y que por lo tanto nos dará una mayor precisión de nuestras secuencias, permitiendo que nuestro perfil mejore significativamente. Sin embargo, para encontrar los mejores parámetros hay que hacer primero unas observaciones:

```
qiime demux summarize --i-data single-end-demux.qza --o-visualization single-end-demux.qzv
```

Se consigue un archivo .qzv que puede ser visualizado con toda la información de nuestras secuencias:

```
qiime tools view single-end-demux.qzv
```



Aquí se observa que la calidad es más o menos homogénea hasta una longitud de unas 300 pb, que sería el tamaño con el que trabajar. Sin embargo, las posibilidades que nos ofrece el programa lo mejor para el caso de nuestra tecnología es continuar con las muestras sin cortar por longitud, aunque cortando las primeras 15 pb de la izquierda. Así, con estos parámetros crearemos nuestra feature-table, uno de los dos archivos clave. Este proceso es largo, alrededor de 36 horas:

```
qiime dada2 denoise-single --i-demultiplexed-seqs single-end-demux.qza --p-trim-left 15 --p-trunc-len 0 --o-representative-sequences rep-seqs-dada2.qza --o-table table-dada2.qza
```

Exploración de los resultados: Después del paso de filtrado, exploramos los datos, de tal manera que podamos establecer la cantidad de secuencias asociadas a cada una de nuestras muestras y las feature=secuencias únicas encontrados en ellas.

```
qiime feature-table summarize --i-table table-dada2.qza --o-visualization table-dada.qzv --m-sample-metadata-file dieta_vs_bs_map.txt
```

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

Generación del árbol filogenético: A partir de ahora lo que vamos a hacer es generar el árbol filogenético para los análisis de diversidad:

Primero alineamos nuestras secuencias:

```
qiime alignment mafft --i-sequences rep-seqs-dada2.qza --o-alignment aligned-rep-seqs-dada.qza
```

Filtramos las posiciones altamente variables de nuestras secuencias:

```
qiime alignment mask --i-alignment aligned-rep-seqs-dada.qza --o-masked-alignment masked-aligned-rep-seqs-dada.qza
```

Aplicamos el método FastTree para generar el árbol filogenético de nuestras secuencias alineadas y filtradas:

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

Aplicamos la raíz de nuestro árbol:

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

Análisis de alfa y beta diversidad: El siguiente paso es uno de los más importantes en ecología microbiana, establecer la diversidad de nuestros grupos. Para ello vamos a crear diferentes análisis de alfa y beta diversidad agrupados en el core-metrics.

```
qiime diversity core-metrics-phylogenetic --i-phylogeny rooted-tree.qza --i-table table-dada2.qza --p-sampling-depth 22273 --m-metadata-file dieta_vs_bs_map.txt --output-dir core-metrics-results-even22273
```

Para hacer los análisis estadísticos de cada índice medido:

```
qiime diversity alpha-group-significance --i-alpha-diversity core-metrics-results-even22272/shannon_vector.qza --m-metadata-file dieta_vs_bs_map.txt --o-visualization core-metrics-results-even22272/shannon-group-significance.qzv
```

```
qiime diversity alpha-group-significance --i-alpha-diversity core-metrics-results-even22272/evenness_vector.qza --m-metadata-file dieta_vs_bs_map.txt --o-visualization core-metrics-results-even22272/evenness-group-significance.qzv
```

```
qiime diversity alpha-group-significance --i-alpha-diversity core-metrics-results-even22272/observed_otus_vector.qza --m-metadata-file dieta_vs_bs_map.txt --o-visualization core-metrics-results-even22272/observed-otus-group-significance.qzv
```

```
qiime diversity alpha-group-significance --i-alpha-diversity core-metrics-results-even22272/faith_pd_vector.qza --m-metadata-file dieta_vs_bs_map.txt --o-visualization core-metrics-results-even22272/faith-pd-otus-group-significance.qzv
```

```
qiime diversity beta-group-significance --i-distance-matrix core-metrics-results-
even22272/unweighted_unifrac_distance_matrix.qza --m-metadata-file
dieta_vs_bs_map.txt --m-metadata-column Treatment-time --o-visualization core-
metrics-results-even22272/unweighted_unifrac_treatment_time-significance.qzv --p-
pairwise
```

Ahora llega el paso más importante y más costoso del análisis, el saber qué es lo que tenemos en nuestras secuencias. Para ello, debido a que nuestra tecnología de secuenciación, Ion Torrent, es diferente a la Illumina que es para la que QIIME está implementada, ha hecho falta hacer varias pruebas para determinar el mejor modelo con el que trabajar. Finalmente ha sido alinear las secuencias mediante Vsearch con una identidad del 99% con los OTUs presentes en la base de datos Greengenes versión 13_8:

Lo primero es adecuar los template al formato de qiime2:

```
qiime tools import --type FeatureData[Taxonomy] --source-format
HeaderlessTSVTaxonomyFormat --input-path
/Volumes/Elements/plataforma_metagenomica/gg_13_8_otus/taxonomy/99_otu_taxono
my.txt --output-path ref-taxonomy-gg13_8.qza
```

```
qiime tools import --type FeatureData[Sequence] --input-path
/Volumes/Elements/plataforma_metagenomica/gg_13_8_otus/rep_set/99_otus.fasta --
output-path gg99_13_8_otus.qza
```

```
qiime feature-classifier classify-consensus-vsearch --i-query rep-seqs-dada2.qza --i-
reference-reads gg99_13_8_otus.qza --i-reference-taxonomy ref-taxonomy-gg13_8.qza
--p-perc-identity 0.99 --o-classification taxonomy_99gg13_8-vsearch.qza
```

Éste es el paso clave en el análisis:

```
qiime feature-classifier classify-consensus-vsearch --i-query rep-seqs-dada2.qza --i-
reference-reads gg99_13_8_otus.qza --i-reference-taxonomy ref-taxonomy-
gg13_8_99.qza --p-perc-identity 0.99 --o-classification taxonomy_99gg13_8-
vsearch.qza --p-threads 0
```

NOTA: para que el ordenador trabaje a pleno rendimiento utilizad `--p-threads 0`, pero hará casi imposible que el ordenador pueda hacer cualquier otra tarea. Con `--p-threads 2` el análisis durará unas 72 horas.

Observamos los resultados:

```
qiime metadata tabulate --m-input-file taxonomy_99gg13_8-vsearch.qza --o-
visualization taxonomy-99gg13_8-vsearch.qzv
```

```
qiime taxa barplot --i-table table-dada2.qza --i-taxonomy taxonomy_99gg13_8-
vsearch.qza --m-metadata-file dieta_vs_bs_map.txt --o-visualization taxa-bar-plots-
99gg13_8.qzv
```

Ahora llega el momento de analizar las diferencias de abundancia de los diferentes taxones con el método ANCOM:

```
qiime taxa collapse --i-table table-dada.qza --i-taxonomy taxonomy_99gg13_8-  
vsearch.qza --p-level 6 --o-collapsed-table table-dada-L6.qza
```

```
qiime composition add-pseudocount --i-table table-dada-L6.qza --o-composition-table  
table-dada-L6.qza
```

```
qiime composition ancom --i-table table-dada-L6.qza --m-metadata-file  
dieta_vs_bs_map.txt --m-metadata-column Treatment --o-visualization ancom-comp-  
feces-table-dada-L6.qzv
```

Anexo 2. Microbiome Analyst

Para la presentación de los resultados filogenéticos se ha seguido en todos los casos la misma secuencia.

Debido a la alta cantidad de datos disponibles, el tiempo restringido y las amplias posibilidades que se están abriendo cada semana en el análisis de la microbiota intestinal, he decidido utilizar un análisis basado en la implementación de diferentes pipelines utilizados en el análisis de la microbiota y recogidos todos en una web que ayuda con estos análisis para hacerlos de una manera sencilla:
<http://www.microbiomeanalyst.ca/faces/home.xhtml>

MicrobiomeAnalyst está basado en tres lenguajes de programación diferentes: Java, R y Javascript, y se ha creado una web mediante la tecnología Java Server Faces usando la librería Primefaces. La web usa recursos de diferentes paquetes, pero principalmente toda la estadística está basada en paquetes de R ampliamente utilizados:

- phyloseq: para la manipulación general de los datos y los análisis estadísticos de los datos metagenómicos.
- vegan: Para la rarefacción de los datos y otros análisis.
- metagenomeSeq, edgeR & DESeq2: para la comparación estadística de los resultados.
- ggplot2: visualización de los datos.

De esta manera, podemos utilizar todas las herramientas disponibles de una manera sencilla, aunque se puedan seguir implementando análisis más pormenorizados directamente con los paquetes por el usuario.

La secuencia de análisis y presentación de resultados ha sido la siguiente.

Se ha utilizado el archivo .biom generado a partir de los datos de qiime2.

```
Qiime tools export table-dada2.qza --output-dir table
```

```
qiime tools export taxonomy_99gg13_8-vsearch.qza --output-dir taxonomy cp  
exported/taxonomy.tsv biom-taxonomy.tsv
```

```
##cambiar la primera línea del archivo
```

```
Feature ID Taxon Confidence#OTUID taxonomy confidence
```

```
Biom add-metadata -i feature-table.biom -o table-with-taxonomy.biom -- observation-  
metadata-fp biom-taxonomy.tsv --sc-separated taxonomy --header- key taxonomy
```

La tabla con los metadatos se ha limpiado de columnas vacías y se han introducido indicando que se ha utilizado la “Greengenes Taxonomy”.

Secuencia de análisis en MicrobiomeAnalyst:

Quitar las secuencias que no se encuentren al menos en dos muestras, que tengan una prevalencia de al menos el 20% y que tengan una varianza menor del 10%.

Normalización de las secuencias: La normalización de los datos permite tratar el problema de la variabilidad en la profundidad de la secuenciación de los datos y permitir una comparación entre muestras más biológicamente significativa. Cuando se utiliza la secuenciación del gen 16S, la rarefacción también se recomienda. Así que vamos a utilizar la técnica de la rarefacción al número de secuencias mínimo de nuestras muestras, pero también vamos a escalar nuestras muestras con la técnica recomendada, que es la TSS.

Una vez hecho esto, ya tenemos disponibles todas las herramientas para explorar nuestros datos. Así, todas las comparaciones se van a presentar de la misma manera como sigue:

1. Exploración visual de los datos:

a. Gráfico de áreas: Nos dará una idea de la homogeneidad de las muestras dentro de cada tratamiento. Se realizará en el nivel de filo, familia y género, los tres taxones más representativos en este tipo de análisis. Los taxones que tengan menos de 10 copias, se eliminarán.

b. Gráfico de círculos: observaremos los taxones consenso dentro de cada tratamiento a nivel de filo y género. De igual manera se eliminarán los taxones que tengan menos de 10 copias.

2. El perfil de la comunidad sin embargo se realizará con los datos directamente del qiime2.

a. Análisis de alpha diversidad

b. Análisis de beta diversidad

3. Análisis de clústers. Se presentará un gráfico heatmap en los diferentes

niveles de taxones utilizando la distancia Euclidea. El algoritmo de clusterización utilizado será el de Ward que utiliza las medidas de distancia con un análisis de su varianza.

4. Análisis de la diferente abundancia. Se utilizarán tres medidas diferentes y se buscará el consenso entre ellas. Actualmente no hay ningún consenso de cómo realizar el análisis. El análisis univariante basado en la estadística clásica se ha observado que es demasiado restrictivo al corregir por las comparaciones múltiples debido a la alta cantidad de observaciones que se tienen en cuenta. Por lo que se han desarrollado diferentes aproximaciones con herramientas implementadas para análisis de secuenciación masiva.

a. Análisis univariante. Se realizará un test no paramétrico (Mann Whitney/kruskal Wallis) con una p-ajustada por el método FDR.

b. MetagenomeSeq. Análisis estadístico de secuenciación masiva. El modelo estadístico utilizado será el ajuste Gausiano . p-ajustada por el método FDR.

c. Métodos de RNAseq. Métodos de análisis de la abundancia diferencial. Se utilizará el algoritmo EdgeR basado en una distribución negativa binomial (estimación Bayesiana, tests exactos, GLM y de bondad de ajuste). p-ajustada por el método FDR.

5. Análisis de biomarcadores. Se buscarán grupos bacterianos representativos de cada tratamiento mediante dos aproximaciones:

a. LEFse. Análisis linear discriminante basado en el efecto del tamaño. Para que sea significativo se utilizará un logaritmo del LDA score de 1.0. p-ajustada por el método FDR.

b. Random Forest. Algoritmo de machine learning para identificar y predecir biomarcadores. Se basa en construir una gran cantidad de árboles de decisión como entrenamiento y prediciendo la respuesta de cada árbol. Se utilizarán 500 árboles de decisión y 7 predictores.

Anexo 3. PICRUt workflow

1. Construir la otu_table.biom frente a Greengenes 13_5 al 97% de identidad. Se hará en qiime.

Macqiime

```
Split_libraries_fastq.py -i fastq,fastq,fastq -sample-ids  
sample1,sample2,sample3 -o slout_not_multiplexed_q20/ -q 19 -barcode_type  
'not-barcoded' -phred-offset 33
```

```
Pick_closed_reference_otus.py -i seqs.fna -r refseqs_97.fna -o otus_w_tax/ -t  
taxa_97.txt -p params
```

2. Ya podemos utilizar PICRUSt:

- a. Normalizar la tabla:

```
Normalize_by_copy_number.py -i closed_otu_table.biom -o  
normalized_table.biom
```

- b. Predecir las funciones del metagenoma:

```
Predict_metagenomes.py -i normalized_table.biom -o  
metagenome_predictions.biom
```

- c. Analizar los metagenomas predecidos:

```
Categorize_by_function.py -i metagenome_predictions.biom -o  
predicted_metagenomes_L3.biom -c KEGG_pathways -l 3
```

3. Pasar los archivos a formato .spf con la herramienta Microbiome Helper

```
Biom_to_stamp.py -m KEGG_Pathways predicted_metagenomes_L3.biom >  
predicted_metagenomes_L3.spf
```

4. Cargar los datos en STAMP y analizar: se utilizará el predicted_metagenomes_L3.spf y la sample_metadata.