

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA



Composición de microbiota intestinal de la población valenciana nativa y la simulada en el sistema de digestión *ex vivo*, MiniARIS

TRABAJO FIN DE MÁSTER EN BIOTECNOLOGÍA BIOMÉDICA

ALUMNO/A: Neus Alemany Ortola

TUTOR/A: Andrés Moya Simarro,

Marisela González Ávila, Joaquin

Cañizares Sales

Curso Académico: 2018-2019

VALÈNCIA, 4 de julio de 2019

Resumen

El tracto gastrointestinal humano alberga una población compleja y dinámica de microorganismos, conocida como microbiota intestinal. La microbiota tiene un papel funcional relevante, directa o indirectamente, en el adecuado funcionamiento de la fisiología humana. Es destacable el papel fundamental que la microbiota tiene en la digestión de los alimentos y la nutrición.

La necesidad de comprender estos procesos llevó a los investigadores del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ) en México a desarrollar una tecnología que simula el tracto gastrointestinal humano en cinco biorreactores, correspondientes al estómago, intestino delgado e intestino grueso. Esta tecnología, conocida como ARIS (*Automated and Robotic Intestinal System*) se adapta a la población de estudio ya que utiliza la microbiota humana nativa, proveniente de donantes, como fuente de microbiota y es, por lo tanto, un sistema *ex vivo*.

En el presente trabajo se compara la microbiota de una cohorte de personas de la ciudad de València con la establecida en el digestor a partir de la primera. Se ha determinado la composición de las microbiotas anteriores mediante técnicas de secuenciación masiva y comparado sus diversidades α y β , tanto en bacterias como en hongos. Aunque los resultados obtenidos muestran que no se ha conseguido emular la microbiota de la población valenciana en el digestor ARIS, que muestra una diversidad menor, se ha podido determinar donde radican los problemas con el prototipo de digestor, y sentado las bases para su adecuada resolución.

Palabras clave: “*ex vivo*”, “simulador”, “sistema digestivo”, MiniARIS.

Agradecimientos

En primer lugar, me gustaría agradecer al Prof. Andrés Moya por haberme dado la oportunidad de participar en este maravilloso proyecto desde el inicio. A la Dra. Marisela González por compartir no solo sus conocimientos si no también su forma de entender la ciencia y la vida conmigo y responder a mis mil preguntas. A la Prof. Amparo Latorre por su inestimable ayuda en la confección del escrito. A la Dra. Nuria Hernández por descubrirme el mundo de la secuenciación y por no perder nunca la calma. Al Dr. Vicente Pérez y a Mariana Reyes por ayudarme a no perder la cabeza con la bioinformática. Y en especial, a Silvestre Chávez, sin el cual este proyecto no hubiera pasado de los primeros meses, por su incalculable ayuda aún estando al otro lado del océano Atlántico. También a mi familia y amigos por su apoyo, aunque la mayoría de ellos no entendiera nada de lo que les decía. Y en general a todas aquellas personas que me han ayudado y acompañado en todos estos meses. Sin vosotros este trabajo no sería lo que es.

Índice de contenidos

1.	Introducción	1
1.1.	Sistema digestivo.....	1
1.2.	Microbiota intestinal.....	2
1.2.1.	Localización y composición	2
1.2.2.	Factores que influyen en el desarrollo de la MI.....	3
1.2.3.	Funciones	5
1.3.	Simuladores del tracto digestivo humano	7
1.3.1.	SHIME (Simulator of the <i>Human Intestinal Microbial Ecosystem</i>).....	8
1.3.2.	Simgi (Simulador Gastrointestinal Dinámico)	9
1.3.3.	ARIS (<i>Automatic and Robotic Intestinal System</i>).....	9
2.	Objetivo.....	11
3.	Materiales y métodos	11
3.1.	Tamaño muestral y recogida de muestras para la estabilización	11
3.2.	Proceso de estabilización	12
3.3.	Verificación del funcionamiento de MiniARIS.....	12
3.3.1.	Composición del alimento.....	13
3.3.2.	Condiciones de los biorreactores.....	13
3.3.3.	pH	13
3.4.	Microbiología	14
3.4.1.	Cultivo de microorganismos aerobios: Lactobacilos y salmoneloides.....	14
3.4.2.	Cultivo de microorganismos anaerobios: bifidobacterias y clostridiales.....	14
3.5.	Identificación molecular.....	15
3.5.1.	Extracción ADN.....	15
3.5.2.	Preparación librerías	15
3.5.3.	Evaluación de calidad	16
3.5.4.	Eliminación de quimeras, eliminación de ruido de fondo y unión de secuencias	16
3.6.	Análisis bioinformático.....	17
3.6.1.	Anotación taxonómica	17
3.6.2.	Estudio de la diversidad	17
3.6.3.	Pruebas estadísticas	17
4.	Resultados.....	17
4.1.	Microbiología	17
4.1.1.	Donantes	17
4.1.2.	ARIS	18
4.1.3.	Comparaciones entre los perfiles de microbiota	22

4.2.	Secuenciación.....	22
4.2.1.	Taxonomía.....	22
4.2.2.	Diversidad α : Estimador CHAO1, índice de Shannon y rarefacción.....	25
4.2.3.	Diversidad β : Análisis de componentes principales (PCoA).....	29
4.2.4.	Pruebas pareadas en función de la taxonomía.....	29
5.	Discusión.....	31
6.	Conclusión.....	33
7.	Bibliografía.....	35
8.	Anexos.....	38
8.1.	Anexo 1: Protocolo de recogida y procesado de muestras de heces.....	39
8.2.	Anexo 2: Cuestionario sobre los hábitos alimentarios.....	40
8.3.	Anexo 3: Problemas enfrentados durante el proceso de puesta a punto.....	44

Índice de figuras

Figura 1: Esquema del sistema digestivo	1
Figura 2: Factores que influyen la microbiota intestinal de infantes, adultos y personas de la tercera edad.	4
Figura 3: Esquema general de un simulador.	8
Figura 4: Simulador SHIME.....	9
Figura 5: Simulador Simgi.....	9
Figura 6: Simulador ARIS	10
Figura 7: Simulador MiniARIS.....	11
Figura 8: Flujo de trabajo para preparar las librerías.....	15
Figura 9: Representación gráfica del perfil de la microbiota de los donantes.....	18
Figura 10: Representación gráfica de los datos del primer recuento.	19
Figura 11: Representación gráfica de los datos del segundo recuento	20
Figura 12: Representación gráfica de los datos del tercer recuento	21
Figura 13: Representación gráfica de las asignaciones taxonómicas bacterianas correspondientes al taxón de filo.	23
Figura 14: Representación gráfica de las asignaciones taxonómicas bacterianas correspondientes al taxón de género	23
Figura 15: Representación gráfica de las asignaciones taxonómicas fúngica correspondientes al taxón de filo.....	24
Figura 16: Representación gráfica de las asignaciones taxonómicas fúngicas correspondientes al taxón de género	25
Figura 17: Representación gráfica de los valores de CHAO1 y Shannon con respecto a bacterias. ...	26
Figura 18: Representación gráfica de las curvas de rarefacción en los grupos de ARIS y donantes, respecto a bacterias	27
Figura 19: Representación gráfica de los valores de CHAO1 y Shannon con respecto a hongos.	28
Figura 20: Representación gráfica de las curvas de rarefacción en los grupos de ARIS y donantes respecto a hongos	28
Figura 21: PCoA del conjunto de datos en función del género bacteriano y del género fúngico.....	29
Figura 22: Imagen de la sección de deshechos	45
Figura 23: Imagen de los cultivos del medio LIA para todas las secciones del simulador	45
Figura 24: Imagen de los cultivos del medio TSC para las secciones del simulador del colon transversal y del colon descendente	45
Figura 25: Imagen de los cultivos del medio TSC para la sección del colon ascendente.....	45
Figura 26: Imagen del cultivo del medio TSC para la sección del colon ascendente	45

Índice de tablas

Tabla 1: Resumen de las diferencias en la microbiota debido a las dietas.....	5
Tabla 2: Principales SCFAs (butirato, propionato y acetato) y sus funciones.....	6
Tabla 3: Alimentos representativos de cada grupo nutricional que sirven como materia prima en la preparación del alimento.....	13
Tabla 4: Detalle de las condiciones en las que se encuentran los biorreactores.....	13
Tabla 5: Secuencias de los cebadores usados en la preparación de la librería 16S.....	15
Tabla 6: Secuencias de los cebadores usados en la preparación de la librería ITS.....	16
Tabla 7: Valores de los parámetros usados en el paso de evaluación de calidad.	16
Tabla 8: Promedio del recuento microbiológico de donantes y su error estándar.	18
Tabla 9: Primer recuento de microorganismos del cultivo de las tres secciones de ARIS.	19
Tabla 10: Segundo recuento de microorganismos del cultivo de las tres secciones de ARIS.....	20
Tabla 11: Tercer recuento de microorganismos del cultivo de las tres secciones de ARIS.	21
Tabla 12: Resultados de la prueba estadística no paramétrica de Wilcoxon	22
Tabla 13: Resultados del estimador de diversidad CHAO1 y del índice de Shannon para los grupos de donantes y ARIS en relación a las bacterias	25
Tabla 14: Resultados del estimador de diversidad CHAO1 y del índice de Shannon para los grupos de donantes y ARIS en relación a los hongos.....	27
Tabla 15: Resultados de las pruebas pareadas en función de la taxonomía bacteriana	30
Tabla 16: Resultados de las pruebas pareadas en función de la taxonomía fúngica.....	31

1. Introducción

El sistema digestivo es el encargado de descomponer los alimentos en unidades absorbibles llamadas nutrientes, los cuales entrarán en el torrente sanguíneo y se distribuirán a lo largo del cuerpo. Los nutrientes son fundamentales para la producción de energía y elementos celulares básicos, por lo que es imprescindible que este sistema funcione correctamente (1). Una de las partes más importantes de este sistema, y en la que se centrará este trabajo, es la microbiota intestinal, que desempeña un papel esencial, ya sea de manera directa o indirecta, en el funcionamiento del cuerpo humano a través de sus funciones.

1.1. Sistema digestivo

El sistema digestivo es el conjunto de órganos que intervienen en la digestión de los alimentos. Estos órganos actúan desde la entrada de comida al cuerpo hasta su expulsión y se clasifican en dos grandes grupos:

1. **Canal alimenticio**, también llamado **tracto gastrointestinal (GI)**, formado por una serie de órganos huecos unidos a un tubo largo y retorcido desde la boca hasta el ano (aproximadamente 11 m). Este tubo a su vez se divide en parte superior donde están localizados la boca, el esófago y el estómago y en parte inferior que comprende el intestino delgado, grueso, el recto y el ano. El tracto GI es una de las mayores superficies del cuerpo ($250-400\text{ m}^2$), donde los factores externos y los antígenos entran en contacto con el hospedador. Además, es el responsable de descomponer y absorber los alimentos ingeridos (1,2).
2. **Órganos digestivos accesorios**, entre los que se encuentran los dientes, la glándula salival, hígado, vesícula biliar y páncreas (1,3).

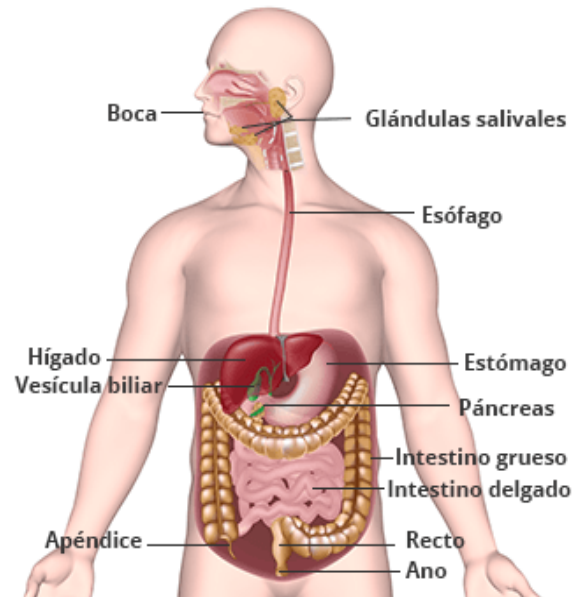


Figura 1: Esquema del sistema digestivo. Extraído de (5).

Todos estos componentes trabajan en equipo para llevar a cabo el proceso de digestión que consta de 6 pasos generales (4):

1. Ingestión
2. Masticación
3. Digestión
4. Secreción
5. Absorción
6. Defecación

Este proceso se inicia con la ingesta de comida, que se da en la boca. Una vez dentro, los dientes procesan la comida rompiéndola mecánicamente mediante la masticación, mientras que las secreciones de la glándula salival inician la digestión química, estos dos procesos dan como resultado el bolo alimenticio. Cuando el individuo traga, la lengua empuja el bolo hacia la garganta donde se encuentra la epiglotis, encargada de evitar el ahogamiento. Posteriormente el bolo pasa al esófago y mediante movimientos peristálticos pasa al estómago donde se mezclan con jugos gástricos. Los jugos gástricos, que contienen pepsina, son los encargados de romper químicamente las proteínas en el proceso de digestión.

Posteriormente, el estómago vacía lentamente su contenido (quimo) en el intestino delgado. En este órgano prosigue la digestión con la adición de jugos provenientes del páncreas, hígado y del propio intestino. Las paredes del intestino delgado absorben el agua y los nutrientes digeridos, que pasan al torrente sanguíneo mientras que los productos de deshecho pasan al intestino grueso. En el intestino grueso se da la reabsorción de agua, así como el empaquetado de los productos de desechos para su excreción. Además, en el intestino grueso se encuentra la microbiota intestinal, fundamental en el proceso de digestión. Por último, al final del intestino grueso, se encuentra el recto que almacena las heces hasta que son expulsadas mediante la defecación (1,4,5).

1.2. Microbiota intestinal

El tracto gastrointestinal humano alberga una población compleja y dinámica de microorganismos, conocida como microbiota intestinal (MI), que ha evolucionado junto con los seres humanos. El microbioma comprende el material genético que forma parte de la microbiota, considerada el conjunto de microorganismos que habitan en un nicho específico. La microbiota ofrece muchos beneficios, entre otros, fortalece la integridad y moldea el epitelio intestinal, protege contra patógenos, contribuye a la producción de vitaminas, interviene en la digestión alimentaria y estimula el sistema inmune, por estos motivos es considerada un órgano adquirido. No obstante, cuando la composición normal se ve alterada, lo que se conoce como disbiosis, se relaciona con enfermedades tanto intestinales como no-intestinales (2,6).

En la microbiota intestinal también están presentes los hongos. Este componente del microbioma humano recibe el nombre de micobioma y representa una pequeña proporción del total (0,2-0,3%). Debido a las dificultades de cultivo y a su pequeña representación comparado con las bacterias, el micobioma no se ha estudiado en profundidad. Sin embargo, las nuevas técnicas de secuenciación masiva han permitido conocer los hongos que se encuentran en la microbiota intestinal y determinar sus funciones, su papel en la salud humana y las interacciones con bacterias, aunque la mayoría de ellas aún se desconocen (7,8).

1.2.1. Localización y composición

La microbiota se distribuye a lo largo del tracto gastrointestinal y su concentración aumenta longitudinalmente, así el estómago alberga 10^1 bacterias/g mientras que el colon alberga 10^{12} bacterias/g, representando más del 70% de todos los microbios encontrados en el cuerpo humano. Además, existen variaciones temporales y espaciales de la distribución de la microbiota debido a los gradientes químicos, nutricionales, inmunológicos y a la presencia o ausencia de oxígeno en el tracto GI. Por un lado, tanto en el estómago como en el intestino delgado hay niveles altos de ácidos, oxígeno, agentes antimicrobianos que limitan el crecimiento bacteriano. Por otro lado, las condiciones del colon (ausencia de oxígeno, ambiente alcalino, etc.) permiten el crecimiento de una comunidad bacteriana densa, principalmente de microorganismos anaerobios con capacidad de descomponer carbohidratos complejos no digeridos en el intestino delgado (2,6,9).

El desarrollo de las tecnologías de secuenciación masiva ha permitido el estudio tanto de la composición (taxonomía) como de las funciones de la microbiota mediante técnicas ómicas. El gen diana usado en el estudio taxonómico codifica para el ARN de la subunidad pequeña de los ribosomas, tanto en procariontes como en eucariontes. En el caso de las bacterias y las arqueas, el gen diana es 16S ADNr mientras que en el caso de los hongos es el 18S ADNr. En el primer caso, las diferencias de las regiones variables permiten diferenciar las especies mientras que, en el segundo caso, es la presencia de diferencias en las regiones ITS (*internal transcribed spacers*) las que permiten la identificación. Los datos obtenidos a través de esta tecnología describen más de 2000 especies aisladas de seres humanos y se clasifican en 12 filos diferentes.

En la microbiota normal y sana, los filos bacterianos con mayor representación son Bacteroidetes, Firmicutes, Proteobacterias y Actinobacterias, teniendo una representación aproximada del 93%. No obstante, dentro de estos 4 filos, los más representados son Bacteroidetes y Firmicutes (2,6,10). En cambio, los filos fúngicos más representados son Basidiomycota y Ascomycota, siendo este último el más representado. Respecto a los géneros, los más representados son *Saccharomyces*, *Malassezia* y *Candida*. Sin embargo, la diversidad bacteriana es superior que la diversidad existente en los hongos (7,8).

La MI es más diversa que la microbiota de las otras partes del cuerpo (piel, tracto urogenital, cavidad oral) y revela un alto grado de redundancia funcional. No obstante, hay variaciones significativas en la composición entre individuos aparentemente sanos. Aproximadamente dos tercios de la microbiota intestinal difiere de una persona a otra. Debido a su alto grado de redundancia funcional, las variaciones temporales y espaciales en la composición pueden dar perfiles proteicos y metabólicos similares (2,6,10,11).

1.2.2. Factores que influyen en el desarrollo de la MI

La composición de la microbiota humana cambia a lo largo del tiempo; así la composición de la MI de adultos sanos es diferente a la de los infantes y la de las personas de la tercera edad. Después del nacimiento, el tracto GI se coloniza rápidamente y varía por efecto de factores como el tipo de nacimiento (parto natural o cesárea), las enfermedades, los tratamientos antibióticos y la dieta, dando una composición específica para cada individuo. Además, se identifican firmas microbianas específicas según región geográfica, lo que sugiere que la composición de la microbiota intestinal está influenciada, además de por los factores genéticos del hospedador, por factores ambientales. Entre los factores ambientales que influyen se encuentran, además de los mencionados anteriormente, los suplementos probióticos y prebióticos, cirugías, embarazo y periodo gestacional, sexo, postmenopausia, tabaquismo, zona de residencia, entre muchos otros (2,6,12). A continuación, se profundiza en dos de los factores más influyentes, la edad (figura 2) y la dieta (tabla 1).

Edad

Durante mucho tiempo se creyó que la colonización del tracto gastrointestinal de los recién nacidos empezaba justo después del nacimiento, pero se han encontrado evidencias de que la colonización empieza ya en el útero materno, dado que el *meconium* alberga una comunidad microbiana compleja. Después del nacimiento empieza la colonización de los distintos hábitats del cuerpo humano (piel, cavidad oral, tracto urogenital y tracto gastrointestinal). El factor más influyente en la primera colonización microbiana es el modo de nacimiento. Así, la microbiota de los infantes nacidos mediante parto vaginal contiene una gran proporción de los géneros *Lactobacillus* y *Prevotella* durante los primeros días, reflejando la composición de la microbiota vaginal materna. Por el contrario, la MI de los bebés nacidos mediante cesárea presenta un retraso en la colonización de especies del filo Bacteroidetes, pero se coloniza por microorganismos anaerobios facultativos como las especies del género *Clostridium*. Durante las primeras etapas del desarrollo, la MI es inestable y su diversidad es baja, predominando dos filos principales, Actinobacterias y Proteobacterias. En el primer año, la MI se estabiliza y la diversidad aumenta creando un perfil microbiano único para cada infante. A partir de los 2-3 años, la composición, diversidad y capacidades funcionales de la MI infantil se parecen más a las de un adulto sano, aunque existen diferencias significativas en la proporción de Bacteroidetes y *Bifidobacteria* respecto a los adultos (2,6,9,13).

Desde los 30 años hasta aproximadamente los 70, la MI se encuentra en un estado estable. No obstante, las proporciones de *Bifidobacteria* y Firmicutes tienden a descender, aumentado por el contrario las proporciones de Proteobacterias y *Staphylococcus* (9).

Respecto a los individuos de más de 65 años, aumenta la abundancia del filo Bacteroidetes y del género *Clostridium* (Firmicutes). En individuos centenarios se observó una reducción significativa de la diversidad y un aumento en la abundancia de microorganismos anaerobios facultativos y un cambio en el perfil de productores de butirato (2,13).

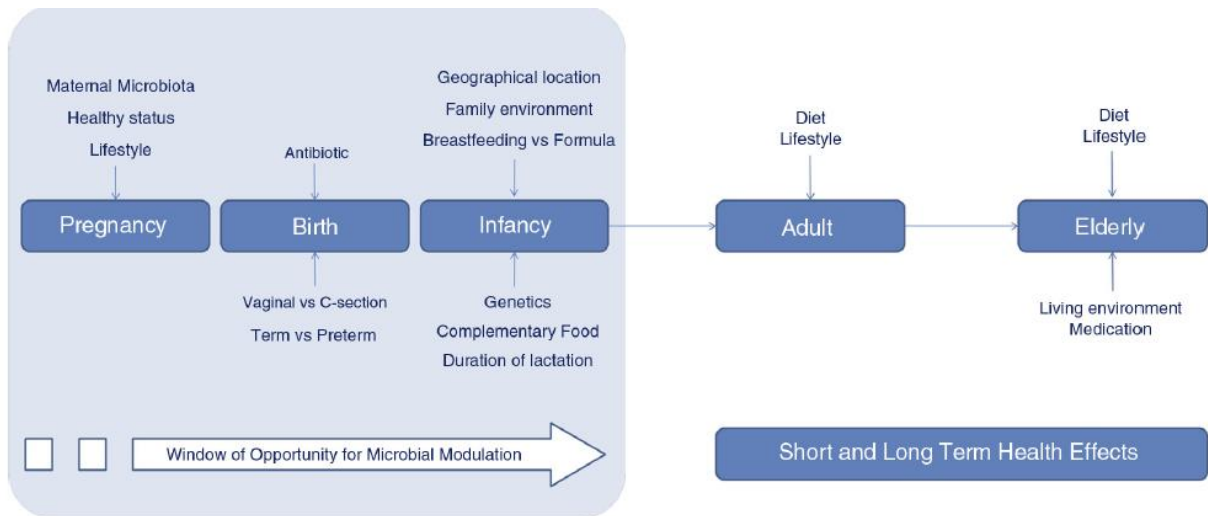


Figura 2: Factores que influyen la microbiota intestinal de infantes, adultos y personas de la tercera edad. La etapa infantil es el periodo donde la MI se puede modular más fácilmente hacia una microbiota que afecte positivamente a la salud y crecimiento de los infantes. Extraído de (13).

Dieta

La dieta es uno de los factores más importantes que determinan la composición y diversidad de la MI, de tal modo que los patrones dietéticos están asociados a diferentes perfiles de composición. En primer lugar, existen diferencias significativas dependiendo de la alimentación de los recién nacidos, leche materna o leche de fórmula. En los infantes alimentados mediante leche materna, se observa un incremento de Bifidobacterias comparado con los alimentados con leche de fórmula. Esto se debe a que la leche materna contiene glicanos indigeribles, llamados oligosacáridos de leche materna (HMO). Los HMO proporcionan nutrientes a las bacterias colónicas y en especial a las Bifidobacterias que tienen un *cluster* de genes específico para los HMO. Sin embargo, en los infantes alimentados con leche materna se ha observado un descenso en la abundancia de microorganismos anaeróbicos, como Bacteroidetes y *Clostridium* (9).

En segundo lugar, la dieta adulta también provoca cambios determinantes en la composición de la microbiota. Por un lado, las dietas tradicionales ricas en frutas, vegetales y fibra, como la dieta mediterránea se asocian a una mayor riqueza y diversidad, teniendo mayor abundancia de microorganismos con capacidad de metabolizar carbohidratos insolubles respecto a la dieta occidental, caracterizada por un consumo elevado de alimentos ricos en grasas, colesterol, proteínas animales, azúcares, sal y una amplia gama de productos procesados. Las dietas tradicionales también están relacionadas con una mayor presencia de Bacteroidetes y un ratio Firmicutes:Bacteroidetes menor respecto a la dieta occidental. Por otro lado, la dieta occidental se asocia a una MI con menos diversidad y riqueza (9,14).

Finalmente, las dietas ricas en carne están asociadas también a una mayor presencia de Bacteroidetes mientras que las dietas ricas en carbohidratos están asociadas a una mayor presencia de *Prevotella*. Las dietas con bajo consumo de fibra y vegetales se asocian a una reducción en la composición y diversidad microbiana mientras que las dietas ricas en fibra y vegetales se asocian a una abundancia mayor de Bifidobacterias (14).

Tabla 1: Resumen de las diferencias en la microbiota debido a las dietas. En primer lugar, se comparan las dietas infantiles (leche materna vs leche de fórmula) y, en segundo lugar, se comparan las dietas adultas (tradicionales, occidental, ricas en carne, en carbohidratos y en fibra y vegetales). En las dietas adultas se usa como referencia de comparación las dietas tradicionales, en concreto la dieta mediterránea. El símbolo ↑ se refiere a un aumento o bien de la riqueza y diversidad o bien de la abundancia de un determinado género o filo bacteriano mientras que el símbolo ↓ se refiere a una disminución de aquello mencionado anteriormente.

Dietas infantiles	Diferencias
Dieta basada en leche materna	↑ Bifidobacterias; ↓ bacteroidetes y clostridium
Dieta basada en leche de formula	↓ Bifidobacterias; ↓ bacteroidetes y clostridium
Dietas adultas	
Dietas tradicionales	↑ riqueza y diversidad; ↑ microorganismos con metabolismo de carbohidratos insolubles; ↑ bacteroidetes; ↓ ratio Firmicutes:Bacteroidetes;
Dieta occidental	↓ riqueza y diversidad
Dietas ricas en carne	↑ presencia Bacteroidetes
Dietas ricas en carbohidratos	↑ presencia Prevotella
Dietas ricas en fibra y vegetales	↑ presencia Bifidobacterias

La dieta también es uno de los principales factores que influyen en la composición fúngica de la MI. Por ejemplo, la frecuencia del género *Candida* se correlaciona positivamente con la ingesta de carbohidratos mientras que el género *Aspergillus* se correlaciona negativamente con la ingesta de ácidos grasos de cadena corta (SCFAs). Los hongos participan en la degradación de alimentos y son proveedores de productos nutricionales intermedios, por lo que influyen en gran medida en las concentraciones de metabolitos (6).

1.2.3. Funciones

La MI tiene una gran variedad de funciones que afectan tanto directa como indirectamente a la salud de los seres humanos. Como ya se ha comentado anteriormente, entre las funciones de la MI se encuentran: mantenimiento de la integridad de la barrera intestinal y de la estructura del tracto GI, protección antimicrobiana, digestión de alimentos, síntesis de vitaminas y modulación del sistema inmune. Todas estas funciones se desarrollan con normalidad cuando la microbiota está sana, sin embargo, cuando se encuentra en situación de disbiosis, todas estas funciones se ven alteradas y perturban la salud individual (9,12). A continuación, se detallan las funciones más importantes de la MI normal relacionadas con el sistema digestivo y el metabolismo.

Integridad de la barrera intestinal y de la estructura del tracto GI

La MI ayuda a mantener la integridad de la barrera intestinal y la estructura del tracto GI bien induciendo la síntesis de pequeñas proteínas necesarias para mantenerlas o bien estimulando los mecanismos propios de las células humanas. Por ejemplo, *Bacteroides thetaiotaomicron* induce la expresión de la proteína pequeña rica en prolina 2A (sprr2a) que es necesaria para el mantenimiento de los desmosomas localizados en el villus epitelial.

De la misma manera, el peptidoglicano presente en la pared celular microbiana estimula, a través de TLR2, el mecanismo para mantener las uniones celulares. Por otra parte, se ha visto que la microbiota intestinal induce el factor de transcripción angiogina-3 implicado en el desarrollo de la microvasculatura intestinal (9).

Metabolismo de fármacos y xenobióticos

La capacidad de la MI de metabolizar xenobióticos y fármacos se conoce desde hace 40 años, pero actualmente han surgido nuevas pruebas que arrojan luz al papel que desempeña. Por ejemplo, el metabolito microbiano p-cresol puede reducir la capacidad del hígado para degradar acetaminofén mediante la inhibición competitiva de las sulfotransferasas hepáticas. Otro ejemplo es la inducción de la deconjugación del fármaco irinotecan, mediante la síntesis de β -glucuronidasa bacteriana, que puede contribuir al desarrollo de efectos adversos como la diarrea o la inflamación (9).

Metabolismo de nutrientes

La gran diversidad de la MI, hace que tenga un repertorio metabólico muy grande que se complementa con la actividad enzimática propia del ser humano. En concreto, aporta enzimas que no están codificadas en el genoma humano, por ejemplo, aquellas necesarias para la síntesis de vitaminas entre otras muchas. Para sobrevivir, la MI depende de los sustratos dietéticos que no han sido digeridos en el tracto digestivo superior, que comprende el estómago y el intestino delgado (15).

Metabolismo de carbohidratos

A partir de la fermentación anaerobia de carbohidratos se producen, por una parte, SCFAs, principalmente butirato, acetato y propionato y por otra gases (9,16).

Respecto a los SCFAs, tienen funciones muy diversas, pero también muy importantes. Una de sus principales funciones es aportar energía al hospedador ya que son fuentes ricas en ella. En la tabla 2 se muestran algunas de las funciones de los SCFAs. (9,15, 17).

Tabla 2: Principales SCFAs (butirato, propionato y acetato) y sus funciones.

SCFAs	Funciones
Butirato	Fuente de energía para colonocitos, induce la apoptosis celular en el cáncer de colon, regula la expresión génica mediante mecanismos epigenéticos, puede activar la gluconeogénesis intestinal (IGN) mediante un mecanismo dependiente de adenosina monofosfato cíclica (cAMP), previene la acumulación de productos metabólicos tóxicos como D-lactato.
Propionato	Fuente de energía para células epiteliales, participa en la gluconeogénesis en el hígado y al transformarse en glucosa, promueve la homeostasis energética disminuyendo la producción de glucosa hepática.
Acetato	Implicado en el metabolismo de colesterol y lipogénesis, cofactor esencial para el crecimiento de otras bacterias.

Respecto a los gases, su producción es inevitable en el proceso de fermentación microbiana en ecosistemas anaerobios. Una parte del gas producido por estos procesos se libera a través de los pulmones o a través de flatulencias. La mayoría de estos gases son inodoros, como hidrogeno, dióxido de carbono, metano y nitrógeno. Sin embargo, los gases responsables del olor de las flatulencias son sulfuro de hidrogeno, indol, escatol, aminas volátiles y amoniaco (17).

Metabolismo de lípidos

La MI también tiene impacto en el metabolismo de lípidos. Por una parte, suprime la inhibición de la actividad de la lipoproteína lipasa en adipocitos. Por otra parte, aumenta la eficiencia de la hidrólisis lipídica, regulando la expresión de una colipasa necesaria en la digestión lipídica (9).

Metabolismo de proteínas

Las proteínas y peptidasas microbianas trabajan juntamente con las humanas para obtener un metabolismo proteico eficiente. El poder proteolítico de las bacterias permite convertir las proteínas ingeridas en la dieta e incluso las endógenas del ser humano en péptidos más cortos aprovechables por las células intestinales, como ácidos grasos de cadena ramificada y SCFAs.

Los transportadores de aminoácidos presentes en la pared celular microbiana permiten el paso de aminoácidos del lumen al interior celular donde los convierten en pequeñas moléculas señalizadores o péptidos antimicrobianos (AMPs). Un ejemplo de ello es la conversión de L-histamina en histamina, o la transformación de glutamato a ácido γ -aminobutírico (GABA) (9,17).

Síntesis de vitaminas

Otra de las funciones que realiza la MI es la síntesis de vitaminas, especialmente las vitaminas del grupo K y del grupo B, entre las que se incluyen biotina, cobalamina, folatos, tiamina y riboflavina, entre otras. Estas vitaminas son imprescindibles en el metabolismo microbiano, pero también tienen importancia metabólica y fisiológica para los seres humanos (17).

Metabolismo de polifenoles

La MI también influye en la digestión de los polifenoles. Los polifenoles son un grupo de sustancias químicas procedentes de plantas y frutas caracterizados por la presencia de más de un grupo fenol. Este grupo ha despertado el interés de la comunidad científica debido a sus actividades y por su elevada ingestión en la dieta, ya que se encuentran en muchos productos que se consumen habitualmente, como cacao, té o vino (9,17).

La mayoría de los polifenoles no se absorben adecuadamente en el intestino y pasan al colon, donde son metabolizados por la MI, entre los que se encuentran ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos, lignanos y taninos. Además, son muy diversos estructuralmente, lo que influye en su biodisponibilidad, metabolismo y actividades. Los polifenoles normalmente se encuentran inactivos en la dieta, pero tras la eliminación de los azúcares por parte de la MI, entre otros factores, pasan a un estado activo. Los productos finales viajan a través de la vena portal a otros tejidos y órganos donde desarrollarán su acción. El nivel de biotransformación de los polifenoles dependerá de la especificidad estructural del propio polifenol y la riqueza de la microbiota individual (9,17).

1.3. Simuladores del tracto digestivo humano

El interés de la comunidad científica por estudiar la composición y las funciones de la MI, especialmente aquellas relacionadas con el metabolismo, ha llevado a diferentes especialistas a desarrollar simuladores del tracto digestivo, tratando de mimetizar las condiciones fisiológicas humanas. Los modelos *in vitro* son una herramienta para estudiar las interacciones entre los microorganismos. No obstante, se debe tener en cuenta los parámetros más influyentes en la MI *in vivo*, como pueden ser la morfología del tracto GI, rangos de pH, secreción de jugos digestivos, tiempos de residencia y la propia composición de la microbiota. Todos estos parámetros difieren en función de la edad, las enfermedades metabólicas y otros factores, por lo que se deben ajustar según la población de estudio (16).

Los avances en tecnología han permitido el desarrollo de diferentes modelos de simuladores, desde aquellos basados en fermentadores independientes con condiciones específicas hasta aquellos que son modelos dinámicos. En primer lugar, el soporte de la microbiota permite diferenciarlos en microsimuladores si utilizan chips, o macrosimuladores si se sirven de biorreactores.

En segundo lugar, se encuentran los simuladores en *Batch* que se basan en incubar la microbiota y los sustratos en un biorreactor durante un tiempo determinado. En tercer lugar, se encuentran los sistemas en continuo, donde el cultivo es alimentado de forma regular. En estos últimos sistemas, es frecuente encontrar más de un biorreactor que se conectan para simular las diferentes partes del tracto GI (16, 18) (figura 3).

Generalmente, los simuladores disponibles en la actualidad constan de un mínimo de 5 biorreactores en los que se simulan el estómago, el intestino delgado y tres regiones del colon (colon ascendente, colon transversal y colon descendente), aunque hay variaciones en las que solo se simula el tracto digestivo alto (estómago e intestino delgado) (18).

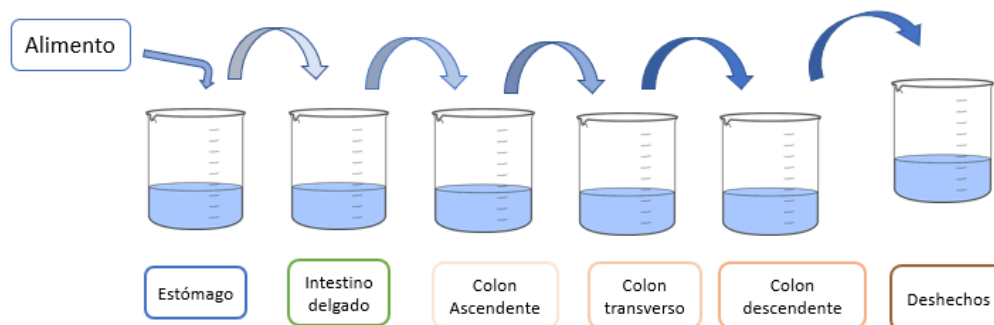


Figura 3: Esquema general de un simulador. Consta de 6 biorreactores en los que se simulan las diferentes partes del tracto GI. La microbiota se encuentra en los biorreactores correspondientes al colon.

Además, se ha de tener en cuenta las interacciones entre las partes como el vaciado gástrico, el paso del alimento, los productos de la digestión y del metabolismo microbiano, la absorción de agua, etc. En todos los simuladores se estudian los parámetros fisicoquímicos, enzimáticos y microbianos en el tracto gastrointestinal dentro de un entorno controlado *in vitro*. Con estos simuladores, se permite estudiar la composición y funciones de la microbiota tanto en individuos sanos como en individuos con problemas metabólicos o enfermedades intestinales, pero también se puede evaluar la digestión de alimentos funcionales y medicamentos. (16, 19).

A continuación, se detallan algunos de los simuladores actualmente disponibles, poniendo especial atención al sistema usado en este trabajo, ARIS (*Automatic and Robotic Intestinal Simulator*).

1.3.1. SHIME (*Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem*)

En 1993, la Universidad de Gante desarrolló el simulador SHIME, que consta de 5 biorreactores, interconectados a través de bombas peristálticas, que simulan secuencialmente el estómago, intestino delgado y las tres regiones del intestino grueso, es decir, el colon ascendente (CA), colon transversal (CT) y colon descendente (CD), tal como se muestra en la figura 4.

En este simulador se controlan las condiciones de pH, temperatura (37 °C) y tiempos de residencia. Además, se puede evaluar el destino metabólico de alimentos, compuestos microbianos y farmacéuticos, componentes bioactivos de plantas, probióticos, prebióticos y compuestos bioterapéuticos para apoyar la microbiota.

Por otra parte, para estudiar los microorganismos presentes en el moco asociado a la pared intestinal, se ha integrado un compartimento de la mucosa en los biorreactores que simulan las regiones del colon, permitiendo la adhesión de dichos microorganismos. Este nuevo simulador recibe el nombre de m-SHIME. (19,20,21).

Actualmente, el simulador SHIME pertenece a la empresa ProDigest, derivada del laboratorio de Ecología y Tecnología Microbiana (LabMet) de la Universidad de Gante (Bélgica) (20).



Figura 4: Simulador SHIME. Extraído de (20).

1.3.2. Simgi (Simulador Gastrointestinal Dinámico)

El Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL), ubicado en Madrid (España), desarrolló otro simulador del tracto gastrointestinal humano, llamado Simgi. Al igual que SHIME, consta de 5 biorreactores (estómago, intestino delgado, y colon) dirigidos por un autómata, como se puede observar en la figura 5. Además del funcionamiento en continuo, el sistema permite trabajar con cada biorreactor de manera individual. El estómago se compone de dos unidades con paredes flexibles y rodeadas por una camisa de metacrilato donde se bombea agua que permite mantener una temperatura constante, mientras que el mezclado del contenido estomacal se da por movimientos peristálticos. El intestino delgado es un biorreactor en condiciones anaerobias y de pH controladas que permite la mezcla del contenido gástrico con las secreciones intestinales mediante agitación mecánica regulable, mientras que el colon se compone de tres reactores (CA, CT y CD) que operan en condiciones de anaerobiosis, con agitación mecánica y pH controlado, y es donde se encuentra la MI de origen humano (19,22).

Este simulador permite el desarrollo de probióticos y prebióticos, estudios comparativos de enfermedades inmunológicas y metabólicas, estudios preclínicos de microbioma intestinal, el monitoreo del efecto de los alimentos y sus componentes sobre la microbiota y la actividad metabólica, así como el seguimiento de las modificaciones que sufren los alimentos en el proceso de digestión (23).



Figura 5: Simulador Simgi. Extraído de (24).

1.3.3. ARIS (Automatic and Robotic Intestinal System)

Los investigadores del Laboratorio de digestión *ex vivo*, perteneciente al Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ) ubicado en Guadalajara (México), desarrollaron otro simulador digestivo, llamado ARIS.

Este, a diferencia de los dos anteriores, es un modelo *ex vivo*, ya que usa microbiota humana nativa acondicionada y se reproducen las condiciones fisiológicas de los sujetos de estudio. Al igual que los dos simuladores anteriores, ARIS consta de 5 biorreactores que secuencialmente simulan el estómago, intestino delgado y colon, tal como se muestra en la figura 6. El control de los parámetros ambientales permite obtener comunidades microbianas complejas y estables muy similares en estructura y función a la comunidad microbiana del colon humano (16,25).

El sistema permite evaluar la digestión de alimentos sólidos, líquidos, ingredientes aislados, suplementos alimentarios, aditivos, fármacos y/o excipientes, ya sea en una sola dosis o en dosis repetidas. El proceso de digestión en ARIS simula la digestión de manera real, es decir, respetando los volúmenes y tiempos de deglución. De esta manera, los resultados obtenidos pueden ser extrapolables a condiciones fisiológicas reales. La administración del alimento a analizar se lleva a cabo mediante pulsos de administración que corresponden al número de degluciones realizadas fisiológicamente por los humanos (16,18,19). Además, en ARIS se puede inocular una microbiota madre que varía en función a las condiciones del grupo de estudio, considerando edad, sexo y condiciones sanas o patológicas. Así mismo, los parámetros de pH, tiempo de residencia en cada biorreactor, condiciones enzimáticas, peristalsis intestinal y temperatura dependerán de la población de estudio (16,18).

El rasgo que hace único a ARIS es la capacidad de adaptarse a las características de la población de estudio, de esta manera los resultados obtenidos pueden aplicarse directamente a humanos con un elevado grado de compatibilidad (18,25).



Figura 6: Simulador ARIS. Extraído de (26).

A partir de ARIS, se desarrolló una versión de tamaño reducido, MiniARIS, que facilita el transporte y la operación. De la misma manera, al trabajar con volúmenes más pequeños (75% menos que ARIS) se reduce el coste de operación, pero se mantienen las ventajas del original.

Además, gracias a su pequeño tamaño es posible su integración en centros de investigación, empresas alimentarias y laboratorios de diagnóstico clínico. En este último caso se puede monitorear la digestión de alimentos particulares, la interacción de la microbiota con medicamentos u otras sustancias de interés, de manera personalizada. (16,18,25). Debido a su pequeño tamaño, fácil transporte y disponibilidad, el simulador usado en este trabajo es MiniARIS (figura 7).



Figura 7: Simulador MiniARIS localizado en la *Fundació per al Foment de la Investigació Sanitària i Biomèdica de la Comunitat Valenciana* (FISABIO).

2. Objetivo

El objetivo de este trabajo es establecer con suficiente grado de fiabilidad la emulación en el digestor de una microbiota natural, en este caso la de la población valenciana.

3. Materiales y métodos

3.1. Tamaño muestral y recogida de muestras para la estabilización

Se obtuvieron muestras fecales de población general que cumplieran los siguientes criterios de inclusión:

- Rango de edad comprendido entre 18-60 años
- Clínicamente sano
- Dieta omnívora
- No haber consumido antibióticos durante los dos meses previos a la recogida de la muestra.
- Residente en València durante al menos 1 año
- Haber permanecido en València durante las dos semanas previas a la recogida de las muestras.

El número de muestras representativas de la población valenciana se obtuvo mediante la prueba estadística ANOVA (18, 27), utilizando los datos de las unidades de abundancia relativa del filo Firmicutes (UAR) de población general (14). Se estimó un tamaño muestral de 12. A continuación, se muestra la fórmula utilizada, así como los parámetros utilizados.

$$n = 2 \left(\frac{\sigma \frac{Z_{1-\alpha} + Z_{1-\beta}}{2r}}{\mu_A} \right)^2$$

Dónde,

$Z_{1-\alpha} = 1,96$, considerando un nivel de significancia de 0,05

$Z_{1-\beta} = 0,842$, con una potencia del 80%.

$\mu_A = 0,77$, UAR Firmicutes población general valenciana

Para la recogida de muestras, se le dio a cada voluntario dos tubos con medio estabilizador preparado a partir de la solución presentada por Molly et al., (18). De los dos tubos, uno se encontraba en condiciones de aerobiosis, mientras que el otro en condiciones de anaerobiosis, este hecho permite recuperar los microorganismos aerobios y anaerobios. Durante el traslado se conservaron en nevera y se procesaron lo más rápido posible, y siempre en menos de 8 horas desde su entrega, para recuperar el mayor número posible de microorganismos.

El procesado de las muestras se hizo siguiendo el protocolo detallado en el anexo 1. Asimismo, a los donantes se les realizó una encuesta sobre sus hábitos alimentarios (anexo 2), que sirvió como base para el diseño del alimento que se le suministraría a MiniARIS.

3.2. Proceso de estabilización

El objetivo de la estabilización es mantener y aumentar la población de microorganismos para que estos permanezcan en el biorreactor durante un tiempo indefinido siendo funcionales. Para que este proceso se lleve a cabo, se necesita medio estabilizador donde se inoculan los microorganismos recuperados de las muestras fecales.

Posteriormente, se adiciona multivitamínico filtrado para favorecer su crecimiento. Este proceso se lleva a cabo tres veces, una por cada biorreactor del colon y de manera consecutiva y secuencial, es decir, primero se estabiliza en colón ascendente y a partir de este, los otros dos (16). Para comprobar el estado de los microorganismos y asegurar que el proceso se desarrolla correctamente se hacen cultivos de los grupos lactobacilos, bifidobacterias, clostridiales y salmoneloides durante todo el proceso. Finalmente, la composición de la microbiota estabilizada debe coincidir con la composición de referencia, generada a partir de la microbiota nativa, sin que necesariamente tenga que llegar a ser idéntica.

3.3. Verificación del funcionamiento de MiniARIS

Una vez la microbiota nativa está estabilizada en los tres biorreactores (colon ascendente, transversal y descendente), empieza el proceso de montaje de MiniARIS. Este proceso consiste en colocar los biorreactores en sus respectivas posiciones y conectarlos entre sí mediante gomas para bombas peristálticas (Freudenberg Medical), con el objetivo de que los trasvases entre los biorreactores se hagan automáticamente. También se deben conectar las gomas de toma de muestras y alimentación, esta última solo en el estómago, así como conectarlas con sus respectivas jeringas. Una vez el montaje está terminado, MiniARIS se conecta a la corriente eléctrica y es en este momento cuando las placas calefactoras empiezan a aumentar su temperatura hasta llegar a los 37 °C. Posteriormente, se calibran los sensores de pH (5 sensores, uno por cada biorreactor excepto deshechos) siguiendo las instrucciones que aparecen en las pantallas LED. Cuando los sensores de pH están calibrados, el motor que controla la agitación se enciende y MiniARIS está a punto para empezar un proceso de digestión.

En todos los procesos de digestión se controlan los siguientes parámetros: pH, temperatura (37 °C) y tiempos de residencia de los biorreactores, determinados por las condiciones fisiológicas humanas, la composición del alimento, las condiciones enzimáticas y la peristalsis intestinal (16,18). El tiempo total de la digestión simulada, correspondiente a adultos sanos, es de 72h.

3.3.1. Composición del alimento

Como ya se ha mencionado anteriormente, la composición del alimento que se le suministra a MiniARIS está basada en las respuestas de los participantes sobre sus hábitos alimentarios. En concreto, se administra una dieta de 1350 kcal/día que consiste en 179 g de carbohidratos, 57 g de proteína, 35 g de lípidos y 2.5 g/día de sal. La consistencia del alimento es espesa como un puré, ya que el proceso de digestión mecánica, llevado a cabo por los dientes, no se da en el simulador. Cada grupo nutricional está representado con los alimentos que más se consumen en España, detallados en la tabla 3.

Tabla 3: Alimentos representativos de cada grupo nutricional que sirven como materia prima en la preparación del alimento.

Grupos nutricionales	Alimentos
Carbohidratos	Arroz, trigo, patata
Lípidos	Aceite de oliva
Proteínas	Extracto de carne (incluye carne y pescado)
Lácteos	Caseína

3.3.2. Condiciones de los biorreactores

Cada biorreactor opera en unas condiciones diferentes, ya que cada uno de ellos simula un segmento del sistema digestivo. Las condiciones de operación son equivalentes a las condiciones del cuerpo humano para el segmento simulado. En la tabla 4 se detallan las condiciones de trabajo (16,18).

Tabla 4: Detalle de las condiciones en las que se encuentran los biorreactores. Se especifica el segmento del aparato digestivo que simulan, el tiempo de residencia del bolo alimenticio en cada sección, así como el pH de cada uno de ellos. Estas condiciones se corresponden con las condiciones de un adulto sano.

Biorreactores	Segmento simulado	Tiempo de residencia (h)	pH
1	Estomago	2	2-2.5
2	Intestino delgado	4	5-5.5
3	Colon ascendente	16	5.5.-6
4	Colon transverso	32	6-6.5
5	Colon descendente	18	6.5-7
6	Deshechos	-	-

3.3.3. pH

El ajuste del pH se hace de forma manual ya que MiniARIS es un sistema semiautomático. Para ajustarlo, se usa como ácido, el ácido clorhídrico (*HCl*) con una concentración de 5M, mientras que como base se usa el hidróxido de sodio (*NaOH*) con una concentración de 2M.

Para llevar a cabo el proceso de digestión, se debe suministrar a MiniARIS aproximadamente 50 mL de alimento mezclado con amilasa (saliva artificial) y pepsina, enzima que se encuentra en el estómago con importantes efectos en la digestión. Además, se usan jeringas de 20 mL para administrar el alimento ya que es el volumen estándar de deglución en un adulto sano, permitiendo simular el proceso de masticación y deglución.

A las 2 horas desde el inicio de la digestión, el quimo pasa del estómago al intestino delgado gracias a la acción de las bombas peristálticas mediante el proceso de vaciado por espasmos. Una vez el contenido del estómago es transvasado completamente, se añade una mezcla de enzimas digestivas (lipasa, pancreatina y bilis) que son importantes en las siguientes etapas de la digestión (16). El quimo se digiere en el intestino delgado durante 4 horas que empiezan a contar desde el momento en el que cae la primera gota procedente del estómago. A partir de este momento el quimo se digiere en cada biorreactor el tiempo determinado, hasta llegar a la digestión completa. Todo el proceso de trasvase entre los biorreactores y el tiempo de residencia está automatizado y controlado mediante microcontroladores Arduino.

3.4. Microbiología

Conocer el estado de los microorganismos en cada biorreactor es esencial para que el simulador funcione correctamente y para ello se hacen cultivos de forma regular. Se cultivan tanto microorganismos aerobios como anaerobios. Dentro del primer grupo se encuentran lactobacilos y salmoneloides mientras que en el segundo grupo se encuentran bifidobacterias y clostridiales.

3.4.1. Cultivo de microorganismos aerobios: Lactobacilos y salmoneloides

Respecto al cultivo de lactobacilos, el medio selectivo utilizado fue *De Man, Rogosa, and Sharpe* (MRS) (Scharlau), diseñado para favorecer el cultivo mediante la supresión del crecimiento de los microorganismos competidores a partir del metabolismo del ácido láctico (28). Por otro lado, para el cultivo de salmoneloides se utilizó el medio diferencial *Lysine Iron Agar* (LIA) (Sigma-Aldarich) que permite diferenciar aquellos microorganismos capaces de sintetizar la enzima lisina decarboxilasa y de producir ácido sulfhídrico, H_2S (29). Además, este medio cambia de color para indicar el crecimiento de *Salmonella typhimurium*, patógeno para el ser humano.

Ambos medios fueron preparados según las instrucciones del fabricante y los cultivos se incubaron durante 24h a 37 °C. En lo referente al método de cultivo, el usado fue la siembra por microgota (10 µl) a partir de diluciones seriadas (-1/-7) sembradas por duplicado, mientras que el método de conteo fue el conteo en caja de Petri.

3.4.2. Cultivo de microorganismos anaerobios: bifidobacterias y clostridiales

Respecto al cultivo de estos microorganismos, es imprescindible mantener las condiciones anaerobias. Para ello, se usa un gasificante que al entrar en contacto con el agua produce dióxido de carbono (CO_2) y este desplaza al oxígeno (O_2), obteniendo un ambiente que permite a estos microorganismos crecer. En lo referente al cultivo de bifidobacterias se usó el medio selectivo *Bifidus Selective Medium* (BSM) (Sigma-Aldarich) que impide el crecimiento de cepas de *Lactobacillus* y *Streptococcus* (30). Por otro lado, para el cultivo de clostridiales se utilizó el medio selectivo y diferencial *Tryptose Sulfite Cycloserine* (TSC) (Scharlau), que inhibe el crecimiento de la mayoría de las especies no deseadas gracias a la molécula D-cicloserina, e incluye un sistema indicador basado en el sulfito y el hierro férrico que las especies clostridiales son capaces de reducir. Además, en este medio las colonias de *Clostridium perfringens* son de color negro, lo que permite identificarlas, ya que esta bacteria puede ser patógena para los seres humanos (31).

Ambos medios fueron preparados según las instrucciones del fabricante y los cultivos se incubaron durante 48h a 37 °C en contenedores de anaerobiosis, usando el método anteriormente descrito para obtener estas condiciones. Respecto al cultivo se utilizó el método de cuenta viable (100 µl) a partir de diluciones seriadas (-1/-7) sembradas por duplicado mientras que el método de conteo fue el conteo en caja de Petri.

3.5. Identificación molecular

3.5.1. Extracción ADN

La extracción del ADN microbiano y fúngico a partir de muestras de heces (100-200 mg) se realizó de forma automática mediante el robot MagNA Pure LC 2.0 (Roche) y con el kit de extracción MPLC DNA Isol. Kit III (Bacteria, Fungi) (Roche), siguiendo las instrucciones del fabricante. La extracción se lleva a cabo mediante el uso de la tecnología de *beads* magnéticas.

3.5.2. Preparación librerías

Librería 16S ADNr

En el caso de las bacterias, las secuencias utilizadas para la identificación taxonómica corresponden a las regiones variables V3 y V4 del gen 16S ADNr. Estas regiones se amplificaron según el protocolo *16S Metagenomic Sequencing Library Preparation* de Illumina (Cod. 15044223 Rev. B). Para iniciar el protocolo, se usa ADN genómico microbiano a una concentración de 5 ng/μl en Tris 10 mM y pH 8,5. Con el objetivo de obtener esta concentración, se cuantificaron las muestras mediante fluorimetría usando el fluorómetro Qubit (ThermoFisher Scientific) y posteriormente se diluyeron para obtener la concentración mencionada anteriormente. En un primer paso, el ADN se amplifica usando cebadores específicos para este gen que están unidos a un adaptador (32). Este adaptador permite el paso de multiplexación al añadir índices que diferenciarán las muestras utilizando el kit de índices Nextera XT (FC-131-1096). Los pasos generales del proceso de preparación de las librerías se muestran en la figura 8 mientras que en la tabla 5 se muestran las secuencias completas de los cebadores, según la nomenclatura de la IUPAC estándar.

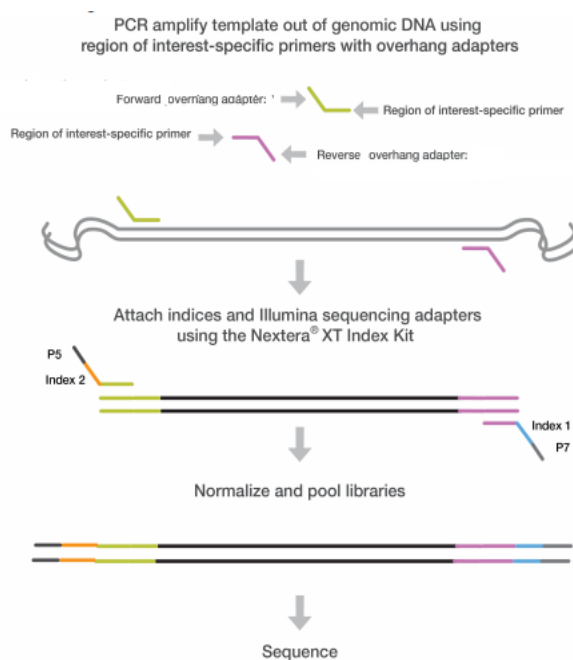


Figura 8: Flujo de trabajo para preparar las librerías. Extraído de *16S Metagenomic Sequencing Library Preparation* (Cod. 15044223 Rev. B).

Tabla 5: Secuencias de los cebadores usados en la preparación de la librería (16S). El primer par de cebadores van dirigidos a las secuencias V3 y V4 del gen bacteriano 16S ADN mientras que los segundos cebadores permiten el paso de multiplexación.

Cebador	Secuencia
Amplicón 16S	
Forward (F)	5'- CCTACGGGNGGCWGCAG
Reverse (R)	5'- GACTACHVGGGTATCTAATCC
Adaptador	
Forward (F)	5'- TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG
Reverse (R)	5'- GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG

Antes de secuenciar es necesario un paso de cuantificación, realizado como se ha explicado anteriormente. Una vez la librería está cuantificada se procede a la secuenciación utilizando un *run 2x300pb paired-end* (kit de reactivo MiSeq v3 (MS-102-3001)) en un secuenciador *MiSeq* de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Illumina).

Librería ITS

En el caso de los hongos, las secuencias que se utilizan en la asignación taxonómica corresponden a las regiones ITS (*internal transcribed spacers*) del gen 18S ADNr. Respecto a la librería de ITS, se siguió el protocolo descrito anteriormente, pero con algunas modificaciones. En primer lugar, dado que las regiones diana son diferentes entre las bacterias y los hongos, se usaron distintos cebadores. En segundo lugar, se necesitó un paso de pre-PCR para aumentar la cantidad de ADN ya que la inicial no llegaba a la concentración mínima requerida por el fabricante (Illumina).

Ambas librerías fueron preparadas por la misma persona y secuenciadas en el mismo *run* para evitar los posibles errores de procesamiento y técnicos. A continuación, se muestran los cebadores dirigidos a las regiones de estudio de los hongos (tabla 6).

Tabla 6: Secuencias de los cebadores usados en la preparación de la librería (ITS). El primer par de cebadores van dirigidos a las regiones ITS del gen fúngico 18S ADNr mientras que el segundo par permiten el paso de multiplexación.

Cebador	Secuencia
Región ITS	
Forward (F)	5'- TAGAGGAAGTAAAAGTCGTAA
Reverse (R)	5'- TTYRCTRCGTTCTTCATC
Adaptador	
Forward (F)	5'- TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG
Reverse (R)	5'- GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGCTRYGTTCTTCATCGDT

3.5.3. Evaluación de calidad

La evaluación de la calidad se realizó mediante el uso del programa *prinseq-lite* (33) aplicando los siguientes parámetros (tabla 7):

Tabla 7: Valores de los parámetros usados en el paso de evaluación de calidad.

Parámetros	Valor
longitud_min	50
trim_qual_right	30
trim_qual_type	Mean
trim_qual_window	20

3.5.4. Eliminación de quimeras, eliminación de ruido de fondo y unión de secuencias

La eliminación de quimeras, ruido de fondo y la unión de secuencias se llevaron a cabo usando el *pipeline* DADA2 (34).

3.6. Análisis bioinformático

Los datos se obtuvieron utilizando un canal *ad-hoc* escrito en *RStatistics* (33), utilizando varias bibliotecas de código abierto. Los datos se agruparon y estratificaron de acuerdo con el archivo de metadatos. Todos los cálculos y análisis estadísticos se han realizado dentro de este entorno, utilizando los paquetes de datos correspondientes. Los datos se analizaron mediante el *pipeline qiime 1.9.2* (36).

3.6.1. Anotación taxonómica

Las afiliaciones taxonómicas se han realizado usando el clasificador *Naive Bayesian* integrado en el *software qiime 1.9.2* (36). Las bacterias se han asignado utilizando la base de datos Silva mientras que para los hongos la base de datos utilizada fue UNITE (37).

3.6.2. Estudio de la diversidad

Se estudió la diversidad α y β de las muestras. La diversidad α representa la riqueza y abundancia de especies presentes en una muestra mientras que la diversidad β determina el grado de diversidad de dos grupos de muestras. Para analizar la diversidad α se calcularon, por una parte, el estimador CHAO1 y por otra, el índice de Shannon. El primero de ellos hace referencia a cuantas especies hay realmente en la muestra teniendo en cuenta que la población presente en la muestra es finita. El índice de Shannon contempla la riqueza y abundancia de especies en una muestra. Además, se compararon las medias de ambos grupos y se representaron gráficamente. Respecto a la diversidad β se representó en un PCoA, realizado a partir de las asignaciones taxonómicas.

3.6.3. Pruebas estadísticas

Para comprobar si las diferencias entre ambos grupos en cuanto a diversidad, riqueza y abundancia eran significativas, se realizó la prueba no paramétrica de Wilcoxon ya que los datos siguen una distribución no normal.

4. Resultados

4.1. Microbiología

En este apartado se presentan los perfiles de microbiota obtenidos, así como los datos en los que se han basado. Se han evaluado 4 grupos diferentes entre los que se encuentran lactobacilos, salmoneloides, bifidobacterias y clostridiales. Además, se ha utilizado la prueba estadística de Wilcoxon para comparar los promedios de los 4 grupos de microorganismos tanto en ARIS como en los donantes.

El objetivo final es que el perfil de la microbiota de ARIS sea similar en las proporciones de los grupos al perfil original de esta manera, ambas microbiotas serían equivalentes y por tanto el proceso de digestión del simulador será extrapolable a la población valenciana. Estos resultados deberán ser validados también por secuenciación para una completa equivalencia.

4.1.1. Donantes

Durante la recogida de las muestras, se hizo un cultivo de los 4 géneros principales mencionados anteriormente, para saber el estado de la MI y realizar un perfil de dicha microbiota para poder compararlo con el perfil del simulador. A continuación, se muestra el recuento medio de cada grupo de microorganismos y su error estándar (tabla 8), así como el perfil de la microbiota (figura 10), obtenido a partir de los datos del recuento.

Tabla 8: Promedio del recuento de cada grupo microbiológico y su error estándar.

Grupo	Lactobacilos	Salmoneloides	Bifidobacterias	Clostridiales
Promedio donantes	2,34E+07	5,10E+06	3,06E+07	2,51E+08
Error estándar	2,18E+07	3,53E+06	9,87E+06	1,99E+08

Los datos presentados anteriormente se representaron en un gráfico de barras para conformar un perfil de la microbiota original. Este perfil servirá como referencia para las futuras comparaciones del perfil de la microbiota de ARIS que se llevarán a cabo mediante el uso de la prueba de Wilcoxon. En este caso, es más interesante comparar las proporciones entre los grupos más que el número de Unidades Formadoras de Colonias por gramo (UFC/g) debido a que el número de UFC/g es distinto en cada ser humano. Sin embargo, la proporción entre los grupos es constante para aquellos que comparten un perfil de microbiota similar, influenciado entre otros factores, por la dieta, la edad y la zona geográfica de residencia.

En la figura 9, se observa que los dos grupos más representados son lactobacilos y bifidobacterias mientras que los grupos clostridiales y salmoneloides son los menos representados. El grupo de lactobacilos y bifidobacterias pertenecen al filo de Firmicutes y Actinobacterias, respectivamente y junto al filo de Bacteroidetes y Proteobacterias, son los más representados en la MI humana.

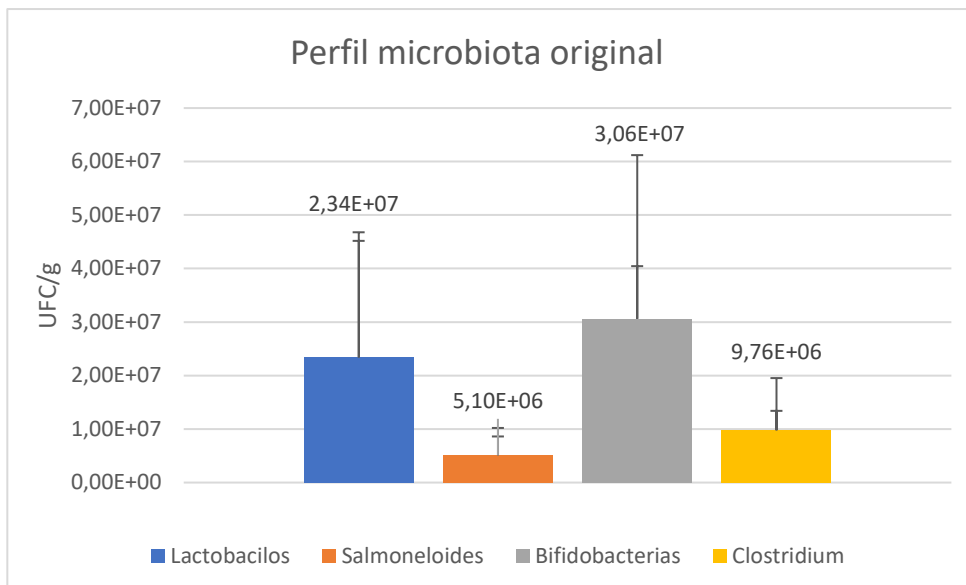


Figura 9: Representación gráfica del perfil de la microbiota de los donantes.

4.1.2. ARIS

En este caso los cultivos se hacían de forma regular, por lo que se presentan los resultados del recuento de los cultivos en tres tiempos diferentes (primer, segundo y tercer recuento), donde cada uno de ellos se corresponde con un tiempo cronológico diferente.

Primer recuento

A continuación, se reflejan los resultados del primer conteo después de la puesta en marcha inicial, así como su representación gráfica (tabla 9 y figura 10). En este caso solo se pudieron evaluar los microorganismos aerobios ya que aún no se disponía del material necesario para cultivar los microorganismos anaerobios.

No obstante, se observó el crecimiento de *S. tiphymurium* en el cultivo del colon transverso en diluciones muy altas (dilución -1). Esto indicaba que la presencia de *S. tiphymurium* en el biorreactor era baja.

Tabla 9: Primer recuento de microorganismos del cultivo de las tres secciones de ARIS. El cultivo se hizo días después de la puesta en marcha inicial.

Primer recuento		
Sección	Lactobacilos	Salmoneloides
CA	8,00E+07	7,00E+09
CT	4,00E+08	8,00E+09
CD	1,00E+10	7,00E+10
Promedio	3,49E+09	2,83E+10
Error estándar	5,64E+09	3,61E+10

En la figura 10, se indica que el grupo de los salmoneloides es el más representado en este cultivo mientras que el grupo de lactobacilos es el menos representado. Al comparar este perfil con el perfil de microbiota original (figura 9), se observa que la proporción entre ambos grupos esta invertida. En la microbiota original se puede ver que el grupo más representado es el grupo de lactobacilos mientras que en ARIS pasa a ser el menos representado.

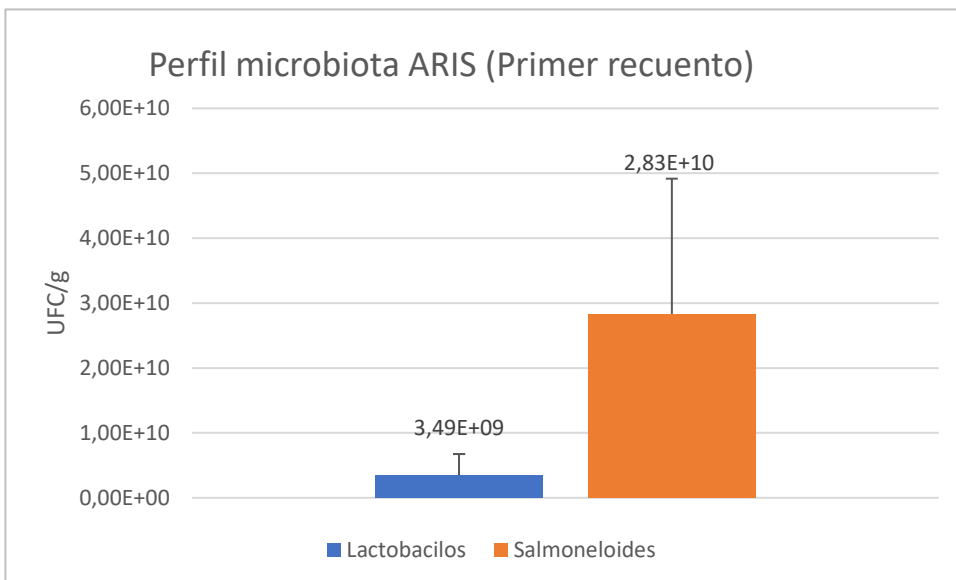


Figura 10: Representación gráfica de los datos del primer recuento.

Segundo recuento

En la tabla 10 se presentan los resultados del conteo al poco tiempo de poner en marcha a ARIS después de estar un mes apagado. En este caso, si se pudieron cultivar todos los géneros. Sin embargo, el recuento de salmoneloides no se pudo llevar a cabo ya que todas las placas estaban contaminadas con *S. tiphymurium* lo que imposibilitaba el conteo (ver anexo 3, figura 23). Respecto al grupo bifidobacteria, se pudieron contar con normalidad, aunque se observó un recuento bajo. Finalmente, respecto a clostridiales, en el medio TSC aparecieron colonias rojas que se cree que pertenecen a hongos (ver anexo 3, figura 24) tanto en el colon transverso como en el descendente mientras que en colon ascendente creció una colonia de color blanco que también se cree que pertenece a hongos (ver anexo 3, figura 25). En el colon descendente la contaminación no permitió el recuento.

Tabla 10: Segundo recuento de microorganismos del cultivo de las tres secciones de ARIS. CONT indica que no se pudo hacer el recuento debido a que las placas se contaminaron. ND indica que los datos no están

Segundo recuento				
Sección	Lactobacilos	Salmoneloides	Bifidobacterias	Clostridiales
CA	2,90E+06	CONT	1,50E+08	2,70E+08
CT	9,00E+06	CONT	2,60E+08	1,70E+09
CD	4,20E+06	CONT	7,00E+07	CONT
Promedio	5,37E+06	ND	1,60E+08	9,85E+08
Error estándar	1,86E+06	ND	5,51E+07	5,84E+08

En la figura 11, se observa que el grupo con mayor crecimiento es el grupo de los clostridiales superando a lactobacilos y bifidobacterias, contrario a lo que se observa en el perfil de microbiota original (figura 9). El crecimiento del grupo lactobacilos es inferior al que se observa en la figura 10, indicando que hay pocos lactobacilos y que habría que buscar la forma de aumentarlos, como se haría en un humano. Finalmente, se decidió suplementar la dieta de ARIS con un probiótico comercial. Respecto al grupo de bifidobacterias su crecimiento es bajo, pero no existen datos anteriores de ARIS con los que se pueda comparar. Sin embargo, si se compara con el perfil de microbiota original se observa que el crecimiento es aproximadamente igual pero la proporción entre los grupos es diferente.

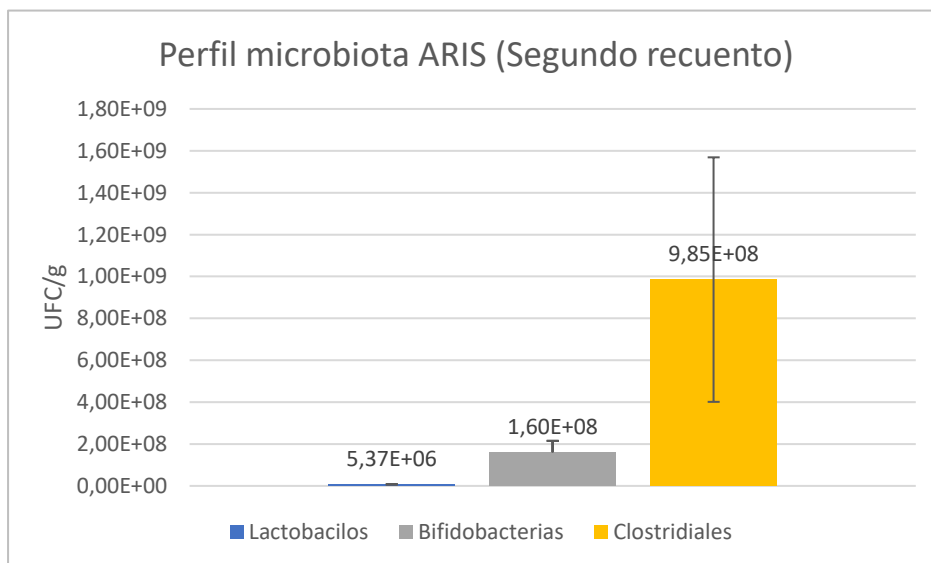


Figura 11: Representación gráfica de los datos del segundo recuento. Se representan todos los grupos a excepción de Salmoneloides ya que el cultivo se contaminó.

Tercer recuento

Como ya se ha mencionado anteriormente, debido al bajo recuento de los géneros *Lactobacillum* y *Bifidobacterium*, se decidió suplementar la alimentación de ARIS con un probiótico comercial. Este probiótico contiene dos especies de bifidobacterias, *Bifidobacterium longum* y *Bifidobacterium animalis spp.lactis*, 3 especies de lactobacilos, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus acidophilus* y una especie de lactococos, *Lactococcus lactis ssp.lactis*.

En la tabla 11 se presentan los resultados del recuento de microorganismos después de la suplementación con el probiótico comercial. Debido al gran crecimiento en todas las diluciones cultivadas, el grupo de las bifidobacterias no se pudo contar.

Tabla 11: Tercer recuento de microorganismos del cultivo de las tres secciones de ARIS. El cultivo se hizo después de la suplementación probiótica. ND indica que los datos no están disponibles.

Tercer recuento				
Sección	Lactobacilos	Salmoneloides	Bifidobacterias	Clostridiales
CA	1,60E+09	4,00E+09	ND	2,16E+09
CT	1,40E+09	1,70E+09	ND	2,76E+09
CD	1,40E+10	1,10E+10	ND	1,30E+09
Promedio	5,67E+09	5,57E+09	ND	2,07E+09
Error estándar	4,17E+09	2,80E+09	ND	4,24E+08

A partir de las observaciones durante el recuento, el grupo con mayor representación es el de las bifidobacterias, ya que no se pudieron contar debido a su gran crecimiento. En la figura 12 se observa que los grupos de lactobacilos y salmoneloides tienen un crecimiento similar mientras que el grupo de clostridiales es el menos representado. Estos resultados no son similares a los del perfil de microbiota original ya que en este último el grupo de lactobacilos estaba más representado que el de salmoneloides, cosa que no ocurre en el perfil del tercer recuento.

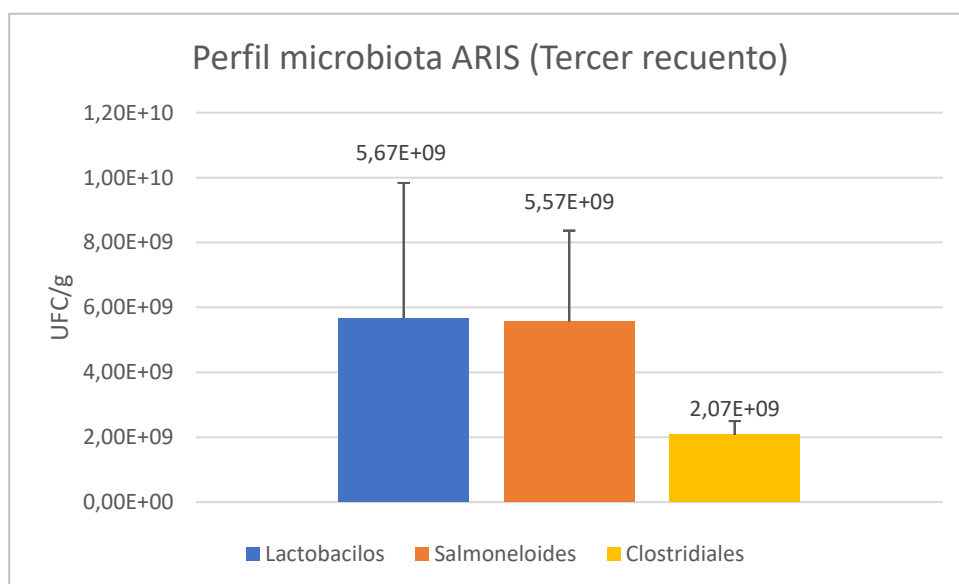


Figura 12: Representación gráfica de los datos del tercer recuento. Se representan todos los grupos excepto Bifidobacterias ya que no se pudieron obtener datos debido al gran crecimiento de dicho grupo.

4.1.3. Comparaciones entre los perfiles de microbiota

Como ya se ha mencionado anteriormente, la comparación entre los perfiles de microbiota pertenecientes a donantes y ARIS se realizó mediante la prueba no paramétrica de Wilcoxon. En esta prueba se comparan las medianas de ambos grupos para comprobar si las diferencias entre ellas son significativas, sin asumir que la distribución de los datos sea normal.

En la tabla 12, se muestran los resultados de dicha prueba y se puede observar que el p-valor para la mayoría de las comparaciones es inferior al límite de significancia, 0,05. Estos valores indican que las diferencias entre donantes y ARIS son significativas, apoyando las observaciones derivadas del análisis visual de los perfiles. Sin embargo, la comparación del grupo lactobacilos entre donantes y ARIS (segundo recuento) no da un p-valor significativo. Esto indica que las diferencias en este grupo de microorganismos no son significativas estadísticamente.

Tabla 12: Resultados de la prueba estadística no paramétrica de Wilcoxon. Se comparan las medias de cada grupo de microorganismos (lactobacilos, salmoneloides, bifidobacterias y clostridiales) para las muestras de donantes y las muestras de MiniARIS, en tres tiempos diferentes (primer, segundo y tercer recuento). Los valores en negrita indican que están por debajo de 0,05, valor de significancia.

Comparación	Grupo	p-valor
Donantes/ARIS (Primer recuento)	Lactobacilos	0,010
	Salmoneloides	0,008
Donantes/ARIS (Segundo recuento)	Lactobacilos	0,100
	Bifidobacterias	0,019
	Clostridiales	0,029
Donantes/ARIS (Tercer recuento)	Lactobacilos	0,008
	Salmoneloides	0,008
	Clostridiales	0,008

4.2. Secuenciación

A partir de los resultados de la secuenciación de los marcadores 16S ADN e ITS para bacterias y hongos respectivamente, se realizó una asignación taxonómica de los microorganismos presentes en las muestras. Así mismo, se analizó la diversidad de microorganismos de las muestras mediante el estudio de la diversidad α y β . Al igual que en los resultados microbiológicos, se realizó la prueba no paramétrica de Wilcoxon para comprobar la significancia de las diferencias entre los dos grupos del estudio, donantes y ARIS.

4.2.1. Taxonomía

A continuación, se presentan las relaciones taxonómicas tanto de bacterias como de hongos. En este trabajo solo se muestran los datos referentes a los taxones filo y género, sin embargo, los datos referentes a los otros taxones están disponibles.

Bacterias (16S ADNr)

En las figuras 13 y 14 se observa la taxonomía bacteriana para las muestras del estudio a nivel de filo y a nivel de género, respectivamente. A simple vista, se observan dos grupos claramente diferenciados, las 4 primeras muestras pertenecen a ARIS y el resto al grupo de donantes. En el grupo de ARIS se observa que el filo de Proteobacterias está sobrerrepresentado en comparación al grupo de los donantes. Por contra, en este último grupo predomina el filo de Bacteroidetes (figura 13).

En relación con la figura 14, se observa que en el grupo de ARIS, solo están presentes unos pocos géneros comparado con la gran cantidad de géneros presentes en las muestras del grupo de donantes.

La diferencia entre estos dos grupos reside en la diversidad y riqueza de las muestras, de esta manera la diversidad que tienen las muestras de los donantes es superior a la diversidad de las muestras de ARIS. Este hecho se ve con más claridad a nivel de género ya que la diversidad del taxón género es superior a la diversidad existente en filo. Estas observaciones, al igual que las observaciones microbiológicas indican que los dos grupos son diferentes entre ellos.

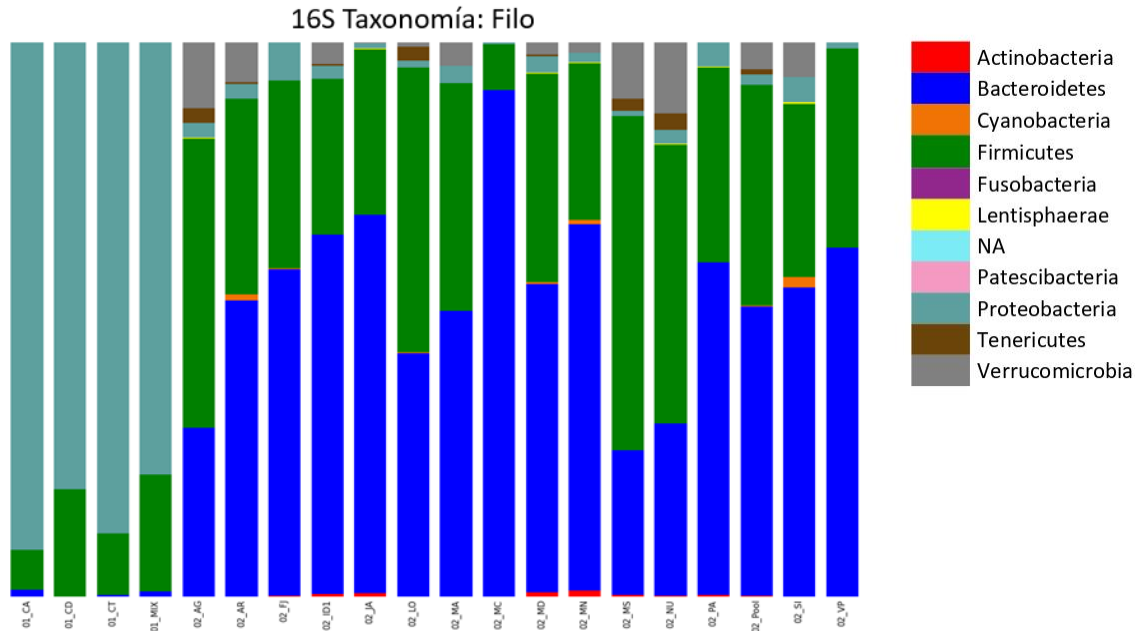


Figura 13: Representación gráfica de las asignaciones taxonómicas bacterianas correspondientes al taxón de filo realizadas mediante el programa *qiime 1.9.2*. Las cuatro primeras columnas corresponden a las muestras procedentes de ARIS mientras que las demás columnas corresponden a los donantes. NA indica no asignados.

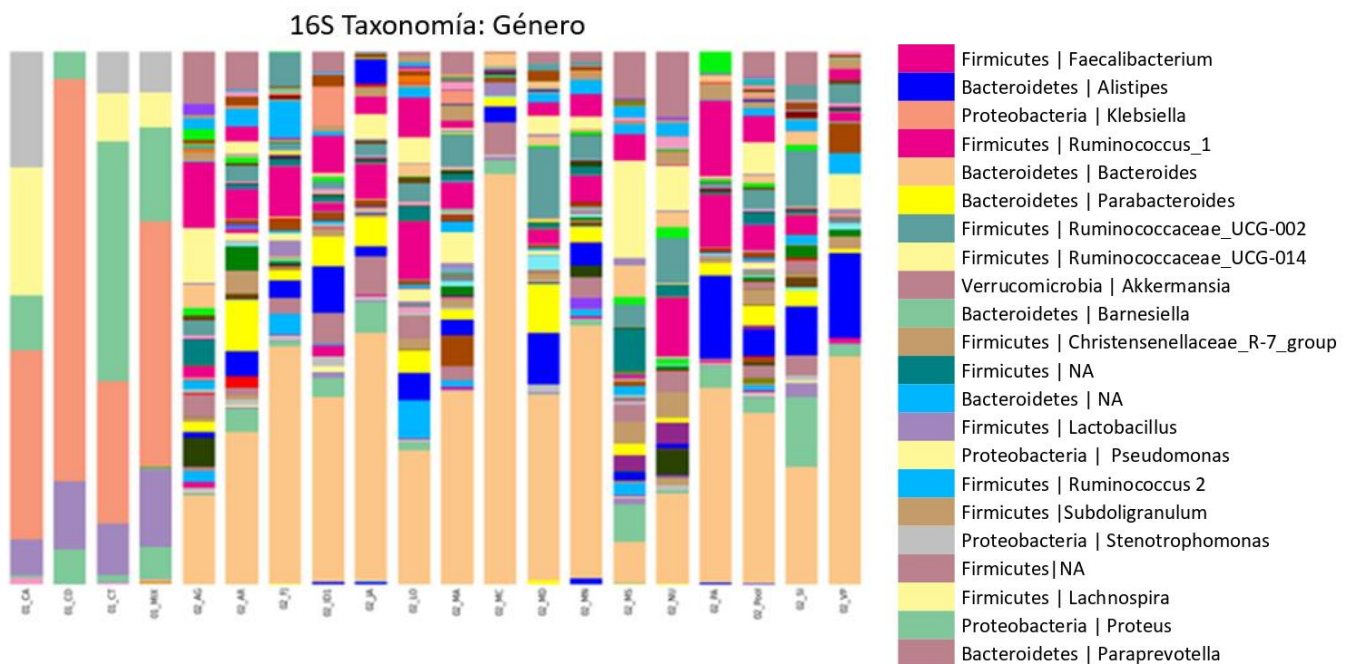


Figura 14: Representación gráfica de las asignaciones taxonómicas bacterianas correspondientes al taxón de género realizadas mediante el programa *qiime 1.9.2*. Las cuatro primeras columnas corresponden a las muestras procedentes de ARIS mientras que las demás columnas corresponden a los donantes. En la leyenda solo se representan los 22 géneros que cuentan con más representación en todas las muestras.

Hongos (ITS)

En las figuras 15 y 16 se observa la taxonomía fúngica de las muestras del estudio, a nivel de filo y género, respectivamente. En el caso de los hongos, la diversidad es mucho menor que la que se encuentra en bacterias. En la figura 15, no se observa ninguna diferencia entre ambos grupos, como si ocurría en bacterias. Lo mismo ocurre a nivel de género (figura 16), pero en este caso si se observa una pequeña diferencia entre ambos grupos, determinada por el género *Aspergillus*, más representado en el grupo de ARIS. La ausencia de diferencias entre los dos grupos del estudio se debe posiblemente a la baja diversidad presente en ambas muestras.

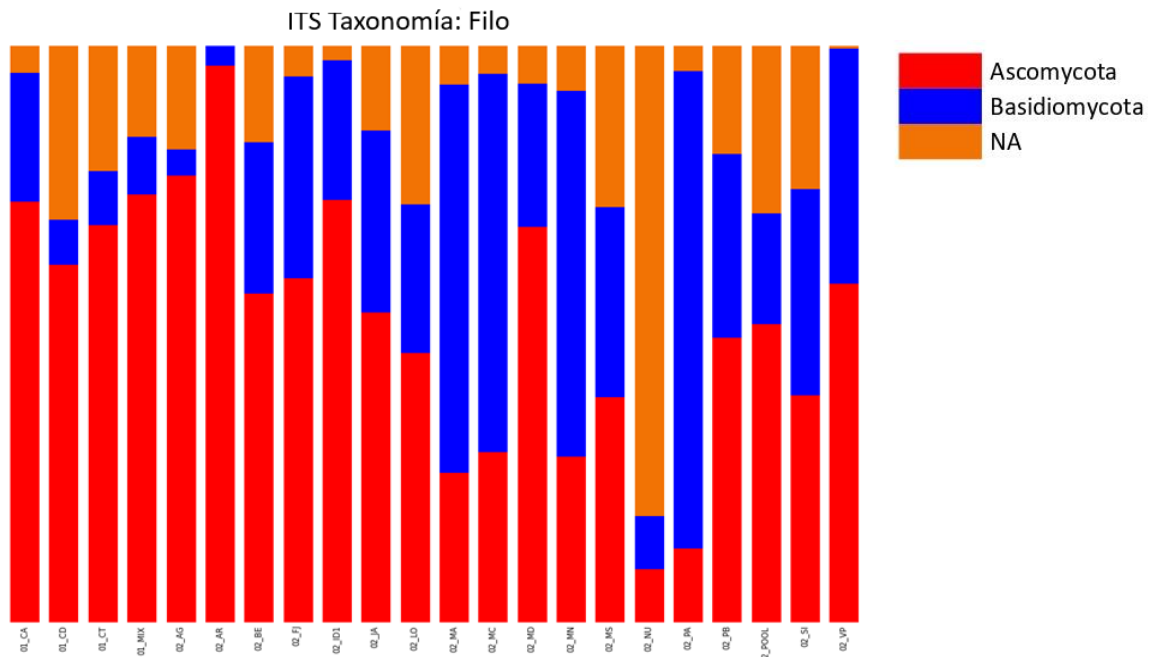


Figura 15: Representación gráfica de las asignaciones taxonómicas fúngica correspondientes al taxón de filo realizadas mediante el programa *qiime 1.9.2*. Las cuatro primeras columnas corresponden a las muestras procedentes de ARIS mientras que las demás columnas corresponden a los donantes.

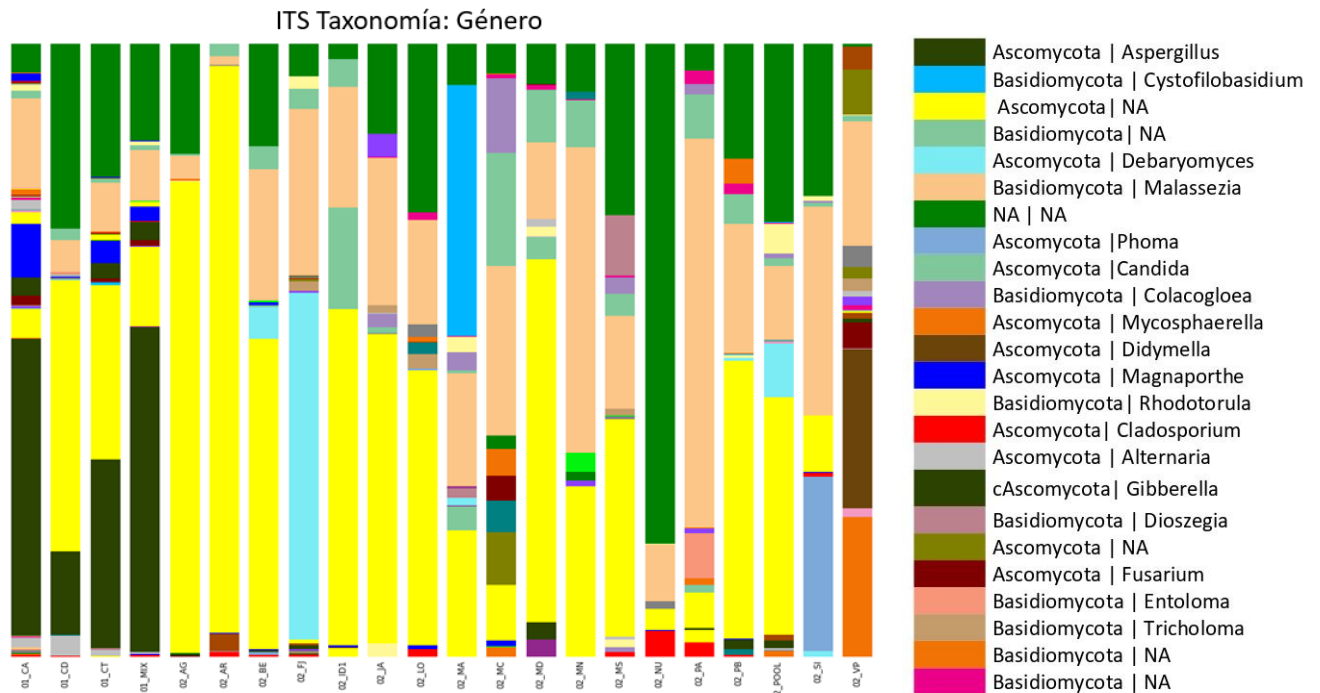


Figura 16: Representación gráfica de las asignaciones taxonómicas fúngicas correspondientes al taxón de género realizadas mediante el programa *qiime 1.9.2*. Las cuatro primeras columnas corresponden a las muestras procedentes de ARIS mientras que las demás columnas corresponden a los donantes. Además, en la leyenda solo se representan los 22 géneros que cuentan con más representación en todas las muestras.

4.2.2. Diversidad α : Estimador CHAO1, índice de Shannon y rarefacción

En este apartado se muestran los datos resultantes del análisis de la diversidad α solo para el taxón de género. Por una parte, se muestran el valor del estimador CHAO1 y el valor del índice de Shannon para los grupos de donantes y ARIS, así como su representación gráfica y el p-valor de la prueba de Wilcoxon. Por otra parte, se presentan las curvas de rarefacción para cada muestra en función del grupo al que pertenecen.

Bacterias (16S)

Estimador CHAO1 e Índice de Shannon

Tanto el estimador CHAO1 como el Índice de Shannon indican la diversidad que tiene una muestra. En la tabla 13, se observa que, para ambos parámetros, el promedio del grupo de donantes es superior al promedio del grupo de ARIS indicando que el segundo grupo es menos diverso que el primero. Además, esa diferencia es significativa estadísticamente y estos resultados van en concordancia con lo que se ha visto en la taxonomía bacteriana, donde se diferencian los dos grupos.

Tabla 13: Resultados del estimador de diversidad CHAO1 y del índice de Shannon para los grupos de donantes y ARIS en relación a bacterias. También se presenta el p-valor resultante de la prueba no paramétrica de Wilcoxon. Los valores en negrita indican que están por debajo de 0,05, valor de significancia

Indice	Grupo	Promedio	Prueba Wilcoxon
CHAO1	Donantes	79,33	0,029
	ARIS	17,50	
Shannon	Donantes	2,42	0,045
	ARIS	1,68	

En la figura 17 se representan los valores de los dos parámetros para cada muestra. Al igual que se observa en la tabla 13, la representación gráfica indica que el grupo de ARIS es menos diverso que el grupo de donantes. En este caso, se observa lo mismo para el estimador CHAO1 y para el índice de Shannon.

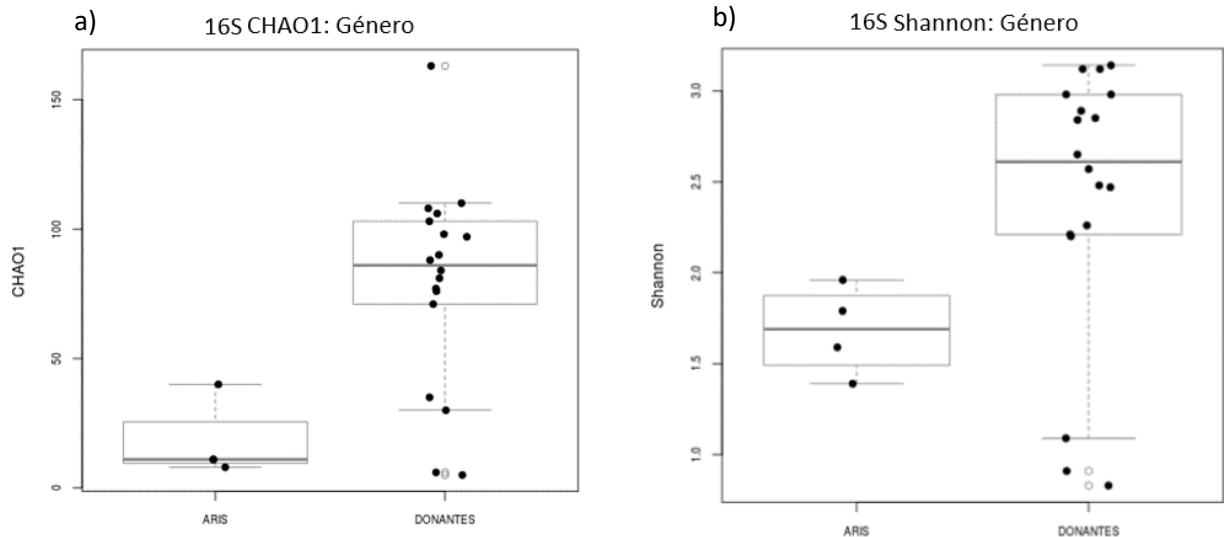


Figura 17: Representación gráfica de los valores de CHAO1 (a) y Shannon (b) para cada muestra y agrupados según los grupos del estudio (bacterias).

Rarefacción

La rarefacción es una técnica que permite evaluar la riqueza de especies a partir de los resultados del muestreo para un número dado de muestras y se basa en la construcción de las llamadas curvas de rarefacción. En estas gráficas se representa el número de especies y el número de lecturas por cada muestra. En general crecen rápidamente al principio, ya que se encuentran las especies más comunes, pero se llega a la saturación cuando o bien no quedan más especies por muestrear o bien cuando solo quedan las poco comunes.

En la figura 18 se observa que los donantes tienen más riqueza que ARIS, en concordancia con los resultados anteriores. Si bien ambos grupos tienen el mismo número de lecturas las muestras del grupo de ARIS se saturan antes de llegar a los 50 géneros, por lo que su riqueza es baja. También se ve como la mezcla de las tres muestras (MIX) la mejora, ya que es la línea que más arriba llega en la gráfica de ARIS. Respecto a los donantes se ve como la mayoría de las muestras superan la barrera de los 50 géneros y se quedan en poco menos de 100. Al igual que en ARIS la mezcla de las muestras se traduce en una mejora de la riqueza, llegando hasta los casi 150 géneros.

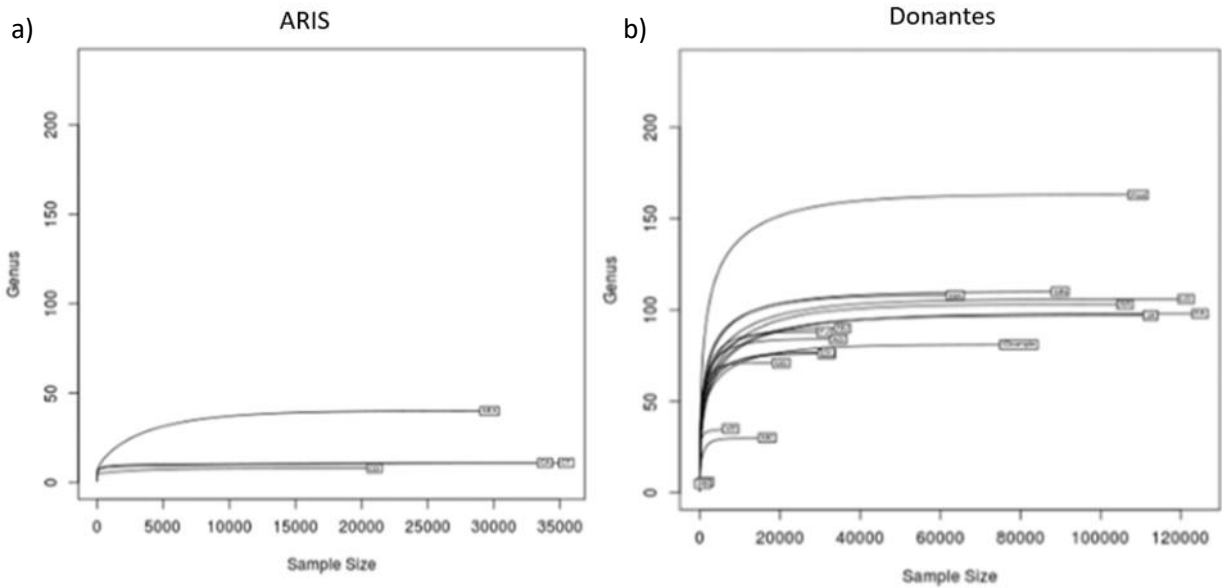


Figura 18: Representación gráfica de las curvas de rarefacción en los grupos de ARIS (a) y donantes (b), en relación a bacterias .

Hongos (ITS)

Estimador CHAO1 e Índice de Shannon

En la tabla 14 se presentan los promedios de ambos parámetros para hongos. Se puede observar que contrariamente a lo que ocurre en bacterias, el grupo con mayor promedio es ARIS tanto en CHAO1 como en Shannon. Por lo que la riqueza de ambos grupos en cuanto a hongos es similar y la diferencia entre ellas no es estadísticamente significativa .

Tabla 14: Resultados del estimador de diversidad CHAO1 y del índice de Shannon para los grupos de donantes y ARIS en relación a los hongos. También se presenta el p-valor resultante de la prueba no paramétrica de Wilcoxon.

Índice	Grupo	Promedio	Prueba Wilcoxon
CHAO1	Donantes	9,510	0,120
	ARIS	13,750	
Shannon	Donantes	1,014	0,831
	ARIS	1,052	

En la figura 19, el estimador CHAO1 determina que el grupo de ARIS es más rico en hongos que el grupo de los donantes, mientras que en el índice de Shannon la riqueza de ambos grupos es muy similar.

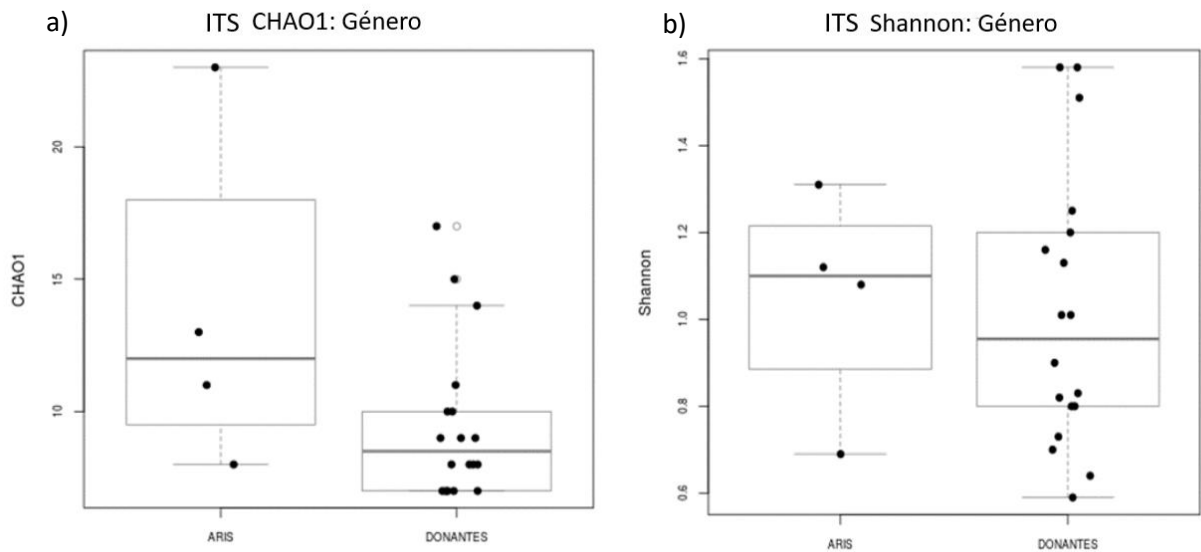


Figura 19: Representación gráfica de los valores de CHAO1 (a) y Shannon (b) para cada muestra y agrupados según los grupos del estudio con respecto a los hongos.

Rarefacción

En la figura 20 se observa que ambos grupos tienen tanto un número de lecturas como una riqueza similar ya que todas las muestras se saturan antes de llegar a los 20 géneros. Además, cabe destacar que en la mayoría de las muestras solo se han identificado como máximo 10 géneros. Al contrario de lo que sucedía en bacterias, en el caso de los hongos la mezcla de las muestras de ARIS por una parte y las muestras de donantes por otra, no mejoran la riqueza, sino que son de las primeras en saturarse.

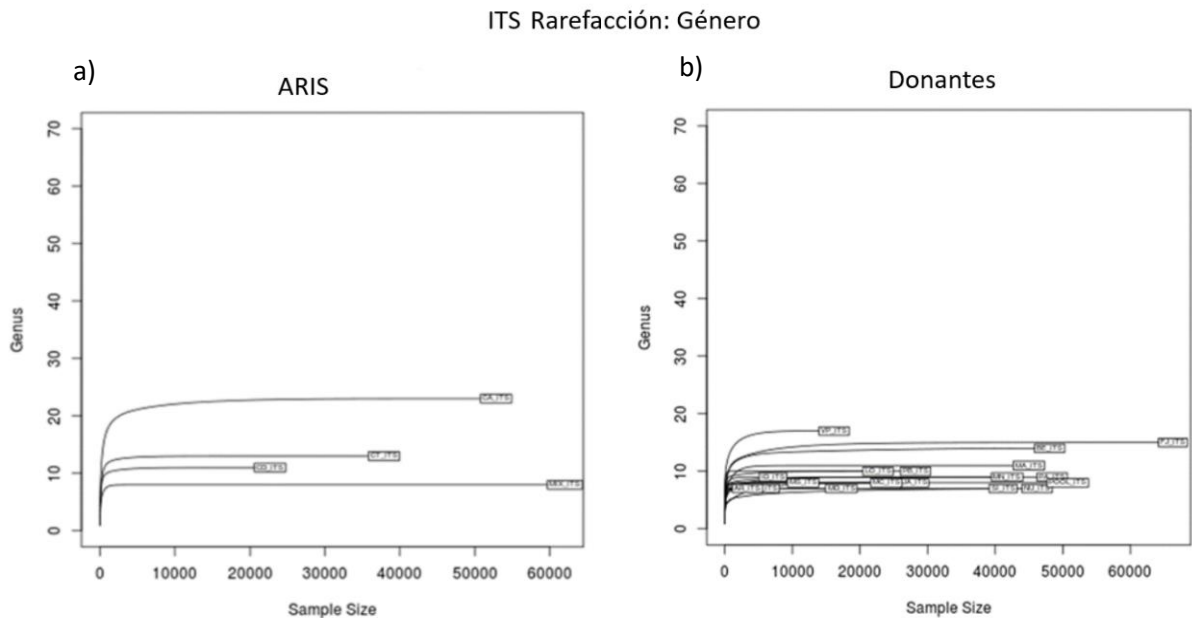


Figura 20: Representación gráfica de las curvas de rarefacción en los grupos de ARIS (a) y donantes (b), respecto a hongos.

4.2.3. Diversidad β : Análisis de componentes principales (PCoA)

En este apartado, se muestra el análisis de componentes principales (PCoA) en función del género bacteriano y fúngico. El PCoA consiste en la reducción de la dimensionalidad de los datos de manera que las múltiples variaciones quedan agrupadas en distintos componentes de acuerdo con su importancia en la interpretación de la variable observada.

En la figura 21, respecto al PCoA de bacterias se ven dos grupos claramente diferenciados. Por una parte, se encuentra el grupo de ARIS y por otra el grupo de los donantes, separados por el eje Y. En el grupo de ARIS aparecen dos muestras pertenecientes al otro grupo. Esto se debe a que las muestras tienen muy pocas lecturas lo que se traduce en menos géneros identificados y menor diversidad. Sin embargo, ARIS sí que tiene un número de lecturas aceptable pero la diversidad es muy baja. Por otro lado, se encuentran las muestras de los donantes que tiene un elevado grado de diversidad y riqueza, por lo que se agrupan. La formación de los dos grupos indica que existen diferencias entre ellas debidas a la riqueza y diversidad de las muestras y confirma las observaciones anteriores.

Respecto al PCoA de hongos, no se observa la división que si se presentaba en bacterias. En este caso, las muestras se agrupan formando un único grupo, sin embargo, hay dos muestras del grupo de ARIS que se diferencian de la demás muestras

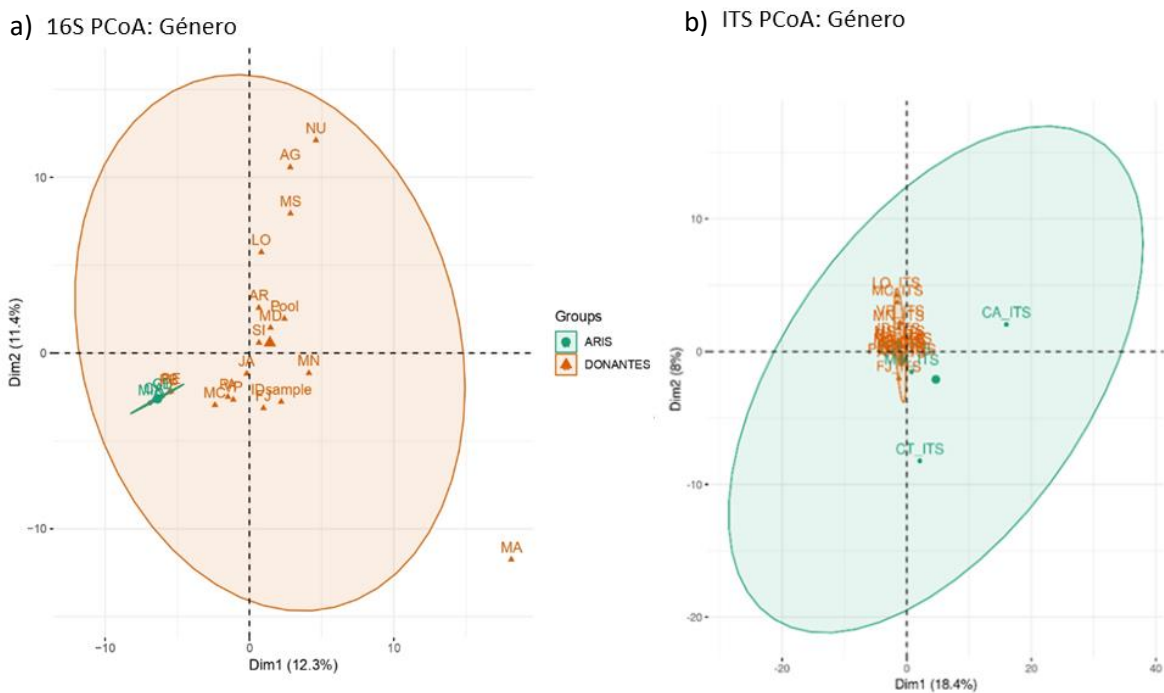


Figura 21: PCoA del conjunto de datos en función del género bacteriano (a) y del género fúngico (b).

4.2.4. Pruebas pareadas en función de la taxonomía

A continuación, se muestran los resultados de las pruebas estadísticas pareadas en función de la taxonomía para los microorganismos con menor p-valor. En este caso como en todos los anteriores, se ha usado la prueba de Wilcoxon.

En la tabla 15 se muestran las bacterias que diferencian ambos grupos. Se contempla que el promedio para los géneros *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Proteus*, *Chryseobacterium*, *Lysinibacillus*, *Stenotrophomonas*, *Pseudomonas*, *Klebsiella* y *Bacillus* en el grupo de ARIS son superiores al promedio en el grupo de los donantes debido a que son o bien aerobios o anaerobios facultativos. Estos resultados son los esperados ya que, según la taxonomía, el grupo de ARIS era rico en bacterias capaces de vivir con oxígeno en el ambiente. Por el contrario, los géneros *Bacteroides* y *Parabacteroides* son anaerobios por lo que su promedio es superior en el grupo de los donantes.

En la tabla 16, se muestran los géneros fúngicos que diferencian a los dos grupos. En este caso, se observa que solo hay dos géneros, *Malassezia* y *Aspergillus*, en los cuales el promedio del grupo de los donantes es diferente de 0. De estos dos géneros, solo hay uno, *Malassezia*, en el que el promedio superior es el de donantes. Respecto al género *Aspergillus*, el grupo de ARIS supera en promedio al otro grupo.

Tabla 15: Resultados de las pruebas pareadas en función de la taxonomía bacteriana. Se presentan los promedios de abundancia de determinados microorganismos para los grupos de estudio, el p-valor de la prueba de Wilcoxon y la taxonomía asignada.

Promedio ARIS	Promedio donantes	Prueba Wilcoxon	Filo	Clase	Orden	Familia	Género
42.962	0.0014	0	Firmicutes,	Bacilli	Lactobacillales	Enterococcaceae	<i>Enterococcus</i>
12.633	3,00E-04	0	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Lactobacillaceae	<i>Lactobacillus</i>
210.823	0	0	Proteobacteria	Gammaproteo bacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	<i>Proteus</i>
0.5423	0	2,00E-04	Bacteroidetes	Bacteroidia	Flavobacteriales	Weeksellaceae	<i>Chryseo bacterium</i>
0.0622	0	2,00E-04	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Planococcaceae	<i>Lysinibacillus</i>
104.804	0	2,00E-04	Proteobacteria	Gammaproteo bacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	<i>Stenotro phomonas</i>
105.937	0.0013	7,00E-04	Proteobacteria	Gammaproteo bacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>
249.308	28.275	0.0012	Proteobacteria	Gammaproteo bacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	<i>Klebsiella</i>
0.0073	0	0.0028	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	<i>Bacillus</i>
0.0901	306.869	0.009	Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	Bacteroidaceae	<i>Bacteroides</i>
0.0211	31.305	0.009	Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	Tannerellaceae	<i>Parabacteroides</i>

Tabla 16: Resultados de las pruebas pareadas en función de la taxonomía fúngica. Se presentan los promedios de abundancia de determinados microorganismos para los grupos de estudio, el p-valor de la prueba de Wilcoxon y la taxonomía asignada de los 16 primeros géneros con el p-valor más bajo.

Promedio ARIS	Promedio Donantes	Prueba Wilcoxon	Filo	Clase	Orden	Familia	Género
1,831	0	0	Ascomycota	Dothideomycetes	Pleosporales	Pleosporaceae	<i>Alternaria</i>
0,373	0	2,00E-04	Ascomycota	Dothideomycetes	Pleosporales	Pleosporaceae	<i>Bipolaris</i>
0,563	0	2,00E-04	Basidiomycota	Ustilaginomycetes	Ustilaginales	Ustilaginaceae	<i>Moesziomyces</i>
65,979	17.064	0,002	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotiales	Aspergillaceae	<i>Aspergillus</i>
217,951	572.702	0,024	Basidiomycota	Malasseziomycetes	Malasseziales	Malasseziaceae	<i>Malassezia</i>
0,110	0	0,045	Ascomycota	Dothideomycetes	Pleosporales	Didymosphaeriaceae	<i>Paraconiothyrium</i>
0,041	0	0,045	Ascomycota	Dothideomycetes	Pleosporales	Pleosporaceae	<i>Pyrenophora</i>
0,090	0	0,045	Ascomycota	Dothideomycetes	Pleosporales	Pleosporaceae	<i>Stemphylium</i>
0,022	0	0,045	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotiales	Trichocomaceae	<i>Xerochrysum</i>
0,026	0	0,045	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Hypocreales_fam Incertae_sedis	<i>Trichothecium</i>
0,008	0	0,045	Ascomycota	Sordariomycetes	Magnaporthales	Magnaporthaceae	<i>Magnaporthe</i>
0,070	0	0,045	Basidiomycota	Agaricomycetes	Agaricales	Tricholomataceae	<i>Lepista</i>
0,067	0	0,045	Basidiomycota	Agaricomycetes	Agaricales	Tricholomataceae	<i>Mycena</i>
0,026	0	0,045	Basidiomycota	Agaricomycetes	Cantharellales	Tulasnellaceae	<i>unidentified</i>
0,162	0	0,045	Basidiomycota	Agaricomycetes	Gomphales	Lentariaceae	<i>Kavinia</i>
0,002	0	0.0451	Mucoromycota	Mucoromycetes	Mucorales	Rhizopodaceae	<i>Rhizopus</i>

5. Discusión

Conocer el estado y la composición de la microbiota en los biorreactores del simulador es esencial para que el proceso de digestión se lleve a cabo correctamente y sea equivalente al de un ser humano. El cultivo microbiológico de los 4 grupos (lactobacilos, salmoneloides, clostridiales y bifidobacterias) da una idea aproximada y rápida de lo que ocurre dentro. No obstante, la secuenciación de las muestras da datos más precisos y fiables, además de permitir conocer los hongos que están presentes.

Hongos

En el caso de los hongos, la diversidad dentro del reino es menor que la diversidad existente en bacterias. Por este motivo, las diferencias entre los dos grupos no son tan acusadas como en el caso de las bacterias. Sin embargo, en el caso del taxón de género se observan más diferencias que en el taxón de filo debido, en parte, al aumento de géneros identificados. En el grupo de donantes los géneros más representados son *Malassezia* y *Candida*, en concordancia con la bibliografía consultada mientras que en ARIS los más representados son *Aspergillus* y *Malassezia*. Según la literatura, el primer género sí está representado en el micobioma, pero en proporciones más bajas. Sin embargo, respecto al segundo género ocurre justo lo contrario, ya que según las referencias debería estar representado en una mayor proporción (7,8).

Por un lado, las referencias consultadas indican una correlación negativa entre la representación del género *Aspergillus* y la ingesta de SCFAs. Cabe mencionar que el género *Aspergillus* crece de manera natural en los cereales y la dieta de ARIS es rica en cereales, cosa que lleva a pensar que la diferencia entre ambos grupos podría residir en la dieta, ya que a ARIS se le da siempre la misma mientras que los seres humanos cambian las comidas cada día y no siempre comen cereales (6). Por otro lado, se ha de tener en cuenta la influencia de las interacciones entre el sistema inmune (SI) y la microbiota, ya que el SI es el encargado de actuar contra los patógenos. En concreto, *Aspergillus* provoca infecciones en pacientes inmunodeprimidos, por lo que la ausencia en ARIS de esas interacciones puede llevar a un aumento del género, cosa que no ocurre en el caso de los donantes al tener ellos un SI completamente funcional (38).

Los índices de diversidad α indican que la riqueza de ambos grupos es similar. Esta observación se ve reforzada con los resultados de la diversidad β , ya que las muestras forman un único grupo más o menos homogéneo.

Todos los resultados son en parte debidos a la baja diversidad de hongos que iguala ambos grupos y que permite que no haya una diferencia significativa entre ellos a pesar de que en ARIS haya menos diversidad. Los resultados de las pruebas pareadas indican que en ARIS los hongos están más representados que en los donantes. Estos últimos resultados apoyan la hipótesis de la pérdida del ambiente anaeróbico en el simulador ya que los hongos son aerobios y debido a la presencia de oxígeno en los biorreactores pueden crecer con más facilidad.

Bacterias

Para tener una visión más clara de la composición aproximada, se generaron perfiles de microbiota, en este caso 4. En ninguno de los tres perfiles de ARIS se han conseguido datos de los 4 géneros, por lo que las comparaciones no están completas. Aun así, los resultados muestran perfiles totalmente diferentes entre ellos. Sin embargo, la visión global del perfil es lo que más información proporciona, ya que el número de UFC/g es muy variable entre individuos, pero la proporción de cada grupo respecto a los demás se mantiene más o menos estable. En el original, de los grupos estudiados los más representados son lactobacilos y bifidobacterias en concordancia con la bibliografía consultada (39,40) mientras que en los perfiles de ARIS solo hay un recuento en el que estos dos grupos son los más representados (tercer recuento). Por otra parte, hay una comparación del grupo de lactobacilos (donantes/segundo recuento) que no da un p-valor por debajo del valor de significación, pero al analizar las proporciones globales, se ve que el perfil es diferente. Finalmente, no se logró la equivalencia entre ambos perfiles, debido a los problemas e incidentes ocurridos con el simulador.

La composición de una microbiota sana se define por la presencia de 4 filos principales: Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacterias y Actinobacterias (2,14). En las muestras de donantes si se han encontrado todos estos filos, siendo los más representados Firmicutes y Bacteroidetes por lo que la composición se ajusta a la mencionada en las referencias consultadas. Sin embargo, las muestras de ARIS no se ajustan a esta composición ya que el filo Actinobacterias no está representado y el más abundante es Proteobacterias. Estas mismas observaciones se trasladan al taxón de género, siendo los géneros más representados *Klebsiella* (Proteobacterias) y *Bacteroides* (Bacteroidetes) para el grupo de ARIS y donantes, respectivamente. Según la bibliografía consultada el género *Bacteroides* es de los más frecuentes mientras que el género *Klebsiella* no pertenece a este grupo. De esta manera, los resultados del grupo de donantes concuerdan con la literatura respecto a la abundancia del género (40,41). Sin embargo, el hecho de que el género más abundante en ARIS sea *Klebsiella* demuestra que no se ha conseguido simular completamente la microbiota de los donantes, representativa de la población valenciana.

Los resultados obtenidos tanto del estudio de taxonomía como del estudio de diversidades α y β indican que ARIS tiene menos riqueza y diversidad que los donantes debido a los problemas e incidentes ocurridos con el simulador que se detallan en el anexo 3.

El problema más importante es la pérdida del ambiente anaeróbico derivado de la entrada de aire ya que al comprobar los microorganismos presentes en los biorreactores, los anaerobios se encontraban en muy bajas proporciones. Los resultados de las pruebas pareadas dan apoyo a esta hipótesis ya que se observa que el promedio de los microorganismos anaerobios facultativos o aerobios es superior en ARIS que en el grupo de donantes, mientras que el promedio de los microorganismos anaerobios es mayor en el grupo de donantes. De la misma manera, los resultados del análisis de ITS dan apoyo a esta hipótesis, al ser superior la representación de hongos en ARIS.

El principal problema del estudio ha sido el mal funcionamiento del simulador teniendo en cuenta, en primer lugar, que se ha tenido que montar por primera vez en nuestro laboratorio y que es un prototipo. Sin duda, el mayor problema fue el agravamiento de la pérdida del ambiente anaeróbico causada por el mal sellado de los tapones y el manejo diario del simulador. Entre los problemas que agravaron la pérdida de ambiente se encuentra el mal funcionamiento a la hora de adquirir los datos de lectura de pH, que provocó que se tuviera que medir el pH de forma manual extrayendo muestras y aumentando así el manejo diario necesario y la entrada de aire. Además, las jeringas se salían de las gomas, por lo que también aumentaba la entrada de aire.

Cabe mencionar que todos los problemas que se han dado en este simulador localizado en València no han ocurrido en los simuladores localizados en el CIATEJ (México), cosa sorprendente teniendo en cuenta que se diseñaron y fabricaron en el mismo sitio y por las mismas personas. Este hecho lleva a pensar que debe haber algunas diferencias entre Guadalajara y València que afectan al prototipo. La primera diferencia está relacionada con la localización geográfica de ambas ciudades, pues mientras que Guadalajara se encuentra a una altitud de 1500 metros sobre el nivel del mar, València se encuentra a 15 m. A nivel del mar la presión atmosférica es mayor que a grandes alturas, lo que provoca que la presurización de los biorreactores se dé con más facilidad en València. Como el sistema está presurizado y no hay un sistema de purga, al introducir líquido aumenta la presión interna del biorreactor y la goma no genera la suficiente fuerza de fricción para mantener la jeringa en su sitio y esta se sale, provocando la pérdida del ambiente. En segundo lugar, la corriente eléctrica de ambos países es diferente, mientras que en México llega con una frecuencia de 60 Hz en España lo hace con una de 50 Hz, respectivamente. Como la fabricación del prototipo se realizó en América, se cree que el cambio de frecuencia ha afectado a los componentes eléctricos. Por otro lado, los picos de sobretensión afectan a los microcontroladores Arduinos, ya que son muy sensibles a ellos y debido a esto se producen fallos en los componentes eléctricos del simulador. A esta problemática, hay que sumarle los cortes de luz programados del centro que también provocan picos de tensión interfiriendo en el normal funcionamiento de los componentes.

6. Conclusión

En conclusión, no se ha podido obtener microbiota equivalente entre la población valenciana y el simulador a causa de diferentes factores, ya desentrañados. No obstante esto, se ha obtenido una microbiota con un perfil muy diferente que por sus problemas podría ser equivalente a la de una persona que, por ejemplo, ha pasado por un tratamiento agresivo contra la misma, como la quimioterapia. Sin embargo, se necesitan más estudios que den apoyo a esta hipótesis.

Aunque los resultados no han sido los esperados, se ha dado un gran paso hacia la aplicación de este simulador en España ya que se ha conseguido hacerlo funcionar correctamente durante un determinado periodo de tiempo y establecer las condiciones de operación y manejo. Además, se ha conseguido mantener la representación de 3 de los 4 filos más representados en la MI humana, por lo que el diseño experimental es correcto. En este caso lo que ha fallado es el diseño del prototipo en sí, ya que se menospreció, fundamentalmente, la influencia que podría tener la corriente eléctrica en el funcionamiento de ARIS.

7. Bibliografía

1. Marieb, E. *Essentials of human anatomy & physiology*. 11th ed. Boston: Pearson; 2015. pp.487-510.
2. Thursby E, Juge N. Introduction to the human gut microbiota. *Biochem J*. 2017;474(11):1823-1836.
3. Medlineplus.gov. *Tracto gastrointestinal: MedlinePlus enciclopedia médica*. [Internet] [Consultado 13 Marzo 2019]. Disponible en: https://medlineplus.gov/spanish/ency/esp_imagepages/9790.htm
4. Colbert, B., Ankney, J. and Lee, K. *Anatomy & physiology for health professions*. 3rd ed. Johnstown: Pearson; 2016. pp.340-367.
5. National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases/ NIDDK. *Aparato digestivo y su funcionamiento*. [Internet] [Consultado 13 Marzo 2019]. Disponible en: <https://www.niddk.nih.gov/health-information/informacion-de-la-salud/enfermedades-digestivas/aparato-digestivo-funcionamiento>
6. Dieterich W, Schink M, Zopf Y. Microbiota in the Gastrointestinal Tract. *Med Sci*. 2018;6(4):116-131.
7. Kapitan M, Niemiec M, Steimle A, Frick J, Jacobsen I. Fungi as Part of the Microbiota and Interactions with Intestinal Bacteria. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2018.
8. Nash A, Auchtung T, Wong M, Smith D, Gesell J, Ross M et al. The gut mycobiome of the Human Microbiome Project healthy cohort. *Microbiome*. 2017;5(153).
9. Jandhyala S. Role of the normal gut microbiota. *World J Gastroenterol*. 2015;21(29):8787-8803.
10. Shreiner A, Kao J, Young V. The gut microbiome in health and in disease. *Curr Opin Gastroenterol*. 2015;31(1):69-75.
11. Gut Microbiota for Health. *Gut Microbiota for Health* [Internet] [consultado 1 Mayo 2019]. Disponible en: <https://www.gutmicrobiotaforhealth.com>
12. Rojo D, Méndez-García C, Raczkowska B, Bargiela R, Moya A, Ferrer M. Exploring the human microbiome from multiple perspectives: factors altering its composition and function. *FEMS Microbiol Rev*. 2017;41(4):453-478.
13. Rodríguez J, Murphy K, Stanton C, Ross R, Kober O, Juge N. The composition of the gut microbiota throughout life, with an emphasis on early life. *Microb Ecol Health Dis*. 2015; 26:26-50.
14. Garcia-Mantrana I, Selma-Royo M, Alcantara C, Collado M. Shifts on Gut Microbiota Associated to Mediterranean Diet Adherence and Specific Dietary Intakes on General Adult Population. *Front Microbiol*. 2018; 9:890.
15. Gut Microbiota for Health. Ácidos grasos de cadena corta [Internet] [consultado 18 Mayo 2019]. Disponible en: <https://www.gutmicrobiotaforhealth.com/es/acidos-grasos-de-cadena-corta/>
16. Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco. Proceso para simulación de tracto digestivo humano. México; 354295, 2012.
17. Rowland I, Gibson G, Heinken A, Scott K, Swann J, Thiele I. Gut microbiota functions: metabolism of nutrients and other food components. *Eur J Nutr*. 2017;57(1):1-24.
18. Rivera Escoto M. Evaluación del efecto de un simbiótico en la microbiota intestinal de escolares de 6 a 12 años con obesidad en un simulador de tracto digestivo. [Ph.D]. Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ); 2018.
19. González Ávila M. Tecnologías de simuladores del tracto digestivo humano. En: *Fundació per al Foment de la Investigació Sanitària i Biomèdica (FISABIO)*. València; 2019.
20. Prodigest | Technology [Internet] [consultado 18 Mayo 2019]. Disponible en: <http://www.prodigest.eu/en/technology/shime-and-m-shime>

21. Van de Wiele T, Van den Abbeele P, Ossieur W, Possemiers S, Marzorati M. The Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem (SHIME®). En K. Verhoeckx, P. Cotter, I. López-Expósito, C. Kleiveland, T. Lea, A. Mackie, T. Requena, D. Swiatecka, & H. Wichers, *The impact of food bioactives on Health*. Londres. Springer;. 2015;305-317
22. ProDigest. Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem (SHIME) [Internet]. [consultado 18 Mayo 2019]. Disponible en: <https://www.prodigest.eu/en/technology/shime-and-m-shime>
23. CIAL-UAM-CSIC. SIMGI [Internet] [consultado 18 Mayo 2019]. Disponible en: <https://www.cial.uam-csic.es/simgi/>
24. Instituto de Investigación en ciencias de la alimentación (CIAL). Simulador Gastrointestinal Dinámico (SIMGI) [Internet]. [consultado 18 Mayo 2019]. Disponible en: <https://www.cial.uam-csic.es/simgi/>
25. Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ). Tecnología [Internet] [consultado 18 Mayo 2019]. Disponible en: <http://www.exvivo-lab.com/tecnologia.html>
26. Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ). Automated and Robotic Intestinal System (ARIS) [Internet]. [consultado 18 May 2019]. Disponible en: <http://www.exvivo-lab.com/servicios.html>
27. Chow S, Shao J, Wang H, Lokhnygina Y. Sample size calculations in clinical research. 2nd Ed. Nueva York: Chapman & Hall/CRC; 2017.
28. De man, Rogosa and Sharpe (MRS) agar. Handbook of Culture Media for Food Microbiology. 2nd Ed. Elsevier Science; 2003;511-513.
29. Atlas R, Snyder J. Handbook of media for clinical microbiology. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press; 2006.
30. Harmon, S.M., Kauter, D.A., a.Peeler, J.T.: Comparison Of media enumeration of Clostridium perfringens. Appl.Microbiol. 1974, 27;78-82
31. Beerens H. An elective and selective isolation medium for Bifidobacterium spp. J Appl Microbiol. 1990;11(3):155-157.
32. Klindworth A, Pruesse E, Schweer T, Peplies J, Quast C, Horn M. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. Nucleic Acids Res. 2012;41(1).
33. Schmieder R, Edwards R. Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. Bioinformatics. 2011;27(6):863-864.
34. Callahan B, McMurdie P, Rosen M, Han A, Johnson A, Holmes S. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. Nat Methods. 2016;13(7):581-583.
35. R Core Team. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. ISBN 3-900051-07-0. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria, 2012. URL: <http://www.R-project.org/>.
36. Caporaso J, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman F, Costello E. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. Nat Methods. 2010;7(5):335-336.
37. Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. Nucleic Acids Res. 2012;41(D1):590-596.
38. Heinekamp T, Schmidt H, Lapp K, Pähz V, Shopova I, Köster-Eiserfunke N, Krüger T, Kniemeyer O, Brakhage AA. Interference of Aspergillus fumigatus with the immune response. Semin Immunopathol. 2015;37(2):141-52.
39. Heeney, D. D., Gareau, M. G., & Marco, M. L. Intestinal Lactobacillus in health and disease, a driver or just along for the ride? Curr Opin Biotechnol. 2018; 49:140-147.

40. Chen T, Chen R, Tsai J, Hu R. Fine Classification of Human Gut Microbiota by Using Hierarchical Clustering Approach. IEEE 16th International Conference on Bioinformatics and Bioengineering (BIBE); 2016 Oct 31- Nov 2; Taichung, Taiwan: IEEE [Internet] [Consultado 27 Junio 2019]. Disponible en: <http://ieeexplore.ieee.org/stamp/stamp.jsp?tp=&arnumber=7789967&isnumber=778994>
41. Arumugam, M., Raes, J., Pelletier, E., Le Paslier, D., Yamada, T., Mende, D. R., Batto, J.-M. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*. 2011; 473(7346): 174–180.

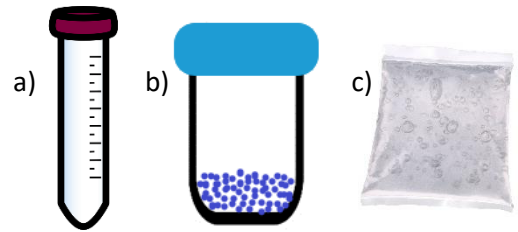
8. Anexos

8.1. Anexo 1: Protocolo de recogida y procesado de muestras de heces

Protocolo recogida de muestras

Kit para la recogida de muestras

- a) 2 tubos con medio estabilizador
- b) 1 tubo con sales
- c) Gel refrigerante

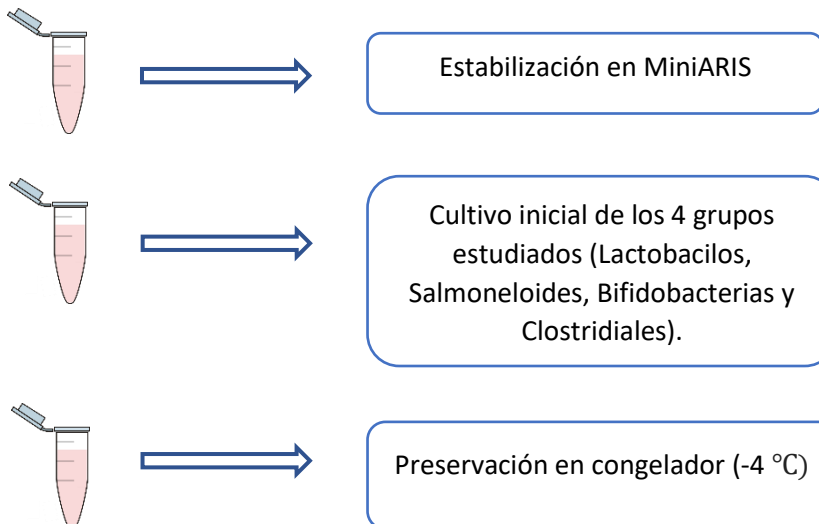


La muestra debe ser tomada en la primera evacuación del día con la ayuda de un objeto desechable para evitar el contacto entre el agua del WC y la muestra.

1. De la muestra obtenida se coge una porción con el palito incluido en el tubo y se coloca tanto en el tubo a como en el tubo b.
2. Una vez el tubo b contiene una porción de la muestra se introduce en el tubo c y se añaden sales y agua para imitar el ambiente anaeróbico. Cerrar rápidamente el tubo c al introducir el agua para que la reacción sea lo más eficaz posible.
3. Introducir ambos tubos en la nevera con el gel refrigerante, que debe ser congelado horas antes de la toma de muestra.

Protocolo procesado de muestras

1. Mezclar los tubos a y b (b se encuentra dentro de c) en un tercer tubo.
2. Pesar los tubos y centrifugarlos durante 10 minutos a 3000 rpm.
3. Recoger el sobrenadante y traspasarlo a 3 *ependorf* diferentes.



8.2. Anexo 2: Cuestionario sobre los hábitos alimentarios

Cuestionario de recordatorio de 24 horas

TIEMPO DE COMIDA Y HORA	ALIMENTO, CANTIDAD E INGREDIENTES
DESAYUNO	
ALMUERZO	
COMIDA	
MERIENDA	
CENA	

Cuestionario de frecuencia de consumo

ALIMENTO	Diario	Semanal	Quincenal	Mensual	Ocasional	No
LECHE:						
A.- Leche descremada o yogur descremado						
B.- Leche semidescremada o yogur						
C.- Leche entera o yogur natural						
D.- Leche con chocolate o vainilla o leche malteada						
PRODUCTOS DE ORIGEN ANIMAL:						
A.- Pechuga de pollo sin piel						
Atún en agua						
Queso cottage						
Tenera.						
B.- Muslo o pierna, hígado de pollo.						
Barbacoa (maciza)						
Carne de cerdo sin grasa.						
Pescado						
Queso panela						
Embutidos de pavo						
Res magra (cuete, filete, falda, aguayón)						
C.- Pollo con piel						
Queso oaxaca						
Huevo entero						
D.-Mariscos						
Embutidos de cerdo						
Queso fuertes						
Cortes de carne con grasa (arrachera, cortes tipo americano como: rib eye, t bone, etc)						

AZUCARES						
Agua preparada de sabor						
Polvo para beber de sabor						
Azúcar						
Cajeta						
Mermelada						
Miel						
Caramelo						
Chicle						
Chocolate en polvo						
Gelatina						
Nieve de frutas						
Helados de crema						
Jugos industrializados						
Refrescos						
Salsa catsup						
SUSTITUTOS						
Sustituto de azúcar (Canderel/Aspartame, Splenda						
Polvo para bebida (Clight)						
Refresco de dieta						

ALIMENTO	Diario	Semanal	Quincenal	Mensual	Ocasional	No
LECHE:						
A.- Leche descremada o yogur descremado						
B.- Leche semidescremada o yogur						
C.- Leche entera o yogur natural						
D.- Leche con chocolate o vainilla o leche malteada						
PRODUCTOS DE ORIGEN ANIMAL:						
A.- Pechuga de pollo sin piel						
Atún en agua						
Queso cottage						
Tenera.						
B.- Muslo o pierna, hígado de pollo.						
Barbacoa (maciza)						
Carne de cerdo sin grasa.						
Pescado						
Queso panela						
Embutidos de pavo						
Res magra (cuete, filete, falda, aguayón)						
C.- Pollo con piel						
Queso oaxaca						
Huevo entero						
D.-Mariscos						
Embutidos de cerdo						
Queso fuertes						
Cortes de carne con grasa (arrachera, cortes tipo americano como: rib eye, t bone, etc)						

CEREALES Y TUBÉRCULOS						
Cereales sin grasa:						
Arroz al vapor						
Cereal industrializado						
Elote						
Papa						
Pastas cocidas						
Galletas Marías o saladas						
Palomitas naturales						
Pan de centeno						
Pan de caja: Pan integral						
Pan de caja: Pan blanco						
Tortilla de maíz						
Tortilla de harina						
Cereales con grasa:						
Arroz a la mexicana						
Pasta preparada (con crema, mantequilla, margarina, aceite)						
Pan dulce						
Hot cakes o waffles						
Frituras						
Tamal						
Pastelillos industrializados						
VERDURAS						
Verduras: crudas/ ensaladas/ cocidas/ precocidos						
Verduras enlatadas						
Jugo de verduras (V8, Licuado de nopal)						
Sopa caldosa						
Sopa de crema						

ALIMENTO	Diario	Semanal	Quincenal	Mensual	Ocasional	No
FRUTA						
Frutas crudas						
Frutas congeladas/ enlatadas						
Jugo de frutas natural						
LEGUMINOSAS						
Frijol, alubia, habas, lentejas, soya, garbanzo						
LIPIDOS						
<u>Ácidos grasos saturados:</u>						
Mantequilla						
Manteca						
Chicharrón						
Sustituto de crema						
Chorizo						
Tocino						
Crema						
Mayonesa						
Aderezo cremoso para ensaladas						
Chocolates						
<u>Ácidos grasos polinsaturados:</u>						
Aceites de maíz						
Ajonjolí girasol						
Vinagreta						
<u>Ácidos grasos monoinsaturados:</u>						
Oleaginosas						
Aceite de oliva						
Aceite canola						
Aguacate						
<u>Ácidos grasos trans:</u>						
Margarina						

8.3. Anexo 3: Problemas enfrentados durante el proceso de puesta a punto

Problemas técnicos

En primer lugar, al inicio hubo un fallo de programación que provocó que una placa térmica calentara por encima de la temperatura de trabajo (37 °C), de manera incontrolada.

En segundo lugar, los expertos se fijaron en el ruido anormal del motor que regula la agitación, por lo que se tuvo que cambiar. Lo mismo ocurrió meses después con otro motor perteneciente a otra sección del simulador.

En tercer lugar, al encender el simulador después de un mes apagado, se observó que las pantallas LED no daban unas lecturas de pH precisas y estables si no que en su lugar aparecían letras. El problema radicaba en que la velocidad de adquisición de datos era superior a la capacidad de procesado del microcontrolador Arduino, por lo que se modificó el código de programación.

En cuarto lugar, una de las pantallas LED dejó de funcionar; sin embargo, al reiniciar el simulador volvió a funcionar con normalidad.

En quinto lugar, debido a las diferencias de presión internas y externas en los biorreactores, las jeringas se salían de las gomas, provocando la entrada de aire y la pérdida del ambiente anaeróbico.

En sexto lugar, una de las placas calefactoras no aumentaba la temperatura, por lo que se tuvo que analizar cuál era el componente que fallaba, ya que podría ser el emisor (Arduino), el transmisor (cables) o el receptor (placa térmica). Al principio se creyó que era la placa térmica (receptor) la que fallaba y se cambió. No obstante, al cambiar el componente eléctrico, la placa calefactora pasó de no aumentar la temperatura a aumentarla sin control y la pantalla LED mencionada anteriormente, volvió a mostrar el mismo tipo de problemas. En vista de estos acontecimientos, se decidió medir la corriente eléctrica que pasaba por la placa dando como resultado una corriente dentro de rango. Después se analizó el Arduino (emisor) y se observó que la corriente eléctrica que pasaba por el componente no llegaba al rango adecuado, por lo que el problema era que el Arduino no transmitía la señal correctamente. Estos dos últimos problemas técnicos se cree que fueron provocados por la desestimación de la influencia del cambio de corriente eléctrica entre México y España y por un apagón programado que interfirieron en la corriente eléctrica de MiniARIS. Hasta la fecha, no se ha conseguido solucionar estos últimos problemas.

Finalmente, y debido a los componentes del alimento, las gomas de las bombas peristálticas que conectan los biorreactores se pegaban entre ellas impidiendo el paso del contenido de los biorreactores. En estos casos, el transvase se hacía de forma manual mediante jeringas y se despegaban las gomas también de forma manual, aumentando el manejo diario y la pérdida del ambiente anaeróbico.

Problemas microbiológicos

Además de los problemas técnicos derivados de trabajar con una máquina prototipo, durante el proceso también se enfrentaron problemas de tipo microbiológico.

En primer lugar y el problema principal fue la pérdida del ambiente anaeróbico por la entrada de aire. La entrada de aire se debió principalmente al mal sellado de los tapones del biorreactor y al manejo diario del simulador (toma de muestras, ajuste de pH, transvase manual, cambios de gomas). Este problema se agravó durante el periodo en el que las lecturas de pH no eran estables ya que para ajustar el rango de pH se tomaban muestras y se medían en un potenciómetro aumentando así las probabilidades de que entrara aire.

El aire fue el causante de que el recuento de microorganismos anaerobios fuera bajo y para solucionar este problema, se compraron unos tapones especiales que se cierran herméticamente evitando la entrada de aire. A partir de ese momento, el ambiente anaeróbico mejoró y se mantuvo en unos niveles aceptables.

En segundo lugar, se notificó el crecimiento de hongos en diferentes secciones del simulador, cosa que indica, por una parte, una infección por hongos y, por otra parte, una pérdida del ambiente anaeróbico ya que los hongos crecen en presencia de oxígeno (figura 22). Para solucionar la infección, se tomaron dos medidas diferentes, la primera de ellas consistía en administrar una dosis de un fármaco antifúngico mientras que la segunda pasaba por recuperar el ambiente anaeróbico eliminando el oxígeno mediante una reacción química.

En tercer lugar, se observó el crecimiento de *S. tiphymurium* en el medio LIA (figura 23) de todas las secciones, indicando una infección. Para controlar esta infección y aumentar la población anaeróbica, se decidió administrar a MiniARIS un probiótico que contenía bifidobacterias y lactobacilos.

En cuarto lugar, en el medio TSC usado para cultivar el grupo de clostridiales, aparecieron colonias rojas que se cree que pertenecen a hongos (figura 24) tanto en el colon transverso como en el descendente mientras que en colon ascendente creció una colonia de color blanco que también se cree que pertenece a hongos (figura 25).

Finalmente, se observó el crecimiento de *Clostridium perfringens* (medio TSC) en la sección del colon ascendente (figura 26); no obstante, en cultivos posteriores su presencia ya no era notable. Con la pérdida del ambiente anaeróbico y las infecciones microbianas, se decidió suplementar la microbiota de MiniARIS con nueva microbiota estabilizada de donantes, quienes cumplen los criterios de inclusión.

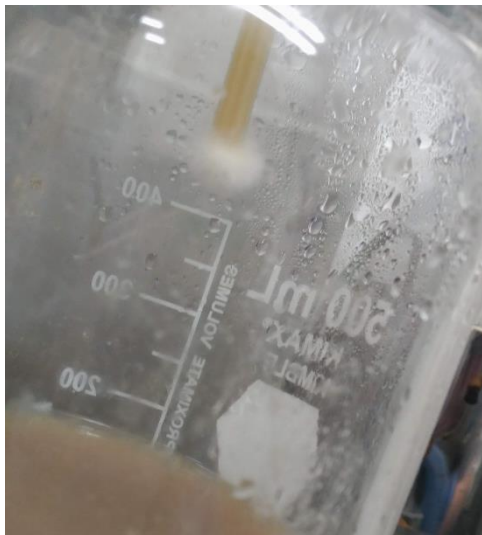


Figura 22: Imagen de la sección de deshechos, donde creció un hongo filamentososo.

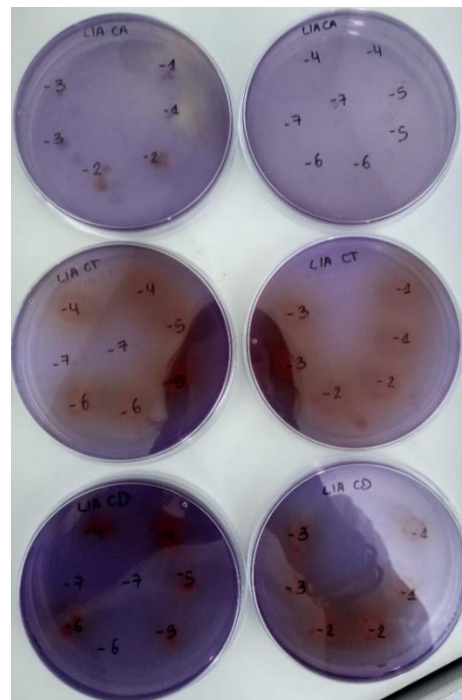


Figura 23: Imagen de los cultivos del medio LIA para todas las secciones del simulador (CA: colon ascendente; CT: colon transeverso; CD: colon descendente) (diluciones de -1 a -7). El viraje de color del medio indica la presencia de *S. tiphymurium*.

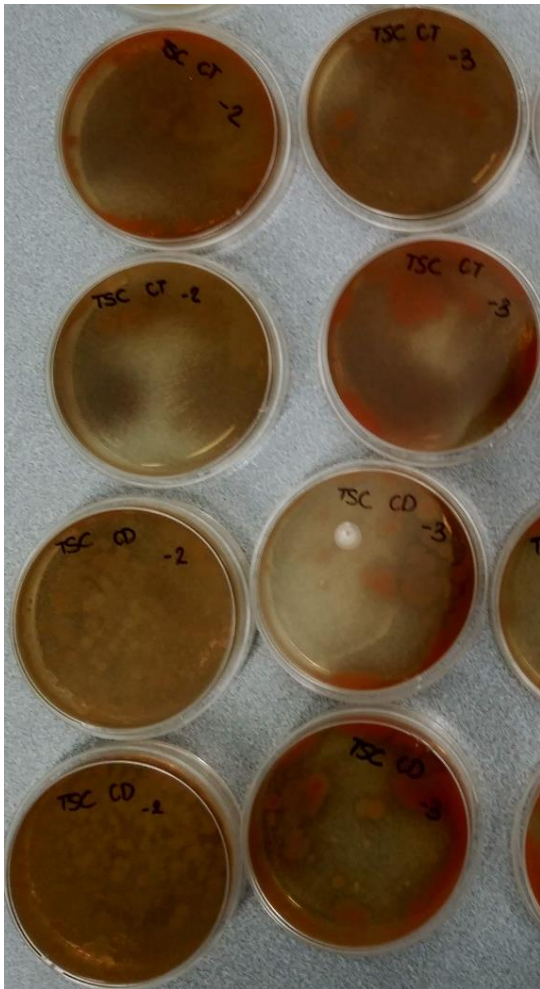


Figura 24: Imagen de los cultivos del medio TSC para las secciones del simulador del colon transverso y del colon descendente (diluciones -1 y -2). Las colonias de color rojo se han asignado a hongos e indican una posible contaminación.



Figura 25: Imagen de los cultivos del medio TSC para la sección del colon ascendente (dilución -5). La colonia de color blanco se ha asignado a hongos e indican una posible contaminación.



Figura 26: Imagen del cultivo del medio TSC para la sección del colon ascendente. El color negro de las colonias en este medio indica que pertenecen a *C.perfringens*.