



FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA

Departamento de Fisiología.

Programa de Doctorado en Fisiología 3127

TESIS DOCTORAL

Cambios de la microbiota intestinal asociados a la osteoporosis en pacientes con fractura de cadera

Autor: Alejandro Roselló Añón

Directores: Dr. Julio Doménech Fernández
Dr. Gaspar Pérez Martínez
Dra. Mari Carmen Gómez Cabrera

Valencia, enero 2024



FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA

Departamento de Fisiología.

Programa de Doctorado en Fisiología 3127

TESIS DOCTORAL

Cambios de la microbiota intestinal asociados a la osteoporosis en pacientes con fractura de cadera

Autor: Alejandro Roselló Añón

Directores: Dr. Julio Doménech Fernández
Dr. Gaspar Pérez Martínez
Dra. Mari Carmen Gómez Cabrera

Valencia, enero 2024

CERTIFICADO DE DIRECCION DE TESIS

D. Julio Doménech Fernández, Doctor por la Universidad de Valencia y Director del Departamento de Cirugía Ortopédica y Traumatología de la Clínica Universidad de Navarra.

D. Gaspar Pérez Martínez, Doctor por la Universidad de Nottingham y Científico titular del Departamento de Biotecnología, Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (C.S.I.C.).

Dña. Mari Carmen Gómez Cabrera, Doctora por la Universidad de Valencia y Catedrática de Fisiología de la Universitat de València.

CERTIFICA/N:

Que la presente memoria, titulada "Cambios de la microbiota intestinal asociados a la osteoporosis en pacientes con fractura de cadera", corresponde al trabajo realizado bajo su dirección por D/Dña. Alejandro Roselló Afión, para su presentación como Tesis Doctoral en el Programa de Doctorado en Fisiología de la Universitat de València.

Y para que conste firma/n el presente certificado en Valencia, a 5 de enero de 2024.

Firmado por los directores de la tesis

JULIO DOMENEC H FERNANDE Z Firmado digitalmente por JULIO DOMENECH FERNANDEZ Fecha: 2024.01.07 10:03:52 +01'00' Fdo.: Julio Doménech Fernández	Firmado por PEREZ MARTINEZ GASPAR - DNI ***7970** el día 08/01/2024 con un certificado emitido por AC Sector Público Fdo.: Gaspar Pérez Martínez	MARIA CARMEN GOMEZ CABRERA Firmado digitalmente por MARIA CARMEN GOMEZ CABRERA Fecha: 2024.01.08 08:18:06 -05'00' Fdo.: Mari Carmen Gómez Cabrera
--	---	--

Ratificación del tutor/a con su firma:

MARIA
CARMEN|
GOMEZ|
CABRERA

Fdo.: Mari Carmen Gómez Cabrera

Fdo.: Mari Carmen Gómez Cabrera

Tutor/a

A mis padres
A mis hijos y Ana

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero mostrar mi agradecimiento a mis directores de tesis. Al Dr. Julio Doménech, por brindarme la oportunidad de realizar este proyecto, por transmitirme su interés en la investigación y poner a mi disposición toda su experiencia docente. Al Dr. Gaspar Pérez, por guiarme en un campo que era totalmente novedoso para mí, por su accesibilidad para comentar nuestros resultados y plantear nuevos puntos de vista. A la Dra. Mari Carmen Gómez, por su labor y aportaciones realizadas en este proyecto. Estoy muy agradecido por haber estado a mi lado en todo momento.

A María José Sangüesa, por apoyarme durante este largo viaje, ser un gran impulso en el progreso de esta tesis y estar siempre disponible para consultarle cualquier cuestión. Sin ti esta tesis no habría salido a la luz. A mi compañero Vicente, estoy muy agradecido por todas tus enseñanzas, así como por tu ayuda y ánimos en esta recta final.

A Caterina y Rocío, por facilitar las cosas con vuestro entusiasmo y predisposición. Sois una parte muy importante de este proyecto.

A Carlos, por abrirme las puertas del laboratorio de biología molecular. A Lorena, por ayudarme con el procesamiento de las muestras sanguíneas y ser una gran compañera de fatigas en nuestros procesos de doctorado. A Lola por resolverme las dudas con el análisis bioinformático. Y a todos los que han aportado su pequeño grano de arena.

A mis hermanas, sois muy importantes para mí. A mi hermana Clara, por enseñarme a ser positivo en las más duras adversidades.

A mi padres, por todo lo que me habéis dado y enseñado, si he llegado hasta aquí es gracias a vosotros. A mi madre por su dedicación y resiliencia. A mi padre, poder escribirte estas líneas, aunque nunca las puedas leer, ha sido una de las grandes motivaciones que me han alentado a acabar esta tesis. Estoy muy agradecido por la huella que dejaste en mí y me reconforta pensar que en cierta medida estés presente en mis decisiones y actos. *Wish you were here.*

A mis hijos. Antonio y Elena, que a pesar de tener una edad en la que requieren una atención especial, han permitido que durante estos últimos meses les robe un poco de su tiempo para finalizar este proyecto. A mi pequeña niña mayor Olivia, con la que hablo de esos "bichitos" que tenemos en la barriga y no deja de sorprenderme con las inquietudes y preguntas de una mente tan despierta como la suya.

A Ana, gracias por ser comprensiva y apoyarme, especialmente, estos últimos meses. Me has dado la confianza y la autoexigencia que necesitaba para escribir una tesis. Gracias también por ser mi compañera todos estos años (y los que vendrán) en el aprendizaje continuo que es la vida. Gracias por ser partícipe de los buenos momentos y estar ahí en los malos. Gracias por dejarme estar a tu lado.

La presente Tesis Doctoral ha sido realizada gracias a la concesión de la Beca: “Ayuda a Proyectos de Investigación en Cirugía Ortopédica y Traumatología, 2019”.

“Antes de intentar una cura debemos averiguar en qué consiste la enfermedad. El primer paso para cocinar estofado de conejo es coger el conejo”

Isaac Asimov (1944). Atrapa esa liebre. [Yo, robot]

INDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	xxi
LISTADO DE TABLAS Y FIGURAS	xxix
INTRODUCCIÓN.....	1
1. Fracturas de cadera	3
1.1. Epidemiología	3
1.2. Clasificación	4
2. Tejido óseo	5
2.1. Componentes del tejido óseo	6
2.1.1. Componente orgánico	6
2.1.2. Componente inorgánico	8
2.1.3. Componente celular	8
2.1.3.a. Células osteoformadoras	8
2.1.3.b. Células osteoresortivas	9
2.2 Fisiopatología ósea	11
2.2.1. Remodelado	12
2.2.1.a. Paratohormona (PTH)	13
2.2.1.b. Vitamina D.....	14
2.2.2.c. Calcitonina	15
2.2.2.d. Citocinas y Factores de crecimiento	15
3. Relación inmunología con metabolismo óseo	19
3.1. Conceptos básicos inmunidad	19
3.2. Generalidades	19

3.3. Células implicadas.....	22
3.3.1. Células presentadoras de antígeno	22
3.3.2. Linfocitos B.....	23
3.3.3. Linfocitos T.....	23
3.3.3.a. Sinapsis inmunológica	24
3.3.3.b. Tipos de LT	25
3.3.3.c. LT efectores	26
3.4 Variaciones del estado inmunológico	28
4. Osteoporosis	29
4.1. Concepto	29
4.2. Fisiopatología	31
4.3. Tipos de osteoporosis.....	36
4.4. Factores de riesgo.....	37
4.4.1. Edad, sexo y antecedentes de fractura previos	37
4.4.2. Densidad Mineral Ósea (DMO)	38
4.4.3. FRAX.....	38
4.4.4. Necesidad de búsqueda de otros factores de riesgo: Microbiota ...	39
5. Microbiota	40
5.1. ¿Qué es?.....	40
5.2. Contexto histórico.....	40
5.2.1. Problemas para analizarlo	42
5.2.2. Auge en investigación	43
5.2.2.a. PCR RNA 16s.....	43
5.2.2.b. Procesamiento y análisis de datos: European MetHit y HMP..	45
5.3. Variabilidad de la microbiota. Concepción actual	46

5.3.1. Núcleo del microbioma.....	47
5.3.2. Enfoque holístico	48
6. Microbiota intestinal	50
6.1. Estructura y evolución del MI a lo largo de la vida del individuo	50
6.2. Funciones. Interacciones huésped-MI.....	51
6.3. Homeostasis microbiana intestinal	53
6.4. Base de distintas patologías.....	54
7. MI y metabolismo óseo	56
7.1. Estudios con modelos animales	57
7.1.1. Estudios con animales libres de gérmenes	57
7.1.2. Estudios con animales con MI modificada por antibióticos	59
7.1.3. Relación inmunológica.....	60
7.1.4. Relación con estrógenos.....	62
7.2. Estudios con Prebióticos.	63
7.3. Estudios con Probióticos	65
7.4. Interacción con la mucosa intestinal.....	67
7.4.1. Permeabilidad.....	69
7.5 Mecanismos de acción del MI sobre el metabolismo óseo	70
7.6. Estudios en humanos	72
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	75
MATERIAL Y MÉTODOS.....	79

1. Tipo de estudio	81
2. Selección muestra del estudio	81
2.1. Criterios de inclusión	81
2.2. Criterios de exclusión	82
3. Tamaño muestral	82
4. Descripción de variables.....	83
4.1. Variables demográficas	83
4.2. Variables clínicas	84
4.3. Variables analíticas	84
4.4. Encuesta dietética	86
4.5. Escalas de valoración clínica.....	87
4.6. Análisis subpoblaciones linfocitarias.....	88
4.6.1. Método de procesamiento de las muestras de sangre periférica	92
4.6.1.a. Contador celular.....	92
4.6.1.b. Citómetro de flujo.....	92
4.6.1.c. Análisis funcional de los Linfocitos T	93
Anticuerpos monoclonales empleados en el análisis de las	
subpoblaciones linfocitarias.....	93
4.6.1.d. Protocolo de marcaje.....	94
4.6.2. Análisis funcional de las distintas subpoblaciones	94
4.7. Análisis Microbiota.....	95
4.7.1. Recolección de las muestras microbiota	95
4.7.2. Procesamiento muestras.....	95
4.7.2.a. Extracción con Robot MagNA Pre LC Roche.....	95

4.7.2.b. Preparación de la biblioteca y secuenciación	96
4.7.2.c. Comprobación de la calidad	98
4.7.3. Análisis metataxonómico	98
4.7.3.a. Desnaturalización y eliminación de quimeras.....	98
4.7.3.b. Asignación taxonómica	98
4.7.4. Análisis bioinformático de la microbiota	99
5. Análisis estadístico multivariante	101
RESULTADOS.....	103
1. Datos demográficos	105
2. Variables Analíticas.....	108
2.1. Perfil Bioquímico y hormonal	108
2.2. Hematología General y Recuento Celular	109
2.3. Inmunofenotipo	110
3. Matriz de correlaciones.....	111
4. Análisis de la microbiota intestinal	113
4.1. DIVERSIDAD.....	115
4.2. ANÁLISIS DE ABUNDANCIAS	119
4.2.1. Perfiles de abundancia	119
4.2.1.a. Filo.....	119
Árbol de calor (filo).....	120
4.2.1.b. Orden	121
Árbol de calor (orden)	124
4.2.1.c. Familia	125
Árbol de calor (familia).....	129
4.2.1.d. Genero	130

Árbol de calor (género)	133
4.2.1.e. Especie	136
Árbol de calor (especie).....	139
4.2.2. Core	142
4.3. Búsqueda de Biomarcadores mediante LEfSe	145
4.3.1. Orden.....	146
4.3.2. Familia	146
4.3.3. Género.....	147
4.3.4. Especie.....	149
5. Evaluación de las correlaciones entre componentes de la microbiota intestinal y las variables sistémicas	149
DISCUSIÓN.....	155
1. Análisis microbiota intestinal.....	160
2. Biomarcadores.....	175
3. Limitaciones.....	180
4. Relevancia y aplicabilidad de los resultados.....	181
CONCLUSIONES FINALES	185
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	189
ANEXOS.....	243
Cuaderno de recogida de muestras	245
Matrices de correlaciones	251
Tabla Taxones tras análisis con MetadeconfoundR	253

LISTA DE ABREVIATURAS

AGCC: Ácidos Grasos de Cadena Corta

ASV: Variantes de Secuencias de Amplicones (*Amplicon Sequence Variants*)

BMP: Proteínas morfogenéticas

CCR: Cáncer Colorrectal

CD: Clúster de Diferenciación

CPA: Células Presentadoras de Antígeno

CPH: Complejo Mayor de Histocompatibilidad

CRP: Proteína C reactiva

CU: Colitis Ulcerosa

DAMP: Patrones moleculares asociados a daño (*Damage-Associated Molecular Patterns*)

DMO: Densidad Mineral Ósea

DXA: Absorciometría de rayos X de Doble energía

EC: Enfermedad de Crohn

EII: Enfermedad Inflamatoria Intestinal

FGF23: Factor de crecimiento fibroblástico 23

FGF- β : factor de crecimiento básico de fibroblastos

FOS: Fructooligosacáridos

FRAX®: Herramienta de evaluación de riesgo de fractura (*Fracture Risk Assessment Tool*)

GDS: Escala de Deterioro Global (*Global Deterioration Scale*)

GM-CSF: Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos y Macrófagos

GMP: Progenitores Granulocítico-Mieloides

GnRH: Hormona Liberadora de Gonadotropina

GOS: Galactooligosacáridos

GPR : Receptores Específicos a Proteínas G

GTBD: Base de datos de taxonomía del genoma (*Genome Taxonomy Database*)

HDAC: Histona-Deacetilasa

HG: Hormona de Crecimiento

HLA: Antígeno Leucocitario Humano

HMP : Proyecto del Microbioma Humano

HSC: Células Pluripotenciales

IFN-10: Interferon 10

IFN-11: Interferon 11

IFN-12: Interferon 12

IFN- γ : Interferon γ

Ig: Inmunoglobulinas

IGF: Factores de Crecimiento Insulínicos

IL: Interleucinas

IL-1: Interleucina 1

IL-10: Interleucina 10

IL-12: Interleucina 12

IL-16: Interleucina 16

IL-4: Interleucina 4

IL-6: Interleucina 6

IL-8: Interleucina 8

LB: Linfocitos B

LDA: Análisis discriminante lineal

LEfSe : Análisis lineal discriminativo del efecto del tamaño

LGG: *Lactobacillus rhamnosus* GG

LLGM: LGG pili mutante

LPS: Lipopolisacarido

LT: Linfocitos T

MALT: Tejido Linfoide Asociado a Mucosa

M-CSF : Factor Estimulante de Colonias de Macrófagos

MI: Microbioma intestinal

NLR : Receptor Nod Like

OPG: Osteoprotegerina

OTU: Secuencias taxonómicas operativas (*Operational Taxonomic Unit*)

PAMP: Patrones Moleculares asociados a Patógenos (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*)

PcoA: Análisis de coordenadas principales

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PDGF: Factor de Crecimiento derivado de Plaquetas

PG-12: Prostaglandina 12

PGE: Prostaglandina E

PGE1: Prostaglandina E1

PGG-2: Prostaglandina G2

PGH-2: Prostaglandina H2

PRR : Receptores de reconocimiento de patrones (*Pattern Recognition Receptor*)

PTH: Parathormona

RANKL: Receptor Activador del Factor Nuclear- κ B

RANK-L : RANK-ligando

RCB: Receptor de Célula B

TCR: Receptores de Células Linfocíticas T

RI: respuesta inmunitaria

SII: Síndrome del Intestino Irritable

Tc: LT citotóxicos

TGF- β : Factor de Crecimiento Transformante Beta

Th: LT colaboradores

TLR: Receptor Toll Like

TNF- α : Factor de necrosis tumoral α

TRAP: Proteína marcadora Fosfatasa Ácida Tartato-resistente

Treg: LT reguladores

TSH: Hormona Estimulante del Tiroides.

VEGF: Factor de Crecimiento Endotelial Vascular.

VSG: Velocidad de Sedimentación Globular.

α -diversidad: Riqueza de especies que hay en una comunidad

β -diversidad: Diversidad (comparación) de especies diferentes entre dos comunidades

LISTADO DE FIGURAS Y TABLAS

Ilustraciones

Ilustración 1. Implicaciones en traumatología y cirugía ortopédica de la diferenciación de células madre hematopoyéticas.....	10
Ilustración 2. Diferenciación la función de los osteoclastos regulada por el RANKL y RANK.....	13
Ilustración 3. Representación esquemática del papel de los LT en el mecanismo por el que el ovariectomía promueve la osteoclastogénesis.....	34
Ilustración 4. Osteoimmunología de las enfermedades óseas inflamatorias.....	35
Ilustración 5. Dinámica del microbioma en el tiempo y a escala.	48
Ilustración 6. Estructura de la microbiota intestinal a lo largo de la vida	51
Ilustración 7. Reabsorción ósea y mircrobioma intestinal.	61
Ilustración 8. Clasificación taxonómica	98
Ilustración 9. Gráfico matriz de correlación de las variables aplicando la correlación de Spearman.....	112
Ilustración 10. Gráfico general de rarefacción	114
Ilustración 11. Estimadores de α -diversidad Chao1, ACE y Shannon para género y especie.....	115
Ilustración 12. Análisis de coordenadas principales (PCoA) basado en la distancia Bray-Curtis de controles y pacientes con fractura de cadera según filo, orden, familia, género y especie.	117
Ilustración 13. Barras apiladas en la que se muestra la abundancia total de la comunidad bacteriana intestinal en el nivel de filo para los grupos de comparación control y casos.	119
Ilustración 14. Árbol de calor según el filo.	121

Ilustración 15. Barras apiladas en la que se muestra la abundancia total de la comunidad bacteriana intestinal en el nivel de orden para los grupos de comparación control y casos	122
Ilustración 16. Árbol de calor según el orden.....	125
Ilustración 17. Barras apiladas en la que se muestra la abundancia total de la comunidad bacteriana intestinal en el nivel de familia para los grupos de comparación control y casos	128
Ilustración 18. Árbol de calor según la familia.....	129
Ilustración 19. Árbol de calor según el género.....	135
Ilustración 20. Árbol de calor según la especie.....	141
Ilustración 21. Comparativa del núcleo del microbioma entre los grupos de estudio.....	142
Ilustración 22. Cladograma taxonómico del análisis LEfSe de orden.....	146
Ilustración 23. Cladograma taxonómico del análisis LEfSe de familia.....	147
Ilustración 24. Cladograma taxonómico del análisis LEfSe de género.....	148
Ilustración 25. Diagrama de cajas LEfSe Especie	149
Ilustración 26. Mapa de calor metadeconfound. Asociación entre los taxones bacterianos (eje y) y las variables estudiadas(eje x)..	152
Ilustración 27. Mapa de calor metadeconfound ajustado por edad. Asociación entre los taxones bacterianos (eje y) y las variables estudiadas(eje x).....	153
Ilustración 28. Estimadores de α -diversidad Shannon, Fisher y Chao1 según la distribución por sexo	255
Ilustración 29. Análisis de coordenadas principales (PCoA) basado en la distancia Bray-Curtis entre mujeres y varones.....	255

Tablas

Tabla 1 Tabla factores de crecimientos y citocinas	17
Tabla 2. Marcadores de las subpoblaciones linfocitarias.	92
Tabla 3. Tabla datos demográficos.	106
Tabla 4. Tabla de antecedentes médicos.	107
Tabla 5. Variables analíticas.	109
Tabla 6. Hematología y recuento celular sanguíneo	109
Tabla 7 Tabla inmunofenotipo tubo activación LT.	110
Tabla 8. Índices de diversidad alfa distribuidos según filo, clase y orden.	116
Tabla 9. Índices de α -diversidad distribuidos según familia, género y especie.	116
Tabla 10. Índices de β -diversidad distribuidos taxonómicamente.	118
Tabla 11. Distribución de la abundancia en el nivel de Filo.	120
Tabla 12. Distribución de la abundancia en el nivel de Orden.	124
Tabla 13. Distribución de la abundancia en el nivel de Familia	127
Tabla 14. Distribución de la abundancia en el nivel de género.	133
Tabla 15. Distribución de la abundancia en el nivel de especie.	139
Tabla 16. Abundancia diferencial de géneros bacterianos	136
Tabla 17. Distribución del núcleo del microbioma	145
Tabla 18. Matriz de correlación de variables clínicas y analíticas ..	251
Tabla 19. Significación estadística de la matriz de correlación de las variables clínicas y analíticas	252
Tabla 20. Tabla taxones metadeconfoundR.	254

INTRODUCCIÓN

1. Fracturas de cadera

1.1. Epidemiología

Las fracturas de cadera son la causa de ingreso más frecuente en un Servicio de Cirugía Ortopédica y Traumatología en Europa. La mayoría se producen por fragilidad ósea y suelen afectar a mayores de 65 años. En España, la incidencia anual de fracturas por fragilidad en 2013 fue de 204.000, de ellas 40.000 fueron de cadera. Se estima que su incremento alcance los 56.700 casos por año en 2025 ¹.

Las fracturas por fragilidad ósea, y en especial, las secundarias a osteoporosis tienen consecuencias devastadoras, sobre todo en personas mayores ². Por ejemplo, las fracturas vertebrales osteoporóticas, aunque generalmente cursan sin síntomas neurológicos, son una fuente de dolor importante y de invalidez. Además, la recurrencia de fractura en otros niveles vertebrales supone un empeoramiento del grado de discapacidad con cada nuevo episodio.

Por su parte, las fracturas de cadera no solo tienen un impacto significativo en la mortalidad del paciente (un 20-40% mortalidad en el primer año)³, sino que también afectan al estado funcional previo, siendo el porcentaje de pacientes que lo recuperan menor al 40% ⁴. Este hecho repercute significativamente en la calidad de vida relacionada con la salud, generando una importante carga social y un elevado coste para los sistemas nacionales de salud.

Se estima que las fracturas de cadera representan el 72% del costo total de las fracturas ^{1,5}. En España, cada fractura de cadera tiene un coste directo estimado de 9.421€ y un promedio de costes directos e

indirectos de 27.000€. La demanda de recursos sanitarios es elevada, tanto durante el ingreso postquirúrgico como en los siguientes 12 meses tras la intervención⁵.

Por todo ello, la fractura de cadera por fragilidad es considerada un problema sanitario nacional de primer nivel que requiere de una mayor profundización en el conocimiento de su patogenia y de la aplicación de nuevas pautas de actuación que minimicen tanto el impacto social como económico.

1.2. Clasificación

La fractura de cadera es la fractura osteoporótica más grave. La mayoría son ocasionadas tras una caída desde la posición de pie, aunque a veces se producen de forma espontánea ⁶.

Afecta el fémur proximal y tradicionalmente se clasifican según su localización en fracturas de la cabeza, cervicales o transcervicales, basicervicales, de la región trocantérea y subtrocantéreas.

No obstante, desde el punto de vista diagnóstico y pronóstico tiene más valor hacer la clasificación en función de su inserción capsular. Por un lado, se definen como fracturas intracapsulares a las que afectan al cuello y su principal problema se debe a características biológicas pues se afecta la circulación de la cabeza femoral. Por otro lado, se engloban como fracturas extracapsulares a las del macizo trocantérico y en estos casos el problema es de tipo mecánico ⁶.

2. Tejido óseo

El hueso como órgano, está compuesto por diferentes tejidos entre los que se encuentran nervios, vasos sanguíneos, vasos linfáticos, tejido conjuntivo, tejido adiposo y tejido óseo. Principalmente, actúa de soporte mecánico, contribuye al funcionamiento del aparato locomotor y protege los órganos internos. Además, se asientan en su interior las células de la médula ósea y contribuye en la actividad metabólica del calcio regulando su homeostasis.

El tejido óseo está formado por células óseas, matriz ósea y el componente inorgánico cristalizado.

Macroscópicamente el tejido óseo se clasifica en:

- Hueso esponjoso o trabecular: Corresponde con el 20% de la masa ósea. Está formado por trabéculas óseas interconectadas que le confiere un aspecto poroso. En su interior esta alojada la médula ósea. En la osteoporosis, la porosidad macroscópica aumenta como consecuencia del adelgazamiento de las estructuras trabeculares.
- Hueso cortical. También llamado hueso compacto. Representa el 80% de la masa ósea y adquiere una apariencia maciza. Esta organizado siguiendo una configuración característica que recibe el nombre de Sistema Haversiano, en el que la unidad básica es la **osteona**.

Microscópicamente el tejido óseo se divide en dos tipos:

- Hueso fibrilar: Corresponde al hueso inmaduro o primitivo (*Woven bone*) y está presente en el embrión, en el recién nacido, en la zona metafisaria de la fisis, en el callo de fractura y en algunos tipos de tumores óseos. Las fibras de colágeno

de su matriz no están orientadas uniformemente y tienen diámetros variables. Además, las células están organizadas de forma anárquica. Mecánicamente es isotrópico, es decir el hueso responde de la misma manera independientemente de la dirección la fuerza aplicada.

- Hueso laminar: Corresponde al hueso maduro. Está presente en el esqueleto del adulto y es el que se produce durante la remodelación ósea. Las fibras de colágeno se organizan paralelamente y las células, que poseen un tamaño constante, están distribuidas de forma más ordenada. Tiene un comportamiento anisotrópico, de manera que ofrecen mayor resistencia cuando la dirección de la fuerza es paralela al eje longitudinal de sus fibras.

2.1. Componentes del tejido óseo

La matriz ósea está constituida por un componente orgánico, un componente inorgánico y agua

2.1.1. *Componente orgánico*

Supone el 25% de toda la matriz ósea y está formado por fibras de colágeno tipo I, proteínas no colágenas y lípidos. Este componente orgánico no mineralizado se conoce como **osteoide**.

Las fibras de colágeno tipo I constituyen el 90% de osteoide. Se disponen en línea y ofrecen resistencia a las fuerzas de tensión. Aunque es el tipo de fibra predominante, también existe un porcentaje en menor cantidad de fibras de colágeno tipo III y IV.

Las proteínas no colágenas más importantes son: la osteocalcina, osteopontina, osteonectina, proteoglicanos y citocinas y factores de crecimiento.

La **osteocalcina** es la proteína no colágena más abundante del tejido óseo y es importante en la regulación de la densidad ósea. Su síntesis es dependiente de la vitamina K, pues esta permite la carboxilación de la forma inactiva de la osteocalcina. Está producida por los osteoblastos y una de sus acciones es atraer a los osteoclastos. Su determinación en sangre permite monitorizar la actividad metabólica ósea del recambio óseo.

La **osteonectina** es secretada por las plaquetas y los osteoblastos. Se encarga de unir el colágeno con la hidroxiapatita y participa en la regulación de la homeostasis mineral ósea.

La **osteopontina** ejerce de sistema de andamiaje y junto los proteoglicanos confieren resistencia a las fuerzas de compresión.

Los proteoglicanos son macromoléculas formadas por un núcleo proteico y cadenas laterales de glicosaminoglicanos que dan estabilidad estructural a los tejidos. Además, regulan la proliferación celular, actúan como receptores de superficie celular y sirven como nexo de unión con los factores tróficos

Los factores de crecimientos y citocinas son proteínas biológicamente activas que regulan la diferenciación y la activación celular. En ellas se incluyen las diferentes BMPs, el TGF- β , el FGF- β los IGFs, VEGF y las ILs.

2.1.2. Componente inorgánico

Constituye el 70% del tejido óseo. Está compuesto en principalmente por cristales de fosfato cálcico y en menor medida por fosfato sódico, fosfato magnésico, carbonato cálcico. Estas moléculas son las encargadas de aportar al hueso resistencia a las fuerzas de compresión. Asimismo, la matriz mineralizada contribuye a mantener la homeostasis de los minerales actuando como reservorio del sodio, fosforo y magnesio. Por su parte, el agua conforma el 5% de la composición del tejido óseo.

2.1.3. Componente celular

2.1.3.a. Células osteoformadoras

Los dos tipos de células osteoformadoras son los osteoblastos y osteocitos. Los **osteoblastos** derivan de las células estromales mesenquimales pluripotentes ⁷. Para que exista esta diferenciación, las células mesenquimales deben ser estimuladas por diferentes factores de transcripción, entre los que se encuentran RUNX2 y osterix.

Los osteoblastos se encuentran en la superficie ósea. Producen colágeno I, osteocalcina y fosfatasa alcalina. Además, poseen receptores para la PTH, la 1,25 vitamina D, glucocorticoides, prostaglandinas y estrógenos. Se encargan de producir el osteoide, regulan la mineralización del tejido óseo e inician el proceso de reabsorción mediante la secreción de proteasas neutras. A medida que los osteoblastos maduran, quedan atrapados en la matriz ósea mineralizada que han generado. Estos osteoblastos son el origen de

los osteocitos y su diferenciación esta mediada por diferentes citocinas como la PTH, las BMP, el TGF- β y las proteínas de la vía Wnt.

Los **osteocitos** representan el 90-95% de la población celular del tejido óseo y se encuentran inmersos en la matriz ósea. Se caracterizan por presentar unas prolongaciones radiales citoplasmáticas que permiten la comunicación con otros osteocitos y con los osteoblastos de la superficie ósea.

Los osteocitos mantienen la homeostasis del Ca y el P extracelular por medio de una regulación sistémica de la mineralización. Además, inician el proceso reparativo de las fracturas actuando sobre la mineralización local. Asimismo, responden a estímulos mecánicos, segregan el **RANKL** (receptor activador del factor nuclear-kB) y regulan el remodelado óseo. También son capaces de regular la regeneración ósea mediante la producción de las proteínas esclerostina y Dkk1, que tiene una acción inhibitoria sobre la vía de señalización osteoformadora Wnt ⁸.

2.1.3.b. Células osteoresortivas

Los **osteoclastos**, al igual que las células inmunitarias, derivan de las células madres hematopoyéticas^{7,9} (**¡Error! La autoreferencia al marcador no es válida.**). Es crucial el microambiente en el que se encuentran estas células pluripotenciales para que se diferencien hacia macrófagos, células dendríticas u osteoclasto.

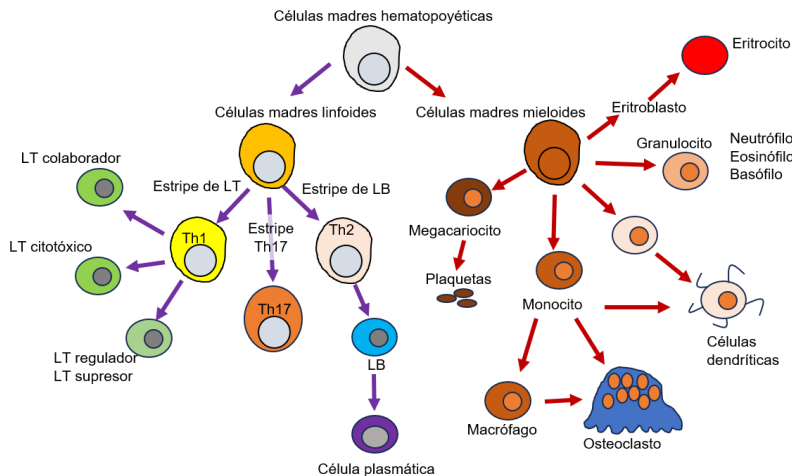


Ilustración 1. Implicaciones en traumatología y cirugía ortopédica de la diferenciación de células madre hematopoyéticas. Los osteoclastos derivan de la serie mieloide-monocito. (adaptación del capítulo "Molecular and cell biology in orthopaedics" de Lee F.⁹).

Los osteoclastos se caracterizan por ser células multinucleadas debido a la fusión de los precursores mononucleares (proosteoblastos). Expresan la TRAP, el receptor de calcitonina y la catepsina K.

Se localizan en la cabeza de los conos perforantes corticales y en los espacios de la superficie ósea trabecular, en las denominadas lagunas de Howship. Su función consiste en reabsorber hueso y para ello, requieren de proteínas del tipo integrinas para poder fijarse a la superficie ósea. En el proceso de resorción ósea disminuyen el pH local, disuelven el componente mineral y, mediante proteasas, degradan el colágeno del osteoide.

La calcitonina, los bisfosfonatos y la IL-1 actúan directamente sobre el osteoclasto. Mientras los dos primeros inhiben directamente la

actividad resortiva, la IL-1 es un potente estimulador de esta acción. Dado que no presentan receptores para la PTH, $1,25(\text{OH})_2$ Vit. D ni prostaglandinas, es necesaria la activación de los osteoblastos mediante estas moléculas para que se desencadene el proceso resortivo. Este proceso está mediado por la proteína de membrana **RANK-L** que está presente en la membrana de los osteoblastos activados.

Los mastocitos sintetizan y secretan heparina, histamina, factores de crecimiento, citocinas, factores proangiogénicos y enzimas degradadoras de la matriz extracelular. Como muchas de estas sustancias influyen en el reclutamiento y activación del osteoclasto, se sospecha que el mastocito puede desempeñar un papel en el recambio óseo ¹⁰.

2.2 Fisiopatología ósea

Tal como se ha comentado previamente, el tejido óseo además de su función de soporte mecánico y del aparato locomotor, regula la calcemia y fosfatemia y aloja los precursores mesenquimales y hematopoyéticos.

El hueso está sometido a un **remodelado óseo** continuo en el que interactúan entre sí los osteoblastos-osteocitos (células formadoras) y los osteoclastos (células resortivas). Durante este proceso se modifica la estructura interna sin alterar la forma, de esta manera se mejora la microarquitectura ósea de acuerdo a los requerimientos mecánicos del entorno. También, se reparan las zonas débiles o de microfractura y ayuda a mejorar la distribución vascular ósea.

El ritmo de regeneración decrece a lo largo de la vida, se estima que el esqueleto completo se renueva al cabo de los 4 y 20 años. Se calcula que un área tarda unos 4-6 meses en completar este proceso y consta de una fase inicial resortiva de 2-4 semanas de duración seguida de otra de 4-6 meses en la que predomina la formación.

2.2.1. Remodelado

Las actividades de formación y reabsorción ósea del remodelado óseo suceden de forma coordinada y está mediado por la PTH, la vitamina D, las hormonas tiroideas, el cortisol, los retinoides, las citocinas inflamatorias y los esteroides sexuales ⁷.

El **M-CSF** aumenta la proliferación y la supervivencia de los proosteoblastos e incrementa la expresión del RANK.

EL **RANKL** es una proteína transmembrana de la familia del TNF- α que es producida por los osteoblastos, las células del sistema inmunitario y las células inmunitarias. El **receptor RANK** se encuentra en la membrana de los proosteoblastos y osteoclastos maduros. La unión del **RANKL** con el **receptor RANK** activa la cascada de señalización que induce la formación del osteoclasto ⁷. Para que se produzca la diferenciación del osteoclasto, es necesario que los osteoblastos expresen en su membrana las moléculas de M-CSF y RANKL (Ilustración 2)¹¹.

La **OPG** es una glucoproteína de la familia del TNF producida por los osteoblastos y las células estromales. Tiene la capacidad de estimular la apoptosis de los osteoclastos y bloquear su activación y formación. Así, cuando la OPG se une al RANK-L se inhiben los efectos resortivos óseos.

El remodelado óseo puede estar influido por la edad, enfermedades metabólicas como la diabetes, alteraciones nutricionales, variaciones circulatorias, fármacos, factores genéticos, físicos y bioquímicos. De estos últimos, se ha estudiado diferentes moléculas que guardan una relación directa con el metabolismo óseo.

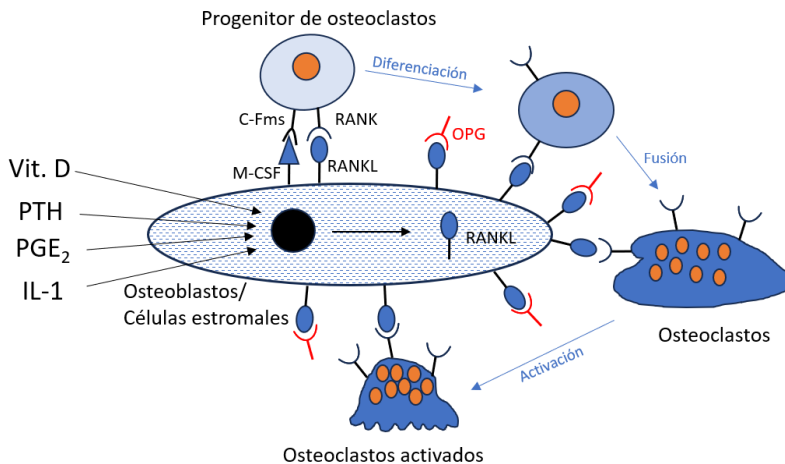


Ilustración 2. Diferenciación la función de los osteoclastos regulada por el RANKL y RANK (Takahashi N, 2002). La PTH, la 1,25 vitamina D, la IL-1 y la IL-6 estimulan la expresión de RANKL del osteoblasto (adaptación del capítulo "Osteoclast generation" de Takahashi N ¹¹).

2.2.1.a. Paratohormona (PTH)

La PTH es una hormona cuya función principal es regular los niveles de calcio en sangre, de manera que la hipocalcemia incrementa su producción y la hipercalcemia, por el contrario, la disminuye. La concentración de Magnesio, las prostaglandinas, los agonistas adrenérgicos y la 1,25 vitamina D también modulan su secreción.

Cuando se une al receptor específico del osteoblasto, se incrementa la expresión del RANK-L y se disminuye la producción de OPG. Los cambios que se generan en la configuración del osteoblasto

desencadenan una serie de interacciones celulares que tiene como resultado el aumento del reclutamiento de proosteoblastos y la estimulación de la resorción ósea realizada por los osteoclastos.

En el riñón, la PTH disminuye la reabsorción de P en el túbulo contorneado proximal y aumenta la del Ca actuando sobre el túbulo contorneado distal. Además, facilita la conversión de la **25-hidroxitamina D -25(OH) Vit D-** en **1,25(OH)₂ Vit. D**.

Si bien es cierto que la PTH no tiene una acción directa sobre la absorción intestinal, hay que señalar que el aumento de la producción del 1,25(OH)₂ Vit. D renal como consecuencia de la acción de la PTH favorece la absorción de Ca y P intestinal.

2.2.1.b. Vitamina D

La vitamina D es una molécula liposoluble que engloba a la vitamina D3 (colecalciferol) y a la vitamina D2 (ergocalciferol). El ser humano puede sintetizarla endógenamente en la piel a partir del dehidrocolesterol de la epidermis por acción de la radiación UVB solar o puede adquirirla de manera exógena a través de la dieta. Estas formas son biológicamente inactivas y necesitan de una serie de transformaciones en nuestro organismo para poder ejercer su función¹².

En el hígado se produce el primer metabolito activo, la 25(OH) Vit D o calcidiol. Sin embargo, es en el riñón donde se sintetiza el metabolito más importante, la 1,25(OH)₂ Vit. D o calcitriol. Sus niveles dependen del α 1-hidrolasa renal, que se activa cuando aumenta la PTH o disminuye la calcemia o la fosforemia.

La $1,25(\text{OH})_2$ Vit. D favorece la absorción del Ca y P intestinal e incrementa la reabsorción de P renal. En el hueso, actúa sobre los receptores de los osteoblastos activando la formación ósea. Además, regula indirectamente la mineralización ósea incrementando la síntesis de colágeno, osteocalcina, osteopontina y FA.

2.2.2.c. Calcitonina

La calcitonina es una hormona producida en las células C del tiroides y su acción consiste en disminuir la calcemia. Su síntesis es estimulada por el aumento de la calcemia.

En el riñón disminuye la reabsorción del Ca y P, mientras que en el hueso disminuye la resorción ósea actuando principalmente sobre los osteoclastos.

2.2.2.d. Citocinas y Factores de crecimiento

Las citocinas son moléculas solubles, principalmente proteínas de bajo peso molecular, que tras unirse a un receptor de membrana celular específico desempeñan una función concreta en las relaciones entre células. Esta interacción genera una cascada de señales intracelulares que modifica la expresión génica de la célula diana. Su producción se limita brevemente mientras dura el estímulo y actúan de manera paracrina o autocrina.

Las citocinas reciben distintos nombres en función si actúan sobre linfocitos (linfocinas), monocitos (monocinas) o células hematopoyéticas (interleucinas). Son pleiotrópicas, es decir, ejercen múltiples efectos debido a que afectan a diferentes líneas celulares. Asimismo, distintas citocinas pueden tener el mismo efecto sobre la

célula diana, incluso, pueden actuar de manera sinérgica o antagónica.

Una de las funciones más importantes es la regulación del sistema inmunitario y de la inflamación. Se consideran citocinas proinflamatoria a las IL-1, IL-6, IL8, IL-12, IL-16, el TNF- α y los IFN-10, IFN-11 e IFN-12; mientras que la IL-4 y IL-10 tienen una función antiinflamatoria. Por otro lado, hay una serie de citocinas como la TGF- β y BMP que actúan como factores de crecimiento.

Los factores de crecimiento son un grupo de sustancias que estimulan la mitosis o la diferenciación celular. Actúan de manera endocrina, paracrina o autocrina. El TGF- β , FGF, PDGF, IGF-1 e IGF-2 tiene acción sobre los osteoblastos mientras que la IL-1, IL-6, el TNF- α , el IFN- α y el GM-CSF lo hacen sobre los osteoclastos (Tabla 1).

Estimulan la formación ósea	
Factores de crecimiento	Citocinas
IGF-1	IL-3
IGF-2	IL-4
BMP (2,4,6,7)	IFN
TGF- β	OPG
PDGF	
VEGF	
Estimulan la reabsorción ósea	
Factores de crecimiento	Citocinas
TNF- α	IL-1
EGF	IL-6
PDGF	IL-8

FGF	IL-11
RANKL	PGE
M-CSF	PGE-1
GM-CSF	PGG-2
	PG-12
	PGH-2

Tabla 1 Tabla factores de crecimientos y citocinas ¹³

La vía de señalización Wnt es un grupo de vías de transducción de señales formadas por proteínas que transmiten la información del exterior celular al interior de esta mediante diferentes receptores. En el hueso, estas proteínas se unen a los receptores de las células madres y progenitores, de manera que perpetúan su autorrenovación y proliferación e inducen la diferenciación de las células osteoprogenitoras.

2.2.2.e. Otras

La **vitamina C** o ácido ascórbico es una molécula esencial que es soluble en el agua, tiene una acción antioxidante y participa en diferentes procesos de síntesis proteica. En el hueso contribuye a la formación de la matriz ósea favoreciendo la síntesis de colágeno mediante la hidroxilación de la prolina.

La **vitamina A** es un grupo de moléculas liposolubles que está involucrada en diferentes procesos del crecimiento y desarrollo. En el hueso se ha demostrado que aumenta la resorción por parte de los osteoclastos.

La **(GH)** como la **IGF-1**, estimulan la proliferación osteoblástica y la producción de osteoide.

Los **estrógenos** tienen un papel importante en la disminución de la resorción ósea y tanto los osteoclastos como los osteoblastos expresan receptores para dicha hormona. Por su parte, los andrógenos tienen un efecto anabólico óseo y actúan por medio de los receptores de los osteoblastos.

Las **Hormonas Tiroideas, T3 y T4**, aunque estimulan los osteoblastos y osteoclastos, finalmente tienen un balance negativo en la formación ósea. A su vez, los **corticoides** disminuyen la formación ósea, inhiben la absorción de Ca y Vit D en el intestino, incrementan la eliminación urinaria de Ca y aumenta el catabolismo proteico. Además, disminuyen la síntesis de colágeno y mucopolisacáridos.

3. Relación inmunología con metabolismo óseo

3.1. Conceptos básicos inmunidad

- Antígeno: cualquier molécula reconocida por las **Ig** o los **TCR**
- Inmunógeno: antígeno que desencadena la RI.
- Epítipo: región del antígeno que se une con el anticuerpo. Un antígeno puede tener diferentes epítopos para diferentes anticuerpos.
- Idiotipo: zona del anticuerpo que se une al Epítipo
- Hapteno: sustancia no proteica de bajo peso molecular que no son inmunógenos por sí mismos, pero que para desencadenar la RI necesitan de la unión a una molécula mayor denominada “*Carrier*” o portador.
- Isotipo: es la clase de la Ig y son 5 (G, A M, E y D)
- CD: son moléculas marcadoras de la superficie, reconocidas por determinados anticuerpos, que permiten identificar el tipo de célula, el estado de diferenciación y la activación de la misma¹⁴. Desempeñan diferentes funciones, entre ellas la de actuar de receptores importantes de la célula, también pueden iniciar la cascada de señalización que altera el comportamiento celular o incluso, participar en la adhesión celular ¹⁵.

3.2. Generalidades

El Sistema Inmunitario (SI) es el encargado de proteger al organismo de las distintas sustancias ajenas al mismo, así como de los patógenos externos. También es capaz de reconocer y tolerar los agentes no patológicos. Las células y moléculas solubles del SI se encuentran

distribuidos por todo el organismo y es en el aparato digestivo donde se encuentra en mayor concentración. Se diferencian dos tipos de inmunidad: la inmunidad innata o inespecífica y la inmunidad adaptativa o específica.

La **inmunidad innata** proporciona una defensa inicial contra sustancias extrañas y agentes patógenos. Está compuesta por diferentes tipos de barreras. Las barreras físicas la forman la epidermis, dermis y submucosa. Las barreras celulares son las células fagocíticas (polimorfonucleares -PMN- y el sistema monocito-macrófago), células dendríticas y células agresoras naturales (linfocitos natural killer -NK-). Por último, la barrera humoral está constituida por el complemento, lisozima e interferón. Este tipo de inmunidad inespecífica, se caracteriza por estar siempre presente y ejercer una acción inmediata sin necesitar un tiempo de latencia para su activación.

La inmunidad innata no desarrolla memoria inmunológica ni es capaz de generar una respuesta específica contra un determinado antígeno. Sin embargo, puede reconocer determinados patrones de estructura que son compartidos por un amplio grupo de microorganismos **PAMP** (pathogen-associated molecular patterns) así como señales endógenas de daño tisular **DAMP** (damage-associated molecular patterns). Ambos se unen a los receptores de membrana de las células de la inmunidad innata **PRR** (pattern recognition receptor), de los que destacan los receptores **TLR** (toll like receptor) y los **NLR** (nod like receptor).

La **inmunidad específica** o adaptativa se caracteriza por generar una respuesta específica contra un antígeno determinado y el resultado provoca la proliferación de las células inmunitarias que están

preparadas para responder a dicho antígeno. Esta respuesta se conoce como memoria inmunitaria y permite al organismo responder de una forma más rápida y precisa en exposiciones posteriores.

Los linfocitos son las células principales de este tipo de inmunidad y se distribuyen en acumulaciones difusas o en órganos concretos. Se diferencian dos grandes grupos de órganos linfoides: **órganos linfoides primarios o centrales** y los **órganos linfoides secundarios o periféricos**. En los órganos linfoides primarios se originan y desarrollan las células inmunitarias mientras que en los órganos linfoides secundarios se produce el contacto de los linfocitos maduros con los antígenos.

La médula ósea y el timo son órganos linfoides primarios. Los linfocitos B (LB) son responsables de la inmunidad humoral y se originan y maduran en la médula ósea. Por su parte, los linfocitos T (LT), aunque se originan también en la médula ósea, se diferencian, maduran y adquieren la inmunocompetencia en el timo durante los primeros años de la vida. Sin embargo, la producción y maduración de los LT en el adulto tiene lugar en la médula ósea.

Los ganglios linfáticos, el bazo y el tejido linfoide asociado a mucosa (**MALT**) son órganos linfoides secundarios. Si bien es cierto que los procesos de estimulación antigénica y proliferación linfocitaria son similares en los tres órganos, se debe destacar que una de sus diferencias fundamentales es la forma en la que el antígeno entra en contacto con el SI. Así pues, en los ganglios linfáticos el antígeno accede a través de la linfa, en el bazo lo hace por medio de la sangre y en el tejido MALT el contacto se establece directamente de la luz intestinal.

El MALT se ubica en la submucosa a lo largo del tubo digestivo, lo configura la concentración de tejido linfoide que está en las zonas de acceso de los microorganismos y facilita una respuesta inmunitaria local en la superficie de las mucosas. En el intestino se conoce como placas de Peyer y la población predominante son LT.

La respuesta inmunitaria (RI) se denomina a la serie de procesos que suceden cuando penetra el antígeno en el organismo y entra en contacto con el SI, consta de una serie de fases. El primer paso es el reconocimiento del antígeno por las células inmunitarias. A continuación, se inicia la activación y proliferación de los linfocitos específicos a dicho antígeno durante un periodo de latencia en el que se forman clones. Finalmente se genera la respuesta efectora del sistema inmunitario sobre el antígeno.

Hay dos grandes grupos de RI: la respuesta inmunitaria humoral y la respuesta inmunitaria celular. Los anticuerpos desarrollan un papel fundamental en la inmunidad humoral, son producidos por los LB y están coordinados por los LT colaboradores Th2. La inmunidad celular está regulada por linfocitos T colaboradores Th1, y aunque la respuesta efectora puede ser muy heterogénea, generalmente destruyen directamente el patógeno por medio de los LT citotóxicos o activan a los macrófagos para que fagociten los patógenos.

3.3. Células implicadas

3.3.1. *Células presentadoras de antígeno*

Las células presentadoras de antígeno (**CPA**) son aquellas que son capaces de presentar antígenos exógenos por medio del complejo

mayor de histocompatibilidad HLA-II. Pueden ejercer como tal las células monocito-macrófagos, células dendríticas y los LB.

3.3.2. Linfocitos B

Los **LB** son células que sintetizan los anticuerpos que se unen a antígenos específicos. Tanto en reposo como activados presentan HLA-I y HLA-II ya que también pueden actuar como CPA. Generalmente, necesitan de la ayuda de los LT colaboradores Th2 para producir su respuesta.

Los LB maduros que se encuentran en reposo (LB vírgenes) expresan en su superficie IgM e IgD y cuando interaccionan con el antígeno, iniciando un proceso de activación y proliferación que está mediado con los LT. Durante este proceso, la célula plasmática originada de la activación del LB es capaz de secretar la IgM que presentaba en membrana. Posteriormente, algunos clones experimentan un cambio de clase de Ig en el que segregarán IgG e IgA en vez de IgM. Este cambio de clase necesita de la sinapsis inmunológica con el LT a través del receptor de membrana **CD40** presente en LB y el **CD40L (CD154)** del LT.

Además de Ig en su superficie, los LB presentan el RCB, CD19, CD21 y CD 20.

3.3.3. Linfocitos T

Los **LT** poseen en su superficie el receptor de célula T (TCR, por sus siglas en inglés T Cell Receptor) y a diferencia de las Ig no se excreta. Suponen el 75-85% de la población linfocitaria, de los que dos tercios son CD4 (reconocen el HLA-II) y un tercio son CD8 (HLA-I). Dado que

pueden ejercer diferentes funciones, se les categorizan en **LT reguladores**, **LT colaborados** y **LT citotóxicos**.

El **TCR** está compuesto por 2 cadenas y se le denomina **$\alpha\beta$** o **$\gamma\delta$** en función del tipo de cadena que participe en su configuración. El 95% de LT de sangre periférica tienen el TCR compuesto con las cadenas **$\alpha\beta$ (TCR-2)** mientras que un pequeño porcentaje está formado por las cadenas **$\gamma\delta$ (TCR-1)**. La población de LT $\gamma\delta$ se encuentran en mayor proporción en los LT intraepiteliales de las mucosas, no suelen expresar el CD4 ni CD8 y, aunque se desconoce su función exacta, se sospecha que están implicados en procesos de tolerancia antigénica. Tal es el caso que en desordenes asociados a problemas de tolerancia como puede ser la celiaquía (intolerancia al gluten), se ha observado que existe un mayor porcentaje de LT $\gamma\delta$ en la mucosa duodenal de pacientes afectos respecto a individuos no celíacos ¹⁶.

3.3.3.a. Sinapsis inmunológica

Para que se desencadene la RI es necesario que se cumplan una serie de fases de señalización durante la sinapsis inmunológica entre el LT y la CPA.

En primer lugar, el TCR de los LT ha de reconocer al antígeno, para ello, la CPA debe presentarlo junto una moléculas del CPH. En humanos, este CPH se conoce como HLA y existen dos clases: el HLA I encargado de presentar antígenos endógenos y el HLA II destinado a péptidos de origen exógeno. Las células con capacidad fagocítica y los linfocitos B presentan HLA-II de manera constitutiva y solo los linfocitos T activados lo hacen transitoriamente.

La unión entre el **TCR** del LT y el antígeno presentado por el **HLA-II** de la CPA origina la **primera señal de activación** de la sinapsis. Tras

producirse esta unión, la señal se transmite al interior de la célula mediante el **CD3**.

Se necesita de una **segunda señal o coestimulación** antigénica para que el LT se convierta en célula efectora. En ella intervienen el **CD28** del LT y el **B7 (CD80 o CD86)** de la CPA. Si esta segunda unión no se produce, el LT no se puede transformar en célula efectora y entra en anergia clonal. La anergia es uno de los mecanismos de adquisición de tolerancia inmunológica en órganos periféricos. La tolerancia consiste en un estado de ausencia de reactividad específica para antígenos concretos que se adquiere activamente.

La **tercera señal** es la **modulación** de la RI por parte de las citocinas (IL-4 y IL-12, entre otras) presentes en dicho microambiente. Al final del proceso, se obtiene un LT activado con una expresión fenotípica que debe presentar en su superficie el TCR-CD3 y CD28.

Aunque el TCR tiene una gran especificidad por el antígeno, presenta una baja afinidad. Para estabilizar la sinapsis entre LT y CPA se necesita otra molécula accesoria que se una con el CPH. Para el HLA-I es la molécula **CD8** y en el HLA-II el **CD4**.

En fases iniciales de la activación del LT se produce una regulación por medio del **CD152 (CTLA4 -antígeno 4 del linfocito T citotóxico-)**. Esta molécula de membrana del LT interacciona con el B7 del CPA que a su vez compite con el CD28 del LT. El resultado de la unión del CD152 es la desactivación del LT.

3.3.3.b. Tipos de LT

Según su grado de activación los LT pueden ser **LT quiescentes** (vírgenes o en reposo) o **LT activados** (efectores). Los LT quiescentes

presentan en su superficie CD45Ra. Por su parte, los LT activados deben presentar el CD25 (receptor de alta afinidad para la IL-2), el CD69 (marcador precoz de activación) y el HLA-II (marcador tardío de activación).

Fenotípicamente, el LT maduro periférico expresa en su superficie el TCR, CD2, CD3, receptor para las lecitinas, fitohemaglutinina, concanavalina A y, dependiendo del tipo de CPH que reconocen, CD4 o CD8.

Generalmente, los LT CD4 ejercen una función colaboradora con la inmunidad celular y la humoral, estos linfocitos son conocidos como **LT CD4 helper 2**. No obstante, hay que destacar un pequeño porcentaje de LT CD4 con actividad citotóxica.

Por su parte, los LT CD8 presentan una actividad mayoritariamente citotóxica aunque existe una pequeña proporción de LT, los **LT CD8 helper 2**, que desarrolla una función colaboradora en la respuesta de anticuerpos.

Los **LT memoria** son los LT que permanecen en reposo tras haber sido anteriormente activados durante la respuesta primaria. En el momento que entran en contacto con el antígeno desencadenan una respuesta rápida, selectiva e intensa. En su superficie presentan CD45-Ro y carecen de CD62L.

3.3.3.c. LT efectores

Los linfocitos T citotóxicos (Tc) reconocen el antígeno asociado al CPH de la membrana de otras células y lisan la célula diana. Precisan de la colaboración de los **LT Th1** e intervienen la IL-2, IFN- γ y TNF- α .

Aunque suelen ser CD8, hay un pequeño porcentaje que reconocen el HLA-II y por lo tanto expresan el CD4 en su superficie.

Los Th modulan la RI ayudando a otras células inmunitarias mediante la secreción de citocinas. Pueden ser CD4 o CD8.

La conversión de un linfocito virgen Th en los distintos subtipos está influida por diversos factores, tanto adquiridos como genéticos. Uno de los más importantes es la citocina que coestimula al Th en el momento en que reconoce el antígeno. Así, el LT virgen se convertirá en Th1 cuando predomine la IL-2, si por el contrario es la IL-4 lo hará en Th2, si existiera un ambiente abundante en TGF- β , IL-10 e IL-2 la transformación se facilitaría hacia Treg y, por último, la presencia de TGF- β hace que la célula se diferencie a Th-17^{17,18}.

A su vez, los diferentes subtipos de Th desempeñaran distintas funciones

- Th1: producen principalmente IL-2 e IFN- γ . Están involucradas en la RI celular de manera que potencian la acción de LT citotóxicos, NK y macrófagos.
- Th2: producen IL-4, IL-5 e IL-6 e intervienen en la RI humoral
- Th3: producen IL10 y TGF- β . Se les denominan Treg pues ejercen funciones reguladoras o inhibitorias. Presentan en su superficie marcadores CD25 y FOXP3.
- Th17: producen IL-17 e IL-22 e interviene en procesos inflamatorios e infecciones fúngicas y bacterianas. Su disregulación parece estar implicada en la fisiopatología de algunas enfermedades inmunológicas.

3.4 Variaciones del estado inmunológico

El estado inmunitario del individuo fluctúa no solo en condiciones patológicas, sino que también lo hace en diferentes estados fisiológicos. Por ejemplo, en el paciente anciano se ha demostrado como se instaura gradualmente un estado proinflamatorio en el que se incrementa la proporción de linfocitos Tc (CD8) y las citocinas proinflamatorias IL-2, IFN- γ y TNF- α ¹⁹⁻²².

Por su parte, en pacientes con fractura de cadera se ha observado que existe, asociado a la edad, un descenso del porcentaje y número de linfocitos Th CD4 ²³. Otra característica inmunológica relacionada con el envejecimiento es la disminución de la coestimulación CD28 de los LT ²¹ que se traduce en la pérdida de la función citotóxica de los LT CD8. Se ha de puntualizar que la disminución de la expresión del CD28 se asocia con el aumento de la supervivencia de los LT autorreactivos, la supresión de la función de CPA de las células dendríticas y la producción de grandes cantidades de IFN- γ . En definitiva, hay indicios suficientes que en el paciente anciano se producen cambios que conllevan el establecimiento de una situación proinflamatoria ^{24,25}.

4. Osteoporosis

4.1. Concepto

La patología ósea metabólica engloba numerosas enfermedades como el raquitismo, la osteomalacia, la osteodistrofia renal o las osteopatías endocrinas. De ellas, la osteoporosis es la más frecuente y produce una disminución de la masa ósea que supone una pérdida del mineral óseo y de la matriz colágena.

La osteoporosis es un trastorno esquelético crónico de carácter sistémico en el que, además de disminuir la masa ósea, se altera su microestructura y se reduce su resistencia. Como resultado se produce un aumento de la fragilidad ósea y del riesgo de fractura ²⁶. Tal como se indica, dicho riesgo de fractura no solo depende de la pérdida de masa ósea, sino también de otros elementos como la alteración de su microestructura. Es por ello que se deberían tener en cuenta todos estos factores de riesgos para realizar una valoración ósea idónea. Sin embargo, en la práctica habitual, generalmente, solo se tiene en cuenta la determinación de la masa ósea ^{27,28}.

Aunque no se puede calcular directamente la resistencia ósea *in vivo*, en la práctica clínica se utiliza la determinación de la DMO para predecir el riesgo de fractura pues se correlaciona altamente con la resistencia ósea ²⁹.

La DMO se mide mediante técnicas densitométricas y determina la cantidad de masa ósea por unidad de volumen (densidad volumétrica, g/cm³) o por unidad de superficie (densidad de área, g/cm²). Los diferentes métodos de densitometría se basan en el principio de la absorciometría de los rayos X por parte del hueso, de ellos el más utilizado es la DXA. Aunque también se emplea la DXA de columna

lumbar, la localización de referencia para realizar el diagnóstico de osteoporosis es la DXA de cuello femoral ^{27,30}.

La DMO se expresa mediante el “*Z score*” o el “*T score*”. El “*Z score*” describe el número de en el que la DMO de un individuo difiere del valor medio esperado para la edad y el sexo. El “*T score*” describe el número de desviaciones estándar en el que la DMO de un individuo difiere del valor medio esperado en individuos jóvenes y sanos.

La Organización Mundial de la Salud ha definido los criterios diagnósticos de osteoporosis basándose en los valores de la DMO. De esta manera, la define como un valor de DMO igual o superior a 2,5 desviaciones estándar por debajo de la media de las mujeres jóvenes adultas (*T score* menor o igual a -2,5 desviaciones estándar)²⁷.

Atendiendo a los criterios de la OMS, se calculó en 2010 que 22 millones de mujeres y 5,5 millones de hombres de la UE padecían osteoporosis. De igual manera, se estimó que 3,5 millones de nuevas fracturas podían ser secundarias a la osteoporosis, de las cuales 610.000 correspondían a fracturas de cadera ⁶.

La enfermedad cursa de manera asintomática hasta que se produce una fractura como consecuencia de un traumatismo de baja energía. Las fracturas son las únicas manifestaciones clínicas y en ellas es donde radica la importancia de este trastorno. Se entiende como "baja energía" a todo traumatismo o caída desde una altura de bipedestación o inferior a ella que en un individuo sano no daría lugar a una fractura ⁶.

Las dos circunstancias que condicionan el riesgo de padecer osteoporosis son la cantidad de hueso que se alcanza durante el crecimiento hasta alcanzar el pico óseo y la tasa de pérdida ósea dependiente de la edad. Aunque existe cierto componente genético en

su génesis, son los factores ambientales quienes tienen mayor carga en el desarrollo de la enfermedad ³¹.

4.2. Fisiopatología

Una vez ha finalizado el crecimiento del esqueleto, el recambio del tejido óseo y el mantenimiento de su estructura es llevado a cabo por la remodelación ósea. Mediante este proceso, que requiere de un preciso ajuste entre formación y resorción ósea, se consigue reparar las microfracturas y se previene la aparición de fracturas en individuos sanos.

La osteoporosis posmenopáusica es una enfermedad esquelética que se genera como consecuencia del cese de la función ovárica. Esta deficiencia estrogénica junto factores genéticos y no genéticos tienen un importante impacto en el esqueleto ^{32,33}.

La disminución de los niveles de estrógenos en la menopausia ejerce una potente estimulación de la reabsorción ósea y, en menor medida, de la formación ósea, lo que conduce a un periodo de rápida pérdida de hueso ³⁴. A esta fase inicial le sucede otra más lenta y prolongada en la que la pérdida ósea afecta principalmente al hueso cortical.

Aunque los andrógenos también contribuyen en el mantenimiento del hueso cortical y trabecular en hombres ^{35,36}, se ha visto que la regulación ósea depende principalmente de la conversión periférica en estrógenos ³⁷. Es por ello, que el déficit de estrógenos en hombres tiene un efecto dramático en la homeostasis ósea ³⁸.

La caída de estrógenos estimula la formación ³⁹ y prolonga la supervivencia de los osteoclastos ⁴⁰. Una posible explicación se debe a la pérdida de los efectos inmunosupresores de los estrógenos sobre

la producción de citocinas que promueven la osteoclastogénesis ^{40,41}. En esta situación, el principal promotor de la estimulación de la osteoclastogénesis es el incremento de la producción del RANKL y TNF- α ⁴².

Los estrógenos además de inhibir la respuesta de las células precursoras de osteoclastos frente al RANKL, regulan la producción de la IL-1, el receptor de IL-1, el TNF- α , el M-CSF, el IL-6 y el receptor IL-6 ⁷. Dichas citocinas y receptores de citocinas tienen una acción resorptiva sobre el hueso.

El sistema inmunitario es fundamental para controlar la DMO. El RANKL es la principal citoquina implicada en la diferenciación de los osteoclastos ⁴³ y es producida en la medula ósea por las células mesenquimales, los osteoblastos y los osteocitos ⁴⁴⁻⁴⁷. En estados inflamatorios, los linfocitos CD4 activados también son capaces de producir RANKL ^{44-46,48,49} además de otras citocinas osteoclastogénicas como la IL-17 y el TNF- α ^{7,50,51}. Es por ello que cambios en la activación de los linfocitos T pueden afectar la diferenciación de los osteoclastos ^{49,52}.

Se ha demostrado que se produce un aumento en la secreción de RANKL y el TNF- α por parte de los LT CD4 en ratones con osteoporosis tras la ovariectomía ⁵³. Sin embargo, esta pérdida ósea no se observa en ratones ovariectomizados con deficiencia de LT CD4 ⁵⁴ ni en los que los LT que han sido bloqueados con anticuerpos anti-CD4 y anti-CD8 ⁵⁵. Paralelamente, se ha demostrado en mujeres menopaúsicas que existe una mayor producción de RANKL y TNF- α procedente de los LT CD4 en sangre periférica con respecto a mujeres premenopáusicas ⁵⁶. También se ha constatado que los monocitos, al igual que los LT, pueden secretar TNF- α en estas condiciones de déficit

de estrógenos ⁵⁵. Por tanto, hay evidencia suficiente para afirmar que en la menopausia son necesarios los LT CD4 productores de TNF- α para se produzca la destrucción ósea debida al déficit de estrógenos (Ilustración 3) ^{44,45,56,57}.

Tal como se ha señalado previamente, los LT CD4 están formados por subconjuntos Th1, Th2, Th17 y Treg. Los **Th1** y **Th2** secretan IFN- γ e IL-4, respectivamente, y como resultado favorecen la inhibición de la osteoclastogénesis. Las células **Treg** secretan además IL-10, CTLA4 (que puede unirse a CD80/CD86 en los precursores de osteoclastos) y promueven la apoptosis y la inhibición de la resorción ósea ⁴². Los **Th17** inducen la osteoclastogénesis mediante la producción de niveles elevados de IL-17A, TNF- α , RANKL, IL-1 e IL-6 y de niveles bajos de IFN- γ ⁵⁸⁻⁶¹.

Una de las citocinas más relacionada con la osteoclastogénesis es la **IL-17A**, cuyos niveles están incrementados en mujeres posmenopáusicas que padecen osteoporosis ⁶²⁻⁶⁴. La IL-17A estimula la liberación de RANKL por parte de las células osteoblásticas ⁶⁵ y también, intensifica la actividad osteoclastógena de RANKL aumentando la expresión de RANK en las células precursoras del osteoclasto ⁶⁶. Otro hecho por el que cobra especial relevancia dicha citocina es la confirmación de que tras el bloqueo del receptor de IL-17 ⁶⁷ o la administración de anticuerpos anti-IL-17 ⁶⁸ en ratones postovariectomizados se previene la pérdida ósea.

Asimismo, se ha observado como en ratones ovariectomizados se produce una estimulación de la diferenciación de los linfocitos CD4 vírgenes hacia Th17 maduros ⁶⁹. Este fenómeno está favorecido por citoquinas como el TGF- β , la IL-6 y la IL-1 β y el TNF- α ⁷⁰⁻⁷³ cuya

producción se encuentran desregulada por la deficiencia de estrógenos ⁴².

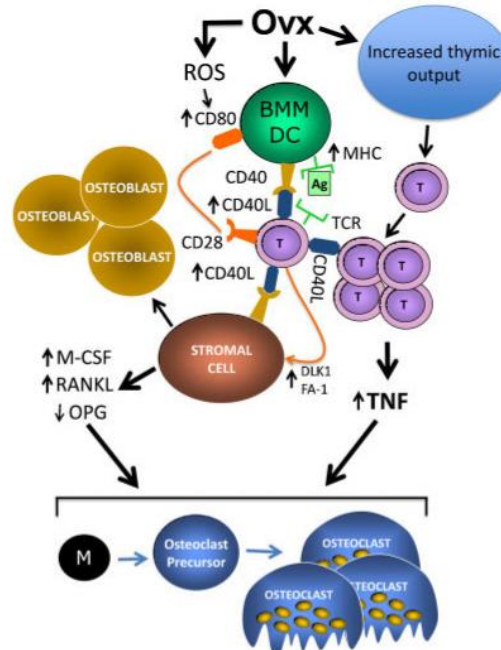


Ilustración 3. Representación esquemática del papel de los LT en el mecanismo por el que el ovariectomía promueve la osteoclastogénesis.

La deficiencia de estrógenos promueve la activación de los LT al aumentar la interacción de las moléculas del MHC cargadas de antígenos (Ag) de los macrófagos de la médula ósea (BMM) y las células dendríticas (DC) con el TCR de los LT. Puede que estos Ag sean péptidos exógenos procedentes de la microbiota intestinal

La activación de los LT también requiere por lo menos de dos señales coestimuladoras proporcionadas por la unión de las moléculas de superficie CD40 y CD80 (B7) de los BMM y las DC y las CD40L y CD28 de los LT, respectivamente. El incremento de la expresión de CD80 de las DC se produce como consecuencia del aumento de la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO).

La expansión clonal de los LT en la médula ósea se debe en parte a un aumento de la producción tímica de LT vírgenes inducido por la ovariectomía. Los LT activados secretan TNF- α , que estimula la formación de osteoclastos principalmente al potenciar la respuesta al RANKL. Además, el CD40L y el DLK1/FA-1 expresados por los LT aumentan la actividad osteoclástica de las células estromales (SC) al reducir su secreción de OPG y aumentar su producción de RANKL, M-CSF y otros factores proinflamatorios (Ilustración original de "Role of T cells in ovariectomy induced bone loss-revisited" Pacifici R. ⁴²).

Los estrógenos inhiben la diferenciación de los linfocitos Th17 mediante la acción de las citocinas IL-4, IL-10 y TGF- β 1 secretadas por los Tregs ⁷⁴. Los Tregs a su vez, también, pueden evitar de la pérdida ósea inhibiendo la diferenciación de los monocitos hacia osteoclastos ⁷⁵.

En definitiva, la osteoporosis por deficiencia de estrógenos es debida a la sobreexpresión de Th17 y el incremento de las diferentes citoquinas proinflamatorias (IL-1, IL-6, IL-17 y TNF- α) y el RANKL. En este estado de falta de estrógenos, la diferenciación y la expresión de Th1, Th2 y Tregs están suprimidas y por tanto hay una menor producción de citoquinas antiinflamatorias como el IFN- γ , la IL-4, la IL-10 y el CTLA-4. También está disminuida la producción de células B que producen OPG. Todo esto confluye en un aumento de la osteoclastogénesis y de la pérdida ósea (Ilustración 4) ⁷⁶.

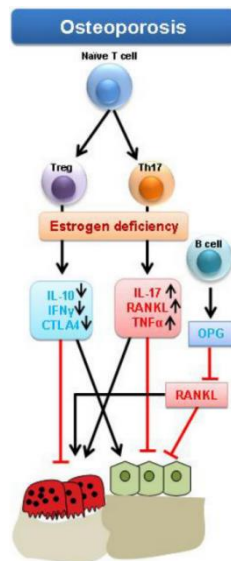


Ilustración 4. Osteoimmunología de las enfermedades óseas inflamatorias (Ilustración original de "Osteoimmunology: The Nexus between bone and immune system" "Dar et al ⁷⁶).

Tal como se puede observar, la osteoporosis posmenopáusica presenta muchos fenómenos que la relacionan con una enfermedad inflamatoria ⁷⁷, de manera que este déficit de estrógenos establece un estado inflamatorio crónico que conduce a la pérdida ósea. Por todo esto, se puede considerar que la pérdida ósea dependiente de los esteroides sexuales es una forma de pérdida ósea inflamatoria ³⁹.

4.3. Tipos de osteoporosis

Según la causa que la origine, la osteoporosis se clasifica en **osteoporosis primaria**, si la causa es desconocida, o **secundaria** cuando se conoce la causa (endocrina, genética, farmacológica...)

A su vez en la osteoporosis primaria y atendiendo a la edad se divide en **osteoporosis idiopática o primaria juvenil** y la **osteoporosis involutiva del adulto**.

Hay dos tipos de osteoporosis involutiva del adulto, la **postmenopáusica o tipo I** y la **senil o tipo II**. La posmenopáusica se da principalmente en mujeres entre los 55 y 75 años. Afecta sobre todo al hueso trabecular y predomina la actividad osteoclástica (aumenta la resorción). Son más frecuentes las fracturas intracapsulares de cadera.

La osteoporosis senil se da en mujeres mayores de 70 años y hombres mayores de 80 años. La proporción entre mujeres y hombres es 2:1. Se afecta el hueso trabecular y cortical y disminuye la función osteoblástica. En estos pacientes son más frecuentes las fracturas extracapsulares de cadera.

4.4. Factores de riesgo

Aunque el diagnóstico de la osteoporosis se centra en la valoración cuantitativa de la DMO, ya que es uno de los principales determinantes de la resistencia ósea, la importancia clínica de este trastorno radica en las fracturas que se producen. Sin embargo, la causa de estas fracturas es multifactorial ⁷⁸.

Se han identificado diferentes factores de riesgo que contribuyen al riesgo de fractura. Se pueden distinguir dos grandes grupos, los potencialmente **modificables** y los **no modificables**. Dentro de los últimos, se encuentran entre otros la raza caucásica, la diabetes mellitus, la enfermedad inflamatoria intestinal, la celiaquía, la osteogénesis imperfecta, la menopausia precoz, la amenorrea, la constitución delgada y las enfermedades endocrinas (hipogonadismo, hiperparatiroidismo, hipercortisolismo, hipertiroidismo, etc) ⁷⁹.

Por otra parte, los factores de riesgo modificables son: ser fumador, el exceso de alcohol, la inactividad, la malnutrición y anorexia, la amenorrea inducida por el ejercicio y medicaciones (glucocorticoides, hormonas tiroideas, diuréticos, anticonvulsivantes como la fenitoína, benzodiacepinas, antidepresivos, heparina, metotrexato) ⁷⁹.

4.4.1. Edad, sexo y antecedentes de fractura previos

Se ha demostrado que la edad, el sexo femenino y la historia previa de fractura ⁸⁰ son los principales factores de riesgo clínico asociados a la misma, sin embargo, tienen un valor predictivo escaso.

4.4.2. Densidad Mineral Ósea (DMO)

La medición de la DMO mediante la DXA es el método de elección en la evaluación del riesgo de fractura en el entorno clínico. Sin embargo, en más de la mitad de los casos, esta técnica presenta resultados dentro de los parámetros de la normalidad”⁸¹. Además, el riesgo de fractura por fragilidad excede al esperado en la DMO, cuando se asocia a otras circunstancias clínicas como la edad avanzada⁸², la diabetes, la obesidad⁸³ y la enfermedad inflamatoria intestinal⁸⁴. Por ello, la DMO no puede ser la única herramienta de medición del riesgo de fractura, ya que existen múltiples factores de riesgo añadidos que hay tener en cuenta a la hora de estimar la predicción de la misma. De hecho, la guías nacional inglesa (NICE National Institute for Health and Care Excellence) cuando evalúa el riesgo de fractura no incluye la DMO como técnica obligatoria de medición de este riesgo, debido entre otras cosas, a la falta de evidencia y la limitación que los estudios actuales presentan con respecto a la fiabilidad de dicha prueba.

4.4.3. FRAX

El FRAX® es la herramienta de medición predictiva más ampliamente utilizada y validada, ya que sirve para estratificar a los grupos de riesgo y el manejo de los mismo. Sin embargo, la herramienta FRAX® en ausencia de DMO, no ha demostrado mayor precisión en la predicción de fractura frente a un modelo simple en el que se use como factores de riesgo la edad y los antecedentes de fractura previa⁸⁵.

4.4.4. Necesidad de búsqueda de otros factores de riesgo: Microbiota

Por todo lo anterior, se necesita desarrollar nuevas herramientas de valoración del riesgo que sean más sensibles y que utilicen otros predictores clínicos de fracturas diferentes a la DMO. De esta manera, se podrá identificar con mayor precisión a los pacientes con mayor susceptibilidad de presentar una fractura de cadera por fragilidad. Si, además, estas nuevas herramientas se basan en factores de riesgo modificables, podría conseguirse una mejora considerable en la prevención primaria de este tipo de fracturas.

5. Microbiota

5.1. ¿Qué es?

El cuerpo humano está colonizado por una comunidad rica y diversa de microorganismos formada por especies de bacterias, hongos, virus y protozoos que se conoce como microbiota humana ⁸⁶.

Se denomina microbioma al conjunto de microorganismos, incluyendo sus genomas y los metabolitos que producen, que forman parte de un hábitat por ejemplo el intestinal humano ^{87,88}.

Cada región del cuerpo posee un hábitat característico que está condicionado por las especies que habitan en él y que evolucionan en función de la edad y estado fisiológico.

El término microbioma puede confundirse con el metagenoma. Sin embargo, este último se define exclusivamente como una colección de genomas y genes de los miembros de una microbiota ⁸⁹.

5.2. Contexto histórico

Como consecuencia de los continuos y recientes descubrimientos en el campo del microbioma humano, conviene plantearse cuándo la humanidad comenzó a ser consciente de su estrecha relación con las bacterias.

A mediados del siglo XIV, en plena epidemia de la Peste Negra en Europa, ya se sospechaba de la asociación contagiosa entre “gérmenes” y el ser humano. No obstante, no fue hasta 1683 cuando *Anton van Leeuwenhoek* observó los primeros “animáculos” en su microscopio rudimentario ⁹⁰. Tras comparar su microbiota oral y fecal, observó las sorprendentes diferencias de microorganismos entre estos

dos hábitats y también entre muestras de individuos con distintos estados de salud y enfermedad ^{91,92}.

En la segunda mitad del siglo XIX, *Louis Pasteur* y *Robert Koch* desarrollaron la Teoría Germinal de la Enfermedad con la que se establecía la causalidad entre una determinada bacteria y una enfermedad concreta. *Pasteur*, entre otras contribuciones científicas, descubrió los microorganismos que fermentaban el azúcar en alcohol y los de la acidificación de la leche. Por su parte, *Koch* desarrolló unos criterios lógicos y experimentales, que posteriormente fueron conocidos como los postulados de Koch, e identificó las bacterias causantes de la tuberculosis y el cólera. Gracias al avance de determinadas técnicas de visualización y cultivo, se entró en la llamada Edad de Oro de la Microbiología ⁹⁰.

Ilya Metchnikov, Premio Nobel en 1908 y profesor del Instituto Pasteur de París, sostuvo que las bacterias ácido-lácticas ofrecían beneficios para la salud y, de alguna forma, eran capaces de promover la longevidad de la vida. Tal es así, que en sus investigaciones planteaba la idea de que «la senilidad debe considerarse como consecuencia de una intoxicación crónica por la presencia de microorganismos en el intestino». Consideraba que la “flora intestinal” desempeñaba un doble papel, por un lado, defendía al organismo contra la infección y retrasaba el envejecimiento, pero por el otro lado podía convertirse en un elemento de autointoxicación. Propuso la posibilidad de modificar la “flora intestinal” potenciando sus componentes positivos y actuando contra los negativos. Además, tras observar la gran longevidad de los campesinos búlgaros que se alimentaban con grandes cantidades de yogur, intuyó que este producto era portador de bacterias positivas ⁹³.

Con el descubrimiento de la penicilina por parte de *Fleming* en 1928 y el uso de los antibióticos para tratar las enfermedades infecciosas en los años 40, se produjo un descenso de la mortalidad de dichas enfermedades. Paralelamente, se observó que los antibióticos favorecían el crecimiento de los animales de granja, incluido el tamaño de los huesos,^{94–96}. Estos efectos se han atribuido principalmente a los cambios de la microbiota residente en el intestino⁹⁷.

Posterior a estos avances, los científicos han sido cada vez más conscientes y han tenido evidencias sobre el impacto potencialmente negativo de la administración de antibióticos en seres humanos. Así, debido al surgimiento de cepas bacterianas resistentes a antibióticos o a la aparición de “superinfecciones” como consecuencia del sobrecrecimiento de bacterias tras la administración de antibióticos (como las producidas por el *Clostridioides difficile*), se produjo un cambio paulatino en la estrategia para el tratamiento de estos problemas. Un ejemplo es el uso de probióticos, que consiste en la introducción de organismos que contribuyen beneficiosamente al equilibrio microbiano del huésped⁹⁸.

El término microbiota fue acuñado por *Josua Lederberg* en 2001 con el fin de designar a «la comunidad ecológica de microorganismos comensales, simbióticos y patógenos que literalmente comparten nuestro espacio corporal y que han sido prácticamente ignorados como determinantes de la salud y la enfermedad»⁹⁹.

5.2.1. Problemas para analizarlo

Desde hace décadas se ha sospechado que el microbioma humano ejerce una labor fundamental sobre el organismo humano, sin embargo, hasta hace unos años no se ha podido corroborar la

implicación de determinadas especies bacterianas en procesos fisiológicos concretos. Esto se debe, en gran parte, a los problemas para reproducir en laboratorio las condiciones de crecimiento bacteriano. Esta dificultad de crecimiento en los cultivos convencionales supone que muchas de las especies sigan sin estar caracterizadas ¹⁰⁰ y que, además, gran parte de las relaciones entre las funciones fisiológicas del huésped y la microbiota no estén demostradas ¹⁰¹.

En el estudio de la microbiota se aplican técnicas moleculares basadas en la secuenciación masiva, especialmente las del gen que codifica la subunidad 16S del ARNr (gen ADNr 16S), así como herramientas de análisis masivo de datos (técnicas meta-ómicas) con el fin de analizar la estructura y función de un gran número de genes microbianos presentes en un ambiente determinado con el fin de establecer correlaciones con la expresión génica del huésped.

5.2.2. Auge en investigación

Dos circunstancias han supuesto un avance en el desarrollo de la investigación del microbioma: la evolución de nuevas técnicas de secuenciación genómica y el desarrollo de bases de datos que organizan toda la información generada.

5.2.2.a. PCR RNA 16s

La PCR es una técnica de laboratorio que permite producir rápidamente (amplificar) millones hasta miles de millones de copias a partir de un segmento específico de ADN para, posteriormente estudiarse con mayor detalle. La PCR requiere del uso de cebadores

y múltiples ciclos de síntesis de ADN para amplificar un segmento. Los cebadores son fragmentos de ADN sintético que seleccionan el segmento de ADN que se quiere amplificar ¹⁰².

La aplicación de la tecnología basada en la PCR del gen del ARNr 16s ha sido crucial para determinar las diferentes especies bacterianas, con la ventaja de no tener que cultivarlas. Este gen está presente en muchos microorganismos y está compuesto por regiones de expresión constantes que están flanqueadas por otras de expresión variables. Los cebadores de PCR que se acoplan a las regiones constantes son capaces de amplificar la región variable interna de un conjunto determinado de bacterias ¹⁰³. Así, estas regiones variables son secuenciadas y comparadas con una base de datos con el fin de identificar los organismos presentes.

Este tipo de secuenciación basada en el gen del ARNr 16S es un método rápido y barato ¹⁰⁴. Además, puede ser utilizado en estudios poblacionales, estudios de casos y controles o en estudios longitudinales que se centran en el cambio de los microbiomas a lo largo del tiempo.

Una vez recogida la muestra, se extrae el ADN bacteriano y se seleccionan las regiones variables del gen ARNr 16s para su secuenciación ¹⁰⁵. Hasta hace unos años, la identificación de bacterias se realizaba mediante la alineación de la secuencia y, según la similitud genética, se agrupan en OTUs para después incorporarse al análisis de asociación estadística ¹⁰⁶. Las secuencias taxonómicas operativas (OTU) se definen como agrupaciones de secuencias que tienen una identidad por encima de un umbral determinado (a menudo el 97%). Esto reduce el tamaño del conjunto de datos brutos de secuencias de ARNr 16S y por supuesto, reduce también los requisitos

computacionales para el análisis. Esto también absorbe los posibles errores técnicos en de secuencias. Pero los recientes avances metodológicos (procesado informático de datos de secuencia) de eliminación de ruido, que producen variantes de secuencia exactas o variantes de secuencias de amplicones (ASV). Por lo que ya no se trabaja con agrupaciones sino con secuencias reales o verdaderas lo que genera una mayor precisión que las OTU con un 97% de identidad. Por lo tanto, también hay que considerar que, dado su método de construcción, los ASV no son equivalentes a "OTU con un 100% de identidad", por lo que los resultados de sus análisis no son comparables ¹⁰⁷.

5.2.2.b. Procesamiento y análisis de datos: European MetHit y HMP

La creación del **Consorcio europeo MetaHIT** y del Proyecto del Microbioma Humano (**HMP**) han facilitado el desarrollo de herramientas bioinformáticas que permiten el procesamiento y el análisis de los datos.

El **consorcio europeo MetaHIT** se ocupa de establecer correlaciones entre el microbioma intestinal y los fenómenos adversos para la salud del individuo, entre los que se encuentran la obesidad y la enfermedad inflamatoria intestinal ¹⁰⁴.

El **HMP**, originado en Estados Unidos, se centra en la caracterización del microbioma humano sano y en la creación de un conjunto de datos que sirvan como control de referencia y sea accesible al público ¹⁰⁸. Se han caracterizado cinco comunidades principales del microbioma humano: el de las vías respiratorias, el de la piel, el oral, el intestinal y el vaginal ¹⁰⁹.

5.3. Variabilidad de la microbiota. Concepción actual

Casi todos los entornos albergan microbiomas distintos, incluidos los que se encuentran en el cuerpo humano. De esta manera, los microorganismos se distribuyen en las regiones externas (piel, bajo de las uñas u ojos), en las internas (riñones, vejiga, vagina e intestino) y en los portales de entrada al organismo (boca y nariz -vías respiratorias-, cavidad oral -tracto gastrointestinal-, tracto urogenital y las grietas de la superficie cutánea).

El microbioma humano ha conseguido implantarse en los distintos microambientes del huésped gracias a que se cumplen las condiciones óptimas para su crecimiento y al desarrollo de mecanismos adaptativos con los que influyen y modifican su ecosistema. Una vez adaptado al entorno, el microbioma humano suele ser estable y resistente. La cavidad oral y el intestino albergan las comunidades más diversas ¹¹⁰.

Los factores ambientales como la temperatura, el pH, la concentración de oxígeno, la presión, la osmolaridad y la fuente de nutrientes afectan a la abundancia y diversidad de microorganismos en las distintas localizaciones del cuerpo. Por ejemplo, la variación del pH de la piel, producida en ocasiones por presencia de fuentes de nutrientes como el sebo, facilitan el crecimiento de determinados grupos de microorganismos ¹¹¹.

La abundancia y diversidad de la microbiota humana depende de factores intrínsecos y extrínsecos. La región corporal, la genética, la etnia, el sexo y la edad corresponden a los factores intrínsecos. Los factores extrínsecos pueden provocar cambios transitorios o permanentes en la comunidad microbiana, y corresponden a la dieta,

la medicación, el estilo de vida, la ubicación geográfica, el clima y la estacionalidad ¹¹².

5.3.1. Núcleo del microbioma

La composición microbiana no solo varía entre las distintas regiones anatómicas, sino que también lo hace entre los individuos ¹⁰⁴. Esto implica que todavía no se haya podido concretar con exactitud cuál es la microbiota saludable para cada ecosistema.

Se puede entender el microbioma como una entidad dinámica, que crece y cambia junto con el hospedador, y que la irrupción de una enfermedad grave puede modificarlo por completo y para siempre, sin que esto conlleve a desenlaces fatales.

La introducción del concepto de “núcleo del microbioma” puede facilitar la diferenciación entre los miembros permanentes y estables de un microbioma específico y las poblaciones que pueden ser intermitentes, estar asociadas únicamente a estados específicos del microbioma o estar restringidas a condiciones ambientales concretas

¹¹³.

En términos de dinámica temporal y espacial, el núcleo del microbioma describe la comunidad microbiana que está constantemente asociada a un determinado genotipo de hospedador o a un entorno específico (Ilustración 5).

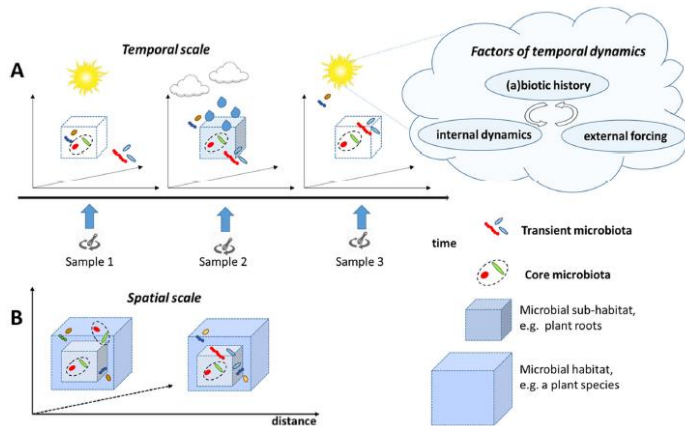


Ilustración 5. Dinámica del microbioma en el tiempo y a escala. a) La dinámica temporal del microbioma se caracteriza por considerar tanto el estado transitorio del microbioma como respuesta a perturbaciones ambientales y el estado residente que contiene un núcleo de microbiota más bien constante. b) La dinámica espacial del microbioma se caracteriza por variaciones en la composición microbiana entre hábitats similares separados en el espacio (Ilustración original de "Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges" Berg G.¹¹³).

5.3.2. Enfoque holístico

La importancia del microbioma radica, más que la composición microbiana, en su funcionalidad ya que diferentes especies microbianas pueden realizar funciones metabólicas equivalentes y una misma especie, diferentes funciones dependiendo de la dotación génica que lleven cepas de la misma especie ¹¹⁴.

Se considera al microbioma como un «órgano» imprescindible para la vida que influye en la salud y la enfermedad. Desde un enfoque

holístico, se ha introducido el concepto de *holobionte* para referirse a la relación entre hospedador y su microbiota, de manera, que coevolucionan como una entidad.

Según este enfoque, el estado de enfermedad del holobionte está relacionado con la disbiosis, la escasa diversidad de la microbiota asociada y su variabilidad: un estado denominado "patobioma". Por el contrario, el estado saludable se acompaña de eubiosis, alta diversidad y uniformidad de la microbiota respectiva ¹¹³.

Con todo ello, se puede definir al microbioma como una comunidad microbiana característica que ocupa un hábitat bastante bien definido y que posee propiedades fisicoquímicas distintas. El microbioma no sólo se refiere a los microorganismos implicados, sino que también abarca su ámbito de actividad, lo que da lugar a la formación de nichos ecológicos específicos. El microbioma, que forma un microecosistema dinámico e interactivo propenso a cambiar en el tiempo y la escala, está integrado en macroecosistemas que incluyen huéspedes eucariotas, y aquí es crucial para su funcionamiento y salud ¹¹³.

6. Microbiota intestinal

La población de microbiota que reside en el tracto intestinal es la más abundante del organismo, se estima que está constituida por alrededor de 10^{14} microorganismos e interactúa con las células del huésped desde la luz intestinal mediante diferentes mecanismos ¹¹⁵. La microbiota intestinal colabora en la digestión transformando las fibras no absorbibles y los carbohidratos en AGCC. Además, ayuda a mantener la integridad de la barrera intestinal, contribuye al desarrollo y la regulación del sistema inmune y sirve de defensa contra microorganismos perjudiciales.

El MI modula la respuesta inmune del huésped por medio de la regulación del desarrollo y la función de los LT y de la producción de citocinas. De esta manera es capaz de defenderse de los agentes patógenos o establecer fenómenos de tolerancia a determinados antígenos que puedan llegar con la ingesta de alimentos.

6.1. Estructura y evolución del MI a lo largo de la vida del individuo

El MI está formado por más de 1000 especies de microorganismos ¹¹⁶, de las cuales gran parte pertenecen a los filos Firmicutes y Bacteroidetes. La combinación del genoma de las distintas especies bacterianas constituye el metagenoma intestinal, que se estima que tiene 450 veces más genes que el genoma humano ¹¹⁷.

La MI coloniza nuestro organismo de manera progresiva tras el nacimiento y alcanza la composición del adulto entre los dos y tres años de edad (Ilustración 6) ¹¹⁸. La composición cambia en tres etapas

de la vida: desde el nacimiento hasta el destete, desde el destete hasta la obtención de una dieta normal y, por último, durante la vejez ^{112,119}.

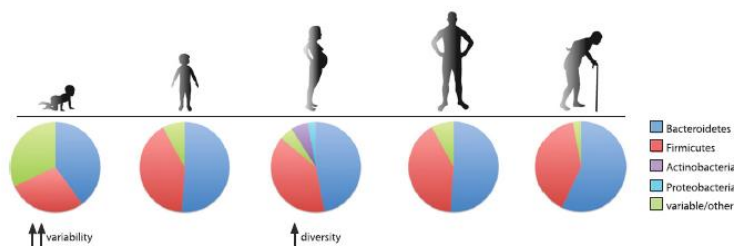


Ilustración 6. Estructura de la microbiota intestinal a lo largo de la vida (Ilustración original de "Exploring host-microbiota interactions in animal models and humans" Kostic AD ¹¹⁹)

Aun así, la microbiota intestinal puede sufrir cambios a lo largo de la vida debido a factores genéticos del huésped ¹²⁰, la dieta ¹²¹, la toma de medicamentos ¹²², el estado inmunitario del huésped ¹²³ y la edad ¹²⁴. Aunque la composición del MI individual suele permanecer relativamente estable en el adulto, es extremadamente variable en sujetos ancianos ¹²⁵. A partir de los 70 años, la disminución de la actividad inmunitaria y la modificación en la digestión de alimentos y la absorción de nutrientes por parte del intestino contribuyen a los cambios en el MI, ya que son más susceptibles a los patógenos, influyendo finalmente en el microbioma central ¹¹².

6.2. Funciones. Interacciones huésped-MI

Además de su consabido papel en la digestión, asimilación de nutrientes y síntesis de vitaminas (función trófica), el MI constituye un sistema biológico en equilibrio que controla la proliferación de patógenos.

La dieta del huésped puede afectar la composición del MI y en consecuencia modificar también la absorción. Una dieta alta en calorías se asocian con una reducción de la relación **Bacterioidetes/Firmicutes**¹²⁶ y puede provocar alteraciones metabólicas en el huésped, mientras que una dieta baja en calorías puede aumentar la concentración de sustancias nocivas en el tracto intestinal¹²⁷. Lo mismo sucede en dietas con un alto contenido en proteínas ya que puede incrementar la producción de compuestos tóxicos como sulfuro de hidrogeno y el metano¹²⁸. Por ello es necesario llevar una dieta equilibrada para evitar trastornos en la composición del MI que influyen en la absorción intestinal y, posiblemente en el metabolismo óseo.

Algunas especies de la microbiota intestinal pueden influir en la absorción de nutrientes de diferentes maneras. Grandes concentraciones de *Limosilactobacillus reuteri* (*Lactobacillus reuteri*) y *Bifidobacterium longum* en el intestino pueden favorecer la absorción de minerales (calcio, fosfato y magnesio) y así incrementar la DMO¹²⁹. En otros casos, el MI puede influir en la absorción del calcio modificando el pH del intestino^{130,131}. También son capaces de descomponer las macromoléculas en componentes más pequeños que para facilitar la absorción¹³² o desempeñar un papel esencial en la síntesis de la vitamina B y K que son fundamentales en la regulación ósea^{133,134}.

Además, ciertas poblaciones bacterianas establecen una relación simbiótica con las mucosas facilitando una actividad endocrina que ayuda a la digestión y estimula la proliferación y supervivencia de las células del epitelio intestinal¹³⁵. Estas comunidades de microorganismos también participan en la modulación de su sistema

inmune local y sistémico ¹³⁶; en la regulación de funciones metabólicas ¹³⁷, en el crecimiento del huésped ⁸⁶, el equilibrio energético ¹³⁸, o en los sistemas de comportamiento cerebral ¹³⁹.

6.3. Homeostasis microbiana intestinal

En condiciones normales, el MI facilita un equilibrio con el epitelio y el sistema inmunitario y, a su vez, ocupa un nicho específico que suprime la colonización y crecimiento de patógenos. Se puede alterar este equilibrio mediante la acción de patógenos, antibióticos o la dieta ¹⁴⁰. Un cambio en la composición o, sobre todo, en la diversidad del MI puede provocar un desequilibrio drástico entre las bacterias beneficiosas y las potencialmente patógenas. Este desequilibrio microbiano se denomina "disbiosis", y se define como una alteración de la homeostasis del MI debida a un desequilibrio de los propios microorganismos, a cambios en su composición funcional y actividades metabólicas, o a cambios en su distribución local ¹⁴¹.

Se puede observar la presencia de un microbioma alterado en toda una serie de enfermedades. Las especies del género *Bifidobacterium* son habituales en el intestino humano sano y las alteraciones en los niveles de estas, o en la composición de las especies, suelen desencadenar situaciones de disbiosis del MI ¹⁴².

En esta situación, el MI pierde su capacidad protectora, se altera la permeabilidad intestinal y no se puede controlar la diseminación sistémica de las bacterias ¹⁴³. El aumento de la permeabilidad intestinal también permite la entrada de productos derivados microbianos, como metabolitos, factores de virulencia y otros componentes lumenales. Esto, a su vez, altera la función normal del microbioma intestinal y contribuye a generar respuestas inmunitarias

e inflamatorias aberrantes, como la inflamación ¹¹², la respuesta desregulada de los LT y la producción de las citocinas IL17, TNF- α , IL-1 β y RANKL ^{144–146}.

6.4. Base de distintas patologías

La disbiosis del MI puede desencadenar el desarrollo de patologías en el tubo digestivo o en otros órganos distantes como SNC, pulmones y las articulaciones ^{43,137,143,147}.

Se ha demostrado una clara asociación entre el microbioma y distintas afecciones crónicas en humanos, entre ellas: EII ¹⁴⁸, obesidad ¹³⁸, enfermedades metabólicas ¹⁴⁹, desnutrición ¹⁵⁰, trastornos neurológicos ¹⁵¹, cáncer ¹⁵², y enfermedad cardiovascular ¹⁵³.

La EII consiste en una inflamación gastrointestinal idiopática, crónica y recurrente con dos formas comunes: la CU y la EC. Se ha demostrado en la EC que el aumento en la proporción de *Escherichia coli* invasiva respecto a la *Faecalibacterium prausnitzii* y especies *Roseburia* (estas dos últimas productoras de butirato) estaba involucrada en la patogénesis de la afección ¹⁵⁴. La especie *F. prausnitzii* tiene funciones antiinflamatorias en el intestino y una modificación en su proporción puede hacer perder esta capacidad protectora ¹⁵⁵. Además, se ha observado que en la fase activa de la enfermedad existe un descenso de bacterias del género *Bifidobacterium* y que una vez superada, en la fase de remisión, se recupera la abundancia de estos microorganismos ¹⁵⁶.

Por otro lado, se ha asociado a la disbiosis intestinal con otros trastornos como la enfermedad celiaca, el CCR y el SII. Se ha descrito en pacientes con SII, un descenso de los géneros del filo Firmicutes,

como *Lactobacillus* y *Faecalibacterium*, y del filo Actinobacteria, como *Bifidobacterium* y *Collinsella*. Además, se ha observado un aumento de la abundancia de algunas familias de *Proteobacteria* (Enterobacteriaceae spp.) y de Firmicutes (*Veillonella*, *Streptococcus* y *Ruminococcus* spp.). Estos hallazgos revelan que la pérdida de determinadas poblaciones microbianas determina la disfunción de la barrera epitelial en pacientes con SII ^{112,157,158}.

Aunque se ha documentado en numerosos estudios la relación del MI con las enfermedades inflamatorias sistémicas ^{43,106,143,159}, no se ha esclarecido si las alteraciones de estas poblaciones bacterianas son la causa o la consecuencia de estas enfermedades.

Se ha descrito la asociación entre diferentes trastornos inflamatorios y autoinmunes del intestino con una masa ósea baja, lo que sugiere una conexión entre el intestino y el hueso ^{160,161}. Además, hay datos suficientes que corroboran la conexión entre el SI y el metabolismo óseo, así como la influencia reciproca entre MI y el SI del huésped. Por tanto, todo parece indicar que el MI podría influir sobre el metabolismo óseo a través de un SI alterado.

7. MI y metabolismo óseo

Las primeras evidencias que relacionaron el MI con el metabolismo óseo fueron la asociación de la pérdida ósea en la columna lumbar y el cuello femoral con el crecimiento excesivo de bacterias intestinales^{162,163}. De esta manera, se observó como los pacientes con sobrecrecimiento bacteriano intestinal presentaban osteomalacia, unos niveles elevados de citocinas inflamatorias (TNF- α e IL-1) y una mayor actividad de los osteoclastos. Además, se determinó un consumo aumentado de nutrientes por parte de las bacterias intestinales y por tanto una disminución de la absorción intestinal de calcio, fosfato y vitamina D¹⁶².

Aunque está aceptado que la malabsorción es un factor de riesgo importante para las enfermedades óseas, la pérdida ósea como consecuencia al sobrecrecimiento bacteriano no se debe únicamente a este déficit de absorción y probablemente está mediada por diversos mecanismos.

Se dispone de datos suficientes que avalan la teoría de la modulación de la masa ósea por la microbiota intestinal¹⁴³, aunque este mecanismo es complejo y poco conocido. El microbioma puede actuar sobre el sistema inmunitario (*osteoinmunología*)¹⁵⁹, las vías hormonales y por la producción de metabolitos bacterianos que actúan como señales para las células óseas¹⁶⁴.

Existen diversos estudios experimentales realizados en ratones, que evalúan el impacto del MI en la estructura y densidad ósea. Estos estudios se centran en ratones con el microbioma intestinal alterado. Para ello, se utilizan animales axénicos (especímenes libres de

gérmenes) o aquellos que poseen una MI modificada tras la administración de antibióticos ¹⁶⁵.

Los estudios en ratones axénicos han demostrado que el sistema inmunitario del MALT intestinal está poco desarrollado y que el número de LT CD4 del bazo están disminuidos. Estos hallazgos apoyan la hipótesis de que el MI es capaz de moldear la inmunidad del huésped ¹⁶⁶.

En los últimos años se ha estudiado el efecto del MI sobre el tejido óseo en animales. Aunque algunos resultados pueden resultar contradictorios, todo parece indicar, tal como se desarrolla a continuación, que el MI es un importante regulador de la DMO y actúa principalmente a través del sistema inmunitario.

7.1. Estudios con modelos animales

7.1.1. Estudios con animales libres de gérmenes

Existe la suficiente evidencia de que la función osteoclástica puede alterarse en los ratones con un MI aberrante como consecuencia de la alteración del estado inmunológico del hueso de este tipo de animales. Sjogren et al ¹⁶⁷ constataron que los **ratones hembra C57B1/6J axénicos** tenían desde el nacimiento una mayor DMO, tanto cortical como trabecular, frente a ratones convencionales. Además, presentaban una disminución de los osteoclastos, de sus precursores (CD11b+/Gr1-) y de los LT CD4+ con expresión de TNF- α y de IL-6 en medula ósea. La formación ósea, en cambio, no estaba alterada. La colonización del intestino de los ratones axénicos con MI procedente de ratones convencionales, normalizó la DMO y los parámetros inmunológicos de los LT CD4+ y las células precursoras de

osteoclastos en médula ósea. Tras estos hallazgos, se pudo concluir que el aumento de masa ósea era consecuencia principalmente de la reducción de la actividad resortiva ósea mediada por la disminución de la actividad osteoclástica. Además, se pudo demostrar que esta baja actividad resortiva ósea se debía a la falta de activación de las células inmunitarias.

Contrariamente a estos hallazgos, en otro estudio experimental, se observó cómo los **ratones juveniles machos axénicos BALB/c** desarrollaban un patrón de crecimiento más retardado respecto los controles. Los fémures de estos animales presentaban un crecimiento óseo significativamente reducido, tanto en longitud, grosor cortical y en la fracción ósea cortical/trabecular del ¹⁶⁵. Estos hallazgos pueden deberse a las diferencias entre las poblaciones de ratones de los distintos estudios ya que las características genéticas, el sexo, la edad, la diversidad de microbioma, los niveles de IgA, el perfil de LT y la duración del tratamiento puede influir en el patrón de crecimiento óseo ¹⁴³. Como muestra, la IgA modula la diversidad del microbioma intestinal y es fundamental para mantener la homeostasis inmunitaria intestinal secretoria innata, en el caso de los **ratones BALB/c** está elevada en las muestras de heces y suero frente a las de los **ratones C57BL6/J** ¹⁶⁸. Esta discrepancia de respuesta inmunitaria puede explicar en cierta medida las diferencias de niveles de las citoquinas que actúan sobre el hueso (TNF- α o la IL-6) y por tanto de la DMO.

Se ha observado en ratones axénicos **CB6F1** (cruce entre hembras BALB/c y machos C57BL/6) que en la fase aguda tras la colonización con MI convencional libre de patógenos específicos se reduce la masa ósea pero que a largo plazo se compensa con un proceso de formación ósea ¹⁶⁹. Este efecto anabólico coincide con un aumento de

la producción IGF-1. El IGF-1 es una hormona con acciones conocidas sobre el crecimiento esquelético que presenta unos niveles bajos en ratones axénicos o tratados con antibióticos. De esta manera, parece que el MI proporciona un estímulo anabólico óseo neto, que este estímulo puede estar mediado por el IGF-1 y que la producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC), entre ellos, el butirato por parte de determinadas especies de MI puede explicar el aumento de IGF-1 ¹⁶⁹.

7.1.2. Estudios con animales con MI modificada por antibióticos

Los estudios con ratones a los que se les administro antibióticos a bajas dosis han permitido respaldar la hipótesis de la influencia de la microbiota intestinal en el crecimiento óseo.

Se ha demostrado que suministrar antibióticos a dosis infraterapéuticas desde el nacimiento o durante el destete del ratón produce un aumento de la DMO como consecuencia de la variación del MI ^{122,170}. Se ha postulado que esta alteración de la composición del microbioma que afecta al crecimiento óseo puede estar mediados por cambios en las hormonas metabólicas o la regulación de la expresión genética hepática ^{170,171}.

Por otro lado, se ha señalado que en con ratones ovariectomizados, la administración de tetraciclinas previene de la pérdida ósea en gran parte debido a la inhibición de la resorción ósea ¹⁷².

7.1.3. Relación inmunológica

Un SI que funciona correctamente es aquel que es capaz de reconocer las moléculas que suelen estar en contacto con el huésped. El MI puede sufrir ligeras modificaciones que desencadenen diferentes reacciones inmunológicas locales o sistémicas. Determinadas especies bacterianas puede favorecer la expresión de citocinas osteoclastogénicas como el TNF- α o IL-6¹⁶⁷.

Se ha demostrado en ratones axénicos que el número de neutrófilos y monocitos en médula ósea es menor que el que presentan los ratones de la misma línea portadores de una MI convencional. Este efecto se debe a la disminución de progenitores granulocítico-mieloides (GMP) a partir de las células pluripotenciales (HSC). No obstante, la colonización de los ratones axénicos con MI convencional o la administración de **PAMP** de bacterias muertas incrementa el número de células mieloides. Estos datos sugieren que los **PAMP** pueden influir en la diferenciación de los progenitores de los osteoclastos^{173,174}.

La activación sistémica y local de los LT activados productores de RANKL puede provocar una pérdida ósea en determinados estados inflamatorios sistémicos^{175,176}. Dentro de las distintas subpoblaciones de LT, los Th17 son los que más RANKL expresan y, por tanto, parecen tener un papel importante en la osteoclastogénesis⁶¹. Los Treg, en cambio, inhiben la osteoclastogénesis a través de la vía CTLA-4¹⁷⁷. Además, los LT producen citocinas que tienen diferentes efectos sobre las células óseas. El INF- γ y la IL-4, secretadas por Th1 y Th2 respectivamente, inhiben la osteoclastogénesis^{178,179}. Por su parte, la IL-17, producida por el Th17, estimula directamente la formación de

osteoclastos y promueve la expresión de RANKL en las células estromales^{66,180}.

Determinados grupos bacterianos intestinales pueden influir en la estimulación de las subpoblaciones Th17¹⁸¹. Por su parte, se ha demostrado que la especie *Bacteroides fragilis* influyen sobre las células Th1 y la diferenciación de los Treg¹⁸². Se ha objetivado en ratones axénicos que la colonización con determinadas especies de clostridios o la administración de probióticos (*Bifidobacterium breve* AH1205, *Bifidobacterium longum* AH1206 y *Lactobacillus salivarius* AH102) normaliza el número de linfocitos Treg^{183,184}.

Los osteoclastos se desarrollan a partir de las células precursoras mieloides influenciadas por el RANKL. Los cambios en el MI pueden alterar el número de precursores de osteoclastos o la capacidad de diferenciación (Ilustración 7)¹⁶⁴. De tal manera que la activación de los osteoclastos de ratones normales es inducida por los Treg mientras que los osteoclastos generados durante estados inflamatorios, como la disbiosis, son activados por las LT que producen TNF- α ¹⁸⁵.

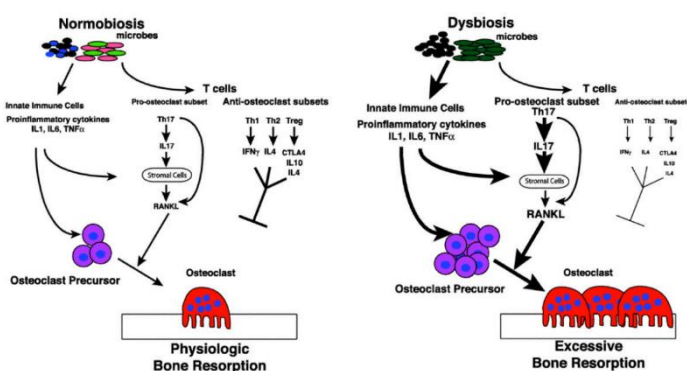


Ilustración 7. Reabsorción ósea y microbioma intestinal (Ilustración original de "The intestinal microbiome and skeletal fitness: Connecting bugs and bones" Charles JF¹⁶⁴).

En estados de disbiosis intestinal, se altera la migración de los monocitos y linfocitos a los diferentes tejidos. En los ratones axénicos, el número de monocitos y precursores osteoclasticos están disminuidos en la médula ósea, pero estos niveles se normalizan al colonizar el tracto digestivo con MI de ratones convencionales ^{167,174}. La Enfermedad de Crohn se asocia a una grave pérdida ósea y disbiosis. En este estado, se produce una desregulación de la respuesta inmunitaria en el intestino de las células Th17 activadas que migran a la médula ósea e inducen el reclutamiento de precursores osteoclasticos, provocando así un aumento masivo de la osteoclastogénesis ¹⁸⁶.

7.1.4. Relación con estrógenos

El MI proporciona los antígenos necesarios para la activación de los LT en la médula ósea y el aumento de la producción de TNF- α . Además, el MI presenta interacciones reciprocas con las hormonas sexuales ⁴³. Por ello, se han diseñado estudios en ratones para evaluar el impacto del MI sobre la disminución de la DMO como consecuencia del déficit de estrógenos.

Li et al demostraron que los ratones axénicos con deficiencia de estrógenos estaban totalmente protegidos contra la pérdida de hueso trabecular ¹⁴⁵. Se administró un agonista de la GnRH, la leuprolida, en ratones axénicos y en ratones portadores de MI convencional. Se observó que se producía un aumento de la pérdida ósea cortical y trabecular y de los marcadores de resorción ósea séricos en el grupo control. Además, en este grupo se incrementó la población de LT productores de TNF- α e IL-17 en médula ósea e intestino delgado, así como también lo hizo la producción de TNF- α y RANKL. En cambio,

en los ratones axénicos, no se produjo ningún aumento del TNF- α , RANKL e IL-17 en la médula ósea ni en los tejidos del intestino delgado. Una vez se colonizó el intestino de los ratones axénicos con MI convencional, se produjo la pérdida ósea inducida por la privación de estrógenos.

Este estudio no solo señala el papel del MI en la pérdida ósea inducida por la deficiencia de esteroides sexuales, sino que también indica su necesidad para que el SI responda a la deficiencia de esteroides sexuales. De la misma manera, se puede sospechar que el estado inflamatorio de las mujeres menopaúsicas, que han perdido el efecto inmunosupresor estrogénico, puede verse agravado por una composición del MI desfavorable y aumentar aún más la pérdida de masa ósea.

7.2. Estudios con Prebióticos.

Los prebióticos son alimentos no digeribles que benefician la salud del huésped al modificar la composición y las actividades del MI ^{106,187}. Son resistentes a la acción del ácido gástrico y a la hidrólisis de los encimas de los mamíferos, no se absorben y estimulan el crecimiento y la actividad de determinados grupos de bacterias intestinales ¹⁸⁸. Engloba a un determinado tipo de fibra vegetal que se encuentra en el tracto gastrointestinal y proporcionan alimento a las bacterias sanas del intestino.

No solo ejercen un importante papel en la digestión, sino que también tiene una acción antiinflamatoria y promueven la absorción de minerales (calcio, magnesio y zinc) ^{189,190}. Así, los prebióticos pueden repercutir en la regulación de la DMO y la prevención de la pérdida

ósea ¹⁰⁶. Se ha demostrado que poseen tales efectos la inulina, los FOS, los GOS y el almidón resistente ^{189,190}.

La **inulina** es un polisacárido de la familia de los fructanos que favorece la absorción intestinal de calcio en animales y humanos. Se ha demostrado que la suplementación durante un año en adolescentes aumenta en un 47% la DMO respecto al grupo control ¹⁹¹. Paralelamente, se ha observado que la suplementación de inulina en modelos experimentales murinos modifica el MI hacia grupos bacteriano que promueven la formación ósea ^{192,193}.

Los **GOS**, son oligosacáridos prebióticos no digeribles que se derivan de la lactosa y tienen potencial para mejorar el equilibrio mineral y las propiedades óseas. Se postula que uno de los mecanismos por el cual facilita la absorción del calcio se debe a su resistencia a la absorción intestinal y a la producción de AGCC que se producen tras su fermentación en el intestino ¹⁸⁸. Se ha estudiado el efecto del GOS sobre la composición del MI y la masa ósea tanto en ratas como en humanos, demostrándose un aumento relativo de la población de **bifidobacterias** y de la masa ósea ^{188,194}.

Los efectos hallados en estos estudios son significativos y podrían reducir potencialmente el riesgo de pérdida de masa ósea asociado a la osteoporosis. Se cree que la capacidad de los prebióticos en modificar el MI y así mejorar la absorción de calcio y la producción de AGCC puede ser la clave. No obstante, es necesaria una mayor validación mediante más estudios.

7.3. Estudios con Probióticos

Los probióticos son microorganismos comensales vivos (bacterias y hongos) que, consumidos en cantidades adecuadas, tienen importantes efectos positivos en la salud del huésped y especialmente ejercen su acción sobre el sistema digestivo ¹⁹⁵. Pueden alterar la composición y la actividad metabólica de la microbiota intestinal ¹⁹⁶, regular la respuesta inmunitarias del huésped ^{197,198} y mejorar la función de la barrera epitelial ^{199,200}.

Las cepas más comunes que actualmente utilizan como probióticos y poseen efectos beneficiosos para la salud son: *Enterococcus faecium*, cepas de *Bifidobacterium*, *Bacillus*, *Saccharomyces boulardii* (*S. boulardii*), *Lactobacillus* y *Pediococcus* ²⁰¹.

Se han realizado varios estudios para evaluar los efectos de los probióticos en animales con el fin de tratar diferentes patologías como la enfermedad inflamatoria intestinal ¹⁸⁷. También se ha investigado en modelos experimentales animales con el fin de esclarecer la relación de los probióticos con el metabolismo óseo.

Se ha demostrado en pollos de crianza que tras una dieta suplementaria de 6 semanas con *Bacillus licheniformis* y *Bacillus subtilis*, la masa ósea de la tibia se incrementaba en los pollos tratados respecto al grupo control ²⁰².

Se ha postulado que la modificación del MI murino administrando *Lactobacillus spp*, entre ellos el *Lactobacillus rhamnosus* y *Lactobacillus paracasei*, puede repercutir de manera directa sobre la modulación inmunológica de la masa ósea y en su resorción ósea ^{144,203}. Se ha documentado que la administración de leche fermentada con *Lactobacillus helveticus* en ratas macho produce una DMO mayor respecto al grupo control ²⁰⁴. La leche contiene nutrientes beneficiosos

para el metabolismo óseo, además algunos tipos de bacterias intestinales pueden ayudar a descomponer las proteínas contenidas en la leche en péptidos biológicamente activos ²⁰³.

La administración oral con *Lactobacillus reuteri* 6475 (*L. reuteri* 6475) en ratones machos sin alteraciones en las hormonas sexuales disminuye la inflamación intestinal y aumenta la masa ósea trabecular ²⁰⁵. Este aumento de la masa ósea es debido a la disminución de la resorción ósea y los niveles de TNF- α . Se ha de puntualizar que, en condiciones basales, estos efectos beneficiosos se han encontrado solo en ratones machos. Posteriormente, se ha revelado que el *L. reuteri* 6475 solo aumenta la densidad ósea en ratones hembra en condiciones inflamatorias inducidas por el estrés quirúrgico ²⁰⁶. Aunque no se conoce el mecanismo exacto para que se produzca este fenómeno, parece que dicho estado inflamatorio es necesario para que *L. reuteri* 6475 aumente la masa ósea.

El MI modula la pérdida ósea en ratones hembras con déficit de estrógenos, por este motivo, se ha planteado la posibilidad que los probióticos pueda proteger a los ratones tras una ovariectomía ^{145,187}.

Se ha demostrado que la administración a ratones ovariectomizados de leche de soja fermentada con *Lactobacillus* (*L. paracasei* y *L. plantarum*) previene de la pérdida de hueso trabecular con la misma eficacia que el Alendronato ²⁰⁷.

De la misma manera, la administración durante 6 semanas a ratones ovariectomizados de una sola cepa de *Lactobacillus* (*L. paracasei* DSM13434) o una mezcla de tres *lactobacilos* (*L. paracasei* DSM13434, *L. plantarum* DSM 15312 y DSM 15313) previene de la pérdida de hueso cortical y del aumento de la resorción ósea inducido por la ovariectomía ¹⁴⁶. El tratamiento con estos probióticos tiene un

efecto protector óseo relacionado con la reducción de la producción de TNF- α e IL-1 y el aumento de la expresión OPG en el hueso cortical¹⁴⁶. Por todo lo anterior, se puede indicar que el tratamiento probiótico atenúa la resorción ósea en ratones ovariectomizados mediante la modificación del estado inmunológico óseo.

Por otro lado, la suplementación en ratones ovariectomizados con una microbiota convencional que la administración de los probióticos *LGG* y la mezcla *VSL#3* (*Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium infantis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*) previene la pérdida ósea inducida por la ovariectomía y disminuye la permeabilidad intestinal y la inflamación sistémica¹⁴⁵. Además, el *LGG* aumenta la masa ósea en estados de deficiencia de estrógenos al estimular la formación ósea. Todo esto indica que tanto el *LGG* como el *VSL#3* interaccionan dinámicamente con epitelio intestinal e inducen activamente la expresión de proteínas implicadas en el mantenimiento de la integridad de la barrera epitelial intestinal.

En resumen, los estudios con probióticos y prebióticos muestran como la administración de estos suplementos pueden modificar el MI y también regular el metabolismo óseo. Uno de los mecanismos de acción por los que se sospecha que podrían actuar es la modulación del SI a través de la modificación del MI.

7.4. Interacción con la mucosa intestinal

Existe una relación recíproca entre la microbiota intestinal y el epitelio digestivo. Por un lado, las bacterias intestinales influyen en el mantenimiento de la homeostasis intestinal ya que aumenta la

proliferación y la supervivencia de las células epiteliales y refuerzan la función de la barrera intestinal ¹⁴³. Por otro lado, la densa capa de moco que recubre el epitelio intestinal sirve como fuente de carbono para las bacterias y proporciona puntos de fijación que permitan la adhesión bacteriana ¹¹².

La pared intestinal está en íntimo contacto con la microbiota luminal del intestino y es decisiva en las interacciones entre el huésped y el MI. Esta estrecha interrelación posibilita la toma de muestras antigénicas por parte del huésped y facilita la respuesta inmunitaria frente la carga antigénica dentro del lumen intestinal ²⁰⁸. Las células inmunitarias que se encuentran en los compartimentos subepiteliales de la mucosa intestinal y que son estimuladas por el MI, pueden generar citoquinas osteoclastógenas en el intestino que afecten a la formación ósea. Por tanto, se puede suponer cualquier cambio en la permeabilidad intestinal puede elevar los niveles de citoquinas osteoclastógenas e influir en la DMO ¹⁴³.

La protección contra la pérdida ósea es específica para cada tipo de cepa bacteriana y puede estar relacionada con la afinidad de las bacterias hacia las diferentes proteínas de la mucosa intestinal que permiten su fijación. Por ejemplo, se ha establecido en ratones ovariectomizados una asociación entre la modelación ósea y el *LLG*, sin embargo, no se ha detectado ninguna acción moduladora en la pérdida ósea tras la administración de *E. coli DH5alpha* ¹⁴⁵. La proteína SpaC es necesaria para que el *LGG* se una a la mucosa del intestino y pueda ejercer su influencia positiva en la salud intestinal ²⁰⁹. El *LLGM* es una variante mutante del *LLG* con una adhesión epitelial defectuosa que genera una protección parcial frente a la pérdida ósea en los ratones ovariectomizados. El hecho de que el *LLGM* tenga este efecto

parcial sugiere que el contacto directo con la mucosa no es la única forma por la cual el *LGG* tiene efectos probióticos ¹⁴⁵. Una posible explicación puede ser la producción de AGCC por parte de dichas bacterias con el fin de modular los niveles de citoquinas en el intestino ²¹⁰.

7.4.1. Permeabilidad

El intestino controla el tráfico molecular entre la luz y la submucosa epitelial a través del espacio paracelular, de manera que en condiciones fisiológicas no permite el paso de moléculas con un tamaño mayor de 15 Å (~3,5 kDa para los oligopéptidos) ²¹¹. La permeabilidad de los espacios paracelulares está controlada por las proteínas intercelulares de unión ²¹² y se regula, al menos en parte, por las vías de señalización MAPK y PI3 Kinase ²¹³.

Los estrógenos activan la vía de señalización MAPK ²¹⁴ a través de los receptores de estrógenos que expresan las células epiteliales intestinales ^{215,216}. Así, una deficiencia de esteroides sexuales podría debilitar la expresión de la vía MAPK y, en consecuencia, la integridad de la barrera intestinal.

Además, la falta de esteroides sexuales debilita la integridad del epitelio debido a la disminución de la transcripción de las proteínas **Claudin 2,3 y 15** y **JAM3** ^{217,218}. En este estado de insuficiencia hormonal, se aumenta la permeabilidad de la barrera intestinal y facilita la translocación bacteriana. Este incremento de carga antigénica que entra en la submucosa epitelial estimula la producción de marcadores inflamatorios y de citoquinas osteoclastógenas. Por tanto, se puede establecer una relación lo suficientemente sólida entre

una barrera intestinal debilitada y el desarrollo de la osteoporosis como consecuencia del aumento de las citocinas osteoclasteogénicas ¹⁴³.

La relación entre el MI y la barrera de la mucosa intestinal es compleja y aunque ambas se complementan para defender el organismo de las bacterias patógenas, se ha demostrado que una modificación en la composición del MI puede alterar la permeabilidad intestinal ²¹⁹. Uno de los metabolitos que se incrementa en sangre cuando aumenta la permeabilidad es el LPS ²²⁰. El LPS se ha asociado con la prolongación de la supervivencia de los osteoclastos *in vitro* ²²¹. Para finalizar, cabe señalar que determinados probióticos tienen un efecto beneficioso en la integridad del epitelio intestinal. Asimismo, el *LGG* y el *VSL#3* pueden compensar la pérdida de actividad de la MAKP en estados de déficit de esteroides sexuales ²¹⁴.

7.5 Mecanismos de acción del MI sobre el metabolismo óseo

Aunque existe suficiente evidencia que detalla la relación entre el MI y el metabolismo óseo, sigue sin conocerse con exactitud los mecanismos específicos por los que el microbioma puede modular la fisiología ósea. De las distintas hipótesis que intentan explicar dicho funcionamiento se encuentran entre otras: la regulación de la absorción de nutrientes, la función de barrera intestinal y la translocación de partículas bacterianas a través de la pared intestinal, y la activación de la respuesta inmunitaria en el intestino y a nivel sistémico ²²².

Tal como se ha comentado previamente, el MI influye sobre el sistema inmunitario modulando la producción de citocinas, tiene la capacidad

de promover la formación ósea por un mecanismo mediado por el IGF-1 y también, influye sobre los niveles de hormonas esteroides, PTH o metabolitos de la vitamina D.

La **vitamina D** es esencial en la absorción del calcio y su deficiencia puede acarrear trastornos en el metabolismo del calcio. Se ha demostrado que el MI puede regular el metabolismo de la vitamina D a través del FGF23 ²²³. La vitamina D regula la composición y la actividad metabólica de la microbiota intestinal y modula las funciones de la barrera fisiológica intestinal y el sistema inmunitario ²²⁴. Además, se ha documentado que el déficit de vitamina D puede inducir disbiosis intestinal y predisponer a la inflamación intestinal ²²⁵. Aunque se necesitan más estudios para dilucidar por completo el mecanismo de acción, diversas publicaciones apuntan que la vitamina D puede generar efectos antiinflamatorios y promueve la función de los Treg ^{12,226}.

La fermentación de los prebióticos por parte del MI produce **AGCC**. Estos productos junto la acidificación de la luz intestinal puede aumentar la solubilidad del calcio favoreciendo su absorción ¹⁶⁴. Los AGCC modulan al huésped inhibiendo la HDAC, activando los GPR o induciendo la autofagia ²²⁷. Algunos juegan un papel importante en la formación y mineralización ósea al actuar sobre las vías de señalización RUNX y de la osteoprotegerina ^{228,229}.

El **Butirato** es un AGCC que es capaz de favorecer la formación ósea e inhibir la osteoclastogénesis al suprimir la vía de señalización del RANKL ^{230,231}. Se ha demostrado en ratones que el **LGG** pueden afectar a la formación ósea a través del butirato. De esta manera el butirato induce la expansión de poblaciones Treg que, a su vez,

estimulan a los LT CD8+ a secretar WNT10b, un ligando WNT anabólico óseo ²³².

También se ha visto que los AGCC pueden actuar sobre el tejido indirectamente por medio de factores endocrinos del huésped (péptido YY y el péptido 1 glucagón-like) que tienen relación con el metabolismo óseo. El péptido YY es una hormona gastrointestinal que se ha asociado negativamente con la DMO en mujeres menopaúsicas ²³³. Por su parte, el péptido 1 glucagón-like es una hormona que regula el metabolismo óseo actuando sobre la diferenciación de células mesenquimales hacia osteoblastos y adipocitos ²³⁴.

7.6. Estudios en humanos

Uno de los primeros trabajos que estudió las diferencias poblacionales de la microbiota en personas, comparó la estructura de las poblaciones bacterianas y los cambios en la diversidad de la microbiota intestinal en pacientes con osteoporosis primaria y osteopenia primaria ²³⁵. Para ello, se analizaron las muestras de 18 pacientes, distribuidos en tres grupos iguales (pacientes sanos, pacientes osteopénicos y pacientes osteoporóticos), mediante la secuenciación del gen 16S rRNA. Los hallazgos mostraban que la estructura y la diversidad de los componentes bacterianos estaban alterados en los pacientes con osteoporosis y osteopenia respecto a los controles. Aunque el tamaño muestral fue pequeño, estos hallazgos son muy sugestivos de que la disbiosis intestinal puede tener un papel importante en el desarrollo de la osteoporosis humana.

En los diferentes estudios que hay publicados al respecto, se han identificado más de 30 taxones con una abundancia diferencial entre

pacientes sanos y osteoporóticos^{235–240}. No obstante, se han observado resultados contradictorios para determinados taxones respecto a su asociación con la osteoporosis. Es por ello que todavía no existe un consenso sobre que taxones son claves para el desarrollo de este trastorno.

Recientemente, se ha publicado un metaanálisis que recoge cinco estudios en los que se caracteriza el MI de las personas utilizando la secuenciación del gen 16S rRNA²⁴¹. Tras agrupar todos los taxones hasta el nivel de género, se analizó 328 muestras, siendo 155 de pacientes sanos y 173 de osteoporóticos. En el grupo de osteoporosis, se identificó un incremento del género de bacterias proinflamatorias como *Bacteroides* o *Clostridium sensu stricto*. Además, se detectó una reducción significativa de los géneros *Agathobaculum*, *Dorea*, *Clostridium group XIV*, *Collinsella*, *Mediterraneibacter* que incluyen especies generadoras de AGCC. Esta alteración de composición microbiana que se ha asociado a la osteoporosis proporciona una sólida perspectiva de la patogénesis de esta patología en humanos.

Con todo, en la actualidad hay suficientes datos que apoyan la teoría de la modulación de la masa ósea por el MI (osteomicrobiología)¹⁴³. Sin embargo, faltan estudios clínicos en humanos que relacionen directamente la microbiota con el riesgo de fractura de cadera. Nuestra hipótesis es que los pacientes con fractura de cadera por fragilidad tienen una microbiota intestinal específica que favorece la pérdida ósea y la aparición de la fractura. El presente estudio tiene como objetivo identificar la MI predominante en ancianos con fractura de cadera por fragilidad en comparación con la microbiota presente en individuos sanos mediante la secuenciación del gen 16S ARNr.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Los pacientes con fractura de cadera presentan una complejidad clínica, funcional y cognitiva relacionada con alteraciones metabólicas, nutricionales e inmunológicas. La fractura de cadera por fragilidad se asocia a la osteoporosis que produce una alteración en la microarquitectura ósea. La microbiota intestinal puede influir sobre el hueso alterando la absorción de nutrientes, estimulando el sistema inmune o por la traslocación de productos microbianos a través del endotelio intestinal, afectando la densidad ósea y la remodelación ósea. Las alteraciones óseas en los pacientes con fractura de cadera pueden estar relacionadas con cambios en la microbiota como factor de riesgo predisponente.

Nuestra hipótesis es que los pacientes con fractura de cadera por fragilidad tienen una microbiota intestinal específica que favorece la pérdida ósea y la aparición de la fractura. El presente estudio tiene como objetivo identificar la MI predominante en ancianos con fractura de cadera por fragilidad en comparación con la microbiota presente en individuos sanos mediante la secuenciación del gen 16S rRNA.

Objetivo general:

Identificar la microbiota intestinal predominante en ancianos con fractura de cadera por fragilidad en comparación con la microbiota presente en individuos sanos de la misma edad.

Objetivos específicos:

- Evaluar la relación entre la microbiota (determinación de los grupos bacterianos más abundantes y aquellos que disminuyan) en enfermos con fractura de cadera con respecto a los controles sanos.
- Evaluar la relación entre la microbiota con las variables clínicas y los parámetros inflamatorios en pacientes con fractura de cadera.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Tipo de estudio

De acuerdo con las directrices de la declaración STROBE ²⁴², se ha realizado un estudio observacional, analítico de casos-control para identificar eventuales diferencias en la composición de la microbiota intestinal en pacientes ancianos con fractura de cadera por fragilidad en comparación con ancianos sin fractura de cadera.

Este estudio ha sido aprobado por el Comité ético de del Hospital Arnau de Vilanova de Valencia (CEim 07/19). Antes de incluir a los pacientes en el estudio, se ha solicitado el consentimiento informado firmado.

2. Selección muestra del estudio

Se han incluido 50 individuos del departamento de salud Arnau de Vilanova-Llíria de Valencia. El grupo patológico estaba compuesto por 25 pacientes diagnosticados de fractura de cadera aguda como consecuencia de un traumatismo de bajo impacto o caída desde altura igual o menor a su estatura, que fueron ingresados para someterse a tratamiento quirúrgico. Por otra parte, se han reclutado de la comunidad 25 controles que no presentaban antecedentes de fractura de cadera.

2.1. Criterios de inclusión

Los siguientes criterios de inclusión que se ha aplicado para ambos grupos son:

- Edad mayor de 70 años.

- Puntuación escala de Barthel ≥ 30 puntos.
- Ausencia de fractura de cadera previa.

2.2. Criterios de exclusión

- Tratamiento antibiótico durante las 2 semanas previas a la inclusión del estudio.
- Tratamiento activo (quimioterapia o radioterapia) para cualquier neoplasia.
- Deterioro cognitivo moderado-severo considerado como una puntuación ≥ 5 en el GDS.
- Haber requerido cirugía u hospitalizados por cualquier motivo en los últimos 3 meses antes de la inclusión en el estudio.
- Vacunación en las últimas 6 semanas.
- Inmunodeficiencia.
- Enfermedad autoinmune.
- Infección aguda.

3. Tamaño muestral

Para el cálculo del tamaño muestral se ha asumido arbitrariamente la capacidad de detección del estudio de una odds ratio mayor de 3, por ser esta cifra la comunicada como capacidad predictiva de fractura de cadera que actualmente tiene la DXA. Con la intención de ser conservadores, se ha asumido que la proporción hipotética de casos con exposición es de un 50% y que hasta un 10% de los controles

podrían tener la misma exposición que los casos. Se empleó un nivel de significación alfa de dos colas de 0,05 y un poder beta de 0,8 en una relación casos y controles de 1:1. La determinación empleada ha sido el método de Kelsey usando el software Open Epi versión 3.03.1723 ²⁴³ que arroja un resultado de 42 sujetos (21 casos y 21 controles). Asumiendo unas posibles pérdidas del 20% la muestra final se establece en 50 sujetos de estudio.

4. Descripción de variables

Todas las variables fueron registradas en el cuaderno de recogida de datos (ver Anexo cuaderno de recogida). En él se ha incluido las variables demográficas, clínicas y analíticas y el cuestionario de adherencia a la dieta mediterránea.

4.1. Variables demográficas

Se han recogido las **variables demográficas** de edad, sexo, peso, índice de peso corporal y altura en todos los casos. Además, se ha registrado la procedencia del paciente antes del ingreso, para ello se han contemplado las siguientes situaciones:

- Vive en su domicilio solo.
- Convivencia en su domicilio con pareja/familia.
- Convivencia en residencia.
- Convive en casa de otros familiares.

4.2. Variables clínicas

Respecto a las **variables clínicas**, se han registrado las fechas de ingreso hospitalario, de intervención y de alta hospitalaria. De la misma forma, se han anotado la presencia de los siguientes antecedentes patológicos de interés:

- Diabetes Mellitus.
- Dislipemia.
- Hipertensión.
- Insuficiencia cardíaca congestiva.
- Enfermedad de Parkinson.
- Hiperplasia benigna de próstata.
- Arritmia cardíaca por fibrilación auricular.
- Enfermedad pulmonar obstructiva crónica.
- Obesidad.
- Hábito tabáquico.

En el grupo de pacientes con fractura se ha identificado la lateralidad y el tipo de fractura conforme la siguiente clasificación:

1. Fracturas subcapitales cuando se producen en la zona del cuello femoral, entre cabeza y macizo trocánterico.
2. Fracturas pertrocantéreas cuando el trazo de fractura entre trocánter mayor y menor
3. Persubtrocantéreas, aquellas producidas entre el trocánter menor y los 5 cm distales a este.

4.3. Variables analíticas

Tanto en el grupo fractura de cadera como en el grupo control se obtuvieron las muestras sanguíneas necesarias para la determinación

de las variables analíticas (mediante el procedimiento de analítica ordinaria convencional) y para la determinación del perfil inmunitario linfocitario (muestra de sangre en fresco).

Todas las muestras sanguíneas en el grupo de casos se han obtenido antes de la cirugía de reparación de la fractura de cadera. El tiempo máximo para realizar la toma de muestras fue de 24 horas desde que se produjo la fractura.

Respecto los controles, se han obtenido de individuos sanos sin fractura de cadera o de pacientes que ingresaron para someterse a un tratamiento quirúrgico ortopédico por un motivo distinto a fractura de cadera. Todas las muestras sanguíneas han sido remitidas al laboratorio de Análisis Clínicos del Hospital Arnau de Vilanova de Valencia.

Las variables analíticas escogidas son:

- Perfil Bioquímico
 - Glucosa: unidades dadas en *mg/dL*.
 - Urea: unidades dadas en *mg/dL*.
 - Creatinina: unidades dadas en *mg/dL*.
 - Filtrado Glomerular: unidades dadas en *mL/min/1.73m²*.
 - Colesterol total: unidades dadas en *mg/dL*.
 - Proteínas Totales: unidades dadas en *g/dL*.
 - Albúmina: unidades dadas en *g/dL*.
 - Fosfatasas alcalinas: unidades dadas en *mU/mL*.
 - Sodio: unidades dadas en *mEq/L*.
 - Potasio: unidades dadas en *mEq/L*.
 - Calcio total: unidades dadas en *mg/dL*.
 - Fósforo inorgánico: unidades dadas en *mg/dL*.
 - Proteína C reactiva: unidades dadas en *mg/L*.

- Perfil Hormonal
 - TSH: unidades dadas en $\mu\text{UI/mL}$.
 - 25 OH Vitamina: unidades dadas en ng/mL .
 - PTH - Parathormona: unidades dadas en pg/mL .
 - IGF-1 : unidades dadas en ng/mL .

- Hematología General y Recuento Celular
 - Hemoglobina: unidades dadas en g/dL .
 - VSG: unidades dadas en mm/h .
 - Hematíes: Recuento porcentual y absoluto ($10^{12}/\text{L}$).
 - Leucocitos: Recuento porcentual y absoluto ($10^9/\text{L}$).
 - Neutrófilos: Recuento porcentual y absoluto ($10^9/\text{L}$).
 - Linfocitos: Recuento porcentual y absoluto ($10^9/\text{L}$).
 - Monocitos: Recuento porcentual y absoluto ($10^9/\text{L}$).
 - Eosinófilos: Recuento porcentual y absoluto ($10^9/\text{L}$).
 - Basófilos: Recuento porcentual y absoluto ($10^9/\text{L}$).
 - Plaquetas: Recuento porcentual y absoluto ($10^9/\text{L}$).

4.4. Encuesta dietética

Se ha evaluado el tipo de dieta mediante la realización del cuestionario de adherencia a la dieta mediterránea MEDAS (Mediterranean Diet Adherence Screener) ²⁴⁴.

El cuestionario MEDAS es un instrumento breve que es capaz de estimar correctamente la adherencia a la dieta mediterránea. De esta manera el investigador puede evaluar de una manera rápida el patrón dietético de un paciente. La encuesta consta de 14 preguntas de opción cerrada con la cual se puede comprobar el grado de adherencia

a la dieta mediterránea (Ver ítems en Anexo cuaderno de recogida de datos). Se establecen tres categorías distintas: adherencia alta, para una puntuación igual o superior a 8; adherencia media, para una puntuación de entre 4 y 7; y adherencia baja, para una puntuación igual o inferior a 3 ²⁴⁵.

4.5. Escalas de valoración clínica

Se ha valorado la situación funcional de los pacientes mediante la entrevista directa. Se ha registrado el estado de comorbilidad, el grado de dependencia, la capacidad funcional y el nivel de demencia mediante la aplicación de los siguientes cuestionarios:

- Índice de comorbilidad de Charlson. Permite predecir la mortalidad al año para un paciente con distintas comorbilidades asociadas. Se asigna una puntuación de 1, 2, 3 o 6 en función del riesgo de fallecer por cada patología. Se suman las distintas puntuaciones y el resultado predice la mortalidad. En general, se considera ausencia de comorbilidad: 0-1 puntos, comorbilidad baja: 2 puntos y alta > 3 puntos ²⁴⁶.
- Índice de Barthel. Es una escala de valoración funcional del paciente y su rehabilitación. Mide la capacidad de una persona para realizar diez actividades básicas de la vida diaria: comer, aseo personal, bañarse/ ducharse, trasladarse “sillón-cama”, uso del retrete, deambulación, subir y bajar escaleras, vestirse, defecación y control miccional. Los valores asignados dependen del tiempo y la ayuda física que se necesita para completar dichas tareas. No se asignará el máximo valor si necesita ayuda o supervisión para completarla. De esta

manera tenemos: Dependencia total (0-20), dependencia severa (21-60), dependencia moderada (61-90), dependencia escasa (91-99) e independencia (100). Mediante esta escala se excluyeron los participantes con una puntuación menor a 30²⁴⁷.

- GDS. Es útil para seguir de una forma global la evolución de la Demencia de anciano y para definir sus etapas (leve, moderada y severa) incluyendo los límites entre el deterioro fisiológico leve y la demencia propiamente dicha. Se aplica mediante entrevista, a partir de datos observacionales, de cuestiones planteadas al propio enfermo, a sus cuidadores o a las personas que estén en contacto con él²⁴⁸.
- Índice de Lawton: Valora las actividades instrumentales propias del medio extrahospitalario necesarias para vivir de manera independiente. Su normalidad indica integridad de las actividades básicas para el autocuidado y del estado mental. Estas actividades son: utilizar el teléfono, comprar, usar de transporte, responsabilidad respecto a la medicación, capacidad de manejo de dinero, hacer comida, tareas domésticas y lavar la ropa. Se considera anormal una puntuación <5 en hombres y <8 en mujeres. El deterioro de las actividades instrumentales es predictivo de deterioro de las actividades básicas y puede ser considerado como un indicador de fragilidad²⁴⁹.

4.6. Análisis subpoblaciones linfocitarias

Se han analizado los valores totales y los porcentajes de las distintas subpoblaciones respecto a la población linfocítica total. Todas las

muestras se han distribuido en 4 tubos diferentes para realizar el estudio linfocitario según el estado funcional, TCR, el fenotipo de los Treg y la expresión en superficie de las citocinas (IL-2, TNF- α e IFN- γ). En la Tabla 2 se muestran los marcadores utilizados para la identificación de cada subpoblación.

Tubo Función	
Subpoblación linfocitaria	Inmunofenotipo
LT CD3+	CD3+
LT CD3+ NAIVE	CD3+CD45RA+CD62L+
LT CD3+ MEMCN	CD3+CD45RA-CD62L+
LT CD3+ EFECTOR	CD3+CD45RA-CD62L-
LT CD3+ TEMRA	CD3+CD45RA+CD62L-
LT CD4+	CD3+CD4+
LT CD4+ NAIVE	CD3+CD4+CD45RA+CD62L+
LT CD4+ MEMCN	CD3+CD4+CD45RA-CD62L+
LT CD4+ MEMEF	CD3+CD4+CD45RA-CD62L-
LT CD4+ TEMRA	CD3+CD4+CD45RA+CD62L-
LT CD8+	CD3+CD8+
LT CD8+ NAIVE	CD3+CD8+CD45RA+CD62L+
LT CD8+ MEMCN	CD3+CD8+CD45RA-CD62L+
LT CD8+ MEMEF	CD3+CD8+CD45RA-CD62L-
LT CD8+ TEMRA	CD3+CD8+CD45RA+CD62L-
LT CD4+ CD8+	CD3+CD4+CD8+
LT CD4+ CD8+ NAIVE	CD3+CD4+CD8+CD45RA+CD62L+
LT CD4+ CD8+ MEMCN	CD3+CD4+CD8+CD45RA-CD62L+
LT CD4+ CD8+ MEMEF	CD3+CD4+CD8+CD45RA-CD62L-
LT CD4+ CD8+ TEMRA	CD3+CD4+CD8+CD45RA+CD62L-
LT $\alpha\beta$	CD3+TCR $\alpha\beta$ +
LT $\alpha\beta$ NAIVE	CD3+TCR $\alpha\beta$ +CD45RA+CD62L+
LT $\alpha\beta$ MEMCN	CD3+TCR $\alpha\beta$ +CD45RA-CD62L+
LT $\alpha\beta$ MEMEF	CD3+TCR $\alpha\beta$ +CD45RA-CD62L-
LT $\alpha\beta$ TEMRA	CD3+TCR $\alpha\beta$ +CD45RA+CD62L-
LT $\alpha\beta$ CD4	CD3+TCR $\alpha\beta$ +CD4+
LT $\alpha\beta$ CD4+ NAIVE	CD3+TCR $\alpha\beta$ +CD4+CD45RA+CD62L+

LT αβ CD4+ MEMCN	CD3+TCRαβ+CD4+CD45RA-CD62L+
LT αβ CD4+ MEMEF	CD3+TCRαβ+CD4+CD45RA-CD62L-
LT αβ CD4+ TEMRA	CD3+TCRαβ+CD4+CD45RA+CD62L-
LT αβ CD8	CD3+TCRαβ+CD4+
LT αβ CD8+ NAIVE	CD3+TCRαβ+CD8+CD45RA+CD62L+
LT αβ CD8+ MEMCN	CD3+TCRαβ+CD8+CD45RA-CD62L+
LT αβ CD8+ MEMEF	CD3+TCRαβ+CD8+CD45RA-CD62L-
LT αβ CD8+ TEMRA	CD3+TCRαβ+CD8+CD45RA+CD62L-
LT γδ	CD3+TCRγδ+
LT γδ NAIVE	CD3+TCRγδ+CD45RA+CD62L+
LT γδ MEMCN	CD3+TCRγδ+CD45RA-CD62L+
LT γδ MEMEF	CD3+TCRγδ+CD45RA-CD62L-
LT γδ TEMRA	CD3+TCRγδ+CD45RA+CD62L-
LT γδ CD4+	CD3+TCRγδ+CD4+
LT γδ CD4+ NAIVE	CD3+TCRγδ+CD4+CD45RA+CD62L+
LT γδ CD4+ MEMCN	CD3+TCRγδ+CD4+CD45RA-CD62L+
LT γδ CD4+ MEMEF	CD3+TCRγδ+CD4+CD45RA-CD62L-
LT γδ CD4+ TEMRA	CD3+TCRγδ+CD4+CD45RA+CD62L-
LT γδ CD8+	CD3+TCRγδ+CD8+
LT γδ CD8+ NAIVE	CD3+TCRγδ+CD8+CD45RA+CD62L+
LT γδ CD8+ MEMCN	CD3+TCRγδ+CD8+CD45RA-CD62L+
LT γδ CD8+ MEMEF	CD3+TCRγδ+CD8+CD45RA-CD62L-
LT γδ CD8+ TEMRA	CD3+TCRγδ+CD8+CD45RA+CD62L-
LT γδ DN	CD3+TCRγδ+CD4-CD8-
LT γδ DNNAIVE	CD3+TCRγδ+CD4-CD8-CD45RA+CD62L+
LT γδ DNMEMCN	CD3+TCRγδ+CD4-CD8-CD45RA-CD62L+
LT γδ DNEF	CD3+TCRγδ+CD4-CD8-CD45RA-CD62L-
LT γδ DNTEMRA	CD3+TCRγδ+CD4-CD8-CD45RA+CD62L-
LT NKTS	CD3+CD56+
LT NKTSNAIVE	CD3+CD56+CD45RA+CD62L+
LT NKTSMEMCN	CD3+CD56+CD45RA-CD62L+
LT NKTSMEMEF	CD3+CD56+CD45RA-CD62L-
LT NKSTEMRA	CD3+CD56+CD45RA+CD62L-
LT NKTyδ	CD3+TCRγδ+CD56+
LT NKTyδ NAIVE	CD3+TCRγδ+CD56+CD45RA+CD62L+
LT NKTyδ MEMCN	CD3+TCRγδ+CD56+CD45RA-CD62L+

LT NKT $\gamma\delta$ MEMEF	CD3+TCR $\gamma\delta$ +CD56+CD45RA-CD62L-
LT NKT $\gamma\delta$ TEMRA	CD3+TCR $\gamma\delta$ +CD56+CD45RA+CD62L-
LT NKT $\alpha\beta$	CD3+TCR $\alpha\beta$ +CD56+
LT NKT $\alpha\beta$ NAIVE	CD3+TCR $\alpha\beta$ +CD56+CD45RA+CD62L+
LT NKT $\alpha\beta$ MEMCN	CD3+TCR $\alpha\beta$ +CD56+CD45RA-CD62L+
LT NKT $\alpha\beta$ MEMEF	CD3+TCR $\alpha\beta$ +CD56+CD45RA-CD62L-
LT NKT $\alpha\beta$ TEMRA	CD3+TCR $\alpha\beta$ +CD56+CD45RA+CD62L-
Linfocitos Natural Killer	CD3-CD56+
Linfocitos Natural Killer NAIVE	CD3-CD56+CD45RA+CD62L+
Linfocitos Natural Killer MEMCN	CD3-CD56+CD45RA-CD62L+
Linfocitos Natural Killer MEMEF	CD3-CD56+CD45RA-CD62L-
Linfocitos Natural Killer TEMRA	CD3-CD56+CD45RA+CD62L-
Tubo TCR	
LT HLADR+	CD3+HLADR+
LT CD4+ HLADR+	CD3+CD4+
LT CD8+ HLADR+	CD3+CD8+
LT $\gamma\delta$ CD8+ VD1	CD3+TCR $\gamma\delta$ +CD8+v δ 1
LT $\gamma\delta$ CD8+ VD2	CD3+TCR $\gamma\delta$ +CD8+v δ 2
LT $\gamma\delta$ DNVD1	CD3+TCR $\gamma\delta$ +CD4-CD8-v δ 1
LT $\gamma\delta$ DNVD2	CD3+TCR $\gamma\delta$ +CD4-CD8-v δ 2
LT Reg	
LT Reg CD4+ CD25+	CD3+CD4+CD25+
LT Reg CD4+ CD39+	CD3+CD4+CD39+
LT Reg CD4+ CD127+	CD3+CD4+CD127+
LT Reg CD4+ CD45RA	CD3+CD4+CD45RA+
Tubo Activación Linfocitos T	
LT CD4+ IL2+ IFN γ -	CD3+CD4+IL-2 +INF- γ -
LT CD4+ IL2+ IFN γ +	CD3+CD4+IL-2 +INF- γ +
LT CD4+ IL2-IFN γ -	CD3+CD4+IL-2 -INF- γ -
LT CD4+ IL2-IFN γ +	CD3+CD4+IL-2 -INF- γ +
LT CD4+ TNFa+ IFN γ -	CD3+CD4+TNF- α +INF- γ -
LT CD4+ TNFa+ IFN γ +	CD3+CD4+TNF- α +INF- γ +
LT CD4+ TNFa-IFN γ -	CD3+CD4+TNF- α -INF- γ -
LT CD4+ TNFa-IFN γ +	CD3+CD4+TNF- α -INF- γ +
LT CD8+ IL2+ IFN γ -	CD3+CD8+IL-2 +INF- γ -

LT CD8+ IL2+ IFNg+	CD3+CD8+IL-2 +INF-γ +
LT CD8+ IL2-IFNg-	CD3+CD8+IL-2 -INF-γ -
LT CD8+ IL2-IFNg+	CD3+CD8+IL-2 -INF-γ +
LT CD8+ TNFa+ IFNg-	CD3+CD8+TNF-α +INF-γ -
LT CD8+ TNFa+ IFNg+	CD3+CD8+TNF-α +INF-γ +
LT CD8+ TNFa-IFNg-	CD3+CD8+TNF-α -INF-γ -
LT CD8+ TNFa-IFNg+	CD3+CD8+TNF-α -INF-γ +

Tabla 2. Marcadores de las subpoblaciones linfocitarias.

4.6.1. Método de procesamiento de las muestras de sangre periférica

4.6.1.a. Contador celular

Una vez obtenida la muestra, se realizó una hematimetría básica en un contador celular (LH750 Beckman Coulter, Inc, Fullerton, CA) para obtener los valores de hemoglobina, leucocitos y diferencial leucocitario y plaquetas. El autoanalizador LH750 se basa en el principio de impedancia: El principio de impedancia en el conteo de células sanguíneas, que debido a su baja conductividad provocan que con el paso de cada célula disminuya la corriente eléctrica, al haber un aumento de la resistencia por un breve periodo de tiempo. Al llevar un registro de pulsos que ocurren en la corriente eléctrica se puede contar el número de células sanguíneas. El número de intermitencias indica la cifra de células sanguíneas. La amplitud de cada intermitencia es proporcional al volumen de la célula.

4.6.1.b. Citómetro de flujo

Para el desarrollo del presente trabajo se utilizó un citómetro de flujo Navios (Beckman Coulter, Inc) con el que se puede medir simultáneamente 10 emisiones fluorescencias distintas usando tres láseres: azul de 488nm, rojo de 647nm y violeta a 405 nm.

4.6.1.c. Análisis funcional de los Linfocitos T

Anticuerpos monoclonales empleados en el análisis de las subpoblaciones linfocitarias

Para el análisis de las distintas subpoblaciones linfocitarias se utilizaron los siguientes anticuerpos monoclonales, conjugados con fluorocromos (Beckman Coulter, Inc, Miami, USA):

- CD45RA- Fluorescein isothiocyanate (FITC)
- CD25- R Phycoerythrin (PE)
- CD39- R PhycoerythrinCyanine 5.5 (PC5.5)
- CD4- R PhycoerythrinCyanine 7 (PC7)
- CD127- APC700
- CD3- Allophycocyanin Alexa Fluor 750 (APC-A750)
- CD45- Krome Orange (KrO)
- IFN γ - Fluorescein isothiocyanate (FITC)
- TNF α - R Phycoerythrin (PE)
- IL2- R Phycoerythrin-Cyanine 7 (PC7)
- CD8- Alexa Fluor 700 (AF700)
- CD4- Pacific Blue (PB)
- TCR $\gamma\delta$ - Fluorescein isothiocyanate (FITC)
- TCR $\alpha\beta$ - R Phycoerythrin (PE)
- HLA-DR- R PhycoerythrinTexas Red-X (ECD)
- TCR V δ 1- R PhycoerythrinCyanine 7 (PC7)
- TCR V δ 2- Pacific Blue (PB)

4.6.1.d. Protocolo de marcaje

El marcaje llevado a cabo está basado en la capacidad de los anticuerpos monoclonales específicos de unirse a células leucocitarias mediante los determinantes antigénicos que éstas expresan en la membrana celular (o incluso intracitoplasmáticamente).

Se utilizaron anticuerpos monoclonales específicos contra antígenos concretos que vienen ya marcados con el fluorocromo.

Se incubó la muestra con el anticuerpo monoclonal. Los leucocitos fueron analizados por citometría de flujo. Dentro de una ventana electrónica se seleccionó la población de interés, definida en un histograma que relaciona los parámetros que deseamos estudiar.

Para la determinación de las distintas subpoblaciones linfocitarias se siguieron los protocolos de marcaje de los distintos Kits comerciales (Beckman Coulter, Inc), que se utilizaron.

4.6.2. Análisis funcional de las distintas subpoblaciones

La adquisición y el análisis se realizaron en un citómetro de flujo Navios (Beckman Coulter, Inc) y luego se analizarán con Kaluza Software.

Se adquirió un total de 100.000 eventos. Los recuentos absolutos de subconjuntos de células circulantes son calculados utilizando los porcentajes obtenidos por citometría de flujo y el recuento de leucocitos se obtiene del analizador hematológico, utilizando un conteo de doble plataforma tecnología.

4.7. Análisis Microbiota

4.7.1. *Recolección de las muestras microbiota*

La toma de muestras fecales en el grupo casos se obtuvo antes de la cirugía de reparación de la fractura de cadera. El tiempo máximo para realizar la toma de muestras fue de 24 horas desde que se produjo la fractura. De esta manera, se minimizaban los cambios en la microbiota intestinal como consecuencia de la fractura y el encamamiento. Respecto los controles, se obtuvo de individuos sanos sin fractura de cadera o de pacientes que ingresaron para someterse a un tratamiento quirúrgico ortopédico.

Todas las muestras fecales se adquirieron siguiendo las Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica de 2016 ²⁵⁰. Las muestras fueron obtenidas mediante frotis rectal antes de administrar dosis de antibiótico profiláctico (en el caso de pertenecer al grupo con fractura de cadera) y cada una fueron guardadas en un bote de 2 mL e inmediatamente se congelaron a -80°.

4.7.2. *Procesamiento muestras*

El primer paso necesario para caracterizar el metagenoma por secuenciación masiva es realizar la extracción del ADN de las muestras fecales de cada uno de los individuos según los procedimientos ya descritos y publicados por el grupo de Bäuerl et al ^{251,252}.

4.7.2.a. *Extracción con Robot MagNA Pre LC Roche*

Se cortó la punta de las dos torundas de cada muestra en un entorno estéril y se introdujeron en un tubo de 2 mL. Se añadió 1 mL de suero

fisiológico en cada tubo y se agitó en vortex a velocidad suave durante dos minutos con el fin de desprender el material adherido en las torundas. Finalizado este tiempo se retiraron con cuidado las torundas del tubo intentando recoger el exceso de líquido que había quedado en las torundas. Tras centrifugar durante 15 minutos a 13.000 rpm a 4°C (Centrífuga Eppendorf 5415R), se descartó el sobrenadante y se obtuvo el pellet bacteriano para su procesamiento.

A continuación, se añadieron 207µL de Bacteria Lysis Buffer (Lisis Buffer kit MagNA Pure LC DNA Isolation Kit III -bacterias, hongos- 3264785001) al pellet bacteriano. Una vez se ha mezclado bien se incorporó 23µL de Lisozima y se agitó de nuevo en el vortex para homogenizar el producto.

Tras la incubación en termobloque a 37°C durante 30 minutos, se añadió 20µL de proteinasa K (Proteinasa K, kit MagNA Pure LC DNA Isolation Kit III -bacterias, hongos- 3264785001) y se agitó en el vortex para homogenizar la mezcla. Se realizó una nueva incubación en termobloque durante 10 minutos a 65°C y posteriormente durante 10 minutos a 95°C.

Tras centrifugar la muestra durante 1 minuto a máxima rpm, se recogió el sobrenadante, 250µL, y se llevó al robot MagNaPure LCA (Roche). Posteriormente se cuantificó el ADN eludido con Qubit 1X dsDNA HS ASSAY KIT (Thermo Fisher Q33231).

4.7.2.b. Preparación de la biblioteca y secuenciación

Los amplicones del gen del ADNr 16S se amplificaron siguiendo el protocolo de Illumina de preparación de bibliotecas de secuenciación metagenómica del gen del ADNr 16S (Cod. 15044223 Rev. A). Las secuencias específicas del gen utilizadas en este protocolo se dirigen

a las regiones V3 y V4 del gen del ADNr 16S. Se añadieron secuencias de nucleótidos de adaptador de Illumina a las secuencias específicas de genes.

Los cebadores se seleccionaron de Klindworth et al ²⁵³. Según nomenclatura estándar de nucleótidos de la IUPAC, las secuencias de cebadores de longitud completa que se han utilizado en este protocolo y que se dirigen a esta región son:

- 16S rDNA gene Amplicon PCR Forward Primer = 5'
TCGTCCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNG
GCWGCAG
- 16S rDNA gene Amplicon PCR Reverse Primer = 5'
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVG
GGTATCTAATCC

Se utilizó el ADN genómico microbiano (5 ng/μl en 10 mM Tris pH 8,5) para iniciar el protocolo. Tras la amplificación del gen 16S rDNA, se realizó el paso de multiplexado utilizando el Nextera XT Index Kit (FC-131-2001).

Se analizó 1μl del producto PCR en un chip Bioanalyzer DNA 1000 para verificar el tamaño, el tamaño esperado en un trazado Bioanalyzer es de ~550 pb.

Tras la verificación del tamaño, las bibliotecas se secuenciaron utilizando una serie por pares finales 2x300pb (MiSeq Reagent kit v3 (MS-102-3003) en un MiSeq Sequencer según las instrucciones del fabricante (Illumina).

4.7.2.c. Comprobación de la calidad

La evaluación de la calidad se realizó mediante el uso del programa fastp (min_length: 50 pb, trim_qual_right: 30, trim_qual_type: mean, trim_qual_window: 10) ²⁵⁴.

4.7.3. Análisis metataxonómico

4.7.3.a. Desnaturalización y eliminación de quimeras

La eliminación de las distorsiones, la unión de extremos emparejados y la eliminación de quimeras se realizaron a partir de datos de extremos emparejados utilizando el proceso DADA2 ²⁵⁵.

4.7.3.b. Asignación taxonómica

La asignación taxonómica y las estadísticas básicas se obtuvieron utilizando el flujo de trabajo QIIME2 ²⁵⁶ y se clasificó en función de filo, clase, orden, familia, género y especie (Ilustración 8). Las secuencias no fueron agrupadas en OTU, por lo que el análisis se basará en ASV. La base de datos utilizada para esta asignación taxonómica fue SILVA ²⁵⁷.

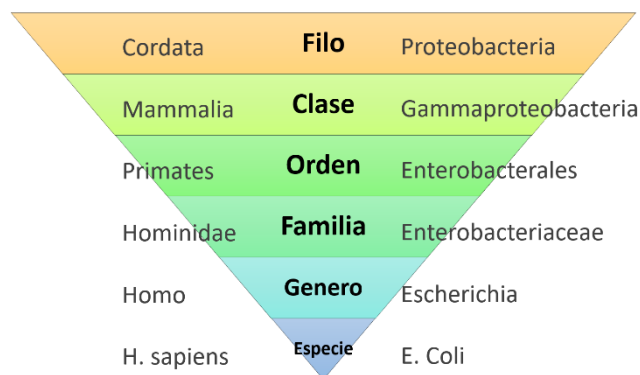


Ilustración 8. Clasificación taxonómica

4.7.4. Análisis bioinformático de la microbiota

Los datos se han obtenido utilizando un pipeline ad-hoc escrito en el entorno RStatistics ²⁵⁸, haciendo uso de varias librerías Open Source como gdata, vegan, etc. Los datos se han agrupado y estratificado según el archivo de metadatos proporcionado por el usuario.

Los datos de secuencia se han analizado utilizando Qiime2 pipeline Bolyen et al ²⁵⁹.

Se ha realizado un análisis de rarefacción con el fin de estimar la diversidad global cubierta por las secuencias obtenidas. En el proceso de normalización de datos se evalúa la rarefacción de las muestras. La rarefacción tiene en cuenta los tamaños desiguales de las bibliotecas y realiza un submuestreo aleatorio sin sustitución hasta el tamaño de la biblioteca más pequeña que no se ha considerado defectuosa ²⁶⁰. El análisis de la curva de rarefacción permite evaluar visiblemente la profundidad de secuenciación con respecto al número de taxones detectados ²⁶¹. En el gráfico general de rarefacción (Ilustración 10), las cifras del eje X representan el número de secuencias y las del eje Y al número de taxones. Cuando una muestra presenta una rarefacción muy baja, el número de taxones se considera insuficiente y no puede incluirse en el análisis de datos. Aunque este procedimiento de normalización de los datos puede suponer una pérdida de información importante ²⁶², se ha contrastado su utilidad cuando los tamaños de las bibliotecas son muy pequeños (<1.000 lecturas/muestra) o muy desiguales entre grupos (cuando difieren más de 10 veces) ²⁶³. También se ha demostrado su utilidad para comparar comunidades ecológicas (β -diversidad) ²⁶⁴.

Se ha estimado la α -diversidad para medir la **diversidad dentro de una muestra**. Las dos medidas de α -diversidad más utilizadas son la riqueza (recuento del número de especies) y la uniformidad (distribución de cada especie). Se han empleado los estimadores de α -diversidad Chao 1, ACE, Shannon y Simpson. Los índices de ACE y de Chao 1 evalúan los ASV observados y tienen en cuenta las especies no observadas en función de los ASV de baja abundancia, de esta manera analizan la riqueza. Los indicadores de Shannon y de Simpson valoran tanto la riqueza como la uniformidad de la muestra

260 .

Se ha medido la β -diversidad con el fin de **evaluar la diferencia de composición de la microbiota entre muestras**. La β -diversidad compara la estructura de las comunidades microbianas y viene determinada por el grado de similitud/disimilitud entre las comunidades de diferentes hábitats microbianos. Las estimaciones de β -diversidad pueden combinarse en una matriz de distancias y utilizarse para la visualización patrones. Las muestras cercanas entre sí son más similares en sus perfiles de comunidad microbiana. Las cinco medidas de beta diversidad más comúnmente utilizadas son: la distancia de Jaccard, la disimilitud de Bray-Curtis, la divergencia de Jensen-Shannon, UniFrac ponderado y UniFrac no ponderado ²⁶⁰.

Se ha realizado un análisis de abundancia diferencial de los taxones microbianos por pruebas estadísticas no paramétricas y la elaboración de un árbol de calor. El objetivo es ilustrar que microorganismos se presentan en mayor cantidad en cada grupo de estudio y conocer las diferencias de la microbiota entre casos y controles

Para establecer las diferencias cuantitativas como estadísticas de la estructura taxonómica entre grupos se ha representado la mediana de

la abundancia para cada grupo bacteriano y la prueba estadística no paramétrica de suma de rangos de Wilcoxon, respectivamente. El Procesado multivariante se realizó mediante diferentes programas diseñados en R.

Para poder explicar las diferencias biológicas observadas se ha aplicado un análisis lineal discriminativo del efecto del tamaño (Linear discriminant analysis Effect Size -LEfSe-). El LEfSe es un algoritmo diseñado para el descubrimiento de biomarcadores metagenómicos mediante comparación de clases, pruebas de consistencia biológica y estimación del tamaño del efecto. De esta manera, se extrae una amplia gama de datos genéticos de alto rendimiento con el fin de encontrar rasgos biológicamente relevantes que caractericen una o más condiciones experimentales y así poder determinar biomarcadores microbiológicos. Así, el LEfSe proporciona una lista de microorganismos diferenciales entre los grupos estudiados con significación estadística y biológica y los clasifica según el tamaño de efecto.

5. Análisis estadístico multivariante

El análisis de los resultados y la generación de figuras basadas en la información clínico-patológica, los estimadores alfa y la abundancia bacteriana relativa se ha llevado a cabo mediante el software libre R.

Para comprobar la normalidad de la distribución de los datos, se ha utilizado el test de Saphiro-Wilk y la prueba de Bartlett. Se han aplicado los test estadísticos oportunos en función del tipo de distribución para comprobar las diferencias estadísticas de las variables clínicas, analíticas e inmunofenotípicas. Se fijó una $p < 0.05$ como el límite para establecer diferencias significativas entre los grupos. Posteriormente,

se ha realizado una matriz de correlaciones utilizando el test de Spearman de las variables significativas utilizando los paquetes de las librerías de Rstudio “Hmisc” y “corrplot”.

En todas las muestras fecales, se han aplicado test no paramétricos para determinar los distintos indicadores de diversidad, abundancia y biomarcadores de la microbiota.

Por último, se han analizado los principales biomarcadores de microbiota con las variables clínicas más representativas mediante el paquete estadístico MetadeconfoundR de Rstudio. Este paquete estadístico realiza una búsqueda de biomarcadores en conjuntos de datos multiómicos transversales. En primer lugar, detecta asociaciones significativas entre los taxones suministrados y los metadatos disponibles mediante pruebas no paramétricas. Los valores P resultantes se ajustaron utilizando la false discovery rate (FDR) de Benjamini-Hochberg. En un segundo paso, se detectan posibles efectos de confusión entre diferentes variables de metadatos, utilizando pruebas post-hoc de comparación de modelos lineales anidados ²⁶⁵

RESULTADOS

1. Datos demográficos

Los datos demográficos se recogen en la Tabla 3. La muestra está compuesta por 32 mujeres (64%) y 18 hombres (36%), con una edad media de 80,9 años ($DE \pm 7,7$). El 82% de los pacientes no presentan deterioro cognitivo (GDS1) mientras que el resto muestran un leve deterioro cognitivo (GDS2). Según el índice de comorbilidad de Charlson, el grado de afectación patológico es bajo con una puntuación de 0-1 y 2-3 en 45 y 5 pacientes, respectivamente.

Tras aplicar la prueba de Shapiro-Wilk, se aprecia que la mayoría de las variables no muestran una distribución normal. Es por ello que se emplean test paramétricos para realizar el análisis estadístico de las diferentes variables.

	Controles	Fractura
Edad (años)	75,8 (3,9)*	84,3 (8,3)*
Mujer	15 (60%)	17 (68%)
Peso (kg)	73,8 (13,2)	71,6 (12,6)
Talla (m)	1,64 (0,09)	1,63 (0,08)
IMC (Kg/m²)	27,4 (4)	26,9 (4,4)
Lateralidad (D, I, Bilateral)	9,5,11 (36%,20%,44%)*	11,14,0 (44%,56%,0%)*

Diagnóstico	Coxartrosis 4 (16%) Gonartrosis 7 (28%) Sin patología 14(56%)	Fr. Subcapital 8 (32%) Fr. Pertrocantérea 15 (60%) Fr. Subcapital 2 (8%)
GDS		
GDS 1	20 (80%)	21 (84%)
GDS 2	5 (20%)	4 (16%)
I.C.Charlson		
0	21 (84%)	16 (64%)
1	2 (8%)	6 (24%)
2	1 (4%)	1 (4%)
3	1 (4%)	2 (8%)
Índice de Barthel	98,4 (2,8)*	86,2 (18,3)*
Índice de Lawton	6,64 (1,7)*	4,72 (2,4)*

Tabla 3. Datos demográficos. Las variables cuantitativas se expresan con su media y su desviación estándar entre paréntesis y las cualitativas con sus frecuencias absolutas y entre paréntesis las relativas. Se marcan con * las variables que muestran diferencias estadísticamente significativas.

No se han encontrado diferencias significativas respecto a la modalidad de convivencia de los pacientes antes de ser incluidos en

el trabajo. La mayoría convivían con su pareja o familia en su domicilio, correspondiendo un total de 17 (68%) en el grupo control y 18 (72%) en el patológico. 7 controles (28%) vivían solos en su domicilio frente a 4 casos (14%). Solo un control (4%) estaba ingresado en residencia mientras que, en los casos, se dio esta circunstancia en dos pacientes (8%). Por último, solo un caso de los registrados (4%) convivía en su domicilio con personas diferentes a su familia.

La HTA está presente como antecedentes médicos en 26 (52%) pacientes de la muestra, la DL en 20 (40%), la DM en 18 (36%), la obesidad en 9 (18%), la ACFA en 4 (8%) y el hábito tabáquico, la ICC, la enfermedad de Parkinson, la HBP y la EPOC en 1 (2%). No se encontraron diferencias significativas al comparar ambos grupos de estudio, la distribución de las variables se indica en la Tabla 4.

	Controles	Casos	sig
HTA	11 (44%)	15 (60%)	n.s.
DL	11 (44%)	9 (36%)	n.s.
DM	7 (28%)	11 (44%)	n.s.
Obesidad	5 (2%)	4 (16%)	n.s.
ACFA	2 (08%)	2 (08%)	n.s.
Fumador	1 (04%)	0(0%)	n.s.
ICC	1 (04%)	0(0%)	n.s.
Parkinson	0(0%)	1 (04%)	n.s.
HBP	1 (04%)	0(0%)	n.s.
EPOC	1 (04%)	0(0%)	n.s.

Tabla 4. Antecedentes médicos.

No se han encontrado diferencias significativas al evaluar la puntuación total del cuestionario de adherencia a la dieta mediterránea

MEDAS entre ambos grupos, con una mediana de 9 (IQR 2) en el grupo control y 10 (IQR 3) en el patológico.

2. Variables Analíticas

2.1. Perfil Bioquímico y hormonal

Tras aplicar la prueba de Shapiro-Wilk, se aprecia que la mayoría de las variables no muestran una distribución normal. Las variables proteínas totales, albuminas, sodio, potasio, calcio y fosforo inorgánico presentan una distribución normal. Tras hacer la prueba de Bartlett para analizar la igualdad de varianzas solo presenta varianzas distintas (heterocedasticidad) la variable fosforo inorgánico. Por lo tanto, solo se aplican pruebas paramétricas a las variables proteínas totales, albuminas, sodio, potasio, calcio mientras que al resto se aplica pruebas no paramétricas. En la Tabla 5 se recogen las diferencias entre las variables.

	Controles	Fractura	Sig
Glucosa (mg/dL)	104 (35)	126 (48)	n.s.
Urea (mg/dL)	38 (12)	50 (22)	0,005
Creatinina (mg/dL)	0,8 (0,3)	1,1 (0,7)	0,023
Filtrado Glomerular (mL/min/1,73m ²)	81,5 (19,3)	57,2 (35,3)	0,002
Colesterol total (mg/dL)	176 (60)	136 (22)	<0,001
Proteínas Totales (mg/dL)*	6,7 (0,5)	6 (0,5)	<0,001
Albumina (g/dL)*	4,2 (0,3)	3,7 (0,3)	<0,001
Fosfatasas alcalinas (mU/mL)	73 (23)	75(25)	n.s.
Sodio (mEq/L)*	141,3 (2,5)	139,6 (2,7)	0,026
Potasio (mEq/L)*	4,3 (0,4)	4,3 (0,4)	n.s.
Calcio total (mg/dL)*	9,4 (0,5)	8,6 (0,4)	<0,001

Fósforo inorgánico (mg/dL)	3,3 (0,5)	3,3 (0,9)	n.s.
Proteína C reactiva (mg/L)	1,7 (3,5)	44,4 (41,5)	<0,001
TSH (μ UI/mL)	1,9 (1,3)	1,8 (1,4)	n.s.
25OH Vitamina D (ng/mL)	21 (9)	15(15)	0,016
PTH (pg/mL)	47 (21)	60(28)	0,005
Somatomedina C (IGF1) (ng/mL)	113 (80)	100(45)	n.s.

Tabla 5. Variables analíticas. Las variables están expresadas en mediana con su rango intercuartil (IRQ) entre paréntesis. Las variables marcadas con * presentan una distribución normal y por tanto están representadas con la media y su desviación estándar entre paréntesis. Se señala las diferencias significativas <0,05 tras realizar el t-test para distribuciones normales y el test Wilcoxon para las no normales.

2.2. Hematología General y Recuento Celular

Según la prueba de Shapiro-Wilk, la mayoría de las variables presentan una distribución no normal. Las variables hemáties, linfocitos y linfocitos T presentan una distribución normal con varianzas iguales (homocedasticidad). En la Tabla 6 se recogen las diferencias entre las variables.

	Controles	Casos	Sig
VSG (mm/h)	18 (15)	26 (26)	n.s.
Hemoglobina (g/dL)	13,7 (1,6)	12,6 (2,9)	0,027
Hemáties (10^{12} /L)*	4,4 (0,4)	3,8 (0,6)	<0,001
Leucocitos (10^9 /L)	6,1 (1,8)	10,4 (4,5)	<0,001
Neutrófilos (10^9 /L)	3,9 (1,8)	7,9 (5)	<0,001
Linfocitos (10^9 /L)*	1,3 (0,4)	1,3 (0,6)	n.s.
Monocitos (10^9 /L)	0,5 (0,2)	0,7 (0,4)	0,001
Eosinófilos (10^9 /L)	0,1 (0,1)	0,1 (0,1)	n.s.
Basófilos (10^9 /L)	0	0	n.s.
Plaquetas (10^9 /L)	201 (63)	192 (82)	n.s.

Tabla 6. Hematología y recuento celular sanguíneo. Las variables están expresadas en mediana con su rango intercuartil (IRQ) entre paréntesis. Las variables marcadas con * presentan una distribución normal y por tanto están representadas con la media y su desviación estándar entre paréntesis. Se señala las diferencias significativas <0,05 tras realizar el t-test para distribuciones normales y el test Wilcoxon para las no normales

2.3. Inmunofenotipo

Tras realizar el test Shapiro-Wilk y de las diferencias de varianza en las variables de las distintas subpoblaciones linfocitarias, se aprecia un comportamiento no normal de estas. Es por ello que se emplea el test no paramétrico de Wilcoxon con el fin de apreciar diferencias entre las variables (se establece nivel de significación estadística $<0,05$). No se han encontrado diferencias significativas en los tubos de función, TCR ni LT, sin embargo, en el tubo de activación de linfocitos T se aprecian diferencias significativas en dos variables (Tabla 7).

	Controles	Fractura	sig
LT CD4+ IL2+ IFNg- ($10^9/L$)	0,106 (0,174)	0,116 (0,165)	n.s.
LT CD4+ IL2+ IFNg+ ($10^9/L$)	0,157 (0,206)	0,136 (0,193)	n.s.
LT CD4+ IL2-IFNg- ($10^9/L$)	0,031 (0,039)	0,01 (0,02)	n.s.
LT CD4+ IL2-IFNg+ ($10^9/L$)	0,262 (0,23)	0,331 (0,265)	n.s.
LT CD4+ TNFa+ IFNg- ($10^9/L$)	0,068 (0,058)	0,039 (0,087)	n.s.
LT CD4+ TNFa+ IFNg+ ($10^9/L$)	0,241 (0,193)	0,085 (0,194)	n.s.
LT CD4+ TNFa-IFNg- ($10^9/L$)	0,074 (0,06)	0,029 (0,061)	$<0,05$
LT CD4+ TNFa-IFNg+ ($10^9/L$)	0,1 (0,213)	0,218 (0,217)	n.s.
LT CD8+ IL2+ IFNg- ($10^9/L$)	0,007 (0,013)	0,012 (0,025)	n.s.
LT CD8+ IL2+ IFNg+ ($10^9/L$)	0,012 (0,026)	0,007 (0,012)	n.s.
LT CD8+ IL2-IFNg- ($10^9/L$)	0,013 (0,022)	0,007 (0,018)	n.s.
LT CD8+ IL2-IFNg+ ($10^9/L$)	0,051 (0,065)	0,073 (0,084)	n.s.
LT CD8+ TNFa+ IFNg- ($10^9/L$)	0,164 (0,159)	0,101 (0,233)	n.s.
LT CD8+ TNFa+ IFNg+ ($10^9/L$)	0,018 (0,035)	0,012 (0,026)	n.s.
LT CD8+ TNFa-IFNg- ($10^9/L$)	0,073 (0,187)	0,033 (0,095)	n.s.
LT CD8+ TNFa-IFNg+ ($10^9/L$)	0,044 (0,063)	0,062 (0,075)	$<0,05$

Tabla 7 Tabla inmunofenotipo tubo activación LT. Las variables están expresadas en mediana con su rango intercuartil (IRQ) entre paréntesis. Se señala las diferencias significativas $<0,05$ tras realizar el test Wilcoxon para las no normales.

3. Matriz de correlaciones

Con la intención de evaluar la interrelación de las variables demográficas y analíticas que han presentado significación estadística, se ha realizado una matriz de correlación. En dicho análisis se incluyen, además, las variables de inmunofenotipo linfocitario del tubo de activación LT. En Tabla 18 del Anexo se presentan los índices de correlación de las variables y en la Tabla 19 del Anexo se recogen las correlaciones que han presentado significación estadística. En la Ilustración 9 se aprecia la relación de las variables en función de las diferentes correlaciones y su significación estadística ($p < 0,05$, $p < 0,01$ y $p < 0,001$).

Se aprecia una alta correlación estadística entre varios grupos de variables destacados en triángulos negros. Hay cinco grupos muy destacados que incluyen :

1. Marcadores típicos de osteoporosis: Vitamina D, Colesterol total, Albúmina y Calcio total.
2. Marcadores linfocitarios CD4 y CD8 con los mismos receptores TNF α y IFN γ y IL2-IFN γ -, así como LT CD8+ IL2+IFN γ +, lo que coinciden con alto recuento de Linfocitos.
3. Por otro lado, la Urea, PTH, Edad, Proteína C Reactiva, leucocitos y neutrófilos, también muestran una fuerte correlación positiva. Al tiempo que la Proteína C Reactiva, Leucocitos y Linfocitos manifiestan correlación negativa con los marcadores de osteoporosis del grupo 1 (Vitamina D, Colesterol total, Albúmina y Calcio total).

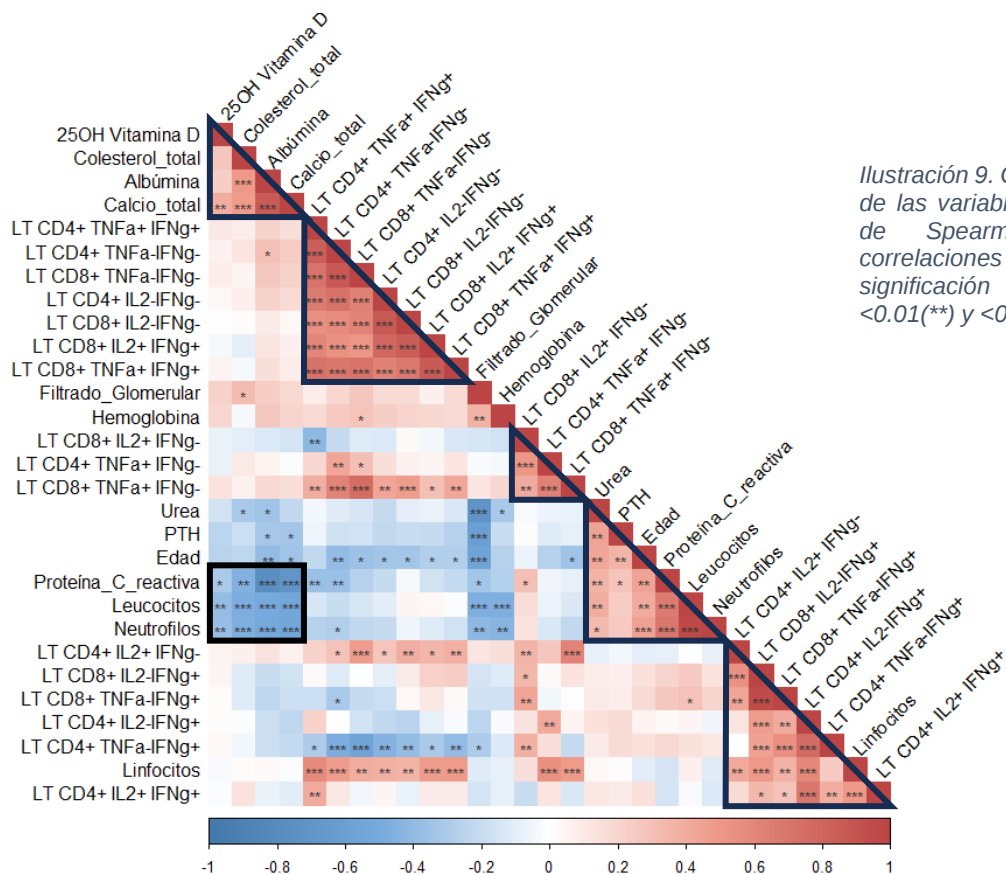


Ilustración 9. Gráfico matriz de correlación de las variables aplicando la correlación de Spearman. Se marcan las correlaciones entre variables con significación estadística <0.05 (*), <0.01 (**) y <0.001 (***)

4. Análisis de la microbiota intestinal

Tras realizar el filtrado y normalización de datos, el número total de taxones obtenidos es de 2.112.538, 1.081.646 corresponden al grupo control y 1.030.892 al grupo patológico. De acuerdo con los datos de secuenciación de todas las muestras, la microbiota intestinal se clasificó en 11 filos, 16 clases, 33 órdenes, 52 familias, 113 géneros y 78 especies. En la Ilustración 10 se detallan las curvas de rarefacción de la riqueza de especies de cada una de las muestras distribuidas según los grupos de estudio. Así, puede observarse que la relación entre la riqueza de taxones respecto el número de secuenciaciones es más uniforme en el grupo control que en el grupo patológico. Además, se debe puntualizar que la muestra del grupo patológico FRC024 presenta una rarefacción baja respecto a todas las muestras del estudio. No obstante, esta se ha incluido en el análisis de datos debido a que alcanza un número de lecturas lo suficientemente alto para que no sea descartada. Por tanto, se ha decidido analizar todas las muestras en su totalidad con el fin de evitar que las poblaciones sean artificialmente similares y se distorsione la comparativa dentro de la comunidad bacteriana.

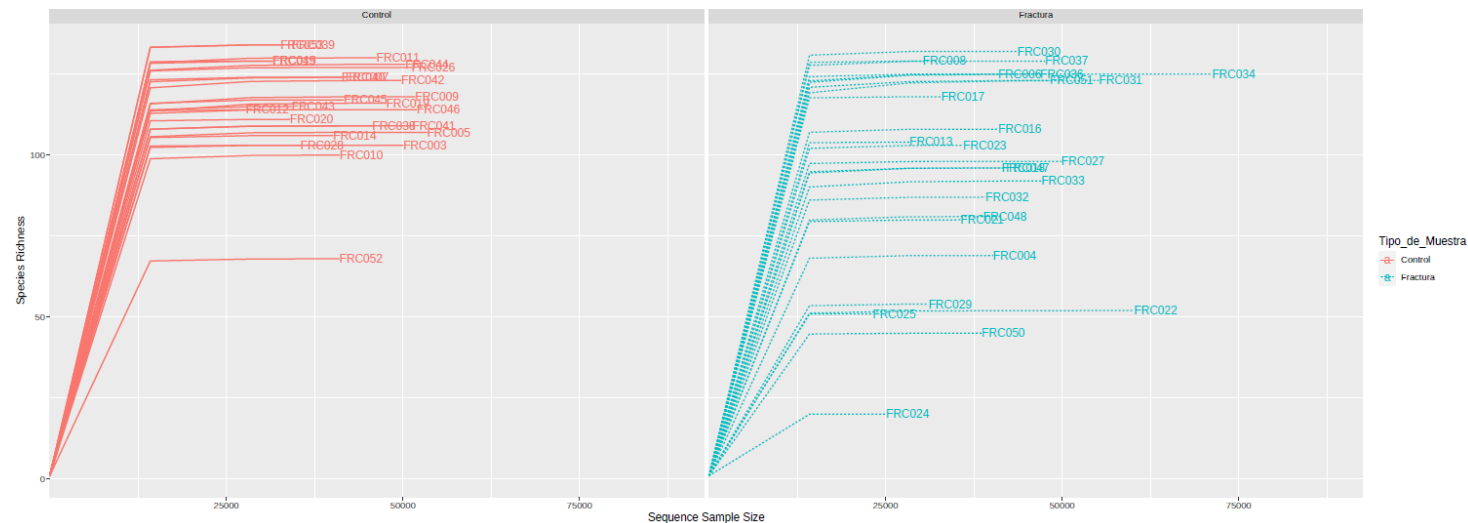


Ilustración 10. Gráfico general de rarefacción, las cifras del eje X representan el número de secuencias y las del eje Y al número de taxones

4.1. DIVERSIDAD

Se ha calculado la α -diversidad para ambos grupos de estudio. La α -diversidad resume tanto la riqueza de especies (número total de especies) como la uniformidad (distribución de la abundancia entre especies) dentro de una muestra ²⁶⁰. Existen diferencias significativas entre los grupos de muestras del Control y Fractura en los estimadores de α -diversidad en el nivel de filo (índice de Simpson 207,0) y clase (índice de Shannon 205,0 e índice de Simpson 210,0). Además, se han encontrado diferencias estadísticas para los índices de Chao1, ACE y Shannon en los niveles de género y especie (Ilustración 11). Esto indica que el grupo de fractura posee menor α -diversidad que el grupo control. La información pormenorizada en la que se aprecia que la riqueza y diversidad fue significativamente menor en el grupo patológico se recogen en las Tablas 8 y 9.

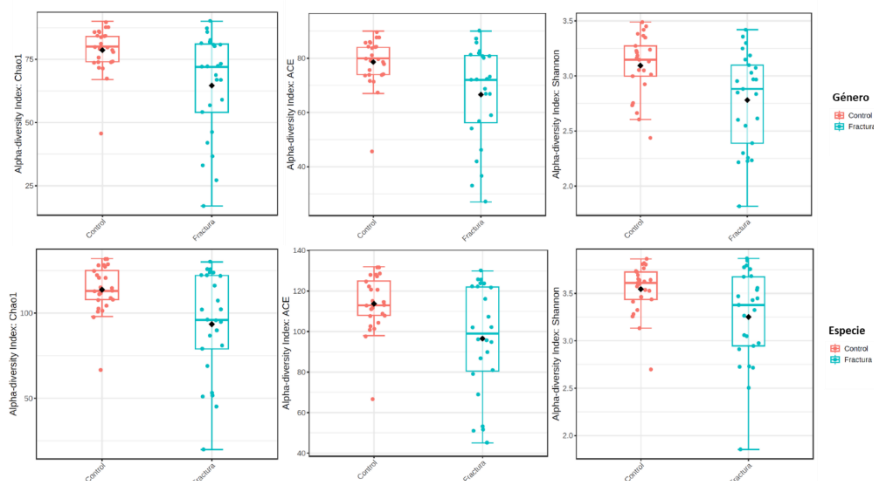


Ilustración 11. Estimadores de α -diversidad Chao1, ACE y Shannon para género y especie.

	FILO		CLASE		ORDEN	
	sig		sig		sig	
<i>Chao1</i>	285,5	0,591	279,0	0,515	380,5	0,188
<i>ACE</i>	44,0	0,664	99,0	0,282	242,5	0,401
<i>Shannon</i>	217,0	0,065	205,0	0,037	375,0	0,231
<i>Simpson</i>	207,0	0,041	210,0	0,047	406,0	0,071

Tabla 8. Índices de diversidad alfa distribuidos según filo, clase y orden. Se marca en negrita los resultados que muestran una diferencia significativa menor de 0,05. Método estadístico Mann-Whitney/Kruskal-Wallis.

	FAMILIA		GÉNERO		ESPECIE	
	sig		sig		sig	
<i>Chao1</i>	392,0	0,124	448,5	0,008	438,5	0,015
<i>ACE</i>	342,0	0,263	423,5	0,014	413,5	0,024
<i>Shannon</i>	309,0	0,954	451,0	0,007	418,0	0,041
<i>Simpson</i>	283,0	0,577	413,0	0,052	394,0	0,117

Tabla 9. Índices de diversidad alfa distribuidos según familia, género y especie. Se marca en negrita los resultados que muestran una diferencia significativa menor de 0,05. Método estadístico Mann-Whitney/Kruskal-Wallis.

Respecto a la β -diversidad, se han analizado los PCoA mediante la medición de la distancia de Bray-Curtis con el fin de evaluar las diferencias en la estructura de las comunidades de bacterias entre ambos grupos. En ellos, se aprecia en todos los niveles taxonómicos del grupo de fractura una mayor heterogeneidad de sus comunidades bacterianas respecto a los controles (Ilustración 12). Además, la microbiota intestinal de los pacientes con fractura de cadera es significativamente diferente de la del grupo sano, como se recoge en la Tabla 10 utilizando diferentes índices para análisis de la β -diversidad.

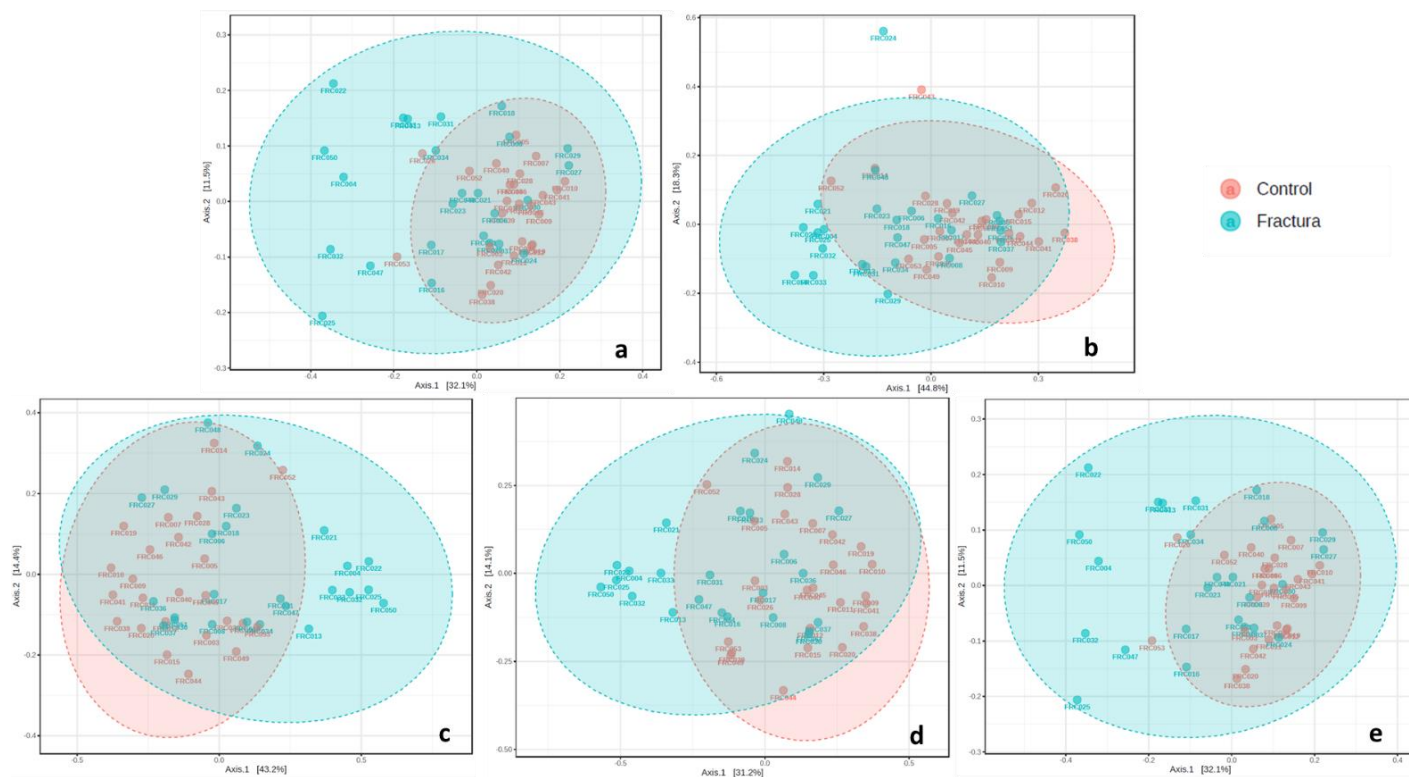


Ilustración 12. Análisis de coordenadas principales (PCoA) basado en la distancia Bray-Curtis de controles y pacientes con fractura de cadera según filo (a), orden (b), familia (c), género (d) y especie (e).

		Bray-Curtis Index	Jensen-Shannon Divergence	Jaccard Index
FILO	F	4,461	12,694	41,058
	R ²	0,08504	0,02576	0,07880
	sig	0,009	0,321	0,006
CLASE	F	48,448	26,255	41,382
	R ²	0,09168	0,05186	0,07937
	sig	0,002	0,084	0,004
ORDEN	F	67,113	97,827	50,158
	R ²	0,12267	0,16930	0,09461
	sig	0,001	0,001	0,001
FAMILIA	F	65,364	11,029	43,338
	R ²	0,11985	0,18683	0,08281
	sig	0,001	0,001	0,001
GÉNERO	F	4,929	75,178	33,363
	R ²	0,09313	0,13541	0,06499
	sig	0,001	0,001	0,001
ESPECIE	F	44,455	49,883	34,712
	R ²	0,08477	0,09414	0,06744
	sig	0,001	0,001	0,001

Tabla 10. Índices de diversidad beta distribuidos taxonómicamente. Análisis estadístico realizado mediante PERMANOVA/adonis (F) donde R indica la disimilitud entre los grupos. Se ha resaltado en negrita los resultados que muestran una diferencia significativa menor de 0,05. Se marca en negrita los resultados que muestran una diferencia significativa menor de 0,05.

En conjunto, estos hallazgos implican que la estructura de la microbiota intestinal es significativamente diferente entre el grupo sano y el grupo patológico, tanto en riqueza y abundancia como en heterogeneidad.

4.2. ANÁLISIS DE ABUNDANCIAS

4.2.1. Perfiles de abundancia

4.2.1.a. Filo

Tras realizar el análisis de abundancia de la comunidad bacteriana intestinal, se objetiva en el nivel de filo (Ilustración 13) que los grupos de bacterias Firmicutes, Bacteroidota, Proteobacteria y Campilobacterota constituyen los cuatro filos dominantes en todas las muestras. Firmicutes y Bacteroidetes son los filos mayoritarios en ambos grupos de estudio y suponen el 87,5% de las bacterias analizadas en todos los participantes del estudio. Las proporciones medias de Firmicutes/Bacteroidetes son de 1,824 y 1,184 en los grupos de controles y de fractura, respectivamente. El resto de filos que constituyen la abundancia total de la comunidad microbiana de ambos grupos se recoge en la Tabla 11.

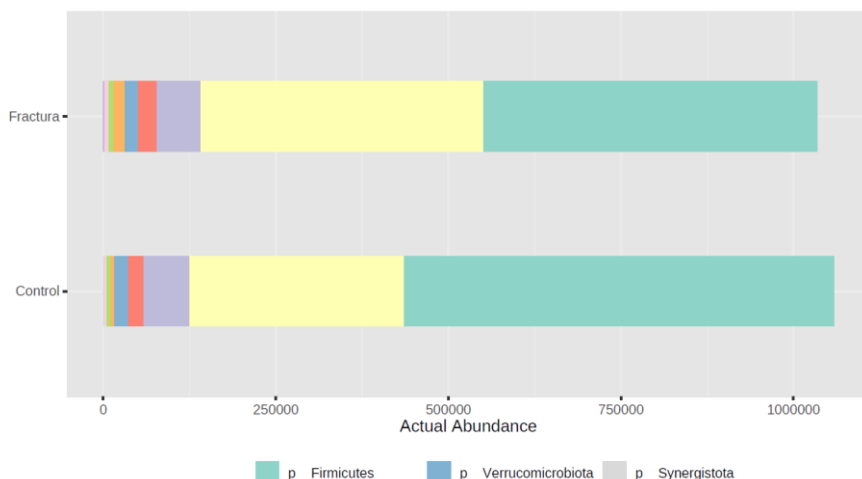


Ilustración 13. Barras apiladas en la que se muestra la abundancia total de la comunidad bacteriana intestinal en el nivel de filo para los grupos de comparación control y casos.

CONTROLES				FRACTURA			
Taxón		Abund.	%	Taxón		Abund.	%
1	Firmicutes	618538	57,2	1	Firmicutes	482901	46,8
2	Bacteroidota	339131	31,3	2	Bacteroidota	407825	39,6
3	Proteobacteria	66242	6,1	3	Proteobacteria	63531	6,2
4	Campilobacterota	22805	2,1	4	Campilobacterota	27794	2,7
5	Verrucomicrobiota	19548	1,8	5	Verrucomicrobiota	17968	1,7
6	Actinobacteriota	6813	0,6	6	Fusobacteriota	16649	1,6
7	Fusobacteriota	4749	0,4	7	Actinobacteriota	7293	0,7
8	Desulfobacterota	3089	0,3	8	Desulfobacterota	4503	0,4
9	Synergistota	311	0,03	9	Synergistota	1318	0,1
10	Euryarchaeota	292	0,03	10	Euryarchaeota	966	0,1
11	Cyanobacteria	128	0,01	11	Cyanobacteria	144	0,01

Tabla 11. Distribución de la abundancia total (Abund.) y relativa (%) de los taxones en el nivel de Filo entre ambos grupos de comparación.

Árbol de calor (filo)

El árbol de calor permite representar cuantitativamente (utilizando la mediana de abundancia) y estadísticamente (utilizando la prueba no paramétrica de suma de rangos de Wilcoxon) las diferencias taxonómicas entre las comunidades microbianas. Se presentan los resultados según los diferentes niveles taxonómicos ²⁶⁶.

Se han encontrado diferencias significativas entre los filos Firmicutes (log 2 median ratio 0,3374 y diferencia de medianas 0,1187; $p < 0,02$) y Bacteroidetes (log 2 median ratio -0,3370 y diferencia de medianas -0,0855; $p < 0,01$) entre el grupo control y el patológico (Ilustración 14). De esta manera, en el grupo con fractura de cadera, se aprecia una disminución estadísticamente significativa en la proporción de Firmicutes y un aumento de Bacteroidetes respecto al grupo control.

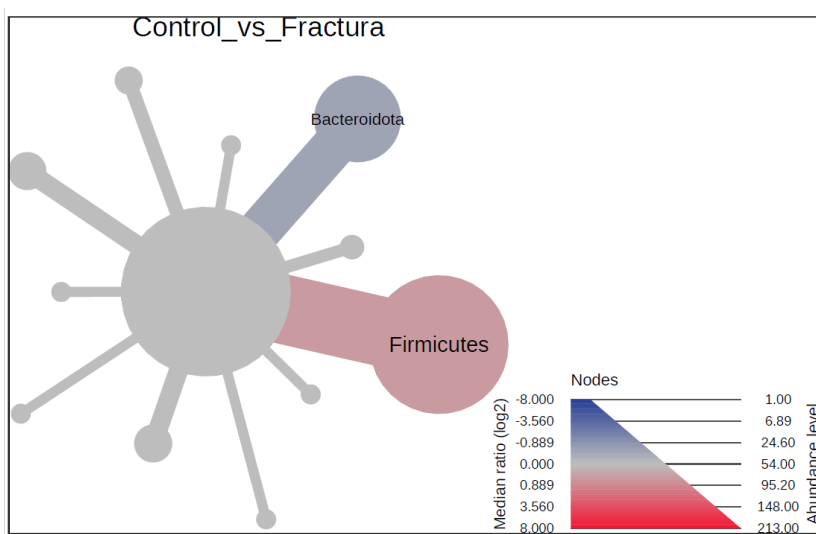


Ilustración 14 Árbol de calor. El tamaño y color de los nodos y las aristas se relacionan con la abundancia de los organismos según el filo. El color de cada taxón representa la relación log-2 de las proporciones medianas de lecturas observadas en cada grupo de estudio. Sólo se indican los filos bacterianos que muestran diferencias significativas determinadas mediante una prueba de suma de rangos de Wilcox seguida de una corrección Benjamini-Hochberg (FDR) para comparaciones múltiples.

4.2.1.b. Orden

Respecto al nivel de orden, se han detectado un total de 33 órdenes de bacterias diferentes (Ilustración 15). La abundancia de todos los microorganismos y su porcentaje se recogen en la Tabla 12. Las Bacteroidales constituyen la mayor proporción en todas las muestras y cinco órdenes representan los grupos bacterianos más prevalentes. De ellos, en el grupo control, solo tres órdenes (Bacteroidales, Oscillospirales y Lachnospirales) contribuyen a más de dos tercios de la comunidad bacteriana. Por su parte, en el grupo patológico, los tres órdenes Bacteroidales, Peptostreptococcales-Tissierellales y Oscillospirales configuran más del 60% de la muestra.

Resultados

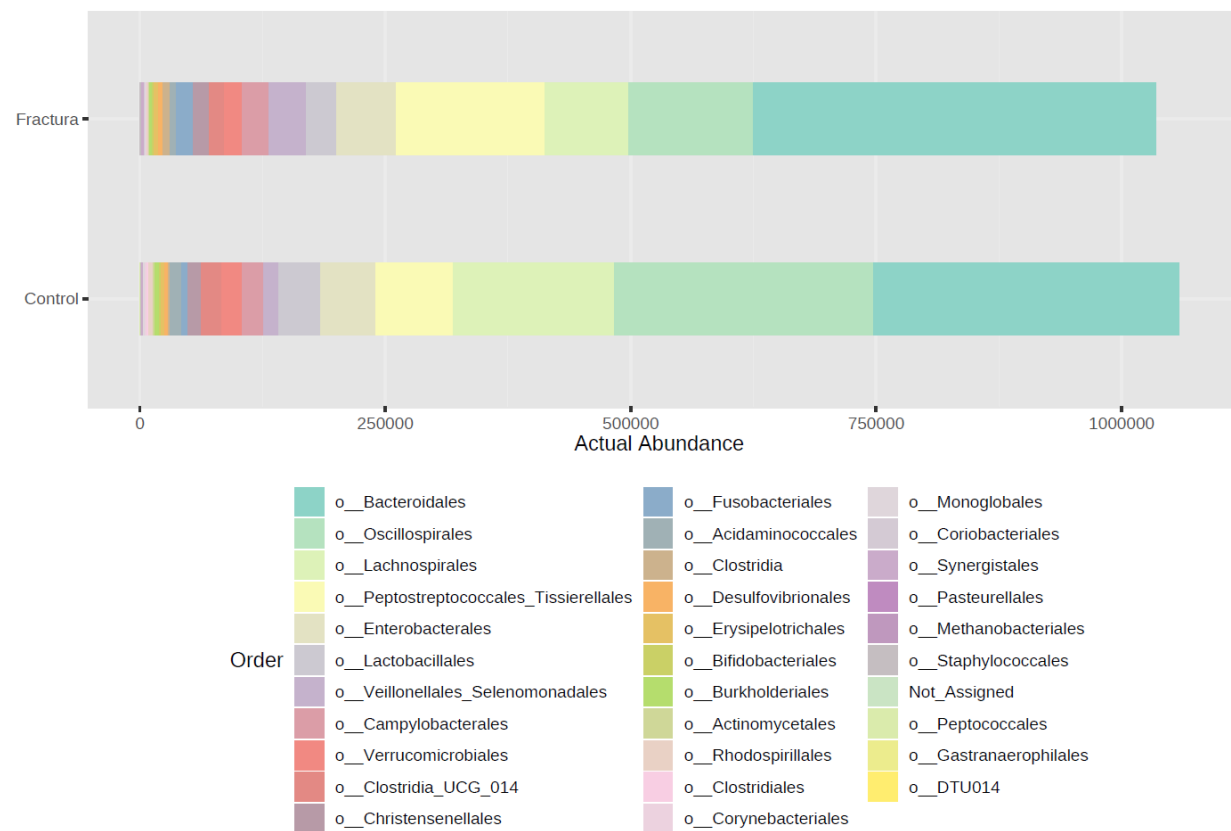


Ilustración 15. Barras apiladas en la que se muestra la abundancia total de la comunidad bacteriana intestinal en el nivel de orden para los grupos de comparación control y casos

CONTROLES				FRACTURA			
Taxón		Abund.	%	Taxón		Abund.	%
1	Bacteroidales	339062	31,4	1	Bacteroidales	407652	39,5
2	Oscillospirales	263102	24,3	2	Peptostreptococcales-Tissierellales	151583	14,7
3	Lachnospirales	164760	15,2	3	Oscillospirales	125788	12,2
4	Peptostreptococcales-Tissierellales	77234	7,1	4	Lachnospirales	86578	8,4
5	Enterobacterales	57329	5,3	5	Enterobacterales	61085	5,9
6	Lactobacillales	39401	3,6	6	Veillonellales-Selenomonadales	36901	3,6
7	Campylobacterales	22805	2,1	7	Lactobacillales	30446	3,0
8	Clostridia_UCG_014	20800	1,9	8	Campylobacterales	27794	2,7
9	Verrucomicrobiales	19548	1,8	9	Verrucomicrobiales	17968	1,7
10	Christensenellales	15066	1,4	10	Christensenellales	17291	1,7
11	Veillonellales-Selenomonadales	14939	1,4	11	Fusobacteriales	16649	1,6
12	Acidaminococcales	12717	1,2	12	Clostridia_UCG_014	15292	1,5
13	Fusobacteriales	4749	0,4	13	Clostridia	7284	0,7
14	Burkholderiales	3925	0,4	14	Acidaminococcales	7216	0,7
15	Rhodospirillales	3838	0,4	15	Desulfovibrionales	4503	0,4
16	Bifidobacteriales	3147	0,3	16	Erysipelotrichales	2827	0,3
17	Desulfovibrionales	3089	0,3	17	Bifidobacteriales	2753	0,3
18	Erysipelotrichales	2909	0,3	18	Actinomycetales	1778	0,2
19	Clostridiales	2774	0,3	19	Coriobacteriales	1699	0,2
20	Clostridia	2362	0,2	20	Burkholderiales	1682	0,2
21	Monoglobales	1768	0,2	21	Synergistales	1318	0,1
22	Corynebacteriales	1653	0,2	22	Corynebacteriales	1063	0,1
23	Actinomycetales	1599	0,2	23	Methanobacteriales	966	0,1
24	Pasteurellales	1150	0,1	24	Rhodospirillales	642	0,1
25	Coriobacteriales	414	0,0	25	Monoglobales	628	0,1
26	Synergistales	311	0,0	26	Clostridiales	460	0,0
27	Peptococcales	301	0,0	27	RF39	214	0,0
28	Methanobacteriales	292	0,0	28	Peptococcales	212	0,0
29	Not_Assigned	213	0,0	29	Flavobacteriales	173	0,0
30	RF39	148	0,0	30	Gastranaerophilales	144	0,0

Resultados

31	Gastranaerophilales	128	0,0	31	Pasteurellales	122	0,0
32	Flavobacteriales	69	0,0	32	DTU014	118	0,0
33	DTU014	44	0,0	33	Not_Assigned	63	0,0

Tabla 12. Distribución de la abundancia total (Abund.) y relativa (%) de los taxones en el nivel de Orden entre ambos grupos de comparación.

Árbol de calor (orden)

Se han encontrado diferencias significativas para los órdenes Oscillospirales (log 2 median ratio 1,3704 y diferencia de medianas 0,1567; $p < 0,001$), Lachnospirales (log 2 median ratio 0,8936 y diferencia de medianas 0,0640; $p = 0,002$), Bacteroidales (log 2 median ratio -0,3370 y diferencia de medianas -0,0855; $p < 0,01$) y Peptostreptococcales-Tissierellales (log 2 median ratio -1,0153 y diferencia de medianas -0,0640; $p < 0,001$) entre el grupo control y el patológico (Ilustración 16).

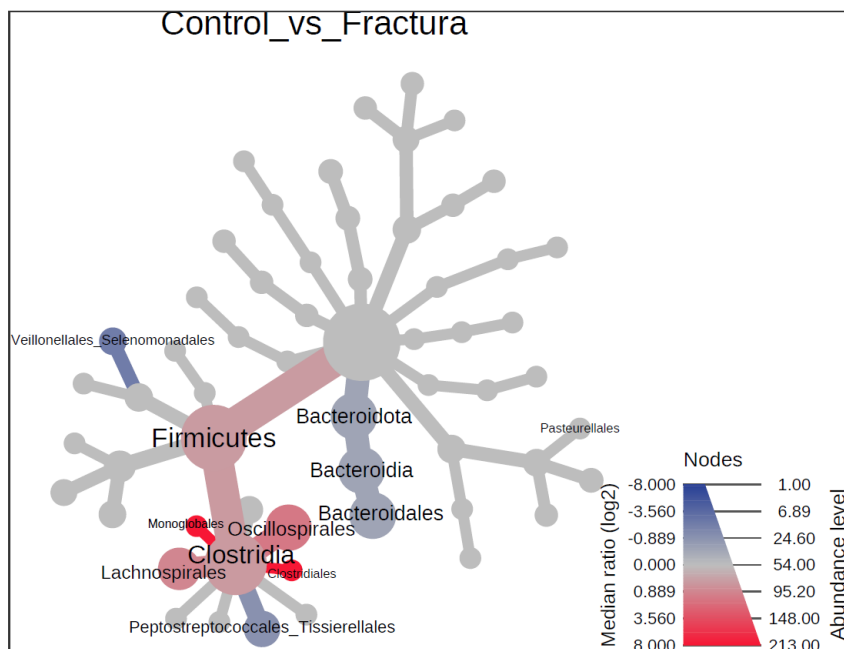


Ilustración 16. Árbol de calor. El tamaño y color de los nodos y las aristas se relacionan con la abundancia de los organismos según el orden. El color de cada taxón representa la relación log-2 de las proporciones medianas de lecturas observadas en cada grupo de estudio. Sólo se indican los órdenes bacterianos que muestran diferencias significativas determinadas mediante una prueba de suma de rangos de Wilcox seguida de una corrección Benjamini-Hochberg (FDR) para comparaciones múltiples.

4.2.1.c. Familia

Se han identificado 52 familias bacterianas entre ambos grupos de estudio y la familia Bacteroidaceae es la población de bacterias más numerosa de las 52 identificadas en toda la muestra estudiada (Ilustración 17). La abundancia de todos los microorganismos y su porcentaje se recogen en la Tabla 13. Cuando se comparan los casos y los controles, es especialmente relevante el cambio de la jerarquía que se produce en los grupos bacterianos más abundantes. Las

Resultados

familias Bacteroidaceae, Ruminococcaceae y Lachnospiraceae constituyen los grupos bacterianos más abundante en los controles y prácticamente suponen el 50% de la muestra. Por otro lado, las familias Peptostreptococcales-Tissierellales, Prevotellaceae, Bacteroidaceae y Porphyromonadaceae representan casi la mitad de los taxones identificados en el grupo patológico.

CONTROLES				FRACTURA			
Taxón		Abund.	%	Taxón		Abund.	%
1	Bacteroidaceae	182571	16,9	1	Peptostreptococcales-Tissierellales	138179	13,4
2	Ruminococcaceae	172104	15,9	2	Prevotellaceae	131605	12,8
3	Lachnospiraceae	164630	15,2	3	Bacteroidaceae	121403	11,8
4	Peptostreptococcales-Tissierellales	68753	6,4	4	Porphyromonadaceae	115435	11,2
5	Prevotellaceae	68737	6,4	5	Lachnospiraceae	86535	8,4
6	Oscillospiraceae	66812	6,2	6	Enterobacteriaceae	61085	5,9
7	Enterobacteriaceae	57329	5,3	7	Ruminococcaceae	60218	5,8
8	Porphyromonadaceae	41992	3,9	8	Oscillospiraceae	50450	4,9
9	Streptococcaceae	32440	3,0	9	Veillonellaceae	36901	3,6
10	Campylobacteraceae	22805	2,1	10	Streptococcaceae	29143	2,8
11	Eubacterium coprostanoligenes	21179	2,0	11	Campylobacteraceae	27794	2,7
12	Clostridia_UCG_014	20800	1,9	12	Rikenellaceae	18217	1,8
13	Akkermansiaceae	19548	1,8	13	Akkermansiaceae	17968	1,7
14	Rikenellaceae	18441	1,7	14	Christensenellaceae	17291	1,7
15	Tannerellaceae	18123	1,7	15	Fusobacteriaceae	16649	1,6
16	Christensenellaceae	15066	1,4	16	Clostridia_UCG_014	15292	1,5
17	Veillonellaceae	14939	1,4	17	Eubacterium coprostanoligenes	13443	1,3
18	Acidaminococcaceae	12717	1,2	18	Tannerellaceae	13366	1,3
19	Anaerovoracaceae	7472	0,7	19	Anaerovoracaceae	13245	1,3
20	Lactobacillaceae	6654	0,6	20	Hungateiclostridiaceae	7284	0,7
21	Fusobacteriaceae	4749	0,4	21	Acidaminococcaceae	7216	0,7
22	Barnesiellaceae	4346	0,4	22	Desulfovibrionaceae	4503	0,4

23	uncultured	3929	0,4	23	Marinifilaceae	3921	0,4
24	Sutterellaceae	3925	0,4	24	Bifidobacteriaceae	2753	0,3
25	Marinifilaceae	3342	0,3	25	Barnesiellaceae	2221	0,2
26	Bifidobacteriaceae	3147	0,3	26	Erysipelatoclostridiaceae	2097	0,2
27	Desulfovibrionaceae	3089	0,3	27	Actinomycetaceae	1778	0,2
28	Clostridiaceae	2774	0,3	28	Sutterellaceae	1682	0,2
29	Erysipelatoclostridiaceae	2409	0,2	29	Muribaculaceae	1484	0,1
30	Hungateiclostridiaceae	2362	0,2	30	Atopobiaceae	1393	0,1
31	Monoglobaceae	1768	0,2	31	Synergistaceae	1318	0,1
32	Corynebacteriaceae	1653	0,2	32	Corynebacteriaceae	1063	0,1
33	Actinomycetaceae	1599	0,2	33	UCG_010	1054	0,1
34	Butyricoccaceae	1516	0,1	34	Lactobacillaceae	1031	0,1
35	Muribaculaceae	1510	0,1	35	Methanobacteriaceae	966	0,1
36	UCG_010	1265	0,1	36	uncultured	764	0,1
37	Pasteurellaceae	1150	0,1	37	Erysipelotrichaceae	730	0,1
38	Peptostreptococcaceae	1009	0,1	38	Monoglobaceae	628	0,1
39	Erysipelotrichaceae	500	0,1	39	Clostridiaceae	460	0,0
40	Coriobacteriaceae	328	0,0	40	Butyricoccaceae	452	0,0
41	Synergistaceae	311	0,0	41	Coriobacteriaceae	306	0,0
42	Aerococcaceae	307	0,0	42	Aerococcaceae	272	0,0
43	Peptococcaceae	301	0,0	43	RF39	214	0,0
44	Methanobacteriaceae	292	0,0	44	Peptococcaceae	212	0,0
45	Not_Assigned	213	0,0	45	Flavobacteriaceae	173	0,0
46	RF39	148	0,0	46	Peptostreptococcaceae	159	0,0
47	Oscillospirales	135	0,0	47	Gastranaerophilales	144	0,0
48	Defluviitaleaceae	130	0,0	48	Pasteurellaceae	122	0,0
49	Gastranaerophilales	128	0,0	49	DTU014	118	0,0
50	Atopobiaceae	86	0,0	50	Not_Assigned	63	0,0
51	Flavobacteriaceae	69	0,0	51	Oscillospirales	49	0,0
52	DTU014	44	0,0	52	Defluviitaleaceae	43	0,0

Tabla 13. Distribución de la abundancia total (Abund.) y relativa (%) de los taxones en el nivel de familia entre ambos grupos de comparación

Resultados

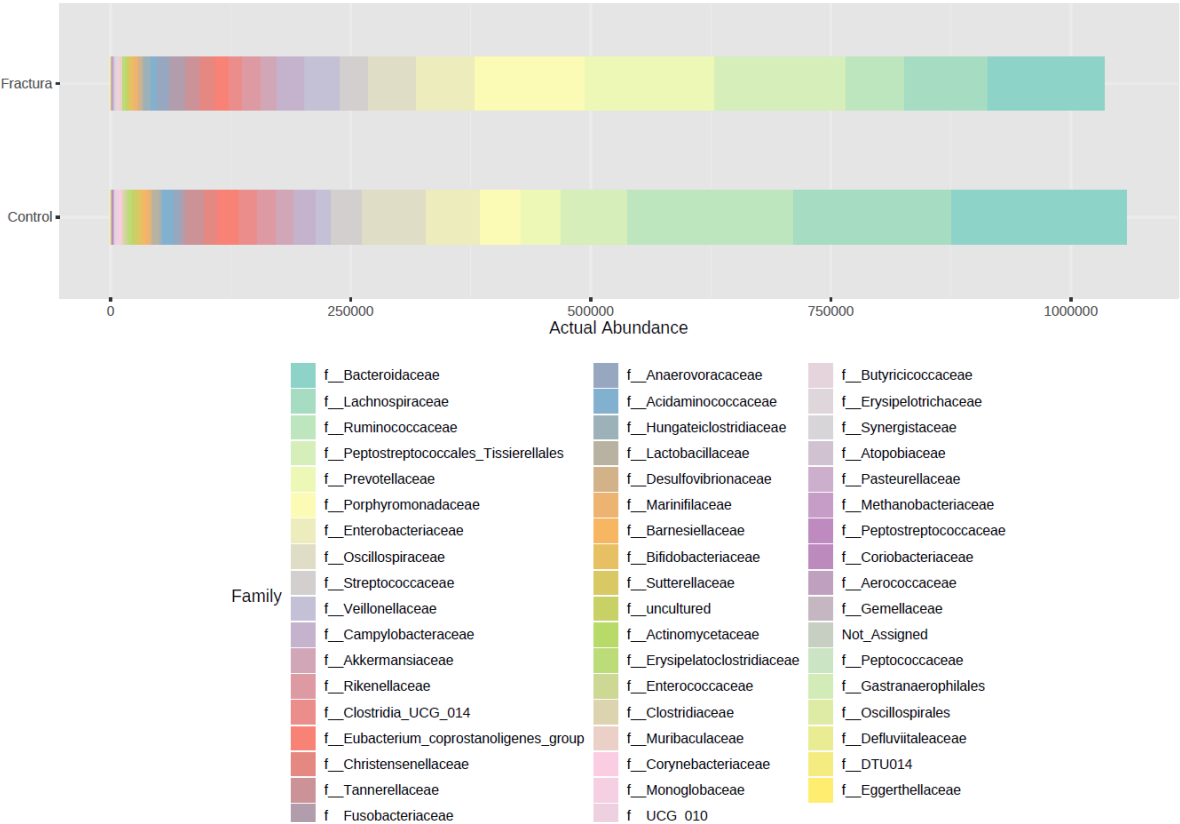


Ilustración 17. Barras apiladas en la que se muestra la abundancia total de la comunidad bacteriana intestinal en el nivel de familia para los grupos de comparación control y casos

Árbol de calor (familia)

Al comparar los grupos control y patológicos, se destacan las siguientes familias de bacterias que presentan diferencias significativas: Ruminococcaceae (log 2 median ratio 2,2692 y diferencia de medianas 0,1077; $p < 0,001$), Lachnospiraceae (log 2 median ratio 0,8936 y diferencia de medianas 0,064; $p = 0,002$), Veillonellaceae (log 2 median ratio -2,1596 y diferencia de medianas -0,0185; $p < 0,05$), Peptostreptococcales_Tissierellales (log 2 median ratio -1,3708 y diferencia de medianas -0,0761; $p = 0,001$) y Porphyromonadaceae (log 2 median ratio -2,2167 y diferencia de medianas -0,0925; $p = 0,001$) (Ilustración 18).

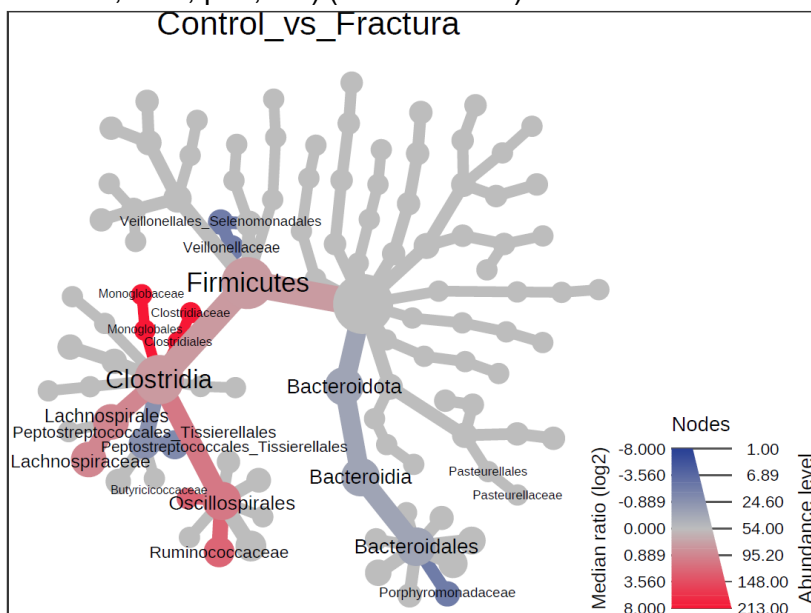


Ilustración 18. Árbol de calor. El tamaño y color de los nodos y las aristas se relacionan con la abundancia de los organismos según la familia. El color de cada taxón representa la relación log-2 de las proporciones medianas de lecturas observadas en cada grupo de estudio. Sólo se indican las familias bacterianas que muestran diferencias significativas determinadas mediante una prueba de suma de rangos de Wilcoxon seguida de una corrección Benjamini-Hochberg (FDR) para comparaciones múltiples.

4.2.1.d. Genero

Se han registrado 113 géneros bacterianos en total, de los que *Prevotella* y *Bacteroides* constituyen dos de los géneros más abundantes. La abundancia de todos los microorganismos y su porcentaje se recogen en la Tabla 14. Los cinco géneros bacterianos más prevalentes de toda la muestra son *Bacteroides*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Escherichia-Shigella* y *Faecalibacterium* con un distribución del 14,4%, 9%, 7,5%, 5% y 4,4% respectivamente. Se aprecia una importante variación de la microbiota intestinal de los pacientes con fractura de cadera respecto los individuos sanos. En el grupo control, los *Bacteroides* son el género más frecuente (16%) seguido del *Faecalibacterium* (6,4%) y *Prevotella* (5,6%). Por su parte, en el grupo de fractura de cadera, *Prevotella*(12,6%), *Bacteroides* (11,8%) y *Porphyromonas* (11,2%) constituyen los tres géneros más frecuentes. Además de los importantes cambios del grupo patológico que suponen un aumento del porcentaje de *Prevotella* y descenso de *Bacteroides*, se debe resaltar por su relevancia la disminución de *Faecalibacterium* y el incremento de *Porphyromonas*.

CONTROLES				FRACTURA			
Taxón		Abund.	%	Taxón		Abund.	%
1	<i>Bacteroides</i>	182571	16,9	1	<i>Prevotella</i>	129963	12,6
2	<i>Faecalibacterium</i>	69531	6,4	2	<i>Bacteroides</i>	121403	11,8
3	<i>Prevotella</i>	60629	5,6	3	<i>Porphyromonas</i>	115435	11,2
4	<i>Escherichia-Shigella</i>	52454	4,9	4	<i>Escherichia-Shigella</i>	54743	5,3
5	<i>Porphyromonas</i>	41992	3,9	5	<i>Peptoniphilus</i>	39764	3,9
6	Not_Assigned	36883	3,4	6	UCG_002	33109	3,2
7	UCG_002	35036	3,2	7	<i>Fenollaria</i>	29645	2,9

8	CAG_352	34809	3,2	8	Streptococcus	29143	2,8
9	Streptococcus	32440	3,0	9	Campylobacter	27794	2,7
10	Subdoligranulum	26108	2,4	10	Anaerococcus	24480	2,4
11	Campylobacter	22805	2,1	11	Not_Assigned	22737	2,2
12	Ruminococcus	21980	2,0	12	Faecalibacterium	22369	2,2
13	Eubacterium coprostanoligenes	21179	2,0	13	Dialister	22096	2,1
14	Clostridia_UCG_014	20800	1,9	14	Finegoldia	21829	2,1
15	Akkermansia	19548	1,8	15	Alistipes	18217	1,8
16	Alistipes	18441	1,7	16	Akkermansia	17968	1,7
17	Parabacteroides	18123	1,7	17	CAG_352	17431	1,7
18	Finegoldia	17085	1,6	18	Christensenellaceae R_7_group	17291	1,7
19	Ruminococcus torques_group	16991	1,6	19	Fusobacterium	16649	1,6
20	Fenollaria	16525	1,5	20	Clostridia UCG_014	15292	1,5
21	Roseburia	16015	1,5	21	Eubacterium coprostanoligenes	13443	1,3
22	Christensenellaceae R_7_group	15066	1,4	22	Parabacteroides	13366	1,3
23	Lachnospiraceae NK4A136_group	14042	1,3	23	Ezakiella	13213	1,3
24	Eubacterium eligens_group	13907	1,3	24	Ruminococcus torques_group	12230	1,2
25	Peptoniphilus	13887	1,3	25	Hungatella	12078	1,2
26	Agathobacter	13650	1,3	26	S5_A14a	11818	1,2
27	Anaerococcus	13199	1,2	27	Veillonella	11676	1,1
28	Phascolarctobacterium	12717	1,2	28	Lachnospiraceae NK4A136_group	8799	0,9
29	Dialister	11934	1,1	29	UCG_005	8150	0,8
30	UCG_005	11034	1,0	30	Subdoligranulum	7598	0,7
31	Blautia	10583	1,0	31	Fastidiosipila	7284	0,7
32	Coprococcus	9633	0,9	32	Phascolarctobacterium	7216	0,7
33	Lachnoclostridium	8407	0,8	33	Lachnoclostridium	6084	0,6
34	uncultured	8359	0,8	34	Ruminococcus gnavus_group	4714	0,5
35	NK4A214_group	7974	0,7	35	W5053	4374	0,4
36	Dorea	7849	0,7	36	Eisenbergiella	4100	0,4
37	Lactobacillus	6654	0,6	37	Eubacterium eligens_group	3914	0,4

Resultados

38	Eubacterium ruminantium_group	6224	0,6	38	Coprococcus	3852	0,4
39	Ezakiella	5543	0,5	39	Murdochella	3401	0,3
40	Prevotellaceae NK3B31_group	5438	0,5	40	Roseburia	3240	0,3
41	S5_A14a	5093	0,5	41	uncultured	3177	0,3
42	Fusobacterium	4749	0,4	42	Negativicoccus	3129	0,3
43	Lachnospira	4627	0,4	43	NK4A214_group	2928	0,3
44	UCG_003	4091	0,4	44	Incertae_Sedis	2777	0,3
45	Barnesiella	3836	0,4	45	Bifidobacterium	2753	0,3
46	Eubacterium siraeum_group	3642	0,3	46	Bilophila	2702	0,3
47	Ruminococcus gnavus_group	3550	0,3	47	Odoribacter	2587	0,3
48	Fusicatenibacter	3312	0,3	48	Blautia	2385	0,2
49	Bifidobacterium	3147	0,3	49	UBA1819	2296	0,2
50	UBA1819	3029	0,3	50	Dorea	2284	0,2
51	Clostridium sensu_stricto_1	2774	0,3	51	Agathobacter	2227	0,2
52	Paraprevotella	2670	0,3	52	Barnesiella	2171	0,2
53	Oscillibacter	2476	0,2	53	Ruminococcus	2159	0,2
54	Parasutterella	2418	0,2	54	Lachnospiraceae UCG_010	1792	0,2
55	Fastidiosipila	2362	0,2	55	Mobiluncus	1778	0,2
56	Bilophila	2207	0,2	56	Oscillibacter	1622	0,2
57	Family_XIII AD3011_group	1990	0,2	57	Desulfovibrio	1573	0,2
58	Odoribacter	1981	0,2	58	Muribaculaceae	1484	0,1
59	Negativibacillus	1900	0,2	59	Gallicola	1473	0,1
60	Incertae_Sedis	1855	0,2	60	Atopobium	1393	0,1
61	Veillonella	1847	0,2	61	UCG_003	1387	0,1
62	Murdochella	1796	0,2	62	Butyricimonas	1334	0,1
63	Monoglobus	1768	0,2	63	Pyramidobacter	1318	0,1
64	Erysipelotrichaceae UCG_003	1756	0,2	64	Family_XIII AD3011_group	1181	0,1
65	Anaerostipes	1658	0,2	65	Flavonifractor	1137	0,1
66	Lawsonella	1653	0,2	66	Erysipelatoclostridium	1113	0,1
67	Hungatella	1641	0,2	67	Prevotellaceae NK3B31_group	1099	0,1
68	Flavonifractor	1629	0,2	68	Lawsonella	1063	0,1

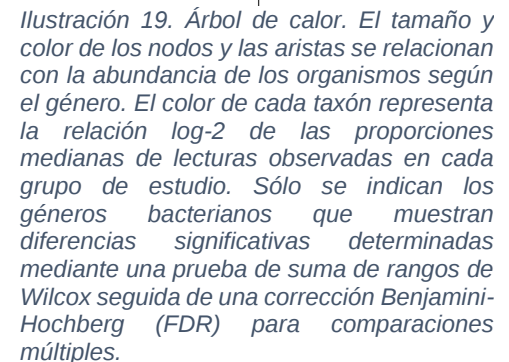
69	Mobiluncus	1599	0,2	69	UCG_010	1054	0,1
70	Lachnospiraceae UCG_010	1582	0,2	70	Lactobacillus	1031	0,1
71	Colidextribacter	1562	0,1	71	Eubacterium ruminantium_group	987	0,1
72	Butyricoccus	1516	0,1	72	Methanobrevibacter	966	0,1

Tabla 14. Distribución de la abundancia total (Abund.) y relativa (%) de los taxones en el nivel de género entre ambos grupos de comparación. Se muestran los primeros 72 taxones de 113 (se establece como punto de corte porcentajes de abundancia menores de 0,1%).

Árbol de calor (género)

Debido al número de géneros implicados y la diversa distribución de estos entre los grupos de estudio, ha sido necesario realizar un análisis estadístico de abundancia diferencial con el fin de profundizar en las modificaciones poblacionales. Las principales géneros bacterianos que muestran diferencias significativas al analizar los grupos control y patológicos son: *Faecalibacterium* (log 2 median ratio 3,4867 y diferencia de medianas 0,0587; $p < 0,001$), *Bacteroides* (log 2 median ratio 0,5708 y diferencia de medianas 0,0525; $p = 0,054$), *Subdoligranulum* (log 2 median ratio 3,3536 y diferencia de medianas 0,0143; $p = 0,001$), *Ruminococcus* (log 2 median ratio 5,0718 y diferencia de medianas 0,0103; $p = 0,001$), *Roseburia* (log 2 median ratio 4,1679 y diferencia de medianas 0,0072; $p = 0,001$), *Porphyromonas* (log 2 median ratio -2,2167 y diferencia de medianas -0,0925; $p = 0,001$), *Peptoniphilus* (log 2 median ratio -1,7483 y diferencia de medianas -0,0254; $p = 0,01$), *Anaerococcus* (log 2 median ratio -2,1608 y diferencia de medianas -0,015; $p < 0,05$) y *Dialister* (log 2 median ratio -1,931 y diferencia de medianas -0,0132; $p = 0,05$) (Ilustración 19).

En la Tabla 15 se detallan todos los géneros de bacterias que muestran diferencias significativos al analizar ambos grupos de estudio.



GÉNERO	log 2 median ratio	Diferencia de mediana	sig
Faecalibacterium	3,4867	0,0587	0,000
Bacteroides	0,5708	0,0525	0,054
Subdoligranulum	3,3536	0,0143	0,001
Ruminococcus	5,0718	0,0103	0,001
Roseburia	4,1679	0,0072	0,001
Blautia	2,0896	0,0050	0,000
NK4A214_group	2,3661	0,0049	0,024
Eubacterium_eligens_group	4,6585	0,0046	0,006
Agathobacter	Inf	0,0044	0,000
Dorea	2,3460	0,0040	0,000
Coprococcus	2,3959	0,0035	0,007
Fusicatenibacter	Inf	0,0021	0,001
Lachnospira	Inf	0,0021	0,003
Oscillibacter	2,6366	0,0014	0,032
Monoglobus	Inf	0,0013	0,001
Ezakiella	-1,8147	-0,0053	0,016
Dialister	-1,9310	-0,0132	0,050
Anaerococcus	-2,1608	-0,0150	0,048
Peptoniphilus	-1,7483	-0,0254	0,010
Porphyromonas	-2,2167	-0,0925	0,001

Tabla 15. Abundancia diferencial de géneros bacterianos

4.2.1.e. Especie

Respecto al nivel de especie, se han detectado un total de 78 especies de bacterias diferentes. La abundancia de todos los microorganismos y su porcentaje se recogen en la Tabla 16. Las especies, con nombre asignado, más prevalentes de toda la muestra son: *Bacteroides dorei*,

Bacteroides vulgatus, *Prevotella timonensis*, *Prevotella corporis*, *Porphyromonas asaccharolytica*, *Campylobacter hominis* y *Porphyromonas somerae*. Tanto en la microbiota intestinal de individuos sanos como en la de pacientes con fractura de cadera, se ha observado un predominio de especies que pertenecen al orden Bacteroidales. Sin embargo, es conveniente apuntar que en ambos grupos la composición de especies varía de manera sustancial.

En el grupo control destacan *Bacteroides dorei*, *Bacteroides vulgatus*, *Campylobacter hominis* y *Ruminococcus bicirculans*. Por su parte, en el grupo patológico *Prevotella timonensis*, *Prevotella corporis*, *Porphyromonas asaccharolytica*, *Bacteroides dorei* y *Porphyromonas somerae* son las especies más relevantes.

CONTROLES				FRACTURA			
	Taxón	Abund.	%		Taxón	Abund.	%
1	Not Assigned	629837	58,2	1	Not Assigned	501516	48,7
2	uncultured bacterium	99245	9,2	2	uncultured bacterium	83856	8,1
3	<i>Bacteroides dorei</i>	37810	3,5	3	<i>Prevotella timonensis</i>	40740	4,0
4	<i>Bacteroides vulgatus</i>	32202	3,0	4	<i>Prevotella corporis</i>	37678	3,7
5	uncultured organism	30567	2,8	5	<i>Porphyromonas asaccharolytica</i>	27414	2,7
6	<i>Campylobacter hominis</i>	18191	1,7	6	<i>Bacteroides dorei</i>	24787	2,4
7	gut metagenome	17662	1,6	7	<i>Porphyromonas somerae</i>	22020	2,1
8	<i>Ruminococcus bicirculans</i>	16466	1,5	8	<i>Prevotella buccalis</i>	19938	1,9
9	<i>Bacteroides plebeius</i>	12663	1,2	9	<i>Dialister propionificiens</i>	19012	1,8
10	human gut	12357	1,1	10	uncultured organism	18979	1,8
11	<i>Porphyromonas asaccharolytica</i>	11888	1,1	11	<i>Bacteroides vulgatus</i>	16114	1,6
12	<i>Bacteroides stercoris</i>	10545	1,0	12	<i>Campylobacter hominis</i>	14948	1,5
13	<i>Streptococcus salivarius</i>	8103	0,8	13	uncultured Bacteroidetes	13742	1,3
14	<i>Bacteroides coprocola</i>	7758	0,7	14	<i>Prevotella disiens</i>	13728	1,3

Resultados

15	Prevotella corporis	7301	0,7	15	Porphyromonas bennonis	13204	1,3
16	uncultured rumen	7193	0,7	16	Campylobacter ureolyticus	12846	1,3
17	Porphyromonas somerae	7111	0,7	17	Streptococcus anginosus	12713	1,2
18	Bacteroides massiliensis	6837	0,6	18	Bacteroides fragilis	11515	1,1
19	Parabacteroides merdae	6435	0,6	19	uncultured rumen	10552	1,0
20	Prevotella buccalis	5928	0,6	20	Clostridiales bacterium	8457	0,8
21	Bacteroides fragilis	5312	0,5	21	gut metagenome	8267	0,8
22	Dialister propionificiens	5183	0,5	22	human gut	7177	0,7
23	Porphyromonas bennonis	4830	0,5	23	Porphyromonas uenonis	6637	0,6
24	Prevotella timonensis	4656	0,4	24	uncultured Anaerovorax	6366	0,6
25	Campylobacter ureolyticus	4614	0,4	25	Anaerococcus vaginalis	5560	0,5
26	Bacteroides cellulosilyticus	4213	0,4	26	Peptoniphilus duerdenii	5142	0,5
27	Prevotella colorans	3851	0,4	27	Parabacteroides merdae	5030	0,5
28	Streptococcus anginosus	3788	0,4	28	unidentified marine	4374	0,4
29	Bacteroides eggerthii	3746	0,4	29	Peptoniphilus lacrimalis	4349	0,4
30	Eubacterium siraeum	3642	0,3	30	Bacteroides massiliensis	4052	0,4
31	uncultured Anaerovorax	3197	0,3	31	Bacteroides eggerthii	3487	0,3
32	Parabacteroides goldsteinii	3156	0,3	32	Murdochiella asaccharolytica	3401	0,3
33	Clostridiales bacterium	2550	0,2	33	uncultured spirochete	3189	0,3
34	Bacteroides caccae	2509	0,2	34	Streptococcus salivarius	2978	0,3
35	Ruminococcus callidus	2479	0,2	35	Prevotella colorans	2869	0,3
36	Alistipes shahii	2226	0,2	36	Bacteroides caccae	2703	0,3
37	Dorea formicigenerans	2216	0,2	37	Bacteroides stercoris	2566	0,3
38	uncultured microorganism	2215	0,2	38	Bacteroides cellulosilyticus	2432	0,2
39	Prevotella disiens	2114	0,2	39	Mobiluncus curtisii	1778	0,2
40	uncultured prokaryote	2109	0,2	40	bacterium	1573	0,2
41	uncultured Bacteroidetes	2001	0,2	41	Alistipes finegoldii	1486	0,1

42	Anaerococcus vaginalis	1827	0,2	42	uncultured microorganism	1397	0,1
43	Murdochella asaccharolytica	1796	0,2	43	Rarimicrobium hominis	1318	0,1
44	Mobiluncus curtisii	1599	0,2	44	Parabacteroides goldsteinii	1300	0,1
45	Peptoniphilus lacrimalis	1441	0,1	45	Ruminococcus bicirculans	1193	0,1
46	Peptoniphilus duerdenii	1322	0,1	46	Parabacteroides johnsonii	1130	0,1
47	Bifidobacterium longum	1223	0,1	47	Odoribacter splanchnicus	1126	0,1
48	uncultured spirochete	1192	0,1	48	Bifidobacterium longum	1035	0,1
49	Alistipes inops	1159	0,1	49	Peptoniphilus koenoeneniae	1034	0,1
50	Parabacteroides johnsonii	1087	0,1	50	uncultured prokaryote	907	0,1
51	Odoribacter splanchnicus	1063	0,1	51	Alistipes shahii	896	0,1
52	Negativicoccus succinicivorans	940	0,1	52	Dorea formicigenerans	849	0,1
53	Porphyromonas uenonis	875	0,1	53	Dialister pneumosintes	834	0,1
54	Alistipes obesi	864	0,1	54	Prevotella bergensis	795	0,1
55	Bacteroides salyersiae	780	0,1	55	Peptoniphilus coxii	741	0,1
56	Alistipes finegoldii	748	0,1	56	Bacteroides coprocola	716	0,1
57	Sutterella wadsworthensis	745	0,1	57	Negativicoccus succinicivorans	638	0,1
58	Streptococcus parasanguinis	692	0,1	58	Sutterella wadsworthensis	633	0,1
59	Dialister pneumosintes	634	0,1	59	Eubacterium siraeum	481	0,1
60	bacterium	570	0,1	60	Peptoniphilus urinimassiliensis	473	0,1
61	Eubacterium ramulus	555	0,1	61	Alistipes obesi	467	0,1

Tabla 16.. Distribución de la abundancia total (Abund.) y relativa (%) de los taxones en el nivel de especie entre ambos grupos de comparación. Se muestran los primeros 61 taxones de 78 (se establece como punto de corte porcentajes de abundancia menores de 0,05%).

Árbol de calor (especie)

Se han encontrado diferencias significativas para las especies *Ruminococcus bicirculans* (log 2 median ratio Inf y diferencia de

medianas 0,0036; $p < 0,001$), *Dialister propionicifaciens* (log 2 median ratio -2,7153 y diferencia de medianas -0,0094; $p = 0,013$), *Prevotella buccalis* (log 2 median ratio -2,4668 y diferencia de medianas -0,008; $p = 0,024$), *Porphyromonas bennonis* (log 2 median ratio -3,421 y diferencia de medianas -0,004; $p = 0,039$) y *Anaerococcus vaginalis* (log 2 median ratio -2,6211 y diferencia de medianas -0,0031; $p = 0,01$) entre el grupo control y el patológico (Ilustración 20)

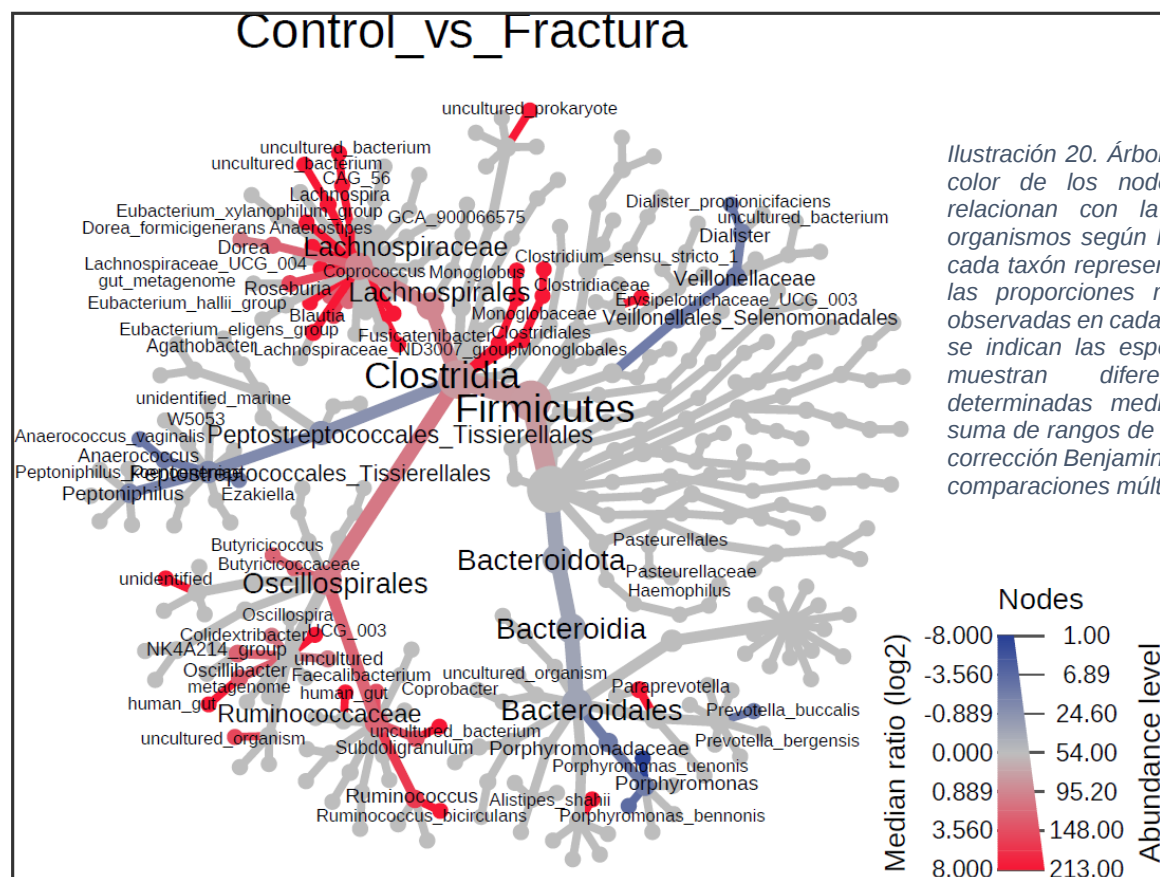
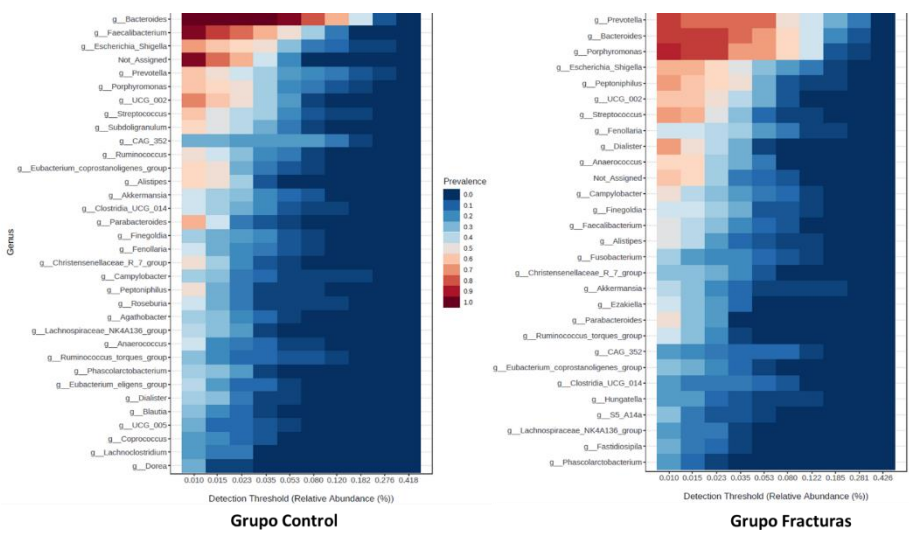


Ilustración 20. Árbol de calor. El tamaño y color de los nodos y las aristas se relacionan con la abundancia de los organismos según la especie. El color de cada taxón representa la relación log-2 de las proporciones medianas de lecturas observadas en cada grupo de estudio. Sólo se indican las especies bacterianas que muestran diferencias significativas determinadas mediante una prueba de suma de rangos de Wilcoxon seguida de una corrección Benjamini-Hochberg (FDR) para comparaciones múltiples.

4.2.2. Core

El microbioma central se refiere al conjunto de taxones que es detectado en una elevada proporción por encima de un umbral de abundancia determinado. Los datos del recuento se transforman en abundancias composicionales (relativas) para realizar dicho análisis. Los géneros mayoritarios que conforman el núcleo del microbioma del grupo control son los *Bacteroides* y *Faecalibacterium* mientras que en el grupo de fracturas son *Porphyromonas*, *Bacteroides* y *Prevotella* (Ilustración 21). La distribución completa de los géneros en ambos grupos se recoge en la Tabla 17.



CONTROLES		FRACTURAS	
Taxón	Prevalencia	Taxón	Prevalencia
Bacteroides	1	Porphyromonas	0,88
Not_Assigned	0,96	Bacteroides	0,84
Faecalibacterium	0,96	Prevotella	0,8
UCG_002	0,72	Streptococcus	0,68
Escherichia_Shigella	0,68	Peptoniphilus	0,68
Parabacteroides	0,64	Dialister	0,68
Streptococcus	0,6	Escherichia_Shigella	0,64
Prevotella	0,6	Not_Assigned	0,6
Porphyromonas	0,6	UCG_002	0,6
Subdoligranulum	0,56	Anaerococcus	0,56
Eubacterium			
Coprostanoligenes	0,56	Parabacteroides	0,52
group			
Alistipes	0,56	Campylobacter	0,52
Ruminococcus	0,52	Faecalibacterium	0,48
Peptoniphilus	0,52	Alistipes	0,48
Christensenellaceae		Ruminococcus	0,44
R_7_group	0,52	torques_group	0,44
Roseburia	0,44	Finegoldia	0,44
Fenollaria	0,44	Fenollaria	0,44
Clostridia_UCG_014	0,44	Ezakiella	0,44
Anaerococcus	0,44	Akkermansia	0,4
Akkermansia	0,44	Fusobacterium	0,36
Lachnospiraceae			
NK4A136_group	0,4	S5_A14a	0,32
Eubacterium		Eubacterium	
eligans_group	0,4	Coprostanoligenes	0,32
Phascolarctobacteriu		group	
m	0,36	Christensenellaceae	0,32
Finegoldia	0,36	R_7_group	0,32
Dialister	0,36	Fastidiosipila	0,28
		Phascolarctobacteriu	0,24
		m	

Resultados

Campylobacter	0,36	Lachnospiraceae	0,24
Agathobacter	0,36	NK4A136_group	0,24
Ruminococcus	0,32	Hungatella	0,24
torques_group	0,32	Clostridia_UCG_014	0,24
Blautia	0,32	CAG_352	0,24
UCG_005	0,28	UCG_005	0,2
Dorea	0,28	Subdoligranulum	0,2
CAG_352	0,28	Lachnoclostridium	0,16
Lachnoclostridium	0,24	Coprococcus	0,16
Coprococcus	0,24	W5053	0,12
NK4A214_group	0,2	Ruminococcus	0,12
Fusobacterium	0,2	gnavus_group	0,12
Eubacterium	0,2	Eubacterium	0,12
ruminantium_group	0,2	eligans_group	0,08
uncultured	0,16	Veillonella	0,08
S5_A14a	0,16	Solobacterium	0,08
Prevotellaceae	0,16	Ruminococcus	0,08
NK3B31_group	0,16	Roseburia	0,08
Lactobacillus	0,16	NK4A214_group	0,08
Lachnospira	0,16	Negativicoccus	0,08
Eubacterium	0,16	Murdochella	0,08
siraeum_group	0,16	Incertae_Sedis	0,08
Parasutterella	0,12	Enterococcus	0,08
Ezakiella	0,12	Bilophila	0,08
UCG_003	0,08	Bifidobacterium	0,08
Sutterella	0,08	Barnesiella	0,08
Fastidiosipila	0,08	Atopobium	0,08
Clostridium	0,08	UBA1819	0,04
sensu_stricto_1	0,08	Prevotellaceae	0,04
Bifidobacterium	0,08	NK3B31_group	0,04
Veillonella	0,04	Parasutterella	0,04
UBA1819	0,04	Odoribacter	0,04
Ruminococcus	0,04		
gnavus_group	0,04		

Romboutsia	0,04	Muribaculaceae	0,04
Paraprevotella	0,04	Methanobrevibacter	0,04
Negativibacillus	0,04	Lawsonella	0,04
Muribaculaceae	0,04	Lachnospiraceae	0,04
Murdochella	0,04	Lachnospiraceae	0,04
Lawsonella	0,04	ND3007_group	0,04
Incertae_Sedis	0,04	Eubacterium	0,04
Hungatella	0,04	siraeum_group	0,04
Fusicatenibacter	0,04	Eubacterium	0,04
Flavonifractor	0,04	ruminantium_group	0,04
Family_XIII	0,04	Erysipelatoclostridium	0,04
AD3011_group	0,04	Eisenbergiella	0,04
Erysipelotrichaceae	0,04	Blautia	0,04
Enterococcus	0,04	Agathobacter	0,04
Corynebacterium	0,04	uncultured	0
Barnesiella	0,04	UCG_010	0
		UCG_003	0
		Sutterella	0

Tabla 17. Distribución del núcleo del microbioma entre los grupos de estudio

4.3. Búsqueda de Biomarcadores mediante LEfSe

Se ha utilizado el algoritmo LEfSe para identificar potenciales biomarcadores de la microbiota intestinal en pacientes con fractura de cadera. Esta herramienta identifica primero las características que son estadísticamente diferentes entre las variables biológicas y después realiza pruebas adicionales para determinar si estas diferencias son consistentes con respecto al comportamiento biológico esperado ²⁶⁷.

4.3.1. Orden

En el grupo control los órdenes Oscillospirales y Lachnospirales presentaron una puntuación de 5,79 y 5,53 en el LDA, respectivamente. Por parte del grupo patológico, Bacteroidales y Peptostreptococcales-Tissierellales alcanzaron unos valores en el LDA de 5,61 y 5,59, respectivamente (Ilustración 22).

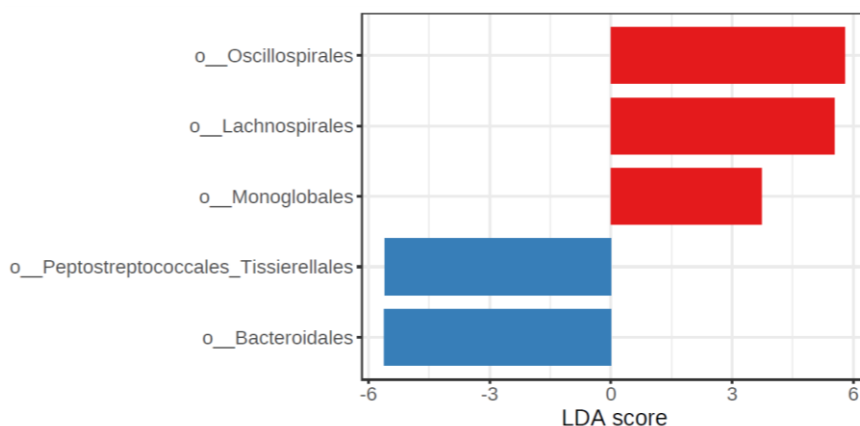


Ilustración 22. Cladograma taxonómico del análisis LEfSe de orden. Todos los microorganismos presentes en la figura tienen el p valor $< 0,05$ mediante la prueba de Kruskal-Wallis y una puntuación de LDA > 3 . Grupo control en color rojo y grupo de fractura de cadera en color verde). LDA: análisis discriminante lineal.

4.3.2. Familia

A continuación, se representan en el siguiente cladograma (Ilustración 23) las familias de microorganismos con LDA mayor de 3 y que son significativamente estadísticas. Tanto Ruminococcaceae como Lachnospiraceae presentan valores de LDA cercanos a 6 en el grupo control, 5,71 y 5,53 respectivamente. Sin embargo, en el grupo de fractura de cadera, Peptostreptococcales_Tissierellales y Porphyromonadaceae muestran valores 5,57 y 5,55, respectivamente.

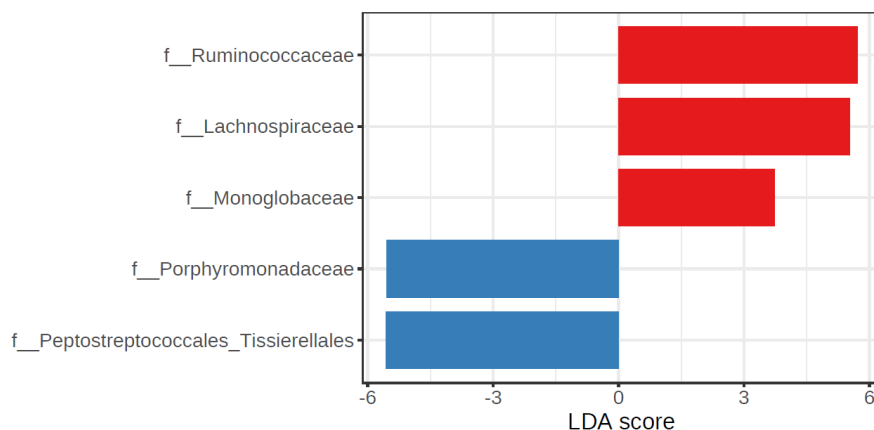


Ilustración 23. Cladograma taxonómico del análisis LEfSe de familia. Todos los microorganismos presentes en la figura tienen el p valor $< 0,05$ mediante la prueba de Kruskal-Wallis y una puntuación de LDA > 3 . Grupo control en color rojo y grupo de fractura de cadera en color verde). LDA: análisis discriminante lineal.

4.3.3. Género

En el siguiente cladograma (Ilustración 24) se representa los géneros con una puntuación del LDA superior a 3 y significación estadística. Los géneros *Faecalibacterium*, *Subdoligranulum*, *Ruminococcus* y *Roseburia* presentan puntuaciones en el LDA cercanos al 5 (5,3, 5,3, 4,9 y 4,8, respectivamente) en el grupo control. En el grupo patológico, los géneros *Porphyromonas* y *Prevotella* muestran unos valores en el LDA de 5,5.

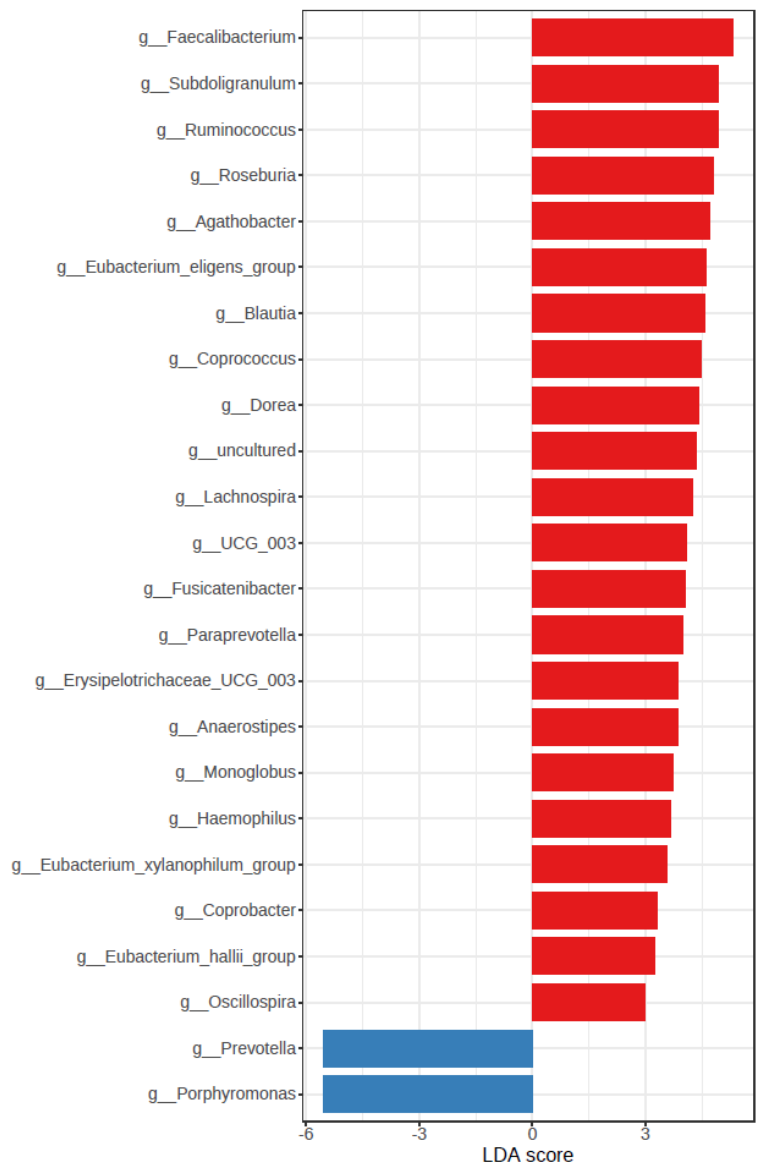


Ilustración 24. Cladograma taxonómico del análisis LEfSe de género. Todos los microorganismos presentes en la figura tienen el p valor < 0,05 mediante la prueba de Kruskal-Wallis y una puntuación de LDA > 3. Grupo control en color rojo y grupo de fractura de cadera en color verde). LDA: análisis discriminante lineal

4.3.4. Especie

La única especie identificada con una significación estadística menor de 0,05 mediante la prueba de Kruskal-Wallis y una puntuación de LDA > 3 es el *Ruminococcus bicirculans*. Tal como se aprecia en la Ilustración 25 dicha especie bacteriana se encuentra aumentada en el grupo control.

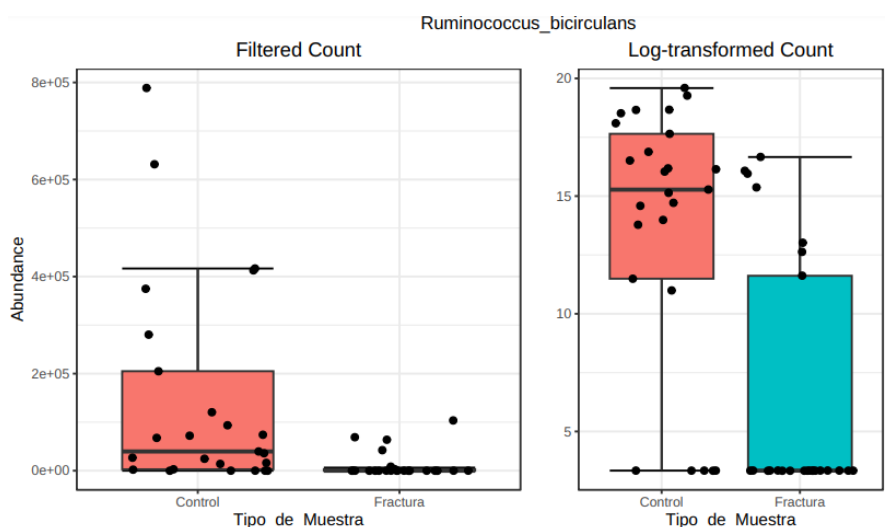


Ilustración 25. Diagrama de cajas LEfSe Especie

5. Evaluación de las correlaciones entre componentes de la microbiota intestinal y las variables sistémicas

Se ha aplicado la función del paquete MetadeconfoundR con el fin de determinar las distintas correlaciones de la microbiota intestinal con

las variables sistémicas (recogidas como metadatos) en las fracturas de cadera por fragilidad ósea y detectar los posibles efectos de confusión. Las correlaciones de taxones y especies con variables señaladas como “Confounded” significan que la variable analizada está muy vinculada a otra que actúa en determinados casos como factor de confusión. Por ejemplo, la CRP está muy vinculada con la fractura de cadera (tienen una fuerte correlación) y se podría decir que la fractura de cadera es dominante, pues actúa como factor de confusión en algunas correlaciones entre la CRP y las especies de la parte baja del gráfico. No obstante, las correlaciones entre las especies y la CRP son significativas y reales. Las correlaciones marcadas como “Deconfounded” también son significativas y, en este caso, independientes de cualquier otra variable. Para confirmar esta asociación, se han analizado las variables que previamente presentaban diferencias estadísticas entre los grupos de estudio (edad, Urea, Filtrado Glomerular, Colesterol total, Albúmina, Calcio total, CRP, Vitamina D, PTH, Hemoglobina, Leucocitos, Neutrófilos, Linfocitos, Monocitos y las variables del tubo de activación de linfocitos T) y los diferentes taxones de microbiota. En la Ilustración 26 figura se muestran las variables de metadatos que han presentado correlaciones significativas con determinados grupos bacterianos. Los valores de CRP presentan el mismo patrón que la fractura de cadera y a su vez, ambas son las variables que más influencia tienen sobre la abundancia de determinadas comunidades bacterianas. *Ruminococcus bicirculans*, *Eubacterium hallii* (*Anaerobutyricum hallii*) y las especies de los géneros *Agathobacter*, *Dorea*, *Faecalibacterium*, , *Anaerostipes* y *Blautia* muestran una correlación negativa con la CRP y la presencia de fractura de cadera. Por su parte,

las *Porphyromonas* presentan una correlación positiva con la CRP y negativa para LT CD4+ TNF α + IFN γ + y LT CD8+ TNF α -IFN γ -. Adicionalmente, se ha realizado un nuevo análisis de correlaciones ajustando por la edad, tal como se aprecia en la Ilustración 27 no se aprecian cambios relevantes en los resultados. La taxonomía completa de los taxones que han mostrado correlación significativa se expone en Tabla 20 del Anexo.

Por último, se analizó estadísticamente la α -diversidad y la β -diversidad según el sexo para confirmar que los cambios de microbiota observados no dependían de esta variable. No se han encontrado diferencias significativas entre los distintos indicadores de α -diversidad ni al realizar el PERMANOVA de la β -diversidad (Ilustración 28 e Ilustración 29 del Anexo).

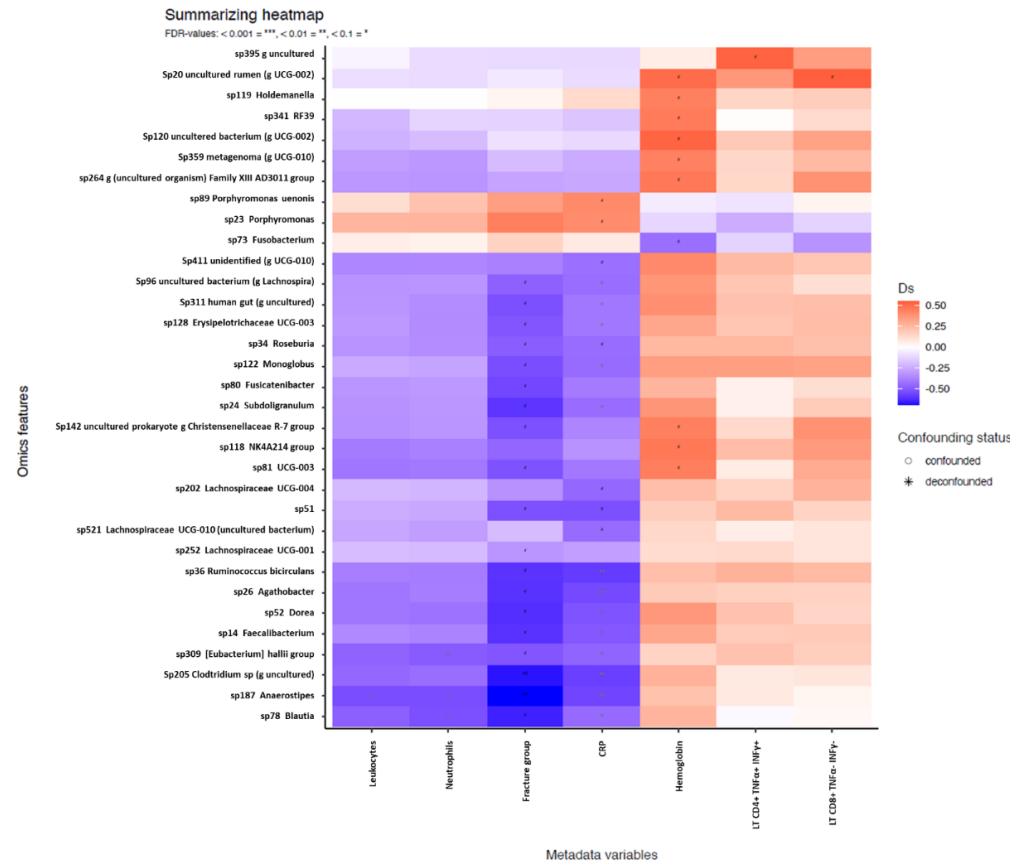


Ilustración 26. Mapa de calor metadeconfound. Asociación entre los taxones bacterianos (eje y) y las variables estudiadas (eje x). El color indica el tamaño del efecto (Delta de Cliff o Rho de Spearman para metavariabes binarias o continuas, respectivamente). La significación de las asociaciones mostradas se indica con asteriscos negros según los p-valores ajustados al false discovery rate (FDR). Las asociaciones significativas pero confusas se indican con círculos grises. El gráfico se agrupa en ambos ejes y se eliminan las características, así como las metavariabes, sin ninguna asociación que supere los límites de tamaño del efecto y significación (por defecto: q_cutoff = 0,1, d_cutoff = 0,01).

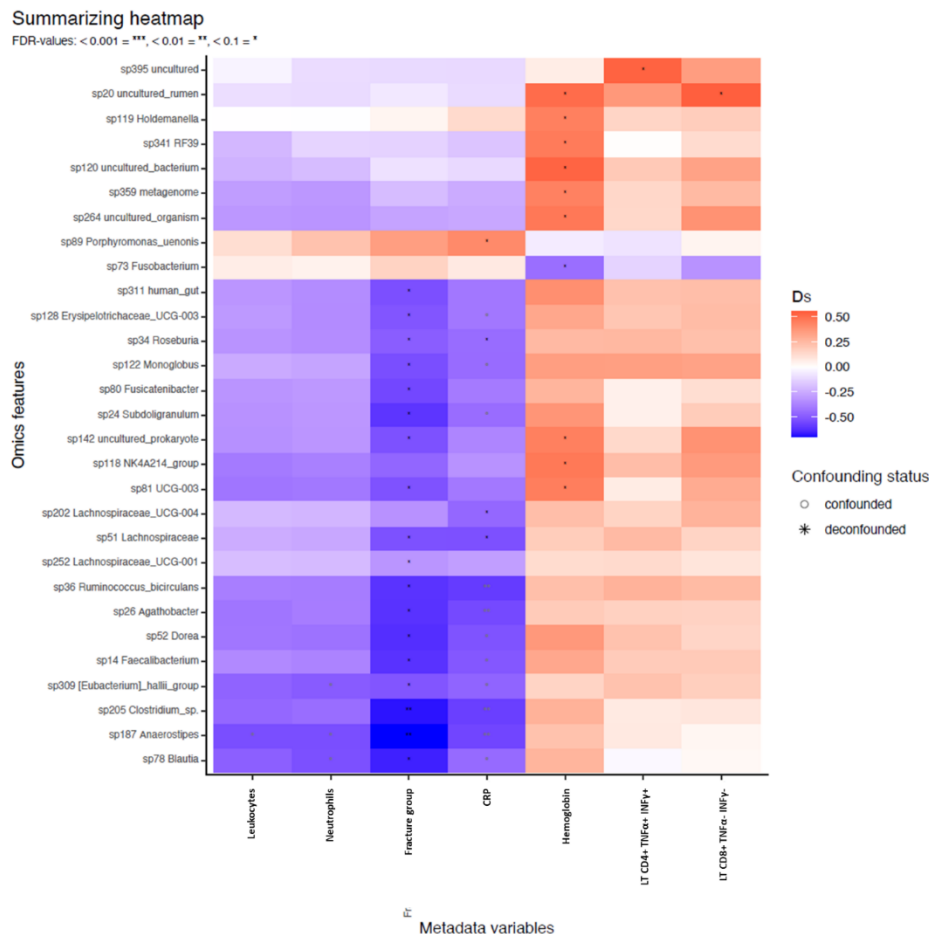


Ilustración 27. Mapa de calor metadefconfound ajustado por edad. Asociación entre los taxones bacterianos (eje y) y las variables estudiadas (eje x). El color indica el tamaño del efecto (Delta de Cliff o Rho de Spearman para metavariabiles binarias o continuas, respectivamente). La significación de las asociaciones mostradas se indica con asteriscos negros según los p-valores ajustados al false discovery rate (FDR). Las asociaciones significativas pero confusas se indican con círculos grises. El gráfico se agrupa en ambos ejes y se eliminan las características, así como las metavariabiles, sin ninguna asociación que supere los límites de tamaño del efecto y significación (por defecto: $q_cutoff = 0,1$, $d_cutoff = 0,01$).

DISCUSIÓN

La osteoporosis es la enfermedad metabólica ósea más frecuente asociada al envejecimiento ²⁶⁸. Se caracteriza por la pérdida de la rigidez y resistencia ósea, la disminución de la masa ósea y la alteración de su microarquitectura ²⁶⁹. Como consecuencia, el hueso resultante es más frágil y, por tanto, el riesgo de fracturas se incrementa. Entre todas las fracturas asociadas a la osteoporosis, la fractura de cadera es la que mayor morbi-mortalidad produce en el paciente y supone un importante gasto económico, tanto directo como indirecto, para el sistema de salud ^{1,5}.

Se ha demostrado que la edad, el sexo femenino y la historia previa de fractura son los principales factores de riesgo clínico asociados a la fractura de cadera, sin embargo, tienen un valor predictivo escaso ⁸⁰. La medición de la DMO mediante DXA es el método de elección en la evaluación del riesgo de fractura en el entorno clínico. Sin embargo, en más de la mitad de los casos, esta técnica presenta resultados dentro de los parámetros de la normalidad ⁸¹. Además, el riesgo de fractura por fragilidad excede al esperado en la DMO, cuando se asocia a otras circunstancias clínicas como la edad avanzada, la diabetes, la obesidad y la enfermedad inflamatoria intestinal ⁸²⁻⁸⁴. Por ello, la DMO no puede ser la única herramienta de medición del riesgo de fractura de cadera, ya que existen múltiples factores de riesgo añadidos que hay tener en cuenta a la hora de estimar la predicción de la misma. De hecho, las guías nacionales británicas (NICE National Institute for Health and Care Excellence) cuando evalúan el riesgo de fractura de cadera no incluyen la DMO como técnica obligatoria de medición de este riesgo, por a la falta de evidencia y la limitación que los estudios actuales presentan con respecto a la fiabilidad de dicha

prueba ⁸⁵. Debido a las limitaciones de las herramientas de las que disponemos, es de gran interés identificar factores de riesgo adicionales que nos ayuden a comprender mejor la fisiopatología de estas fracturas y mejorar nuestra capacidad preventiva.

El microbioma humano constituye el segundo genoma de nuestro organismo y puede actuar sobre el sistema inmunitario (osteoinmunología) ¹⁵⁹, las vías hormonales y la producción de metabolitos bacterianos que actúan como señales para las células óseas ¹⁶⁴. Los avances en secuenciación genética han permitido analizar muestras bacterianas que antes no se podían cultivar por métodos convencionales en laboratorio. Existen diversos estudios experimentales realizados en ratones, que evalúan el impacto del microbioma en la estructura y densidad ósea ^{165,167}. Aunque todavía no se ha descubierto el mecanismo exacto por el cual la disbiosis intestinal afecta a la calidad ósea, existen indicios de que el aumento de la permeabilidad intestinal, el deterioro del transporte del calcio, la inflamación sistémica secundaria a la activación de citocinas intestinales o el aumento de la respuesta de los LT pueden estar implicados en la relación de la microbiota intestinal y osteoporosis ^{235,270–273}.

La identificación de las alteraciones de los principales los taxones bacterianos implicados en la osteoporosis pueden ofrecer una información útil y facilitar el desarrollo de estrategias adecuadas para controlar la enfermedad. Hasta la fecha, se han realizado diversos estudios que han relacionado los cambios en el MI con un riesgo de generar osteoporosis ^{235–237,239,274–278}. Este estudio es el primero que evalúa la composición y la diversidad de la microbiota intestinal en

pacientes que han sufrido una fractura de cadera por fragilidad ósea frente a controles sanos. Cabe recordar que la mitad de los pacientes con fractura de cadera tienen valores dentro de la normalidad de la DMO ⁸¹, por lo que la determinación de la microbiota intestinal solamente en pacientes diagnosticados de osteoporosis mediante la DMO puede dar una visión incompleta o sesgada de los cambios reales que ocurren en este tipo de pacientes. Por este motivo, este estudio utiliza la presencia de fractura de cadera como criterio para diferenciar los dos grupos de estudio. Así, se consigue medir el verdadero impacto de la enfermedad y, además, los resultados obtenidos pueden dar una aproximación más precisa de los cambios que se producen en la microbiota intestinal de pacientes con riesgo de fractura de cadera.

Tal como se ha señalado, el sexo femenino es un factor de riesgo para el desarrollo de la osteoporosis y fractura de cadera por fragilidad ósea. Gran parte de los estudios que comparan la microbiota intestinal de pacientes osteoporóticos segregan por sexos o bien, presentan una frecuencia del sexo femenino no representativa de la población que padece una fractura de cadera por fragilidad ^{236,237,239,274,276–278}. En la presente investigación, la distribución del sexo se ajusta al porcentaje real de pacientes que tienen riesgo de sufrir fractura de cadera ⁵ y la proporción del sexo femenino se dispone homogéneamente entre los dos grupos de estudio. Además, se ha comprobado que no existen diferencias estadísticas significativas tras realizar el análisis de α -diversidad y β -diversidad de los cambios de microbiota intestinal entre ambos sexos.

Otro factor de riesgo que se ha tenido en cuenta es la edad. En los diferentes estudios que hay publicados hasta la fecha, se ha constatado que la edad media de los pacientes osteoporóticos en los que se analizan los cambios de microbiota intestinal es inferior a 70 años ^{235–237,239,274–278}. En este estudio, con el fin de que la muestra estudiada sea más representativa de la población real afectada ^{1,5} y que los resultados obtenidos sean más consistentes, se ha fijado la edad de inclusión por encima de los 70 años.

La naturaleza inflamatoria de la osteoporosis se ve reforzada en esta investigación por los hallazgos que muestran un descenso de parámetros típicos de osteoporosis y el incremento de los marcadores de inflamación. Además, se existe una importante correlación negativa entre las variables vitamina D y proteína C reactiva, vitamina D y leucocitos, vitamina D y neutrófilos, calcio y proteína C reactiva, calcio y leucocitos, calcio y neutrófilos, albumina y proteína C reactiva, albumina y leucocitos y albumina y neutrófilos.

Los hallazgos de esta tesis indican que tanto la estructura como la diversidad bacteriana intestinal se encuentran alteradas en los pacientes con fractura de cadera por fragilidad. Estos resultados aportan más evidencia a la relación entre la salud ósea y la microbiota intestinal, y dan apoyo a la existencia de una población microbiana que puede predisponer a la osteoporosis y la aparición de fracturas de cadera por fragilidad ósea.

1. Análisis microbiota intestinal

Tras analizar los perfiles comunitarios, se ha confirmado mediante diferentes métodos estadísticos que la estructura de la microbiota intestinal es significativamente diferente entre el grupo sano y el grupo

patológico. Así, se observa que los estimadores de α -diversidad se encuentran elevados significativamente en el grupo control en los niveles de género y especie. De entre ellos, es particularmente interesante el índice de Shannon, pues valora el número de especies (riqueza) y la uniformidad. Además, es un buen indicador de la diversidad porque considera igual de importante a las especies raras y abundantes respecto al resto de la muestra ²⁷⁹. La presencia de un valor alto del índice de Shannon indica que una comunidad es diversa y está distribuida por igual, mientras que un valor bajo señala que una comunidad es menos diversa y puede predominar un único taxón ²⁴¹.

El análisis de la α -diversidad de la microbiota es una herramienta importante para cuantificar la riqueza relativa y el componente bacteriano de una comunidad determinada. Una pérdida de la diversidad puede originar una disbiosis que repercuta sobre el sistema inmunitario y facilite la proliferación de patógenos ^{280–282}. Se ha asociado niveles bajos de α -diversidad del microbioma humano con patologías agudas graves (enteritis necrotizante por *C. perfringens*) y crónicas (DM, HTA, EII o cáncer colorrectal) ²⁸³. La osteoporosis como consecuencia del déficit de estrógenos es un proceso crónico en el que se produce un desequilibrio entre citocinas proinflamatorias frente a antiinflamatorias ⁷⁶ y la microbiota intestinal puede ser un factor importante en su génesis ⁴³. La disminución de la α -diversidad observada en el grupo de fractura de cadera por fragilidad ósea coincide con trabajos recientes que analizan la microbiota intestinal entre pacientes sanos y osteoporóticos ^{240,277} y apoya la idea de que una baja diversidad de la microbiota intestinal está asociada con estados de inflamación y en consecuencia con la osteoporosis.

La β -diversidad compara la cantidad de grupos bacterianos diferentes entre las muestras. En esta investigación, el gráfico PCoA de β -diversidad para cada nivel taxonómico muestra una población más heterogénea en el grupo de fracturas de caderas. Tras realizar el análisis estadístico, se aprecian diferencias significativas en todos los indicadores de β -diversidad para cada nivel taxonómico. En estados de ausencia de enfermedad, la microbiota intestinal presenta una alta diversidad y uniformidad mientras que, en determinados procesos patológicos del huésped, la diversidad de esta se caracteriza por ser variable y poco abundante ¹¹³. Además, también se ha descrito que, respecto a individuos sanos, la composición de la comunidad bacteriana y las respuestas inmunitarias están significativamente alteradas en individuos con Enfermedad inflamatoria intestinal, Enfermedad de Alzheimer, Hígado graso no alcohólico y enfermedad metabólica ^{284–286}. Por tanto, resulta interesante que la heterogeneidad de este estudio sea tan marcada ya que sugiere que esta alteración puede asociarse con un estado inmunitario proinflamatorio que facilite la pérdida ósea y aumente el riesgo de fractura de cadera.

En este estudio, y al igual que otras patologías con una base etiopatogénica inflamatoria, los cambios observados en la microbiota de pacientes con fractura de cadera muestran una pérdida de la diversidad y una mayor heterogeneidad respecto sujetos sanos. Estos hallazgos contrastan con los resultados de 4 estudios publicados con anterioridad. En ellos, no se encontraron diferencias significativas en la α -diversidad ni en la β -diversidad tras comparar la microbiota intestinal de individuos sanos y pacientes osteoporóticos ^{236,275,276,278}. Esta discrepancia puede deberse al criterio establecido para diferenciar los grupos de estudio. Mientras que todos los estudios se

basaron en la medición de la densidad ósea para constituir los grupos de comparación, el presente estudio diferencia los grupos en función de la presencia de fractura de cadera. De este modo, los hallazgos de esta investigación dan una visión más precisa de la diversidad de la microbiota intestinal pues permite comparar dos grupos de forma clara y con relevancia clínica. No obstante, y aunque la determinación de la diversidad puede considerarse un biomarcador de enfermedad, debe realizarse un análisis pormenorizado de la abundancia de los taxones.

Los hallazgos en el nivel del filo indican una disminución significativa de la relación Firmicutes/Bacteroidetes en la microbiota intestinal de pacientes con fractura de cadera. El filo Bacteroidetes está constituido por unas 7.000 especies de bacterias Gram-negativas diferentes y los principales géneros son *Bacteroides*, *Alistipes*, *Parabacteroides*, *Porphyromonas* y *Prevotella*²⁸⁷. Por su parte, el filo Firmicutes engloba bacterias Gram-positivas que pertenecen principalmente a los géneros *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Ruminococcus*, *Bacillus*, y *Enterococcus*^{288,289}. Se considera que aproximadamente el 60% de las bacterias intestinales pertenecen a los filos Bacteroidetes y Firmicutes²⁹⁰ y que el mantenimiento de una proporción equilibrada entre ambos filos se ha asociado con la conservación de la homeostasis intestinal. En la EII, la proporción Firmicutes/Bacteroides se encuentra disminuida²⁹¹. Ciertas bacterias que pertenecen al filo Firmicutes juegan un papel clave en la nutrición y el metabolismo del huésped a través de la síntesis de los AGCC, que entre otras propiedades actúan como factores antiinflamatorios. En cambio, los componentes de determinadas bacterias del filo Bacteroidetes, como los lipopolisacáridos y la flagelina, potencian las reacciones inmunitarias a través de la síntesis de citocinas²⁹². La osteoporosis

posmenopáusica presenta numerosos fenómenos que la relacionan con una enfermedad inflamatoria (aumento de citocinas IL-1, IL-6, IL-17 y TNF- α - y del RANKL) ⁷⁷, de manera que el déficit de estrógenos establece un estado inflamatorio crónico que conduce a la pérdida ósea ³⁹. Además, el envejecimiento se acompaña de un aumento de la respuesta inflamatoria que provoca una mayor sensibilidad del sistema inmunitario intestinal del huésped hacia patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) ²⁹³. De esta manera, se establece una retroalimentación inflamatoria intestinal que puede explicar por qué cambios en la composición de la microbiota intestinal, como los que se presentan en este estudio, pueden estar relacionados en la génesis y/o progresión de enfermedades como la osteoporosis.

De igual manera, los estudios que analizan los cambios de la microbiota intestinal entre individuos sanos y pacientes con osteoporosis describen un aumento del filo Bacteroidetes y una disminución de Firmicutes en los pacientes con osteoporosis ^{236,237,278}. Aunque los cambios en el nivel de filo de este estudio son interesantes y sugieren que existe un tipo específico de microbiota relacionado con la enfermedad (asociación de fractura de cadera), no pueden ser utilizados como biomarcadores de esta. Se ha de recordar que dentro de ambos filos se engloban géneros de bacterias que ejercen como organismos patógenos, comensales y no patógenos con diferentes funciones. Asimismo, es necesario investigar los cambios de composición en los niveles de orden, familia, género y especie para adquirir información más precisa de los posibles biomarcadores.

En este estudio, las bacterias Bacteroidales suponen el orden más abundante y junto Oscillospirales y Lachnospirales representan más del 60% de todos los grupos bacterianos en total. Las Oscillospirales

y Lachnospirales son ordenes que pertenecen a la clase Clostridia (filo Firmicutes), suelen tener una importante presencia en la microbiota intestinal humana ²⁹⁴ y se han asociado con el desarrollo óseo ²⁹⁵.

Al comparar las variaciones de abundancia bacteriana entre grupos, puede observarse como los Bacteroidales y los Peptostreptococcales-Tissierellales presentan un aumento porcentual significativo en los pacientes con fractura. De igual manera, hay que destacar también, que existe una disminución considerable de los Oscillospirales y Lachnospirales en el grupo patológico. Estos resultados tienen especial relevancia pues determinadas bacterias pertenecientes a Oscillospirales y Lachnospirales están asociadas con el aumento de la producción de butirato (AGCC) ²⁹⁶. Los AGCC son producidos por la microbiota intestinal a partir de la fermentación de polisacáridos complejos, como la fibra soluble usada como prebióticos, o fibra la vegetal formada por almidón, celulosa, hemicelulosa y lignina que no son digeribles por nuestro sistema digestivo, y entre otras características pueden aumentar la solubilidad y absorción del calcio a través de la acidificación de la luz intestinal ¹⁶⁴. Además, se ha demostrado que el butirato es capaz de favorecer la formación ósea y de inhibir la osteoclastogénesis al suprimir la vía de señalización RANKL que como se sabe, induce la síntesis de citoquinas pro-inflamatorias ^{230,231,297}. Igualmente, los AGCC pueden afectar indirectamente a la osteoclastogénesis regulando el número y la función de los linfocitos Treg que están asociados a la mucosa del colon ²⁹⁸.

Los cambios descritos en el nivel de orden de este estudio, son similares a los observados en otros estudios que comparan población

sanas con pacientes con osteoporosis ^{237,239,278}. De tal manera, se ha observado un incremento de las Bacteroidales en los pacientes osteoporóticos ²³⁷ mientras que en los individuos sanos existe un aumento de las bacterias englobadas en el orden Clostridiales ^{239,278}. Cuando se analiza la abundancia relativa de las Clostridiales de este estudio, llama la atención el elevado porcentaje que muestran otros trabajos ^{239,278}. Estas diferencias, independientemente de las diferencias intrínsecas de las muestras poblacionales (región geográfica, dieta o estilo de vida), parecen estar condicionadas por el tipo de clasificación taxonómica filogenética realizada en el procesamiento y análisis de los datos moleculares. El primer paso en la identificación de una muestra desconocida, consiste en encontrar la secuencia del gen 16S rRNA más similar en las bases de datos de secuencias internacionales con el fin de generar un árbol filogenético que de una idea de la posición filogenética de la secuencia ²⁹⁹. Las principales bases de datos son: EMBL (<http://www.ebi.ac.uk/>), EzTaxonm (<http://www.ezbiocloud.net/>), NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) y SILVA (<https://www.arb-silva.de/>). Algunas de estas no están filtradas y pueden originar clasificaciones erróneas al agrupar microorganismos que comparten similitudes morfológicas, pero no tienen en cuenta sus relaciones evolutivas ³⁰⁰. La base de datos utilizada en este trabajo ha sido SILVA ²⁵⁷. SILVA utiliza secuencias de alta calidad y los resultados son más fiables y fáciles de interpretar. Además, en los últimos años ha integrado los avances de clasificación y nomenclatura de la base de datos GTBD. De esta manera, SILVA incluye dentro de la Clase Clostridia a los órdenes Lachnospirales, Oscillospirales, Peptostreptococcales-Tissierellales o Christensenellales, mientras que otras bases de datos

no hacen tal distinción y clasifican esos taxones en un único orden de Clostridiales. A pesar de esto, los hallazgos en este nivel taxonómico, en especial el aumento de Bacteroidales y descenso de Oscillospirales y Lachnospirales, sugieren que puede existir un fenotipo de microbiota asociado a la fractura de cadera con reducción de la masa ósea.

La microbiota intestinal está influenciada por factores ambientales y puede fluctuar con relativa facilidad. En el presente estudio se ha determinado el núcleo del microbioma entre casos y controles para definir la comunidad bacteriana que está asociada constantemente a los pacientes con fractura de cadera. Los géneros mayoritarios que constituyen el núcleo del microbioma de los individuos sanos son *Bacteroides* y *Faecalibacterium* y en los pacientes con fractura de cadera son *Porphyromonas*, *Bacteroides* y *Prevotella*.

Bacteroides es un género de la familia Bacteroidaceae y son bacilos anaerobios Gram-negativos. Principalmente se encuentran en el colon y actúan como comensales. Aunque tienen efecto beneficioso en el huésped, cuando se altera la barrera intestinal algunas especies de este género pueden desencadenar infecciones en forma de abscesos o bacteriemia ³⁰¹. Como consecuencia del proyecto del microbioma humano y otros estudios metagenómicos, su taxonomía se ha modificado drásticamente en las últimas décadas y se han añadido nuevas especies a su género ^{302,303}. En estados de disbiosis intestinal, se ha asociado el aumento de determinados taxones de *Bacteroides* a la DM, obesidad o enfermedad cardiovascular ³⁰⁴. Sin embargo, existe controversia respecto a su relación con la osteoporosis. Se ha sugerido que el género *Bacteroides* puede tener un efecto positivo sobre el metabolismo óseo y la disminución de la incidencia de fracturas por fragilidad ^{235,305}. En contraste, se ha asociado el

incremento de *Bacteroides* con el aumento de la respuesta inflamatoria que desencadena la pérdida de la masa ósea y el desarrollo de osteoporosis ^{236,238,241,276,278}. Los hallazgos de este estudio y la evidencia actual obligan a ser prudentes a la hora de señalar a este género bacteriano como biomarcador de fractura de cadera en situaciones de fragilidad ósea y es necesario analizar las especies que lo constituyen con el fin de alcanzar un resultado relevante.

Prevotella (Orden Bacteroidales; Familia Prevotellaceae) es un género diverso de bacilos cortos anaerobios Gram-negativos. Las especies de *Prevotella* son unos comensales abundantes de la microbiota intestinal humana que también están presentes en la piel, cavidad oral y vagina. Aunque no se ha descrito ninguna especie patógena, algunos de sus miembros se han relacionado con enfermedades oportunistas, vaginosis bacteriana o enfermedades inflamatorias autoinmunes. De todas formas, todavía no está claro el papel que desempeña dentro del microbioma humano ³⁰⁶. El aumento de la abundancia de determinadas especies de *Prevotella* se asocia a un incremento de la inflamación de la mucosa mediada por Th17. Esta inflamación de la mucosa favorece la diseminación sistémica de mediadores inflamatorios, bacterias y productos bacterianos y contribuye a promover la inflamación crónica en determinadas patologías ³⁰⁷. *P. timonensis*, *P. buccalis*, y *P. corporis* pertenecen a grupos filogenéticos distintos y aunque son muy prevalentes en el microbioma vaginal, también están presentes en el microbioma oral e intestinal ³⁰⁶. Existen resultados contradictorios respecto a la participación de *Prevotella* en el metabolismo óseo. En estudios con animales se ha descrito que facilita el desarrollo de la osteoporosis mediante la producción de

mediadores inflamatorios y la disminución de AGCC^{308,309}. Contrariamente, algunos estudios han demostrado que determinadas cepas de *Prevotella* son más abundantes en individuos sanos que en pacientes osteoporóticos^{235,277}. Es posible que *Prevotella* no sea el único género que participe en la inflamación crónica ni en el desarrollo de la osteoporosis y puede que especies específicas de *Prevotella* presenten propiedades diferentes. De esta manera, los hallazgos del presente trabajo respecto *P. timonensis*, *P. buccalis*, y *P. corporis* son relevantes porque pueden aportar evidencia a la hora de encontrar indicadores de patología dentro de este género tan heterogéneo.

Tal como se ha detallado, las bacterias de las familias Ruminococcaceae y Lachnospiraceae predominan en los pacientes sanos de este estudio. Se ha descrito que los porcentajes de Ruminococcaceae y Lachnospiraceae oscilan entre el 10 y el 45% de la microbiota intestinal sana³¹⁰. Diferentes estudios que comparan la microbiota intestinal de pacientes osteoporóticos con la de individuos sanos han demostrado que el descenso de la abundancia de Ruminococcaceae aumenta el riesgo de desarrollar osteoporosis^{235,275,311}. El acetato, el propionato y el butirato son AGCC sintetizados por diferentes grupos bacterianos de la microbiota intestinal a partir de la fibra vegetal no digerible. El acetato puede ser producido por un amplio número de especies bacterianas mientras que el butirato y propionato son generados por cepas más específicas³¹². Algunas especies de la familia Ruminococcaceae se han relacionado con la síntesis de propionato³¹³, mientras que el butirato es producido por bacterias que pertenecen a las familias Eubacteriaceae, Clostridiaceae, Ruminococcaceae y Lachnospiraceae³¹⁴. Asimismo, se ha documentado que en pacientes osteoporóticos se produce un

descenso en la microbiota intestinal de las bacterias la familia Lachnospiraceae y, en consecuencia, una pérdida de los beneficios derivados de la producción de butirato ^{236,240,273,275,305}. Este descenso en las bacterias Lachnospiraceae se ha constatado también en pacientes con historial de fractura osteoporótica o pacientes de edad avanzada ³⁰⁵. Por tanto, los hallazgos presentados en este estudio, sugieren que tanto las familias Ruminococcaceae como Lachnospiraceae ejercen un papel beneficioso en el metabolismo óseo y en la prevención de la fractura de cadera.

Faecalibacterium es un género de bacterias que pertenece a la familia Ruminococcaceae y son bacilos estrictamente anaerobios Gram-positivos ³¹⁵. Este género es comensal del tubo digestivo y supone uno de los géneros más abundantes de la microbiota intestinal, constituyendo un 5%, de la población total. Además, se considera que es bastante prevalente en las poblaciones humanas de todo el mundo ya que se ha detectado en el 85% de las muestras intestinales ³¹⁶. Se encuentra extendido por todo el tracto digestivo y su prevalencia está disminuida en recién nacidos y ancianos ³¹⁷. Se considera que puede desempeñar el papel de taxón clave en el mantenimiento de la homeostasis intestinal mediante la estabilización de la microbiota intestinal ³¹⁸. Se ha demostrado que su concentración varía entre individuos sanos y pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal y su papel beneficioso parece estar asociado a las propiedades antiinflamatorias de los AGCC que producen ³¹⁹. Además, se ha observado que la abundancia de algunas especies de *Faecalibacterium* está alterada en trastornos como síndrome del intestino irritable, cáncer colorrectal, obesidad, alteraciones metabólicas o desordenes hepáticos ³²⁰. Las bacterias del género

Faecalibacterium pueden regular el metabolismo óseo mediante la producción de ácido butírico, de manera que pueden promover la formación de hueso e inhibir la resorción ósea ²²⁹. El descenso de la abundancia de *Faecalibacterium* observado en este estudio en pacientes con fractura de cadera, coincide con la disminución descrita en otros trabajos que analizan la microbiota intestinal entre pacientes sanos y osteoporóticos. En ellos, se ha descrito una correlación positiva entre masa ósea y la abundancia de *Faecalibacterium* ^{235,311}.

Ruminococcus bicirculans pertenece al género *Ruminococcus* y son cocos anaerobios Gram-positivos. *Ruminococcus spp* muestran una abundancia constante en el intestino humano sano y se les atribuye funciones de mantenimiento del entorno intestinal. En los últimos años se han producido modificaciones en la taxonomía que han supuesto, entre otros, la reasignación taxonómica de un nuevo género *Blautia* ³²¹ o el descubrimiento de *R. bicirculans* ³²². Esta especie de *Ruminococcus* puede producir etanol, formiato y acetato fermentando glucosa, celobiosa y almidón soluble ³²². *R. albus* es la especie de *Ruminococcus* más cercana filogenéticamente a *R. bicirculans* y se ha asociado su baja abundancia con la enfermedad inflamatoria intestinal ³²³. Se ha observado que, tras una intervención nutricional mediante suplementos dietéticos basados en taninos, se produjo un incremento de la abundancia de *R. bicirculans*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Lachnospiraceae* UCG 010, *Lachnospiraceae* NK4A136, *Bacteroides thetaiotaomicron* y *Bacteroides uniformis*. Además, el incremento de *R. bicirculans* y *B. thetaiotaomicron* se correlacionó positivamente con el aumento de acetato y butirato ³²⁴. Asimismo, en otro estudio se ha descrito el incremento de las bacterias *Acidaminococcaceae*, *Butyricicoccus*, *R. bicirculans*, *Ruminococcus bromii*, *Bifidobacterium*

dentium, *Eubacterium hallii* (*Anaerobutyricum hallii*) en la microbiota intestinal de pacientes con insuficiencia renal crónica que fueron tratados con Roxadustat, para tratar su anemia crónica. Junto estos cambios en la abundancia de la microbiota intestinal, se observó un incremento significativo de los AGCC en sangre, así como un descenso de factores inflamatorios como el TNF- α , IL-1 e IL-6 ³²⁵. Hasta la fecha, no hay ningún estudio que haya descrito la asociación de *R. bicirculans* con trastornos del metabolismo óseo. Sin embargo, un estudio en ratas ha comprobado que Roxadustat promueve la diferenciación de osteoblastos y previene la pérdida de masa ósea³²⁶. De esta manera, dada la considerable y significativa disminución de la abundancia *R. bicirculans* en la microbiota intestinal de pacientes con fractura de cadera y la evidencia descrita previamente como microorganismo productor de metabolitos antiinflamatorios, debería considerarse la alteración de *R. bicirculans* en pacientes con fractura de cadera como indicador de patología.

El incremento de Porphyromonadaceae (Orden Bacteroidales) en el grupo de pacientes con fractura es un hallazgo interesante porque hasta la fecha no se han descrito cambios de esta familia en la microbiota intestinal de pacientes osteoporóticos. Muchas de las especies de esta familia forman parte de la microbiota gastrointestinal humana, aunque algunas especies se asocian habitualmente a diversas infecciones humanas, especialmente las gingivales ³²⁷. Parece que diferentes procesos que cursan con una inflamación crónica sistémica puedan tener relación con el incremento de dicha familia. En pacientes cirróticos por esteatosis hepática no alcohólica, la microbiota intestinal es significativamente diferente a la de sujetos normales. En estos casos, se ha observado un incremento de la

abundancia de las Porphyromonadaceae que se ha asociado a una mayor respuesta de la inmunidad innata y de los LT Th17 ³²⁸. Igualmente, hay evidencia de que la disbiosis intestinal puede estar asociada a la carcinogénesis colorrectal, de manera que aumentan algunas familias bacterianas, entre ellas Porphyromonadaceae. Además, se ha demostrado que estos cambios van acompañados del descenso de determinadas especies bacterianas que están englobadas en Ruminococcaceae y son productoras de butirato ³²⁹.

Porphyromonas es un género de coco-bacilos estrictamente anaerobios Gram-negativos ³³⁰. Además de la asociación en la génesis del carcinoma colorrectal mencionada previamente, la presencia de grandes cantidades de *Porphyromonas* en la cavidad oral y de elevadas citocinas proinflamatorias se ha asociado con el desarrollo de hipertensión en pacientes con apnea obstructiva del sueño ³³¹. Algunos miembros de este género son bacterias autóctonas de la cavidad oral de humanos y animales y otros se consideran verdaderos patógenos asociados a infecciones en humanas. *Porphyromonas gingivalis* es un agente importante causal de la enfermedad periodontal y posee multitud de mecanismos asociados a su superficie celular que contribuye a su agresividad. Presenta el LPS, hemaglutininas, fimbrias (importantes en la inducción de respuestas inflamatorias inmunitarias y la resorción ósea alveolar), enzimas como la gingipaínas, toxinas y hemolisinas que desempeñan un papel importante en la destrucción tisular, en la propagación del organismo a través de los tejidos y en la evasión de las defensas del huésped ^{301,332}. Es más, se ha sugerido que la inflamación crónica que produce dicha bacteria influye en otras enfermedades de tipo sistémico como DM, trastornos cardiovasculares, Alzheimer, respiratorios o bajo peso

al nacer ^{333,334}. Es por ello que los hallazgos referentes a Porphyromonadaceae del presente estudio son relevantes y sugieren la oportunidad de indagar en los niveles inferiores con el fin de fundamentar una asociación con la fractura de cadera por fragilidad ósea.

Aunque en menor proporción, se ha encontrado un aumento significativo de la familia Veillonellaceae en la microbiota intestinal de pacientes con fractura de cadera. El incremento de este grupo bacteriano se ha asociado con un mayor riesgo de osteoporosis ²³⁸. Además, se ha observado que en la microbiota intestinal de mujeres con deficiencia de vitamina D, la proporción de Veillonellaceae es significativamente más elevada que en pacientes sanos ³³⁵.

Dialister es un género que pertenece a la familia Veillonellaceae y son coco-bacilos anaerobios Gram-negativos. Se ha relacionado con enfermedades infecciosas orales y podría estar involucrado en la disminución de la masa ósea alveolar ³³⁶. Además, el aumento de la abundancia de este género se ha relacionado con el aumento de LPS e IL-6 ^{337,338}. En este estudio, se ha observado un incremento de *Dialister* en los pacientes con fractura de cadera. Este hallazgo concuerda con otro trabajo en el que se asocia el incremento de esta población con la disminución de la masa ósea y el aumento de riesgo de osteoporosis ²³⁷.

Peptoniphilus y *Anaerococcus* son géneros de bacterias que pertenecen a la familia XI de Peptostreptococcales-Tissierellales y son cocos anaerobios Gram-positivos productores de butirato. Son comensales de la microbiota intestinal y vaginal y se han asociado a infecciones de piel y partes blandas en diabéticos y a infecciones

osteoarticulares ³³⁹. El presente estudio ha mostrado un incremento significativo de ambas abundancias en los pacientes con fractura de cadera. Hasta la fecha no hay estudios que asocien el incremento de ambas poblaciones con el metabolismo óseo. El hecho de que ambos sean productores de butirato (ACCG beneficioso para el metabolismo óseo por sus características antiinflamatorias) obliga a ser prudente cuando se interpretan estos resultados. Por esta razón sería necesario realizar un análisis más discriminativo para poder establecer cierta asociación con el metabolismo óseo e investigar su implicación en la génesis de la osteoporosis.

El importante incremento de *Prevotella timonensis* y *Prevotella corporis*, *Porphyromonas assacahralitica* y *Porphyromonas somerae* en la microbiota intestinal de pacientes con fractura de cadera junto el incremento de la abundancia de otras especies como *Dialister propionificiens* y el considerable descenso de *R. bicirculans*, sugiere que existe un perfil de microbiota intestinal proinflamatoria que facilita la activación inmunitaria que participa en la osteoporosis.

2. Biomarcadores

“Los biomarcadores se definen como las variables de un proceso biológico, ya sea fisiológico o patológico, que se pueden medir objetivamente y que proporcionan una información fiable sobre el estado de ese proceso específico en un momento concreto” ³⁴⁰. Los biomarcadores pueden ser variables moleculares, histológicas, radiográficas o fisiológicas. Al igual que ha sucedido en diversos trastornos del organismo, se ha sugerido que el microbioma intestinal

puede facilitar nuevos biomarcadores para el diagnóstico y pronóstico de las alteraciones óseas ³⁴¹.

En el presente estudio, una vez se han identificado los cambios taxonómicos significativos que se asocian a los pacientes con fractura de cadera, se ha realizado un análisis LEfSe con el fin de determinar los posibles biomarcadores de patología. El método del tamaño del efecto (LEfSe) del análisis discriminante lineal (LDA) se utiliza para apoyar las comparaciones de clases de alta dimensión en los análisis metagenómicos. LEfSe determina las características (organismos, clados, unidades taxonómicas operativas, variantes de secuencias de amplicones, genes o funciones) con mayor probabilidad de explicar las diferencias entre clases mediante el acoplamiento de pruebas estándar de significación estadística con pruebas adicionales que codifican la coherencia biológica y la relevancia del efecto. De esta manera, se han identificado 4 órdenes, 4 familias, 6 géneros y una especie con significación estadística ($p < 0,05$) y un alto tamaño del efecto ($LDA \geq 5$). Es especialmente relevante que los taxones que presentan mayor puntuación de LDA y actúan como indicadores de ausencia de patología (órdenes: Oscillospirales y Lachnospirales, familias Ruminococcaceae y Lachnospiraceae, géneros *Faecalibacterium*, *Subdoligranulum*, *Ruminococcus* y *Roseburia* y especie *Ruminococcus bicirculans*) son productores de AGCC. También se debe destacar que los taxones incluidos como marcadores de fractura de cadera (orden Bacteroidales, familia Porphyromonadaceae, géneros *Porphyromonas* y *Prevotella*) muestran un claro perfil proinflamatorio.

Parte de los biomarcadores derivados de este estudio presentan similitudes con otros publicados recientemente. Se ha asociado el aumento del orden Bacteroidales con la osteopenia y la osteoporosis ^{237,276}. De igual manera, se ha considerado como marcador de osteoporosis al incremento de la familia de Prevotellaceae ²³⁷, sin embargo, se han señalado a determinadas especies de *Prevotella* por ejercer una labor favorable sobre el metabolismo óseo ²⁷⁷. Paralelamente, un estudio que comparó la microbiota intestinal entre pacientes sanos y osteoporóticos, señaló a Lachnospiraceae y *Ruminococcus sp. 5_1_39BFAA* por presentar una papel beneficioso sobre la salud ósea. No obstante, también se debe añadir que en dicho trabajo se describió como posible indicador de osteoporosis al incremento de Ruminococcaceae ²³⁷.

Las variables clínicas y analíticas que han mostrado diferencias significativas entre individuos sanos y pacientes con fractura de cadera se les ha denominado metadatos. La realización de la matriz de correlaciones entre los metadatos ha mostrado una correlación inversa muy significativa entre las variables que definen la Osteoporosis (Vit. D, calcio total) con indicadores objetivos de perfiles de infección-inflamación-lesiones-estrés físico (CPR, Leucocitos y Neutrófilos). De acuerdo con la bibliografía actual ^{293,342}, se ha establecido una correlación positiva entre la CRP con la edad y los niveles plasmáticos de PTH.

Los trastornos con base inflamatoria crónica como la enfermedad del hígado graso no alcohólico, Alzheimer u obesidad se han asociado a cambios en la microbiota intestinal que muestran un perfil proinflamatorio ^{343–347}. Además, se ha demostrado que en este tipo de

pacientes se produce una pérdida de masa ósea^{348–351}. Los cambios de los indicadores de inflamación y la microbiota intestinal en pacientes con fractura de cadera observados en este estudio concuerda con los hallazgos observados en estos trastornos inflamatorios crónicos y refuerzan la idea de que la fractura de cadera y la osteoporosis tienen una base inflamatoria crónica que puede estar influenciada por un cambios en la microbiota intestinal.

En el presente estudio se han obtenido una serie de biomarcadores de microbiota intestinal que podrían ser útiles para establecer las bases de nuevos factores de riesgo del desarrollo de la fractura de cadera. Es cierto que la microbiota intestinal está sujeta a continuos cambios que pueden alterar la composición de la misma. Frente a ello, se ha evaluado con pruebas de abundancia diferencial la microbiota intestinal, se ha identificado el núcleo del microbioma y se ha realizado un análisis de LefSe entre ambos grupos de estudio. Además, y para dar mayor consistencia a estos resultados, se han analizado las variables clínicas y analíticas que pueden influir en el proceso patológico con dichos cambios bacterianos. Para ello, se ha realizado un análisis de correlaciones de los metadatos con los diferentes taxones microbianos.

La realización de estudios multiómicos entraña cierta complejidad y la utilización de test estadísticos convencionales puede arrojar resultados espurios. Las correlaciones de los cambios de microbiota intestinal con las variables sistémicas pueden estar sujetos a factores de confusión como la edad, la medicación o el índice de masa corporal³⁵². La función MetadeconfoundR se ha empleado en esta investigación con el fin de encontrar las distintas correlaciones entre la

microbiota intestinal y los metadatos y, además, detectar los posibles efectos de confusión. Los resultados obtenidos confirman la correlación negativa de un grupo de bacterias bien definido que pertenecen mayoritariamente a las familias Ruminococcaceae y Lachnospiraceae con la fractura de cadera. Aparte de la clara relación de *Ruminococcus bicirculans* y *Faecalibacterium* ya mencionada previamente, destacan la presencia de *Blautia*, *Anaerostipes*, *Agathobacter*, *Dorea*, *Subdoligranulum*, *Roseburia* y *Eubacterium hallii*. Se ha descrito previamente la disminución de *Blautia*, *Anaerostipes*, *Agathobacter*, *Roseburia* (pertenecientes a Lachnospiraceae) y *Subdoligranulum* (Ruminococcaceae) en la microbiota intestinal de pacientes con osteoporosis ^{235,237,240,276,353}. El género *Dorea* (Lachnospiraceae) está considerado beneficioso para la salud ósea ³⁵⁴ y se ha demostrado la disminución de su población en pacientes con osteoporosis ²⁴¹. Se ha comprobado que bacterias del género *Blautia* pueden generar AGCC a partir de fibra vegetal y son capaces de modular la respuesta inmunitaria de los Treg ³⁵⁵.

Paralelamente, existe una correlación positiva de *Porphyromonas spp* con los pacientes que presenta fractura de cadera y con el incremento de la CRP. Hay que recordar que, aunque la CRP puede ser un factor de confusión, sus correlaciones con los grupos bacterianos son reales y deben considerarse. De hecho, esta vinculación tan intensa entre presencia de la enfermedad e incremento de la CRP subraya aún más el estado inflamatorio sistémico que presentan los pacientes con fractura de cadera. Por tanto, estos resultados confirman la relación entre *Porphyromonas* y el estado proinflamatorio de estos pacientes.

Aunque existen estudios que relacionan determinados cambios en el microbioma intestinal con la osteoporosis, todavía no existe un consenso que establezca un patobioma característico. Los resultados de este estudio deberían tenerse en cuenta a la hora de buscar los biomarcadores de microbiota en la patología ósea por representar una población definida con un trastorno clínico relevante (fractura de cadera), coincidir en gran parte con los cambios de microbiota publicados y haber realizado un análisis exhaustivo de la microbiota que incluye la correlación con variables clínicas y analíticas.

3. Limitaciones

A pesar de extraer conclusiones relevantes, asumimos que este estudio cuenta con varias limitaciones. Puede parecer que el tamaño de la muestra sea pequeño, pero hay que remarcar que es el único trabajo que establece una asociación entre microbiota intestinal y pacientes que han sufrido una fractura de cadera.

El diseño del presente estudio es de casos-control, de modo que los resultados del estudio pueden demostrar asociación, pero no causalidad. Sin embargo, el enfoque de un estudio casos-control es el más apropiado en el abordaje inicial de la investigación de una asociación y puede abrir la puerta a estudios de cohortes que confirmen la hipótesis planteada por nuestro estudio. Adicionalmente, es posible que por la naturaleza del diseño del estudio (casos-control) los efectos de asociación estén magnificados en los pacientes que ingresan en el hospital (sesgo de Berkson). Sin embargo, creemos que el impacto de este sesgo en la fractura de cadera será mínimo ya que en estos pacientes no hay gradación en la intensidad de la enfermedad

(fractura de cadera) y es poco probable que una fractura de cadera tenga la levedad sintomática para evitar su ingreso.

Por último, independientemente de haber realizado un diseño con criterios de inclusión y exclusión restrictivos, hemos encontrado que la discrepancia de edad puede suponer una limitación a la hora de interpretar nuestros resultados. No obstante, se ha confirmado que los resultados de las correlaciones realizadas con MetadeconfoundR cuando se ajusta por edad apenas varía respecto a los obtenidos sin dicho ajuste. Además, y dadas las grandes diferencias interindividuales en la microbiota intestinal de las personas mayores, es difícil definir cuál es la microbiota intestinal típica de las personas mayores o establecer en que intervalos de edad se producen los cambios sustanciales en la abundancia bacteriana^{356–358}.

4. Relevancia y aplicabilidad de los resultados

La eventual relación de la microbiota intestinal humana en la patogenia de la osteoporosis y la incidencia de fractura de cadera por fragilidad no había sido explorada previamente. En este estudio se ha observado una marcada diferencia en la composición de la microbiota intestinal entre los pacientes ancianos con fractura de cadera en comparación con ancianos sin fractura por fragilidad.

En la actualidad existe incertidumbre sobre los factores de riesgo predictores de fractura de cadera en el anciano. Por otra parte, el tratamiento actual de la osteoporosis tiene un impacto pequeño en la prevención de fracturas de cadera. Así, por ejemplo, el NNT de la toma de bifosfonatos durante un año para evitar una fractura de cadera es de 175. Por este motivo es imperativo buscar tratamientos con

enfoque innovadores que mejoren los resultados de los tratamientos convencionales en la prevención de fracturas por fragilidad.

Los resultados de este estudio permiten plantear nuevas estrategias preventivas y terapéuticas de la osteoporosis. De acuerdo a los resultados de esta investigación, puede considerarse la realización de PCR cuantitativa de las muestras para confirmar los biomarcadores más característicos de este estudio. Con los estudios y comprobaciones pertinentes, la PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR) podría confirmar los ASV asociados a riesgo de fractura en muestras fecales de ancianos osteoporóticos con el fin de implementar las medidas preventivas de fractura de cadera por fragilidad ósea.

Por su parte, la asociación demostrada entre una microbiota alterada y la presencia de fractura de cadera justifica la realización de un estudio de cohortes prospectivo (más caro y costoso que el presente diseño de casos-control) que confirme la causalidad.

En este estudio se ha demostrado una clara asociación entre la ocurrencia de fractura osteoporótica de cadera con cambios en la diversidad de la microbiota intestinal. Un estado de inflamación crónica sistémica puede producir una alteración en la microbiota intestinal y esta a su vez puede perpetuar dicho estado inflamatorio. En estos casos, puede plantearse actuaciones que favorezcan la competencia de determinados grupos bacterianos con acción antiinflamatoria. Evidencias recientes provenientes de investigación básica demuestran el papel modulador de la microbiota intestinal en la homeostasis ósea y en la aparición de osteoporosis. Es posible que la aplicación de tratamientos moduladores de la microbiota intestinal

como el uso de probióticos disminuya el riesgo de fracturas osteoporóticas en población anciana.

Igualmente, los estudios en los que se modifica la dieta pueden aportar evidencia al evaluar los cambios que se producen a largo plazo en la microbiota intestinal de pacientes susceptibles de sufrir una fractura de cadera por fragilidad y permiten analizar la reducción del riesgo de fractura. En este estudio no se han encontrado diferencias significativas entre grupos respecto a la adhesión a la dieta mediterránea. No obstante, existen determinadas variables como la exposición a fibra soluble no digerible o la administración de dietas vegetarianas (o con alto contenido en vegetales) que influyen sobre la microbiota intestinal y pueden modificarse en los grupos de estudios con el fin de establecer diferencias entre los grupos que modulen la microbiota intestinal.

De manera más interesante, este estudio da justificación a un ensayo clínico que evalúe la modificación dietética o mediante probióticos de la microbiota intestinal en la reducción del riesgo de fractura de cadera.

Los resultados de este estudio pueden contribuir al cambio del paradigma de tratamiento de la osteoporosis y de los factores de riesgo de fractura por fragilidad.

CONCLUSIONES

1. Los pacientes con fractura de cadera en comparación con sujetos sin fractura muestran cambios significativos en la microbiota intestinal, tanto en la diversidad como en la abundancia bacteriana.
2. La diversidad de la microbiota intestinal de pacientes con fractura de cadera presenta una menor riqueza de taxones y es más heterogénea que los sujetos sanos.
3. Se han identificado dos grandes cambios en los pacientes con fractura de cadera. Por un lado, ha disminuido un grupo numeroso de bacterias productoras de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) mientras que, por otro, se han incrementado otras bacterias que presentan un claro perfil inflamatorio
4. Las familias Ruminococcaceae y Lachnospiraceae son las que más han disminuido su abundancia en los pacientes con fractura de cadera. Los géneros más afectados han sido *Faecalibacterium*, *Subdoligranulum*, *Ruminococcus*, *Roseburia*, *Agathobacter*, *Eubacterium*, *Blautia* y *Dorea*.
5. Los géneros *Prevotella* y *Porphyromonas* han experimentado un incremento en los pacientes con fractura de cadera, siendo estos últimos los que mayor correlación han presentado con la enfermedad y con el incremento del marcador de inflamación CRP.

6. Estos cambios en la microbiota intestinal pueden sentar las bases de la búsqueda de nuevos biomarcadores microbianos que en un futuro sirvan para establecer pronóstico y evolución de una fractura de cadera, así como para investigar el efecto de la modificación de la microbiota intestinal en la prevención de fracturas por fragilidad.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Svedbom A., Hernlund E., Ivergård M., Compston J., Cooper C., Stenmark J., et al. Osteoporosis in the European Union: a compendium of country-specific reports. *Arch Osteoporos.* 2013;8(1-2):137, doi: 10.1007/s11657-013-0137-0.
2. Cooper C., Atkinson EJ., Jacobsen SJ., O'fallon WM., Melton LJ. Population-based study of survival after osteoporotic fractures. *Am J Epidemiol.* 1993;137(9), doi: 10.1093/oxfordjournals.aje.a116756.
3. Ryg J., Rejnmark L., Overgaard S., Brixen K., Vestergaard P. Hip Fracture Patients at Risk of Second Hip Fracture: A Nationwide Population-Based Cohort Study of 169,145 Cases During 1977–2001. *Journal of Bone and Mineral Research.* 2009;24(7):1299-307, doi: 10.1359/jbmr.090207.
4. O'Neill TW., Roy DK. How many people develop fractures with what outcome? *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2005;19(6):879-95, doi: 10.1016/j.berh.2005.06.003.
5. Bartra A., Caeiro J-R., Mesa-Ramos M., Etxebarria-Foronda I., Montejo J., Carpintero P., et al. Coste de la fractura de cadera osteoporótica en España por comunidad autónoma. *Rev Esp Cir Ortop Traumatol.* 2019;63(1):56-68, doi: 10.1016/j.recot.2018.03.005.
6. Hernlund E., Svedbom A., Ivergård M., Compston J., Cooper C., Stenmark J., et al. Osteoporosis in the European Union: medical management, epidemiology and economic burden. *Arch Osteoporos.* 2013;8(1-2), doi: 10.1007/s11657-013-0136-1.
7. Lorenzo J., Horowitz M., Choi Y. Osteoimmunology: Interactions of the Bone and Immune System. *Endocr Rev.* 2008;29(4):403-40, doi: 10.1210/er.2007-0038.

8. Yee CS., Xie L., Hatsell S., Hum N., Muruges D., Economides AN., et al. Sclerostin antibody treatment improves fracture outcomes in a Type I diabetic mouse model. *Bone*. 2016;82:122-34, doi: 10.1016/j.bone.2015.04.048.
9. Lee FY., Hicham Drissi M., Zuscik MJ., Chen D., Nizami S., Goto H. *Molecular and cell biology in orthopaedics*. 2018.
10. Fischer V., Haffner-Luntzer M. Interaction between bone and immune cells: Implications for postmenopausal osteoporosis. *Semin Cell Dev Biol*. 2022, doi: 10.1016/j.semcdb.2021.05.014.
11. Takahashi N UNTMST. Osteoclast generation,. En: Bilezikian HP, Raisz LG, Rodan GA, eds. *Principles of Bone Biology*. 3.^a ed. San Diego GA; 2002. p. 109-26.
12. Yang C-Y., Leung PSC., Adamopoulos IE., Gershwin ME. The Implication of Vitamin D and Autoimmunity: a Comprehensive Review. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2013;45(2):217-26, doi: 10.1007/s12016-013-8361-3.
13. Amarasekara DS., Yun H., Kim S., Lee N., Kim H., Rho J. Regulation of osteoclast differentiation by cytokine networks. *Immune Netw*. 2018, doi: 10.4110/in.2018.18.e8.
14. CHAN JKC., NG CS., HUI PK. A simple guide to the terminology and application of leucocyte monoclonal antibodies. *Histopathology*. 1988;12(5):461-80, doi: 10.1111/j.1365-2559.1988.tb01967.x.
15. Zola H., Swart B., Banham A., Barry S., Beare A., Bensussan A., et al. CD molecules 2006 — Human cell differentiation molecules. *J Immunol Methods*. 2007;319(1-2):1-5, doi: 10.1016/j.jim.2006.11.001.

16. Han A., Newell EW., Glanville J., Fernandez-Becker N., Khosla C., Chien Y., et al. Dietary gluten triggers concomitant activation of CD4⁺ and CD8⁺ $\alpha\beta$ T cells and $\gamma\delta$ T cells in celiac disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2013;110(32):13073-8, doi: 10.1073/pnas.1311861110.
17. Abbas AK. *Cellular and Molecular Immunology*, 7th Edition. 7th edition. 2012.
18. Read KA., Powell MD., Sreekumar BK., Oestreich KJ. In Vitro Differentiation of Effector CD4⁺ T Helper Cell Subsets. *Methods Mol Biol*. 2019;1960:75-84, doi: 10.1007/978-1-4939-9167-9_6.
19. Gerli R., Monti D., Bistoni O., Mazzone AM., Peri G., Cossarizza A., et al. Chemokines, sTNF-Rs and sCD30 serum levels in healthy aged people and centenarians. *Mech Ageing Dev*. 2000;121(1-3):37-46, doi: 10.1016/S0047-6374(00)00195-0.
20. Alberti S., Cevenini E., Ostan R., Capri M., Salvioli S., Bucci L., et al. Age-dependent modifications of Type 1 and Type 2 cytokines within virgin and memory CD4⁺ T cells in humans. *Mech Ageing Dev*. 2006;127(6):560-6, doi: 10.1016/j.mad.2006.01.014.
21. Sansoni P., Vescovini R., Fagnoni F., Biasini C., Zanni F., Zanlari L., et al. The immune system in extreme longevity. *Exp Gerontol*. 2008;43(2):61-5, doi: 10.1016/j.exger.2007.06.008.
22. Frasca D., Pucci S., Goso C., Barattini P., Barile S., Pioli C., et al. Regulation of cytokine production in aging: use of recombinant cytokines to upregulate mitogen-stimulated spleen cells. *Mech Ageing Dev*. 1997;93(1-3):157-69, doi: 10.1016/S0047-6374(96)01825-8.

23. García-Alvarez F A-GRG-AILLGMPL-BA et al. Estado inmunológico de ancianos candidatos a artroplastia tras fractura subcapital de cadera: estudio de su relación con la edad y con la morbilidad postoperatoria. *Rev Esp Cir Ortop Traumatol.* 2007;51(6):309-13.
24. Vallejo AN. CD28 extinction in human T cells: altered functions and the program of T-cell senescence. *Immunol Rev.* 2005;205(1):158-69, doi: 10.1111/j.0105-2896.2005.00256.x.
25. Weng N., Akbar AN., Goronzy J. CD28- T cells: their role in the age-associated decline of immune function. *Trends Immunol.* 2009;30(7):306-12, doi: 10.1016/j.it.2009.03.013.
26. Consensus development conference: Diagnosis, prophylaxis, and treatment of osteoporosis. *The American Journal of Medicine*, vol. 94. 1993.
27. Kanis J a. Assessment of osteoporosis at the primary health care level. *World Health.* 2007.
28. Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. Report of a WHO Study Group. *World Health Organ Tech Rep Ser.* 1994.
29. Sambrook P., Cooper C. Osteoporosis. *The Lancet.* 2006;367(9527):2010-8, doi: 10.1016/S0140-6736(06)68891-0.
30. Kanis JA., McCloskey E V., Johansson H., Oden A., Melton LJ., Khaltayev N. A reference standard for the description of osteoporosis. *Bone.* 2008, doi: 10.1016/j.bone.2007.11.001.
31. Ralston SH., Uitterlinden AG. Genetics of osteoporosis. *Endocr Rev.* 2010, doi: 10.1210/er.2009-0044.

32. Riggs BL., Melton LJ. Evidence for two distinct syndromes of involutional osteoporosis. *Am J Med.* 1983;75(6):899-901, doi: 10.1016/0002-9343(83)90860-4.
33. Riggs BL., Melton LJ. Involutional Osteoporosis. *New England Journal of Medicine.* 1986;314(26):1676-86, doi: 10.1056/NEJM198606263142605.
34. Zaidi M. Skeletal remodeling in health and disease. *Nat Med.* 2007, doi: 10.1038/nm1593.
35. Finkelstein JS., Klibanski A., Neer RM., Greenspan SL., Rosenthal DI., Crowley WF. Osteoporosis in men with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *Ann Intern Med.* 1987;106(3), doi: 10.7326/0003-4819-106-3-.
36. Venken K., De Gendt K., Boonen S., Ophoff J., Bouillon R., Swinnen J V., et al. Relative impact of androgen and estrogen receptor activation in the effects of androgens on trabecular and cortical bone in growing male mice: A study in the androgen receptor knockout mouse model. *Journal of Bone and Mineral Research.* 2006;21(4), doi: 10.1359/jbmr.060103.
37. Finkelstein JS., Lee H., Leder BZ., Burnett-Bowie SAM., Goldstein DW., Hahn CW., et al. Gonadal steroid-dependent effects on bone turnover and bone mineral density in men. *Journal of Clinical Investigation.* 2016;126(3), doi: 10.1172/JCI84137.
38. Fink HA., Ewing SK., Ensrud KE., Barrett-Connor E., Taylor BC., Cauley JA., et al. Association of testosterone and estradiol deficiency with osteoporosis and rapid bone loss in older men. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.* 2006;91(10), doi: 10.1210/jc.2006-0173.

39. Weitzmann MN., Pacifici R. Estrogen deficiency and bone loss: An inflammatory tale. *Journal of Clinical Investigation*. 2006, doi: 10.1172/JCI28550.
40. Nakamura T., Imai Y., Matsumoto T., Sato S., Takeuchi K., Igarashi K., et al. Estrogen Prevents Bone Loss via Estrogen Receptor α and Induction of Fas Ligand in Osteoclasts. *Cell*. 2007;130(5), doi: 10.1016/j.cell.2007.07.025.
41. Martin-Millan M., Almeida M., Ambrogini E., Han L., Zhao H., Weinstein RS., et al. The estrogen receptor- α in osteoclasts mediates the protective effects of estrogens on cancellous but not cortical bone. *Molecular Endocrinology*. 2010;24(2), doi: 10.1210/me.2009-0354.
42. Pacifici R. Role of T cells in ovariectomy induced bone loss-revisited. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2012, doi: 10.1002/jbmr.1500.
43. Ibáñez L., Rouleau M., Wakkach A., Blin-Wakkach C. Gut microbiome and bone. *Joint Bone Spine*. 2019;43-7, doi: 10.1016/j.jbspin.2018.02.008.
44. Eghbali-Fatourehchi G., Khosla S., Sanyal A., Boyle WJ., Lacey DL., Riggs BL. Role of RANK ligand in mediating increased bone resorption in early postmenopausal women. *Journal of Clinical Investigation*. 2003;111(8), doi: 10.1172/JCI200317215.
45. Taxel P., Kaneko H., Lee SK., Aguila HL., Raisz LG., Lorenzo JA. Estradiol rapidly inhibits osteoclastogenesis and RANKL expression in bone marrow cultures in postmenopausal women: A pilot study. *Osteoporosis International*. 2008;19(2), doi: 10.1007/s00198-007-0452-7.

46. Xiong J., Onal M., Jilka RL., Weinstein RS., Manolagas SC., O'Brien CA. Matrix-embedded cells control osteoclast formation. *Nat Med.* 2011;17(10), doi: 10.1038/nm.2448.
47. Kitaura H., Kimura K., Ishida M., Kohara H., Yoshimatsu M., Takano-Yamamoto T. Immunological reaction in TNF- α -mediated osteoclast formation and bone resorption in vitro and in vivo. *Clin Dev Immunol.* 2013, doi: 10.1155/2013/181849.
48. Nakashima T., Hayashi M., Fukunaga T., Kurata K., Oh-Hora M., Feng JQ., et al. Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression. *Nat Med.* 2011;17(10), doi: 10.1038/nm.2452.
49. Kong YY., Yoshida H., Sarosi I., Tan HL., Timms E., Capparelli C., et al. OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature.* 1999;397(6717), doi: 10.1038/16852.
50. Kotake S., Udagawa N., Takahashi N., Matsuzaki K., Itoh K., Ishiyama S., et al. IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis. *Journal of Clinical Investigation.* 1999;103(9), doi: 10.1172/JCI5703.
51. Lam J., Takeshita S., Barker JE., Kanagawa O., Ross FP., Teitelbaum SL. TNF- α induces osteoclastogenesis by direct stimulation of macrophages exposed to permissive levels of RANK ligand. *Journal of Clinical Investigation.* 2000;106(12):1481-8, doi: 10.1172/JCI11176.
52. Wakkach A., Mansour A., Dacquin R., Coste E., Jurdic P., Carle GF., et al. Bone marrow microenvironment controls the in vivo

- differentiation of murine dendritic cells into osteoclasts. *Blood*. 2008;112(13), doi: 10.1182/blood-2008-01-132787.
53. Roggia C., Gao Y., Cenci S., Weitzmann MN., Toraldo G., Isaia G., et al. Up-regulation of TNF-producing T cells in the bone marrow: A key mechanism by which estrogen deficiency induces bone loss in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(24), doi: 10.1073/pnas.251534698.
54. Cenci S., Weitzmann MN., Roggia C., Namba N., Novack D., Woodring J., et al. Estrogen deficiency induces bone loss by enhancing T-cell production of TNF- α . *Journal of Clinical Investigation*. 2000;106(10), doi: 10.1172/JCI11066.
55. Li JY., Tawfeek H., Bedi B., Yang X., Adams J., Gao KY., et al. Ovariectomy disregulates osteoblast and osteoclast formation through the T-cell receptor CD40 ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(2), doi: 10.1073/pnas.1013492108.
56. D'Amelio P., Grimaldi A., Di Bella S., Brianza SZM., Cristofaro MA., Tamone C., et al. Estrogen deficiency increases osteoclastogenesis up-regulating T cells activity: A key mechanism in osteoporosis. *Bone*. 2008;43(1), doi: 10.1016/j.bone.2008.02.017.
57. Adeel S., Singh K., Vydareny KH., Kumari M., Shah E., Weitzmann MN., et al. Bone loss in surgically ovariectomized premenopausal women is associated with T lymphocyte activation and thymic hypertrophy. *Journal of Investigative Medicine*. 2013;61(8), doi: 10.2310/JIM.0000000000000016.
58. Jovanovic D V., Di Battista JA., Martel-Pelletier J., Jolicoeur FC., He Y., Zhang M., et al. IL-17 stimulates the production and

- expression of proinflammatory cytokines, IL-beta and TNF-alpha, by human macrophages. *J Immunol.* 1998;160(7).
59. Waisman A. T helper cell populations: As flexible as the skin? *Eur J Immunol.* 2011, doi: 10.1002/eji.201141938.
60. Komatsu N., Takayanagi H. Autoimmune Arthritis. The Interface Between the Immune System and Joints. *Advances in Immunology*, vol. 115. 2012.
61. Sato K., Suematsu A., Okamoto K., Yamaguchi A., Morishita Y., Kadono Y., et al. Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction. *Journal of Experimental Medicine.* 2006;203(12):2673-82, doi: 10.1084/jem.20061775.
62. Molnár I., Bohaty I., Somogyiné-Vári É. High prevalence of increased interleukin-17A serum levels in postmenopausal estrogen deficiency. *Menopause.* 2014;21(7), doi: 10.1097/GME.000000000000125.
63. Zhang J., Fu Q., Ren Z., Wang Y., Wang C., Shen T., et al. Changes of serum cytokines-related Th1/Th2/Th17 concentration in patients with postmenopausal osteoporosis. *Gynecological Endocrinology.* 2015;31(3), doi: 10.3109/09513590.2014.975683.
64. Molnár I., Bohaty I., Somogyiné-Vári É. IL-17A-mediated sRANK ligand elevation involved in postmenopausal osteoporosis. *Osteoporosis International.* 2014;25(2), doi: 10.1007/s00198-013-2548-6.
65. Li JY., D'Amelio P., Robinson J., Walker LD., Vaccaro C., Luo T., et al. IL-17A Is Increased in Humans with Primary

- Hyperparathyroidism and Mediates PTH-Induced Bone Loss in Mice. *Cell Metab.* 2015;22(5), doi: 10.1016/j.cmet.2015.09.012.
66. Adamopoulos IE., Chao C., Geissler R., Laface D., Blumenschein W., Iwakura Y., et al. Interleukin-17A upregulates receptor activator of NF- κ B on osteoclast precursors. *Arthritis Res Ther.* 2010;12(1):R29, doi: 10.1186/ar2936.
67. Deselm CJ., Takahata Y., Warren J., Chappel JC., Khan T., Li X., et al. IL-17 mediates estrogen-deficient osteoporosis in an Act1-dependent manner. *J Cell Biochem.* 2012;113(9), doi: 10.1002/jcb.24165.
68. Tyagi AM., Mansoori MN., Srivastava K., Khan MP., Kureel J., Dixit M., et al. Enhanced immunoprotective effects by anti-il-17 antibody translates to improved skeletal parameters under estrogen deficiency compared with anti-RANKL and anti-TNF- α antibodies. *Journal of Bone and Mineral Research.* 2014;29(9), doi: 10.1002/jbmr.2228.
69. Tyagi AM., Srivastava K., Mansoori MN., Trivedi R., Chattopadhyay N., Singh D. Estrogen deficiency induces the differentiation of IL-17 secreting Th17 cells: A new candidate in the pathogenesis of osteoporosis. *PLoS One.* 2012;7(9), doi: 10.1371/journal.pone.0044552.
70. Chen DY., Chen YM., Chen HH., Hsieh CW., Lin CC., Lan JL. Increasing levels of circulating Th17 cells and interleukin-17 in rheumatoid arthritis patients with an inadequate response to anti-TNF- α therapy. *Arthritis Res Ther.* 2011;13(4), doi: 10.1186/ar3431.
71. Sugita S., Kawazoe Y., Imai A., Yamada Y., Horie S., Mochizuki M. Inhibition of Th17 differentiation by anti-TNF-alpha therapy in

- uveitis patients with Behçet's disease. *Arthritis Res Ther.* 2012;14(3), doi: 10.1186/ar3824.
72. Basu R., Hatton RD., Weaver CT. The Th17 family: Flexibility follows function. *Immunol Rev.* 2013;252(1), doi: 10.1111/imr.12035.
73. Veldhoen M., Hocking RJ., Atkins CJ., Locksley RM., Stockinger B. TGF β in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity.* 2006;24(2), doi: 10.1016/j.immuni.2006.01.001.
74. Lélou K., Laffont S., Delpy L., Paulet P-E., Périnat T., Tschanz SA., et al. Estrogen Receptor α Signaling in T Lymphocytes Is Required for Estradiol-Mediated Inhibition of Th1 and Th17 Cell Differentiation and Protection against Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *The Journal of Immunology.* 2011;187(5), doi: 10.4049/jimmunol.1101578.
75. Yuan FL., Li X., Lu WG., Xu RS., Zhao YQ., Li CW., et al. Regulatory T cells as a potent target for controlling bone loss. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010, doi: 10.1016/j.bbrc.2010.09.120.
76. Dar HY., Azam Z., Anupam R., Mondal RK., Srivastava RK. Osteoimmunology: The Nexus between bone and immune system. *Frontiers in Bioscience - Landmark.* 2018, doi: 10.2741/4600.
77. Tomkinson A., Gevers EF., Wit JM., Reeve J., Noble BS. The role of estrogen in the control of rat osteocyte apoptosis. *Journal of Bone and Mineral Research.* 1998;13(8), doi: 10.1359/jbmr.1998.13.8.1243.

78. Kanis JA., Harvey NC., Johansson H., Odén A., McCloskey E V., Leslie WD. Overview of Fracture Prediction Tools. *Journal of Clinical Densitometry*. 2017;20(3), doi: 10.1016/j.jocd.2017.06.013.
79. Johnston CB., Dagar M. Osteoporosis in Older Adults. *Medical Clinics of North America*. 2020, doi: 10.1016/j.mcna.2020.06.004.
80. Kanis JA., Johnell O., De Laet C., Johansson H., Oden A., Delmas P., et al. A meta-analysis of previous fracture and subsequent fracture risk. *Bone*. 2004;35(2):375-82, doi: 10.1016/j.bone.2004.03.024.
81. Schuit SCE., van der Klift M., Weel AEAM., de Laet CEDH., Burger H., Seeman E., et al. Fracture incidence and association with bone mineral density in elderly men and women: the Rotterdam Study. *Bone*. 2004;34(1):195-202, doi: 10.1016/j.bone.2003.10.001.
82. Hui SL., Slemenda CW., Johnston CC. Age and bone mass as predictors of fracture in a prospective study. *Journal of Clinical Investigation*. 1988;81(6):1804-9, doi: 10.1172/JCI113523.
83. Vestergaard P. Discrepancies in bone mineral density and fracture risk in patients with type 1 and type 2 diabetes—a meta-analysis. *Osteoporosis International*. 2007;18(4):427-44, doi: 10.1007/s00198-006-0253-4.
84. Ali T., Lam D., Bronze MS., Humphrey MB. Osteoporosis in Inflammatory Bowel Disease. *Am J Med*. 2009;122(7):599-604, doi: 10.1016/j.amjmed.2009.01.022.

85. Sambrook PN., Flahive J., Hooven FH., Boonen S., Chapurlat R., Lindsay R., et al. Predicting fractures in an international cohort using risk factor algorithms without BMD. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2011;26(11):2770-7, doi: 10.1002/jbmr.503.
86. Sommer F., Bäckhed F. The gut microbiota — masters of host development and physiology. *Nat Rev Microbiol*. 2013;11(4):227-38, doi: 10.1038/nrmicro2974.
87. Claesson MJ., O'Sullivan O., Wang Q., Nikkilä J., Marchesi JR., Smidt H., et al. Comparative Analysis of Pyrosequencing and a Phylogenetic Microarray for Exploring Microbial Community Structures in the Human Distal Intestine. *PLoS One*. 2009;4(8):e6669, doi: 10.1371/journal.pone.0006669.
88. Gordon JL. Honor Thy Gut Symbionts Redux. *Science* (1979). 2012;336(6086):1251-3, doi: 10.1126/science.1224686.
89. Marchesi JR., Ravel J. The vocabulary of microbiome research: a proposal. *Microbiome*. 2015;3(1), doi: 10.1186/s40168-015-0094-5.
90. Lederberg J. PATHWAYS OF DISCOVERY; Infectious History. *Science* (1979). 2000;288(April).
91. van Leeuwenhoek A. An abstract of a Letter from Antonie van Leeuwenhoek, Sep. 12, 1683. About Animals in the scruff of the Teeth. *Philos Trans R Soc Lond*. 1684;14:568-74.
92. Dobell C. The Discovery of the Intestinal Protozoa of Man. *Proc R Soc Med*. 1920;13(sect_hist_med), doi: 10.1177/003591572001301601.

93. Ribera Casado JM. Centenario de Elie Metchnikoff (1845-1916). Educación Médica. 2017;18(2), doi: 10.1016/j.edumed.2016.11.009.
94. Ross E., Yacowitz H. Effect of Penicillin on Growth and Bone Ash of Chicks Fed Different Levels of Vitamin D and Phosphorus. Poult Sci. 1954;33(2), doi: 10.3382/ps.0330262.
95. Rusoff LL., Fussell JM., Hyde CE., Crown RM., Gall LS. Parenteral Administration of Aureomycin to Young Calves with a Note on Mode of Action. J Dairy Sci. 1954;37(5), doi: 10.3168/jds.S0022-0302(54)91289-8.
96. JUKES TH., WILLIAMS WL. Nutritional effects of antibiotics. Pharmacol Rev. 1953;5(4).
97. Castaneda M., Strong JM., Alabi DA., Hernandez CJ. The Gut Microbiome and Bone Strength. Curr Osteoporos Rep. 2020;677-83, doi: 10.1007/s11914-020-00627-x.
98. Podolsky SH. Metchnikoff and the microbiome. The Lancet. 2012, doi: 10.1016/S0140-6736(12)62018-2.
99. Lederberg J., McCray A. 'Ome Sweet 'Omics-- A Genealogical Treasury of Words | The Scientist Magazine®. The Scientist. 2001;15(3-4).
100. Lozupone CA., Stombaugh JL., Gordon JL., Jansson JK., Knight R. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. Nature. 2012;489(7415):220-30, doi: 10.1038/nature11550.
101. Wade W. Unculturable bacteria - The uncharacterized organisms that cause oral infections. Journal of the Royal Society of Medicine, vol. 95. 2002.

102. Smith M. <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Polymerase-Chain-Reaction>. accedido 20/10/2023.
103. Lane DJ., Pace B., Olsen GJ., Stahl DA., Sogin ML., Pace NR. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985;82(20), doi: 10.1073/pnas.82.20.6955.
104. Qin J., Li R., Raes J., Arumugam M., Burgdorf KS., Manichanh C., et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*. 2010;464(7285), doi: 10.1038/nature08821.
105. Wagner J., Coupland P., Browne HP., Lawley TD., Francis SC., Parkhill J. Evaluation of PacBio sequencing for full-length bacterial 16S rRNA gene classification. *BMC Microbiol*. 2016;16(1):274, doi: 10.1186/s12866-016-0891-4.
106. Chen YC., Greenbaum J., Shen H., Deng HW. Association between gut microbiota and bone health: Potential mechanisms and prospective. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2017;3635-46, doi: 10.1210/jc.2017-00513.
107. Chiarello M., McCauley M., Villéger S., Jackson CR. Ranking the biases: The choice of OTUs vs. ASVs in 16S rRNA amplicon data analysis has stronger effects on diversity measures than rarefaction and OTU identity threshold. *PLoS One*. 2022;17(2 February), doi: 10.1371/journal.pone.0264443.
108. Peterson J., Garges S., Giovanni M., McInnes P., Wang L., Schloss JA., et al. The NIH Human Microbiome Project. *Genome Res*. 2009;19(12):2317-23, doi: 10.1101/gr.096651.109.

109. A framework for human microbiome research. *Nature*. 2012;486(7402):215-21, doi: 10.1038/nature11209.
110. Costello EK., Lauber CL., Hamady M., Fierer N., Gordon JL., Knight R. Bacterial community variation in human body habitats across space and time. *Science* (1979). 2009;326(5960), doi: 10.1126/science.1177486.
111. Kim SA., Kim BR., Chun MY., Youn SW. Relation between pH in the trunk and face: Truncal pH can be easily predicted from facial pH. *Ann Dermatol*. 2016;28(2), doi: 10.5021/ad.2016.28.2.216.
112. Aggarwal N., Kitano S., Puah GRY., Kittelmann S., Hwang IY., Chang MW. Microbiome and Human Health: Current Understanding, Engineering, and Enabling Technologies. *Chem Rev*. 2023, doi: 10.1021/acs.chemrev.2c00431.
113. Berg G., Rybakova D., Fischer D., Cernava T., Vergès MCC., Charles T., et al. Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges. *Microbiome*. 2020, doi: 10.1186/s40168-020-00875-0.
114. Ursell LK., Metcalf JL., Parfrey LW., Knight R. Defining the human microbiome. *Nutr Rev*. 2012;70(SUPPL. 1), doi: 10.1111/j.1753-4887.2012.00493.x.
115. Marchesi J., Shanahan F. The normal intestinal microbiota. *Curr Opin Infect Dis*. 2007;20(5):508-13, doi: 10.1097/QCO.0b013e3282a56a99.
116. Nielsen HB., Almeida M., Juncker AS., Rasmussen S., Li J., Sunagawa S., et al. Identification and assembly of genomes and genetic elements in complex metagenomic samples without

- p>using reference genomes.
- Nat Biotechnol.*
- 2014;32(8):822-8, doi: 10.1038/nbt.2939.
117. Li J., Jia H., Cai X., Zhong H., Feng Q., Sunagawa S., et al. An integrated catalog of reference genes in the human gut microbiome. *Nat Biotechnol.* 2014;32(8), doi: 10.1038/nbt.2942.
118. Collado MC., Cernada M., Baüerl C., Vento M., Pérez-Martínez G. Microbial ecology and host-microbiota interactions during early life stages. *Gut Microbes.* 2012, doi: 10.4161/gmic.21215.
119. Kostic AD., Howitt MR., Garrett WS. Exploring host-microbiota interactions in animal models and humans. *Genes Dev.* 2013;27(7), doi: 10.1101/gad.212522.112.
120. Blekhman R., Goodrich JK., Huang K., Sun Q., Bukowski R., Bell JT., et al. Host genetic variation impacts microbiome composition across human body sites. *Genome Biol.* 2015;16(1), doi: 10.1186/s13059-015-0759-1.
121. Graf D., Di Cagno R., Fåk F., Flint HJ., Nyman M., Saarela M., et al. Contribution of diet to the composition of the human gut microbiota. *Microb Ecol Health Dis.* 2015;26(0), doi: 10.3402/mehd.v26.26164.
122. Cho I., Yamanishi S., Cox L., Methé BA., Zavadil J., Li K., et al. Antibiotics in early life alter the murine colonic microbiome and adiposity. *Nature.* 2012;488(7413), doi: 10.1038/nature11400.
123. Fiebigier U., Bereswill S., Heimesaat MM. Dissecting the interplay between intestinal microbiota and host immunity in health and disease: Lessons learned from germfree and gnotobiotic animal models. *Eur J Microbiol Immunol (Bp).* 2016;6(4):253-71, doi: 10.1556/1886.2016.00036.

124. Yatsunencko T., Rey FE., Manary MJ., Trehan I., Dominguez-Bello MG., Contreras M., et al. Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature*. 2012;486(7402):222-7, doi: 10.1038/nature11053.
125. Claesson MJ., Cusack S., O'Sullivan O., Greene-Diniz R., De Weerd H., Flannery E., et al. Composition, variability, and temporal stability of the intestinal microbiota of the elderly. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(SUPPL. 1), doi: 10.1073/pnas.1000097107.
126. Vaughn AC., Cooper EM., Diliberto PM., O'Loughlin LJ., Konkel ME., Peters JH., et al. Energy-dense diet triggers changes in gut microbiota, reorganization of gut-brain vagal communication and increases body fat accumulation. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. 2017;77(1), doi: 10.21307/ane-2017-033.
127. Rowland I., Gibson G., Heinken A., Scott K., Swann J., Thiele I., et al. Gut microbiota functions: metabolism of nutrients and other food components. *Eur J Nutr*. 2018, doi: 10.1007/s00394-017-1445-8.
128. Li Q., Lauber CL., Czarnecki-Maulden G., Pan Y., Hannah SS. Effects of the dietary protein and carbohydrate ratio on gut microbiomes in dogs of different body conditions. *mBio*. 2017;8(1), doi: 10.1128/mBio.01703-16.
129. Rodrigues FC., Castro ASB., Rodrigues VC., Fernandes SA., Fontes EAF., De Oliveira TT., et al. Yacon flour and bifidobacterium longum modulate bone health in rats. *J Med Food*. 2012;15(7), doi: 10.1089/jmf.2011.0296.
130. Palmer MF., Rolls BA. The absorption and secretion of calcium in the gastrointestinal tract of germ-free and conventional chicks.

- British Journal of Nutrition. 1981;46(3), doi: 10.1079/bjn19810064.
131. Yang LC., Wu J Bin., Lu TJ., Lin WC. The prebiotic effect of *Anoectochilus formosanus* and its consequences on bone health. British Journal of Nutrition. 2013;109(10), doi: 10.1017/S0007114512003777.
 132. Quigley EMM. Gut bacteria in health and disease. Gastroenterol Hepatol (N Y). 2013;9(9).
 133. Van Wijngaarden JP., Doets EL., Szczecińska A., Souverein OW., Duffy ME., Dullemeijer C., et al. Vitamin B12, folate, homocysteine, and bone health in adults and elderly people: A systematic review with meta-analyses. J Nutr Metab. 2013, doi: 10.1155/2013/486186.
 134. Villa JKD., Diaz MAN., Pizzuolo VR., Martino HSD. Effect of vitamin K in bone metabolism and vascular calcification: A review of mechanisms of action and evidences. Crit Rev Food Sci Nutr. 2017;57(18), doi: 10.1080/10408398.2016.1211616.
 135. Khosravi A., Mazmanian SK. Disruption of the gut microbiome as a risk factor for microbial infections. Curr Opin Microbiol. 2013, doi: 10.1016/j.mib.2013.03.009.
 136. Round JL., Mazmanian SK. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. Nat Rev Immunol. 2009;9(5):313-23, doi: 10.1038/nri2515.
 137. Tremaroli V., Bäckhed F. Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. Nature. 2012, doi: 10.1038/nature11552.

138. Turnbaugh PJ., Ley RE., Mahowald MA., Magrini V., Mardis ER., Gordon JI. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*. 2006;444(7122):1027-31, doi: 10.1038/nature05414.
139. Kennedy PJ., Cryan JF., Dinan TG., Clarke G. Kynurenine pathway metabolism and the microbiota-gut-brain axis. *Neuropharmacology*. 2017;112:399-412, doi: 10.1016/j.neuropharm.2016.07.002.
140. Blumberg R., Powrie F. Microbiota, disease, and back to health: A metastable journey. *Sci Transl Med*. 2012, doi: 10.1126/scitranslmed.3004184.
141. DeGruttola AK., Low D., Mizoguchi A., Mizoguchi E. Current Understanding of Dysbiosis in Disease in Human and Animal Models. *Inflamm Bowel Dis*. 2016;22(5):1137-50, doi: 10.1097/MIB.0000000000000750.
142. Tojo R., Suárez A., Clemente MG., De Los Reyes-Gavilán CG., Margolles A., Gueimonde M., et al. Intestinal microbiota in health and disease: Role of bifidobacteria in gut homeostasis. *World J Gastroenterol*. 2014, doi: 10.3748/wjg.v20.i41.15163.
143. Jones RM., Mülle JG., Pacifici R. Osteomicrobiology: The influence of gut microbiota on bone in health and disease. *Bone*. 2018;115:59-67, doi: 10.1016/j.bone.2017.04.009.
144. Britton RA., Irwin R., Quach D., Schaefer L., Zhang J., Lee T., et al. Probiotic *L. reuteri* Treatment Prevents Bone Loss in a Menopausal Ovariectomized Mouse Model. *J Cell Physiol*. 2014;229(11):1822-30, doi: 10.1002/jcp.24636.

145. Li JY., Chassaing B., Tyagi AM., Vaccaro C., Luo T., Adams J., et al. Sex steroid deficiency-associated bone loss is microbiota dependent and prevented by probiotics. *Journal of Clinical Investigation*. 2016;126(6):2049-63, doi: 10.1172/JCI86062.
146. Ohlsson C., Engdahl C., Fak F., Andersson A., Windahl SH., Farman HH., et al. Probiotics protect mice from ovariectomy-induced cortical bone loss. *PLoS One*. 2014;9(3), doi: 10.1371/journal.pone.0092368.
147. Maynard CL., Elson CO., Hatton RD., Weaver CT. Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system. *Nature*. 2012, doi: 10.1038/nature11551.
148. Kostic AD., Xavier RJ., Gevers D. The Microbiome in Inflammatory Bowel Disease: Current Status and the Future Ahead. *Gastroenterology*. 2014;146(6):1489-99, doi: 10.1053/j.gastro.2014.02.009.
149. Chassaing B., Aitken JD., Gewirtz AT., Vijay-Kumar M. Gut Microbiota Drives Metabolic Disease in Immunologically Altered Mice. 2012. p. 93-112.
150. Kane A V., Dinh DM., Ward HD. Childhood malnutrition and the intestinal microbiome. *Pediatr Res*. 2015;77(1-2):256-62, doi: 10.1038/pr.2014.179.
151. Wang Y., Kasper LH. The role of microbiome in central nervous system disorders. *Brain Behav Immun*. 2014;38:1-12, doi: 10.1016/j.bbi.2013.12.015.
152. Schwabe RF., Jobin C. The microbiome and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2013;13(11):800-12, doi: 10.1038/nrc3610.

153. Tang WHW., Hazen SL. The contributory role of gut microbiota in cardiovascular disease. *Journal of Clinical Investigation*. 2014;124(10):4204-11, doi: 10.1172/JCI72331.
154. Willing B., Halfvarson J., Dicksved J., Rosenquist M., Järnerot G., Engstrand L., et al. Twin studies reveal specific imbalances in the mucosa-associated microbiota of patients with ileal Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2009;15(5), doi: 10.1002/ibd.20783.
155. Sokol H., Pigneur B., Watterlot L., Lakhdari O., Bermúdez-Humarán LG., Gratadoux JJ., et al. *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(43), doi: 10.1073/pnas.0804812105.
156. Andoh A., Kuzuoka H., Tsujikawa T., Nakamura S., Hirai F., Suzuki Y., et al. Multicenter analysis of fecal microbiota profiles in Japanese patients with Crohn's disease. *J Gastroenterol*. 2012;47(12), doi: 10.1007/s00535-012-0605-0.
157. Salonen A., De Vos WM., Palva A. Gastrointestinal microbiota in irritable bowel syndrome: Present state and perspectives. *Microbiology (N Y)*. 2010, doi: 10.1099/mic.0.043257-0.
158. Bhattarai Y., Muniz Pedrego DA., Kashyap PC. Irritable bowel syndrome: A gut microbiota-related disorder? *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2016, doi: 10.1152/ajpgi.00338.2016.
159. Jones D., Glimcher LH., Aliprantis AO. Osteoimmunology at the nexus of arthritis, osteoporosis, cancer, and infection. *Journal of Clinical Investigation*. 2011;121(7):2534-42, doi: 10.1172/JCI46262.

160. Brzozowska MM., Sainsbury A., Eisman JA., Baldock PA., Center JR. Bariatric surgery, bone loss, obesity and possible mechanisms. *Obesity Reviews*. 2013;14(1):52-67, doi: 10.1111/j.1467-789X.2012.01050.x.
161. Schmidt S., Mellström D., Norjavaara E., Sundh V., Saalman R. Longitudinal Assessment of Bone Mineral Density in Children and Adolescents With Inflammatory Bowel Disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2012;55(5):511-8, doi: 10.1097/MPG.0b013e31825817a0.
162. Stotzer P-O., Johansson C., Mellström D., Lindstedt G., Kilander AF. Bone mineral density in patients with small intestinal bacterial overgrowth. *Hepatogastroenterology*. 2003;50(53):1415-8.
163. Di Stefano M., Veneto G., Malservisi S., Corazza GR. Small intestine bacterial overgrowth and metabolic bone disease. *Dig Dis Sci*. 2001;46(5), doi: 10.1023/A:1010722314493.
164. Charles JF., Ermann J., Aliprantis AO. The intestinal microbiome and skeletal fitness: Connecting bugs and bones. *Clinical Immunology*. 2014;159(2):163-9, doi: 10.1016/j.clim.2015.03.019.
165. Schwarzer M., Makki K., Storelli G., Machuca-Gayet I., Srutkova D., Hermanova P., et al. *Lactobacillus plantarum* strain maintains growth of infant mice during chronic undernutrition. *Science* (1979). 2016;351(6275):854-7, doi: 10.1126/science.aad8588.
166. Macpherson AJ., Harris NL. Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2004, doi: 10.1038/nri1373.

167. Sjögren K., Engdahl C., Henning P., Lerner UH., Tremaroli V., Lagerquist MK., et al. The gut microbiota regulates bone mass in mice. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2012;27(6):1357-67, doi: 10.1002/jbmr.1588.
168. Fransen F., Zagato E., Mazzini E., Fosso B., Manzari C., El Aidy S., et al. BALB/c and C57BL/6 Mice Differ in Polyreactive IgA Abundance, which Impacts the Generation of Antigen-Specific IgA and Microbiota Diversity. *Immunity*. 2015;43(3), doi: 10.1016/j.immuni.2015.08.011.
169. Yan J., Herzog JW., Tsang K., Brennan CA., Bower MA., Garrett WS., et al. Gut microbiota induce IGF-1 and promote bone formation and growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113(47), doi: 10.1073/pnas.1607235113.
170. Cox LM., Yamanishi S., Sohn J., Alekseyenko A V., Leung JM., Cho I., et al. Altering the intestinal microbiota during a critical developmental window has lasting metabolic consequences. *Cell*. 2014;158(4), doi: 10.1016/j.cell.2014.05.052.
171. Nobel YR., Cox LM., Kirigin FF., Bokulich NA., Yamanishi S., Teitler I., et al. Metabolic and metagenomic outcomes from early-life pulsed antibiotic treatment. *Nat Commun*. 2015;6, doi: 10.1038/ncomms8486.
172. Williams S., Wakisaka A., Zeng QQ., Barnes J., Martin G., Wechter WJ., et al. Minocycline prevents the decrease in bone mineral density and trabecular bone in ovariectomized aged rats. *Bone*. 1996;19(6), doi: 10.1016/S8756-3282(96)00302-X.
173. Balmer ML., Schürch CM., Saito Y., Geuking MB., Li H., Cuenca M., et al. Microbiota-Derived Compounds Drive Steady-State Granulopoiesis via MyD88/TICAM Signaling. *The Journal of*

- Immunology. 2014;193(10):5273-83, doi: 10.4049/jimmunol.1400762.
174. Khosravi A., Yáñez A., Price JG., Chow A., Merad M., Goodridge HS., et al. Gut Microbiota Promote Hematopoiesis to Control Bacterial Infection. *Cell Host Microbe*. 2014;15(3):374-81, doi: 10.1016/j.chom.2014.02.006.
175. Kong Y-Y., Feige U., Sarosi I., Bolon B., Tafuri A., Morony S., et al. Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand. *Nature*. 1999;402(6759):304-9, doi: 10.1038/46303.
176. Moschen AR., Kaser A., Enrich B., Ludwiczek O., Gabriel M., Obrist P., et al. The RANKL/OPG system is activated in inflammatory bowel diseases and relates to the state or bone loss. *Gut*. 2005;54(4):479-87, doi: 10.1136/gut.2004.044370.
177. Zaiss MM., Frey B., Hess A., Zwerina J., Luther J., Nimmerjahn F., et al. Regulatory T Cells Protect from Local and Systemic Bone Destruction in Arthritis. *The Journal of Immunology*. 2010;184(12):7238-46, doi: 10.4049/jimmunol.0903841.
178. Takayanagi H., Ogasawara K., Hida S., Chiba T., Murata S., Sato K., et al. T-cell-mediated regulation of osteoclastogenesis by signalling cross-talk between RANKL and IFN- γ . *Nature*. 2000;408(6812):600-5, doi: 10.1038/35046102.
179. Abu-Amer Y. IL-4 abrogates osteoclastogenesis through STAT6-dependent inhibition of NF- κ B. *Journal of Clinical Investigation*. 2001;107(11):1375-85, doi: 10.1172/JCI10530.

180. Guerrini MM., Takayanagi H. The immune system, bone and RANKL. Arch Biochem Biophys. 2014;561:118-23, doi: 10.1016/j.abb.2014.06.003.
181. Ivanov IL., Atarashi K., Manel N., Brodie EL., Shima T., Karaoz U., et al. Induction of Intestinal Th17 Cells by Segmented Filamentous Bacteria. Cell. 2009;139(3):485-98, doi: 10.1016/j.cell.2009.09.033.
182. Mazmanian SK., Kasper DL. The love-hate relationship between bacterial polysaccharides and the host immune system. Nat Rev Immunol. 2006, doi: 10.1038/nri1956.
183. Atarashi K., Tanoue T., Shima T., Imaoka A., Kuwahara T., Momose Y., et al. Induction of Colonic Regulatory T Cells by Indigenous *Clostridium* Species. Science (1979). 2011;331(6015):337-41, doi: 10.1126/science.1198469.
184. Lyons A., O'Mahony D., O'Brien F., MacSharry J., Sheil B., Ccedia M., et al. Bacterial strain-specific induction of Foxp3⁺ T regulatory cells is protective in murine allergy models. Clinical & Experimental Allergy. 2010, doi: 10.1111/j.1365-2222.2009.03437.x.
185. Ibáñez L., Abou-Ezzi G., Ciucci T., Amiot V., Belaïd N., Obino D., et al. Inflammatory Osteoclasts Prime TNF α -Producing CD4⁺ T Cells and Express CX3CR1. Journal of Bone and Mineral Research. 2016;31(10), doi: 10.1002/jbmr.2868.
186. Ciucci T., Ibáñez L., Boucoiran A., Birgy-Barelli E., Pène J., Abou-Ezzi G., et al. Bone marrow Th17 TNF α cells induce osteoclast differentiation, and link bone destruction to IBD. Gut. 2015;64(7), doi: 10.1136/gutjnl-2014-306947.

187. Ohlsson C., Sjögren K. Effects of the gut microbiota on bone mass. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 2015;69-74, doi: 10.1016/j.tem.2014.11.004.
188. Weaver CM., Martin BR., Nakatsu CH., Armstrong AP., Clavijo A., McCabe LD., et al. Galactooligosaccharides improve mineral absorption and bone properties in growing rats through gut fermentation. *J Agric Food Chem*. 2011;59(12), doi: 10.1021/jf2009777.
189. Younes H., Coudray C., Bellanger J., Demigné C., Rayssiguier Y., Rémésy C. Effects of two fermentable carbohydrates (inulin and resistant starch) and their combination on calcium and magnesium balance in rats. *British Journal of Nutrition*. 2001;86(4), doi: 10.1079/bjn2001430.
190. Raschka L., Daniel H. Diet composition and age determine the effects of inulin-type fructans on intestinal calcium absorption in rat. *Eur J Nutr*. 2005;44(6), doi: 10.1007/s00394-004-0535-6.
191. Abrams SA., Griffin IJ., Hawthorne KM., Liang L., Gunn SK., Darlington G., et al. A combination of prebiotic short- and long-chain inulin-type fructans enhances calcium absorption and bone mineralization in young adolescents. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2005;82(2), doi: 10.1093/ajcn.82.2.471.
192. Kiewiet MBG., Elderman ME., El Aidy S., Burgerhof JGM., Visser H., Vaughan EE., et al. Flexibility of Gut Microbiota in Ageing Individuals during Dietary Fiber Long-Chain Inulin Intake. *Mol Nutr Food Res*. 2021;65(4), doi: 10.1002/mnfr.202000390.
193. He W., Xie Z., Wittig NK., Zachariassen LF., Andersen A., Andersen HJ., et al. Yogurt Benefits Bone Mineralization in

- Ovariectomized Rats with Concomitant Modulation of the Gut Microbiome. *Mol Nutr Food Res.* 2022;66(20), doi: 10.1002/mnfr.202200174.
194. Whisner CM., Martin BR., Schoterman MHC., Nakatsu CH., McCabe LD., McCabe GP., et al. Galacto-oligosaccharides increase calcium absorption and gut bifidobacteria in young girls: A double-blind cross-over trial. *British Journal of Nutrition.* 2013;110(7), doi: 10.1017/S000711451300055X.
195. Brown AC., Valiere A. Probiotics and medical nutrition therapy. *Nutr Clin Care.* 2004.
196. Bron PA., Van Baarlen P., Kleerebezem M. Emerging molecular insights into the interaction between probiotics and the host intestinal mucosa. *Nat Rev Microbiol.* 2012, doi: 10.1038/nrmicro2690.
197. Scholz-Ahrens KE., Adolphi B., Rochat F., Barclay D V., de Vrese M., Açıllı Y., et al. Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on mineral metabolism in ovariectomized rats - impact of bacterial mass, intestinal absorptive area and reduction of bone turn-over. *NFS Journal.* 2016;3:41-50, doi: 10.1016/j.nfs.2016.03.001.
198. Yan F., Polk DB. Probiotics and immune health. *Curr Opin Gastroenterol.* 2011, doi: 10.1097/MOG.0b013e32834baa4d.
199. Anderson RC., Cookson AL., McNabb WC., Park Z., McCann MJ., Kelly WJ., et al. *Lactobacillus plantarum* MB452 enhances the function of the intestinal barrier by increasing the expression levels of genes involved in tight junction formation. *BMC Microbiol.* 2010;10, doi: 10.1186/1471-2180-10-316.

200. Seth A., Yan F., Polk DB., Rao RK. Probiotics ameliorate the hydrogen peroxide-induced epithelial barrier disruption by a PKC- And MAP kinase-dependent mechanism. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2008;294(4), doi: 10.1152/ajpgi.00202.2007.
201. Roy S., Dhaneshwar S. Role of prebiotics, probiotics, and synbiotics in management of inflammatory bowel disease: Current perspectives. *World J Gastroenterol.* 2023, doi: 10.3748/WJG.V29.I14.2078.
202. Mutuş R., Kocabağlı N., Alp M., Acar N., Eren M., Gezen ŞŞ. The effect of dietary probiotic supplementation on tibial bone characteristics and strength in broilers. *Poult Sci.* 2006;85(9), doi: 10.1093/ps/85.9.1621.
203. Mohanty DP., Mohapatra S., Misra S., Sahu PS. Milk derived bioactive peptides and their impact on human health – A review. *Saudi J Biol Sci.* 2016, doi: 10.1016/j.sjbs.2015.06.005.
204. Narva M., Collin M., Lamberg-Allardt C., Kärkkäinen M., Poussa T., Vapaatalo H., et al. Effects of long-term intervention with lactobacillus helveticus-fermented milk on bone mineral density and bone mineral content in growing rats. *Ann Nutr Metab.* 2004;48(4), doi: 10.1159/000080455.
205. McCabe LR., Irwin R., Schaefer L., Britton RA. Probiotic use decreases intestinal inflammation and increases bone density in healthy male but not female mice. *J Cell Physiol.* 2013;228(8):1793-8, doi: 10.1002/jcp.24340.
206. Collins FL., Irwin R., Bierhalter H., Schepper J., Britton RA., Parameswaran N., et al. Lactobacillus reuteri 6475 increases bone density in intact females only under an inflammatory

- p setting. PLoS One. 2016;11(4), doi: 10.1371/journal.pone.0153180.
207. Chiang SS., Pan TM. Antiosteoporotic effects of lactobacillus-fermented soy skim milk on bone mineral density and the microstructure of femoral bone in ovariectomized mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 59. 2011.
 208. McDole JR., Wheeler LW., McDonald KG., Wang B., Konjufca V., Knoop KA., et al. Goblet cells deliver luminal antigen to CD103 + dendritic cells in the small intestine. *Nature*. 2012;483(7389), doi: 10.1038/nature10863.
 209. Ardita CS., Mercante JW., Kwon YM., Luo L., Crawford ME., Powell DN., et al. Epithelial adhesion mediated by pilin SpaC is required for *Lactobacillus rhamnosus* GG-induced cellular responses. *Appl Environ Microbiol*. 2014;80(16), doi: 10.1128/AEM.01039-14.
 210. Asarat M., Apostolopoulos V., Vasiljevic T., Donkor O. Short-chain fatty acids produced by synbiotic mixtures in skim milk differentially regulate proliferation and cytokine production in peripheral blood mononuclear cells. *Int J Food Sci Nutr*. 2015;66(7), doi: 10.3109/09637486.2015.1088935.
 211. Fasano A. Leaky Gut and Autoimmune Diseases. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2012;42(1):71-8, doi: 10.1007/s12016-011-8291-x.
 212. Yu QH., Yang Q. Diversity of tight junctions (TJs) between gastrointestinal epithelial cells and their function in maintaining the mucosal barrier. *Cell Biol Int*. 2009;33(1), doi: 10.1016/j.cellbi.2008.09.007.

213. Wang Y., Zhang J., Yi XJ., Yu FSX. Activation of ERK1/2 MAP kinase pathway induces tight junction disruption in human corneal epithelial cells. *Exp Eye Res.* 2004;78(1), doi: 10.1016/j.exer.2003.09.002.
214. Filardo EJ., Quinn JA., Bland KI., Frackelton J. Estrogen-induced activation of Erk-1 and Erk-2 requires the G protein-coupled receptor homolog, GPR30, and occurs via trans-activation of the epidermal growth factor receptor through release of HB-EGF. *Molecular Endocrinology.* 2000;14(10), doi: 10.1210/mend.14.10.0532.
215. Qin B., Dong L., Guo X., Jiang J., He Y., Wang X., et al. Expression of G protein-coupled estrogen receptor in irritable bowel syndrome and its clinical significance. *Int J Clin Exp Pathol.* 2014;7(5).
216. Armstrong CM., Billimek AR., Allred KF., Sturino JM., Weeks BR., Allred CD. A novel shift in estrogen receptor expression occurs as estradiol suppresses inflammation-associated colon tumor formation. *Endocr Relat Cancer.* 2013;20(4), doi: 10.1530/ERC-12-0308.
217. Ulluwishewa D., Anderson RC., McNabb WC., Moughan PJ., Wells JM., Roy NC. Regulation of tight junction permeability by intestinal bacteria and dietary components. *Journal of Nutrition.* 2011, doi: 10.3945/jn.110.135657.
218. Zeissig S., Bürgel N., Günzel D., Richter J., Mankertz J., Wahnschaffe U., et al. Changes in expression and distribution of claudin 2, 5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn's disease. *Gut.* 2007;56(1), doi: 10.1136/gut.2006.094375.

219. Guo Y., Zhou G., He C., Yang W., He Z., Liu Z. Serum Levels of Lipopolysaccharide and 1,3- β -D-Glucan Refer to the Severity in Patients with Crohn's Disease. *Mediators Inflamm.* 2015;2015, doi: 10.1155/2015/843089.
220. Cani PD., Amar J., Iglesias MA., Poggi M., Knauf C., Bastelica D., et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes.* 2007;56(7), doi: 10.2337/db06-1491.
221. Hou GQ., Guo C., Song GH., Fang N., Fan WJ., Chen XD., et al. Lipopolysaccharide (LPS) promotes osteoclast differentiation and activation by enhancing the MAPK pathway and COX-2 expression in RAW264.7 cells. *Int J Mol Med.* 2013;32(2), doi: 10.3892/ijmm.2013.1406.
222. Pacifici R. Bone remodeling and the microbiome. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2018;8(4), doi: 10.1101/cshperspect.a031203.
223. Bora SA., Kennett MJ., Smith PB., Patterson AD., Cantorna MT. The Gut Microbiota Regulates Endocrine Vitamin D Metabolism through Fibroblast Growth Factor 23. *Front Immunol.* 2018;9, doi: 10.3389/fimmu.2018.00408.
224. Aggeletopoulou I., Tsounis EP., Mouzaki A., Triantos C. Exploring the Role of Vitamin D and the Vitamin D Receptor in the Composition of the Gut Microbiota. *Frontiers in Bioscience-Landmark.* 2023;28(6), doi: 10.31083/j.fbl2806116.
225. Ooi JH., Li Y., Rogers CJ., Cantorna MT. Vitamin D Regulates the Gut Microbiome and Protects Mice from Dextran Sodium Sulfate–Induced Colitis. *J Nutr.* 2013;143(10):1679-86, doi: 10.3945/jn.113.180794.

226. Boccuzzi L., Infante M., Ricordi C. The potential therapeutic role of vitamin D in inflammatory bowel disease. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2023;27(10), doi: 10.26355/eurev_202305_32479.
227. Sharon G., Garg N., Debelius J., Knight R., Dorrestein PC., Mazmanian SK. Specialized Metabolites from the Microbiome in Health and Disease. *Cell Metab.* 2014;20(5):719-30, doi: 10.1016/j.cmet.2014.10.016.
228. Katono T., Kawato T., Tanabe N., Suzuki N., Iida T., Morozumi A., et al. Sodium butyrate stimulates mineralized nodule formation and osteoprotegerin expression by human osteoblasts. *Arch Oral Biol.* 2008;53(10), doi: 10.1016/j.archoralbio.2008.02.016.
229. Lee HW., Suh JH., Kim AY., Lee YS., Park SY., Kim JB. Histone deacetylase 1-mediated histone modification regulates osteoblast differentiation. *Molecular Endocrinology.* 2006;20(10), doi: 10.1210/me.2006-0061.
230. Morozumi A. High concentration of sodium butyrate suppresses osteoblastic differentiation and mineralized nodule formation in ROS17/2.8 cells. *J Oral Sci.* 2011;53(4):509-16, doi: 10.2334/josnurd.53.509.
231. Iwami K., Moriyama T. Effects of short chain fatty acid, sodium butyrate, on osteoblastic cells and osteoclastic cells. *International Journal of Biochemistry.* 1993;25(11):1631-5, doi: 10.1016/0020-711X(93)90522-G.
232. Tyagi AM., Yu M., Darby TM., Vaccaro C., Li JY., Owens JA., et al. The Microbial Metabolite Butyrate Stimulates Bone Formation via T Regulatory Cell-Mediated Regulation of

- WNT10B Expression. *Immunity*. 2018;49(6):1116-1131.e7, doi: 10.1016/j.immuni.2018.10.013.
233. Scheid JL., Toombs RJ., Ducher G., Gibbs JC., Williams NI., De Souza MJ. Estrogen and peptide YY are associated with bone mineral density in premenopausal exercising women. *Bone*. 2011;49(2), doi: 10.1016/j.bone.2011.04.011.
234. Luo G., Liu H., Lu H. Glucagon-like peptide-1(GLP-1) receptor agonists: Potential to reduce fracture risk in diabetic patients? *Br J Clin Pharmacol*. 2016, doi: 10.1111/bcp.12777.
235. Wang J., Wang Y., Gao W., Wang B., Zhao H., Zeng Y., et al. Diversity analysis of gut microbiota in osteoporosis and osteopenia patients. *PeerJ*. 2017;2017(6), doi: 10.7717/peerj.3450.
236. Wei M., Li C., Dai Y., Zhou H., Cui Y., Zeng Y., et al. High-Throughput Absolute Quantification Sequencing Revealed Osteoporosis-Related Gut Microbiota Alterations in Han Chinese Elderly. *Front Cell Infect Microbiol*. 2021;11, doi: 10.3389/fcimb.2021.630372.
237. Xu Z., Xie Z., Sun J., Huang S., Chen Y., Li C., et al. Gut Microbiome Reveals Specific Dysbiosis in Primary Osteoporosis. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020;10, doi: 10.3389/fcimb.2020.00160.
238. Ling CW., Miao Z., Xiao ML., Zhou H., Jiang Z., Fu Y., et al. The Association of Gut Microbiota with Osteoporosis Is Mediated by Amino Acid Metabolism: Multiomics in a Large Cohort. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2021;106(10), doi: 10.1210/clinem/dgab492.

239. Wang Y., Gao X., Lv J., Zeng Y., Li Q., Wang L., et al. Gut Microbiome Signature Are Correlated With Bone Mineral Density Alterations in the Chinese Elders. *Front Cell Infect Microbiol.* 2022;12, doi: 10.3389/fcimb.2022.827575.
240. He J., Xu S., Zhang B., Xiao C., Chen Z., Si F., et al. Gut microbiota and metabolite alterations associated with reduced bone mineral density or bone metabolic indexes in postmenopausal osteoporosis. *Aging.* 2020;12(9), doi: 10.18632/aging.103168.
241. Akinsuyi OS., Roesch LFW. Meta-Analysis Reveals Compositional and Functional Microbial Changes Associated with Osteoporosis. *Microbiol Spectr.* 2023;11(3), doi: 10.1128/spectrum.00322-23.
242. von Elm E., Altman DG., Egger M., Pocock SJ., Gøtzsche PC., Vandenbroucke JP. The strengthening the reporting of observational studies in epidemiology (STROBE) statement: Guidelines for reporting observational studies. *International Journal of Surgery.* 2014;12(12), doi: 10.1016/j.ijsu.2014.07.013.
243. Dean AG SKSM. OpenEpi: Open Source Epidemiologic Statistics for Public Health, Versión. www.OpenEpi.com. accedido 11/11/2018. [accedido 1 octubre 2023]. Disponible en: www.OpenEpi.com.
244. Schröder H., Fitó M., Estruch R., Martínez-González MA., Corella D., Salas-Salvadó J., et al. A Short screener is valid for assessing mediterranean diet adherence among older spanish men and women. *Journal of Nutrition.* 2011;141(6), doi: 10.3945/jn.110.135566.

245. Tárraga Marcos A., Panisello Royo JM., Carbayo Herencia JA., López Gil JF., García Cantó E., Tárraga López PJ., et al. Valoración de la adherencia a la dieta mediterránea en estudiantes universitarios de Ciencias de la Salud y su relación con el nivel de actividad física. *Nutr Hosp.* 2021;38(4).
246. Charlson ME., Pompei P., Ales KL., MacKenzie CR. A new method of classifying prognostic comorbidity in longitudinal studies: Development and validation. *J Chronic Dis.* 1987;40(5), doi: 10.1016/0021-9681(87)90171-8.
247. MAHONEY FI., BARTHEL DW. FUNCTIONAL EVALUATION: THE BARTHEL INDEX. *Md State Med J.* 1965;14.
248. Reisberg B., Ferris SH., De Leon MJ., Crook T. The global deterioration scale for assessment of primary degenerative dementia. *American Journal of Psychiatry.* 1982;139(9), doi: 10.1176/ajp.139.9.1136.
249. Lawton MP., Brody EM. Assessment of older people: Self-maintaining and instrumental activities of daily living. *Gerontologist.* 1969;9(3), doi: 10.1093/geront/9.3_Part_1.179.
250. Coque González TM., López Cerero L., Moreno Romo MA., Torres Manrique C. Técnicas microbiológicas de detección de microorganismos multirresistentes en animales, alimentos y muestras ambientales. 2016.
251. Bäuerl C., Collado MC., Zúñiga M., Blas E., Martínez GP. Changes in cecal microbiota and mucosal gene expression revealed new aspects of epizootic rabbit enteropathy. *PLoS One.* 2014;9(8), doi: 10.1371/journal.pone.0105707.

252. Mira-Pascual L., Cabrera-Rubio R., Ocon S., Costales P., Parra A., Suarez A., et al. Microbial mucosal colonic shifts associated with the development of colorectal cancer reveal the presence of different bacterial and archaeal biomarkers. *J Gastroenterol.* 2015;50(2), doi: 10.1007/s00535-014-0963-x.
253. Klindworth A., Pruesse E., Schweer T., Peplies J., Quast C., Horn M., et al. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res.* 2013;41(1), doi: 10.1093/nar/gks808.
254. Chen S., Zhou Y., Chen Y., Gu J. Fastp: An ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics*, vol. 34. 2018.
255. Callahan BJ., McMurdie PJ., Rosen MJ., Han AW., Johnson AJA., Holmes SP. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat Methods.* 2016;13(7), doi: 10.1038/nmeth.3869.
256. Kuczynski J., Stombaugh J., Walters WA., González A., Caporaso JG., Knight R. Using QIIME to analyze 16s rRNA gene sequences from microbial communities. *Curr Protoc Microbiol.* 2012;(SUPPL.27), doi: 10.1002/9780471729259.mc01e05s27.
257. Quast C., Pruesse E., Yilmaz P., Gerken J., Schweer T., Yarza P., et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* 2013;41(D1), doi: 10.1093/nar/gks1219.
258. R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria. <http://www.R-project.org/>.

259. Bolyen E., Rideout JR., Dillon MR., Bokulich NA., Abnet CC., Al-Ghalith GA., et al. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nat Biotechnol.* 2019;37(8):852-7, doi: 10.1038/s41587-019-0209-9.
260. Chong J., Liu P., Zhou G., Xia J. Using MicrobiomeAnalyst for comprehensive statistical, functional, and meta-analysis of microbiome data. *Nat Protoc.* 2020;15(3), doi: 10.1038/s41596-019-0264-1.
261. Dhariwal A., Chong J., Habib S., King IL., Agellon LB., Xia J. MicrobiomeAnalyst: A web-based tool for comprehensive statistical, visual and meta-analysis of microbiome data. *Nucleic Acids Res.* 2017;45(W1), doi: 10.1093/nar/gkx295.
262. McMurdie PJ., Holmes S. Waste Not, Want Not: Why Rarefying Microbiome Data Is Inadmissible. *PLoS Comput Biol.* 2014;10(4), doi: 10.1371/journal.pcbi.1003531.
263. Weiss S., Xu ZZ., Peddada S., Amir A., Bittinger K., Gonzalez A., et al. Normalization and microbial differential abundance strategies depend upon data characteristics. *Microbiome.* 2017;5(1), doi: 10.1186/s40168-017-0237-y.
264. McKnight DT., Huerlimann R., Bower DS., Schwarzkopf L., Alford RA., Zenger KR. Methods for normalizing microbiome data: An ecological perspective. *Methods Ecol Evol.* 2019;10(3), doi: 10.1111/2041-210X.13115.
265. Birkner T. MetadeconfoundR Release for Documentation of the MetaDrugs Analysis as Part of the MetaCardis Consortium. accedido 29/9/2023. [accedido 29 septiembre 2023]. Disponible en: <https://github.com/TillBirkner/metadeconfoundR>.

266. Foster ZSL., Sharpton TJ., Grünwald NJ. Metacoder: An R package for visualization and manipulation of community taxonomic diversity data. *PLoS Comput Biol.* 2017;13(2), doi: 10.1371/journal.pcbi.1005404.
267. Segata N., Izard J., Waldron L., Gevers D., Miropolsky L., Garrett WS., et al. Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biol.* 2011;12(6), doi: 10.1186/gb-2011-12-6-r60.
268. Sozen T., Ozisik L., Calik Basaran N. An overview and management of osteoporosis. *Eur J Rheumatol.* 2017;4(1), doi: 10.5152/eurjrheum.2016.048.
269. Tran T., Bliuc D., Pham HM., van Geel T., Adachi JD., Berger C., et al. A Risk Assessment Tool for Predicting Fragility Fractures and Mortality in the Elderly. *Journal of Bone and Mineral Research.* 2020;35(10), doi: 10.1002/jbmr.4100.
270. Clowes JA., Riggs BL., Khosla S. The role of the immune system in the pathophysiology of osteoporosis. *Immunol Rev.* 2005, doi: 10.1111/j.0105-2896.2005.00334.x.
271. Zhang YW., Li YJ., Lu PP., Dai GC., Chen XX., Rui YF. The modulatory effect and implication of gut microbiota on osteoporosis: From the perspective of «brain-gut-bone» axis. *Food Funct.* 2021, doi: 10.1039/d0fo03468a.
272. He Y., Chen Y. The potential mechanism of the microbiota-gut-bone axis in osteoporosis: a review. *Osteoporosis International.* 2022, doi: 10.1007/s00198-022-06557-x.
273. Li C., Huang Q., Yang R., Dai Y., Zeng Y., Tao L., et al. Gut microbiota composition and bone mineral loss—epidemiologic

- evidence from individuals in Wuhan, China. *Osteoporosis International*. 2019;30(5), doi: 10.1007/s00198-019-04855-5.
274. Orwoll ES., Parimi N., Wiedrick J., Lapidus J., Napoli N., Wilkinson JE., et al. Analysis of the Associations Between the Human Fecal Microbiome and Bone Density, Structure, and Strength: The Osteoporotic Fractures in Men (MrOS) Cohort. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2022;37(4), doi: 10.1002/jbmr.4518.
275. Das M., Cronin O., Keohane DM., Cormac EM., Nugent H., Nugent M., et al. Gut microbiota alterations associated with reduced bone mineral density in older adults. *Rheumatology (United Kingdom)*. 2019;58(12), doi: 10.1093/rheumatology/kez302.
276. Rettedal EA., Ilesanmi-Oyelere BL., Roy NC., Coad J., Kruger MC. The Gut Microbiome Is Altered in Postmenopausal Women With Osteoporosis and Osteopenia. *JBMR Plus*. 2021;5(3), doi: 10.1002/jbm4.10452.
277. Wang Z., Chen K., Wu C., Chen J., Pan H., Liu Y., et al. An emerging role of *Prevotella histicola* on estrogen deficiency-induced bone loss through the gut microbiota-bone axis in postmenopausal women and in ovariectomized mice. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2021;114(4), doi: 10.1093/ajcn/nqab194.
278. Ul-Haq A., Seo H., Jo S., Park H., Kim S., Lee Y., et al. Characterization of Fecal Microbiomes of Osteoporotic Patients in Korea. *Pol J Microbiol*. 2022;71(4), doi: 10.33073/pjm-2022-045.

279. Morris EK., Caruso T., Buscot F., Fischer M., Hancock C., Maier TS., et al. Choosing and using diversity indices: Insights for ecological applications from the German Biodiversity Exploratories. *Ecol Evol.* 2014;4(18), doi: 10.1002/ece3.1155.
280. Bello MGD., Knight R., Gilbert JA., Blaser MJ. Preserving microbial diversity. *Science* (1979). 2018;362(6410), doi: 10.1126/science.aau8816.
281. Hooks KB., O'Malley MA. Dysbiosis and its discontents. *mBio.* 2017;8(5), doi: 10.1128/mBio.01492-17.
282. Tamboli CP. Dysbiosis in inflammatory bowel disease. *Gut.* 2004;53(1):1-4, doi: 10.1136/gut.53.1.1.
283. Manor O., Dai CL., Kornilov SA., Smith B., Price ND., Lovejoy JC., et al. Health and disease markers correlate with gut microbiome composition across thousands of people. *Nat Commun.* 2020;11(1), doi: 10.1038/s41467-020-18871-1.
284. Lloyd-Price J., Arze C., Ananthakrishnan AN., Schirmer M., Avila-Pacheco J., Poon TW., et al. Multi-omics of the gut microbial ecosystem in inflammatory bowel diseases. *Nature.* 2019;569(7758), doi: 10.1038/s41586-019-1237-9.
285. Leblhuber F., Ehrlich D., Steiner K., Geisler S., Fuchs D., Lanser L., et al. The Immunopathogenesis of Alzheimer's Disease Is Related to the Composition of Gut Microbiota. *Nutrients.* 2021;13(2):1-34, doi: 10.3390/NU13020361.
286. Jiang W., Wu N., Wang X., Chi Y., Zhang Y., Qiu X., et al. Dysbiosis gut microbiota associated with inflammation and impaired mucosal immune function in intestine of humans with

- non-alcoholic fatty liver disease. *Scientific Reports* 2015 5:1. 2015;5(1):1-7, doi: 10.1038/srep08096.
287. Gibiino G., Lopetuso LR., Scaldaferri F., Rizzatti G., Binda C., Gasbarrini A. Exploring Bacteroidetes: Metabolic key points and immunological tricks of our gut commensals. *Digestive and Liver Disease*. 2018, doi: 10.1016/j.dld.2018.03.016.
288. Seong CN., Kang JW., Lee JH., Seo SY., Woo JJ., Park C., et al. Taxonomic hierarchy of the phylum Firmicutes and novel Firmicutes species originated from various environments in Korea. *Journal of Microbiology*. 2018, doi: 10.1007/s12275-018-7318-x.
289. Rinninella E., Raoul P., Cintoni M., Franceschi F., Miggiano GAD., Gasbarrini A., et al. What is the healthy gut microbiota composition? A changing ecosystem across age, environment, diet, and diseases. *Microorganisms*. 2019;7(1), doi: 10.3390/microorganisms7010014.
290. Huttenhower C., Gevers D., Knight R., Abubucker S., Badger JH., Chinwalla AT., et al. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*. 2012;486(7402), doi: 10.1038/nature11234.
291. Morgan XC., Tickle TL., Sokol H., Gevers D., Devaney KL., Ward D V., et al. Dysfunction of the intestinal microbiome in inflammatory bowel disease and treatment. *Genome Biol*. 2012;13(9), doi: 10.1186/gb-2012-13-9-r79.
292. Stojanov S., Berlec A., Štrukelj B. The influence of probiotics on the firmicutes/bacteroidetes ratio in the treatment of obesity and inflammatory bowel disease. *Microorganisms*. 2020, doi: 10.3390/microorganisms8111715.

293. Guigoz Y., Doré J., Schiffrin EJ. The inflammatory status of old age can be nurtured from the intestinal environment. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2008, doi: 10.1097/MCO.0b013e3282f2bdfd.
294. Gosalbes MJ., Durbán A., Pignatelli M., Abellan JJ., Jiménez-Hernández N., Pérez-Cobas AE., et al. Metatranscriptomic approach to analyze the functional human gut microbiota. *PLoS One.* 2011;6(3), doi: 10.1371/journal.pone.0017447.
295. Ni JJ., Yang XL., Zhang H., Xu Q., Wei XT., Feng GJ., et al. Assessing causal relationship from gut microbiota to heel bone mineral density. *Bone.* 2021;143, doi: 10.1016/j.bone.2020.115652.
296. Louis P., Flint HJ. Formation of propionate and butyrate by the human colonic microbiota. *Environ Microbiol.* 2017, doi: 10.1111/1462-2920.13589.
297. Tyagi AM., Yu M., Darby TM., Vaccaro C., Li JY., Owens JA., et al. The Microbial Metabolite Butyrate Stimulates Bone Formation via T Regulatory Cell-Mediated Regulation of WNT10B Expression. *Immunity.* 2018;49(6), doi: 10.1016/j.immuni.2018.10.013.
298. Smith PM., Howitt MR., Panikov N., Michaud M., Gallini CA., Bohlooly-Y M., et al. The Microbial Metabolites, Short-Chain Fatty Acids, Regulate Colonic T_{reg} Cell Homeostasis. *Science (1979).* 2013;341(6145):569-73, doi: 10.1126/science.1241165.
299. De Vos P., Thompson F., Thompson C., Swings J. A Flavor of Prokaryotic Taxonomy: Systematics Revisited. *Microbial Resources: From Functional Existence in Nature to*

- Applications. 2017;29-44, doi: 10.1016/B978-0-12-804765-1.00002-3.
300. Parks DH., Chuvochina M., Waite DW., Rinke C., Skarszewski A., Chaumeil PA., et al. A standardized bacterial taxonomy based on genome phylogeny substantially revises the tree of life. *Nat Biotechnol.* 2018;36(10), doi: 10.1038/nbt.4229.
301. Rosenberg E., De Long EF., Lory S., Stackebrandt E., Thompson F. The prokaryotes: Other major lineages of bacteria and the archaea. 2014.
302. Turnbaugh PJ., Ley RE., Hamady M., Fraser-Liggett CM., Knight R., Gordon JI. The Human Microbiome Project. s. f., doi: 10.1038/nature06244.
303. Gill SR., Pop M., DeBoy RT., Eckburg PB., Turnbaugh PJ., Samuel BS., et al. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science* (1979). 2006;312(5778), doi: 10.1126/science.1124234.
304. Wilkins LJ., Monga M., Miller AW. Defining Dysbiosis for a Cluster of Chronic Diseases. *Sci Rep.* 2019;9(1):12918, doi: 10.1038/s41598-019-49452-y.
305. Ozaki D., Kubota R., Maeno T., Abdelhakim M., Hitosugi N. Association between gut microbiota, bone metabolism, and fracture risk in postmenopausal Japanese women. *Osteoporosis International.* 2021;32(1), doi: 10.1007/s00198-020-05728-y.
306. Tett A., Pasolli E., Masetti G., Ercolini D., Segata N. Prevotella diversity, niches and interactions with the human host. *Nat Rev Microbiol.* 2021, doi: 10.1038/s41579-021-00559-y.

307. Larsen JM. The immune response to *Prevotella* bacteria in chronic inflammatory disease. *Immunology*. 2017, doi: 10.1111/imm.12760.
308. Lucas S., Omata Y., Hofmann J., Böttcher M., Iljazovic A., Sarter K., et al. Short-chain fatty acids regulate systemic bone mass and protect from pathological bone loss. *Nat Commun*. 2018;9(1), doi: 10.1038/s41467-017-02490-4.
309. Ma S., Qin J., Hao Y., Shi Y., Fu L. Structural and functional changes of gut microbiota in ovariectomized rats and their correlations with altered bone mass. *Aging*. 2020;12(11), doi: 10.18632/aging.103290.
310. Maukonen J., Saarela M. Human gut microbiota: does diet matter? 2014, doi: 10.1017/S0029665114000688.
311. Huang D., Wang J., Zeng Y., Li Q., Wang Y. Identifying microbial signatures for patients with postmenopausal osteoporosis using gut microbiota analyses and feature selection approaches. *Front Microbiol*. 2023;14, doi: 10.3389/fmicb.2023.1113174.
312. Morrison DJ., Preston T. Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism. *Gut Microbes*. 2016, doi: 10.1080/19490976.2015.1134082.
313. Shimizu J., Kubota T., Takada E., Takai K., Fujiwara N., Arimitsu N., et al. Propionate-producing bacteria in the intestine may associate with skewed responses of IL10-producing regulatory T cells in patients with relapsing polychondritis. *PLoS One*. 2018;13(9), doi: 10.1371/journal.pone.0203657.
314. Fu X., Liu Z., Zhu C., Mou H., Kong Q. Nondigestible carbohydrates, butyrate, and butyrate-producing bacteria. *Crit*

- Rev Food Sci Nutr. 2019, doi: 10.1080/10408398.2018.1542587.
315. Duncan SH., Hold GL., Harmsen HJM., Stewart CS., Flint HJ. Growth requirements and fermentation products of *Fusobacterium prausnitzii*, and a proposal to reclassify it as *Faecalibacterium prausnitzii* gen. nov., comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2002;52(6), doi: 10.1099/00207713-52-6-2141.
 316. De Filippis F., Pasolli E., Ercolini D. Newly Explored *Faecalibacterium* Diversity Is Connected to Age, Lifestyle, Geography, and Disease. *Current Biology.* 2020;30(24), doi: 10.1016/j.cub.2020.09.063.
 317. Tap J., Mondot S., Levenez F., Pelletier E., Caron C., Furet JP., et al. Towards the human intestinal microbiota phylogenetic core. *Environ Microbiol.* 2009;11(10), doi: 10.1111/j.1462-2920.2009.01982.x.
 318. Tudela H., Claus SP., Saleh M. Next Generation Microbiome Research: Identification of Keystone Species in the Metabolic Regulation of Host-Gut Microbiota Interplay. *Front Cell Dev Biol.* 2021, doi: 10.3389/fcell.2021.719072.
 319. Sokol H., Seksik P., Furet JP., Firmesse O., Nion-Larmurier I., Beaugerie L., et al. Low counts of *faecalibacterium prausnitzii* in colitis microbiota. *Inflamm Bowel Dis.* 2009;15(8), doi: 10.1002/ibd.20903.
 320. Martín R., Rios-Covian D., Huillet E., Auger S., Khazaal S., Bermúdez-Humarán LG., et al. *Faecalibacterium*: a bacterial genus with promising human health applications. *FEMS Microbiol Rev.* 2023;47:1-18, doi: 10.1093/femsre/fuad039.

321. La Reau AJ., Meier-Kolthoff JP., Suen G. Sequence-based analysis of the genus *Ruminococcus* resolves its phylogeny and reveals strong host association. *Microb Genom.* 2016;2(12):e000099, doi: 10.1099/MGEN.0.000099.
322. Wegmann U., Louis P., Goesmann A., Henrissat B., Duncan SH., Flint HJ. Complete genome of a new Firmicutes species belonging to the dominant human colonic microbiota ('*Ruminococcus bicirculans*') reveals two chromosomes and a selective capacity to utilize plant glucans. *Environ Microbiol.* 2014;16(9):2879-90, doi: 10.1111/1462-2920.12217.
323. Nagao-Kitamoto H., Kamada N. Host-microbial Cross-talk in Inflammatory Bowel Disease. *Immune Netw.* 2017;17(1):1, doi: 10.4110/IN.2017.17.1.1.
324. Molino S., Lerma-Aguilera A., Jiménez-Hernández N., Rufián Henares JÁ., Francino MP. Evaluation of the Effects of a Short Supplementation With Tannins on the Gut Microbiota of Healthy Subjects. *Front Microbiol.* 2022;13, doi: 10.3389/FMICB.2022.848611/FULL.
325. Zhao X-N., Liu S-X., Wang Z-Z., Zhang S., You L-L. RESEARCH Open Access Roxadustat alleviates the inflammatory status in patients receiving maintenance hemodialysis with erythropoiesis-stimulating agent resistance by increasing the short-chain fatty acids producing gut bacteria. *Eur J Med Res.* 2023;28:230, doi: 10.1186/s40001-023-01179-3.
326. Li L., Li A., Zhu L., Gan L., Zuo L. Roxadustat promotes osteoblast differentiation and prevents estrogen deficiency-induced bone loss by stabilizing HIF-1 α and activating the

- Wnt/ β -catenin signaling pathway. J Orthop Surg Res. 2022;17(1), doi: 10.1186/s13018-022-03162-w.
327. Sakamoto M. The family porphyromonadaceae. The Prokaryotes: Other Major Lineages of Bacteria and The Archaea, vol. 9783642389542. 2014.
328. Bajaj JS., Ridlon JM., Hylemon PB., Thacker LR., Heuman DM., Smith S., et al. Linkage of gut microbiome with cognition in hepatic encephalopathy. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2012;302(1), doi: 10.1152/ajpgi.00190.2011.
329. Marques TM., Holster S., Wall R., König J., Brummer RJ., de Vos WM. Correlating the Gut Microbiome to Health and Disease. The Gut-Brain Axis Dietary, Probiotic, and Prebiotic Interventions on the Microbiota. 2016.
330. Summanen P., Finegold SM. *Porphyromonas*. Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. Wiley; 2015. p. 1-14.
331. Ko CY., Hu AK., Chou D., Huang LM., Su HZ., Yan FR., et al. Analysis of oral microbiota in patients with obstructive sleep apnea-associated hypertension. Hypertension Research 2019 42:11. 2019;42(11):1692-700, doi: 10.1038/s41440-019-0260-4.
332. Kobayashi R., Kobayashi T., Sakai F., Hosoya T., Yamamoto M., Kurita-Ochiai T. Oral administration of Lactobacillus gasseri SBT2055 is effective in preventing Porphyromonas gingivalis-accelerated periodontal disease. Sci Rep. 2017;7(1), doi: 10.1038/S41598-017-00623-9.
333. Hajishengallis G. Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. s. f., doi: 10.1038/nri3785.

334. Singhrao SK., Harding A., Poole S., Kesavalu L., Crean SJ. Porphyromonas gingivalis periodontal infection and its putative links with Alzheimer's disease. *Mediators Inflamm.* 2015;2015, doi: 10.1155/2015/137357.
335. Palacios-González B., Ramírez-Salazar EG., Rivera-Paredes B., Quiterio M., Flores YN., Macias-Kauffer L., et al. A multi-omic analysis for low bone mineral density in postmenopausal women suggests a relationship between diet, metabolites, and microbiota. *Microorganisms.* 2020;8(11), doi: 10.3390/microorganisms8111630.
336. Slots J., Sugar C., Kamma JJ. Cytomegalovirus periodontal presence is associated with subgingival Dialister pneumosintes and alveolar bone loss. *Oral Microbiol Immunol.* 2002;17(6):369-74, doi: 10.1034/J.1399-302X.2002.170606.X.
337. Rossi M., Battafarano G., Pepe J., Minisola S., Fattore A Del. *Molecular Sciences The Endocrine Function of Osteocalcin Regulated by Bone Resorption: A Lesson from Reduced and Increased Bone Mass Diseases.* 2019, doi: 10.3390/ijms20184502.
338. Martínez I., Lattimer JM., Hubach KL., Case JA., Yang J., Weber CG., et al. Gut microbiome composition is linked to whole grain-induced immunological improvements Subject Category: microbe-microbe and microbe-host interactions. *ISME J.* 2012;7:269-80, doi: 10.1038/ismej.2012.104.
339. Ezaki T., Kawamura Y., Li N., Li ZY., Zhao L., Shu SE. Proposal of the genera Anaerococcus gen. nov., Peptoniphilus gen. nov. and Gallicola gen. nov for members of the genus

- Peptostreptococcus. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2001;51(4):1521-8, doi: 10.1099/00207713-51-4-1521/CITE/REFWORKS.
340. Silver Spring (MD): Food and Drug Administration (US); Bethesda (MD): National Institutes of Health (US). BEST (Biomarkers, EndpointS, and other Tools) Resource. BEST (Biomarkers , EndpointS , and other Tools) Resource. 2016.
341. Biver E., Berenbaum F., Valdes AM., Araujo de Carvalho I., Bindels LB., Brandi ML., et al. Gut microbiota and osteoarthritis management: An expert consensus of the European society for clinical and economic aspects of osteoporosis, osteoarthritis and musculoskeletal diseases (ESCEO). *Ageing Res Rev*. 2019;55:100946, doi: 10.1016/J.ARR.2019.100946.
342. Cheng S-P., Liu C-L., Liu T-P., Hsu Y-C., Lee J-J. Clinical Study Association between Parathyroid Hormone Levels and Inflammatory Markers among US Adults. 2014, doi: 10.1155/2014/709024.
343. Drapkina OM., Elkina AY., Sheptulina AF., Kiselev AR. Non-Alcoholic Fatty Liver Disease and Bone Tissue Metabolism: Current Findings and Future Perspectives. *Int J Mol Sci*. 2023;24(9), doi: 10.3390/IJMS24098445.
344. Juanola O., Martínez-López S., Francés R., Gómez-Hurtado I. Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: Metabolic, Genetic, Epigenetic and Environmental Risk Factors. *Int J Environ Res Public Health*. 2021;18(10), doi: 10.3390/IJERPH18105227.
345. Sergeev IN. Vitamin D-Cellular Ca²⁺ link to obesity and diabetes. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2016;164:326-30, doi: 10.1016/J.JSBMB.2015.11.008.

346. Bouter KE., van Raalte DH., Groen AK., Nieuwdorp M. Role of the Gut Microbiome in the Pathogenesis of Obesity and Obesity-Related Metabolic Dysfunction. *Gastroenterology*. 2017;152(7):1671-8, doi: 10.1053/J.GASTRO.2016.12.048.
347. Megur A., Baltriukienė D., Bukelskienė V., Burokas A. The microbiota–gut–brain axis and Alzheimer’s disease: Neuroinflammation is to blame? *Nutrients*. 2021, doi: 10.3390/nu13010037.
348. Song W., Sheng Q., Bai Y., Li L., Ning X., Liu Y., et al. Obesity, but not high-fat diet, is associated with bone loss that is reversed via CD4+CD25+Foxp3+ Tregs-mediated gut microbiome of non-obese mice. *npj Science of Food* 2023 7:1. 2023;7(1):1-14, doi: 10.1038/s41538-023-00190-6.
349. Sergeev IN., Aljutaily T., Walton G., Huarte E. Effects of Synbiotic Supplement on Human Gut Microbiota, Body Composition and Weight Loss in Obesity. *Nutrients*. 2020;12(1), doi: 10.3390/NU12010222.
350. Culibrk RA., Hahn MS. The Role of Chronic Inflammatory Bone and Joint Disorders in the Pathogenesis and Progression of Alzheimer’s Disease. *Front Aging Neurosci*. 2020, doi: 10.3389/fnagi.2020.583884.
351. Chen YH., Lo RY. Alzheimer’s disease and osteoporosis. *Tzu Chi Med J*. 2017, doi: 10.4103/tcmj.tcmj_54_17.
352. Walker AW., Hoyles L. Human microbiome myths and misconceptions. *Nat Microbiol*. 2023;8(8), doi: 10.1038/s41564-023-01426-7.

353. Huang R., Liu P., Bai Y., Huang J., Pan R., Li H., et al. Changes in the gut microbiota of osteoporosis patients based on 16S rRNA gene sequencing: a systematic review and meta-analysis. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2022;23(12), doi: 10.1631/jzus.B2200344.
354. Yan Q., Cai L., Guo W. New Advances in Improving Bone Health Based on Specific Gut Microbiota. *Front Cell Infect Microbiol*. 2022, doi: 10.3389/fcimb.2022.821429.
355. Lyu Z., Hu Y., Guo Y., Liu D. Modulation of bone remodeling by the gut microbiota: a new therapy for osteoporosis. *Bone Res*. 2023, doi: 10.1038/s41413-023-00264-x.
356. An R., Wilms E., Masclee AAM., Smidt H., Zoetendal EG., Jonkers D. Age-dependent changes in GI physiology and microbiota: Time to reconsider? *Gut*. 2018;67(12), doi: 10.1136/gutjnl-2017-315542.
357. Odamaki T., Kato K., Sugahara H., Hashikura N., Takahashi S., Xiao JZ., et al. Age-related changes in gut microbiota composition from newborn to centenarian: A cross-sectional study. *BMC Microbiol*. 2016;16(1), doi: 10.1186/s12866-016-0708-5.
358. Salazar N., Arboleya S., Fernández-Navarro T., de los Reyes-Gavilán CG., Gonzalez S., Gueimonde M. Age-associated changes in gut microbiota and dietary components related with the immune system in adulthood and old age: A cross-sectional study. *Nutrients*. 2019;11(8), doi: 10.3390/nu11081765.

ANEXOS

Cuaderno de recogida de muestras

**CUADERNO DE RECOGIDA DE DATOS MICROBIOTA INTESTINAL ASOCIADOS A FRACTURA DE CADERA.
ESTUDIO DE CASOS CONTROL**

CODIGO IDENTIFICACIÓN PACIENTE

FRC

*****Criterios Inclusión:**

- Mayor de 70 años
- Escala de Barthel $\geq$ 30 puntos
- Ausencia de fractura de cadera previa

*****Criterios Exclusión:**

- Vacunación últimos 6 meses
- Inmunodeficiencia
- Enfermedad autoinmune
- Infección aguda
- Tratamiento ATB en las 2 semanas previas
- Tratamiento activo (quimioterapia o radioterapia) para cualquier neoplasia
- Deterioro cognitivo moderado-severo considerado (GDS $\geq$ 5)
- Cirugía u hospitalización por cualquier motivo en los últimos 3 meses

DATOS PACIENTE

Sexo: M (0) F(1)
Fecha nacimiento: Talla(m): IMC(Kg/m²):
Fecha Ingreso: Fecha Intervención: Fecha Alta:

- Origen del paciente
- Vive en su domicilio solo (0)
 - Vive en su domicilio con pareja/familia (1)
 - Residencia (2)
 - Vive en casa de otros familiares (3)

DIAGNÓSTICO

Lateralidad: D(0) I(1)

Fractura cadera	Artrosis (Artroplastia)
0 Fractura subcapital	3 Coxartrosis
1 Fractura pertrocanterea	4 Gonartrosis
2 Fractura peritrocanterea	

ANTECEDENTES

Problema metabólico/médico subyacente:
DM (0) DL (1) HTA (2) Otros (especificar)

Obesidad No (0) Si (1)
Fumador No (0) Si (1)
Consumo fármacos último año
Antibióticos No (0) Si (1)

Otros: Tipo:
Fecha inicio administración:
Fecha fin administración:

VARIABLES ANALÍTICAS (ingreso)

BIOQUÍMICA		HORMONAS		
Glucosa		TSH		
Urea		25 OH Vitamina D		
Creatinina		PTH - Parathormona		
Filtrado Glomerular e. (CKD-EPI)		Somatomedina C (IGF-1)		
Colesterol total		HEMATOLOGÍA GENERAL		
Proteínas Totales		Hemoglobina		
Albúmina		VSG		
Fosfatasas alcalinas		Leucocitos		
Sodio		Neutrofilos		
Potasio		Linfocitos		
Calcio total		Monocitos		
Fósforo inorgánico		Eosinofilos		
Proteína C reactiva		Basofilos		
		Plaquetas		

PROCEDIMIENTO ANESTÉSICO

General (0) Raquidea (1) ALR (2) Otro (3) No precisa (4)

PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO

Osteosintesis:

-	<u>Enclavado:</u>	Modelo	Longitud	Diametro	ACD*	Tornillo/lamina	Tornillo distal	cerclaje
		PFNA						
		Gamma						
		Otros						
-	RAFI							

*ACD: angulo cervicodialisario

Protesis

Rodilla: Modelo
 Femur CR(0) PS(1)
 Tamaño
 Tibia Tamaño
 Polietileno Tamaño
 Rotula No(0) Si(1)

Cadera
 Parcial/Bipolar
 Total: Modelo
 Cotilo Tamaño
 Fijacion
 Press fit (0) Tornillo(1) Cemento(2)
 Inserto Polietileno (0) Cerámica (1)
 Vastago: Cementado: No(0) Si(1)
 Cabeza: Tamaño/cuello
 Metal (0) Ceramica (1)

CUESTIONARIO DE ADHERENCIA A LA DIETA MEDITERRÁNEA

- 1 ¿Usa usted el aceite de oliva como principal grasa para cocinar?
 - ☐ Sí (1)
 - ☐ No (0)
- 2 ¿Cuánto aceite de oliva consume en total al día (incluyendo el usado para freír, el de las comidas fuera de casa, las ensaladas, etc.)?
 - ☐ Dos o más cucharadas (1)
 - ☐ Menos de dos cucharadas (0)
- 3 ¿Cuántas raciones de verdura u hortalizas consume al día? (las guarniciones o acompañamientos contabilizan como media ración)
 - ☐ Dos o más al día (al menos una de ellas en ensaladas o crudas) (1)
 - ☐ Menos de dos raciones al día (0)
- 4 ¿Cuántas piezas de fruta (incluyendo zumo natural) consume al día?
 - ☐ Tres o más al día (1)
 - ☐ Menos de tres al día (0)
- 5 ¿Cuántas raciones de carnes rojas, hamburguesas, salchichas o embutidos consume al día (una ración equivale a 100-150 gr)?
 - ☐ Menos de una al día (1)
 - ☐ Más de 1 ración al día (0)
- 6 ¿Cuántas raciones de mantequilla, margarina o nata consume al día (una porción individual equivale a 12 gr)?
 - ☐ Menos de una al día (1)
 - ☐ Más de 1 ración al día (0)
- 7 ¿Cuántas bebidas carbonatadas y/o azucaradas (refrescos, colas, tónicas, bitter) consume al día?
 - ☐ Menos de una al día (1)
 - ☐ Más de 1 al día (0)
- 8 ¿Bebe vino? ¿Cuánto consume a la semana?
 - ☐ Tres o más vasos por semana (1)
 - ☐ Menos de tres a la semana (0)
- 9 ¿Cuántas raciones de legumbres consume a la semana (una ración o plato equivale a 150 gr)?
 - ☐ Tres o más por semana (1)
 - ☐ Menos de tres a la semana (0)
- 10 ¿Cuántas raciones de pescado o mariscos consume a la semana (un plato, pieza o ración equivale a 100-150 gr de pescado ó 4-5 piezas de marisco)?
 - ☐ Tres o más por semana (1)
 - ☐ Menos de tres a la semana (0)
- 11 ¿Cuántas veces consume repostería comercial (no casera) como galletas, flanes, dulces o pasteles a la semana?
 - ☐ Menos de tres por semana (1)
 - ☐ Más de tres a la semana (0)
- 12 ¿Cuántas veces consume frutos secos a la semana (una ración equivale a 30 gr)?
 - ☐ Una o más por semana (1)
 - ☐ Menos de una a la semana (0)
- 13 ¿Consume preferentemente carne de pollo, pavo o conejo en vez de ternera, cerdo, hamburguesas o salchichas (carne de pollo: una pieza o ración equivale a 100-150 gr)? (0)
 - ☐ Sí (1)
 - ☐ No (0)
- 14 ¿Cuántas veces a la semana consume los vegetales cocinados, la pasta, el arroz u otros platos aderezados con una salsa de tomate, ajo, cebolla o puerro elaborada a fuego lento con aceite de oliva (sofrito)?
 - ☐ Dos o más por semana (1)
 - ☐ Menos de dos a la semana (0)

INDICE COMORBILIDAD CHARLSON. Total:

Infarto de miocardio: debe existir evidencia en la historia clínica de que el paciente fue hospitalizado por ello, o bien evidencias de que existieron cambios en enzimas y/o en ECG
Insuficiencia cardíaca: debe existir historia de disnea de esfuerzos y/o signos de insuficiencia cardíaca en la exploración física que respondieron favorablemente al tratamiento con digital, diuréticos o vasodilatadores. Los pacientes que estén tomando estos tratamientos, pero no podamos constatar que hubo mejoría clínica de los síntomas y/o signos, no se incluirán como tales
Enfermedad arterial periférica: incluye claudicación intermitente, intervenidos de by-pass arterial periférico, isquemia arterial aguda y aquellos con aneurisma de la aorta (torácica o abdominal) de > 6 cm de diámetro
Enfermedad cerebrovascular: pacientes con AVC con mínimas secuelas o AVC transitorio
Demencia: pacientes con evidencia en la historia clínica de deterioro cognitivo crónico
Enfermedad respiratoria crónica: debe existir evidencia en la historia clínica, en la exploración física y en exploración complementaria de cualquier enfermedad respiratoria crónica, incluyendo EPOC y asma
Enfermedad del tejido conectivo: incluye lupus, polimiositis, enf. mixta, polimialgia reumática, artritis cel. gigantes y artritis reumatoide
Úlcera gastroduodenal: incluye a aquellos que han recibido tratamiento por un úlcus y aquellos que tuvieron sangrado por úlceras
Hepatopatía crónica leve: sin evidencia de hipertensión portal, incluye pacientes con hepatitis crónica
Diabetes: incluye los tratados con insulina o hipoglucemiantes, pero sin complicaciones tardías, no se incluirán los tratados únicamente con dieta
Hemiplejía: evidencia de hemiplejía o paraplejía como consecuencia de un AVC u otra condición
Insuficiencia renal crónica moderada/severa: incluye pacientes en diálisis, o bien con creatininas > 3 mg/dl objetivadas de forma repetida y mantenida
Diabetes con lesión en órganos diana: evidencia de retinopatía, neuropatía o nefropatía, se incluyen también antecedentes de cetoacidosis o descompensación hiperosmolar
Tumor o neoplasia sólida: incluye pacientes con cáncer, pero sin metástasis documentadas
Leucemia: incluye leucemia mieloide crónica, leucemia linfática crónica, policitemia vera, otras leucemias crónicas y todas las leucemias agudas
Linfoma: incluye todos los linfomas, Waldstrom y mieloma
Hepatopatía crónica moderada/severa: con evidencia de hipertensión portal (ascitis, varices esofágicas o encefalopatía)
Tumor o neoplasia sólida con metástasis
Sida definido: no incluye portadores asintomáticos

GLOBAL DETERIORATION SCALE (GDS)

- (0) Ausencia de quejas subjetivas y de trastornos evidentes de memoria.
- (1) Olvidos subjetivos, pero con exploración normal (Olvido donde ha colocado objetos familiares, o nombres bien conocidos por todos)
- (2) Dificultad en el trabajo, en la comunicación verbal o al recorrer lugares poco familiares; detectable por la familia; déficit sutil de memoria en la exploración
- (3) Disminución de la capacidad para viajar, para contar o para recordar acontecimientos recientes.
- (4) Necesita ayuda para elegir la ropa; desorientación en tiempo o espacio; recuerda peor el nombre de sus nietos
- (5) Necesita supervisión para comer y asearse, posible incontinencia; desorientación en tiempo, espacio y posiblemente en identidad
- (6) Pérdida importante de la capacidad verbal, incontinencia y rigidez motora.

ÍNDICE DE BARTHEL (actividades básicas de la vida diaria)

Alimentación 10 Independiente 5 Necesita ayuda: por ejemplo, para cortar, extender la mantequilla, etc. 0 Dependiente: necesita ser alimentado.	Micción 10 Continente, ningún accidente: seco día y noche. Capaz de usar cualquier dispositivo (catéter). Si es necesario, es capaz de cambiar la bolsa. 5 Accidente ocasional: menos de una vez por semana. Necesita ayuda con los instrumentos. 0 Incontinente
Lavado (baño) 5 Independiente: capaz de lavarse entero; puede ser usando la ducha, la bañera o permaneciendo de pie y aplicando la esponja por todo el cuerpo. Incluye entrar y salir de la bañera sin estar una persona presente. 0 Dependiente: necesita alguna ayuda	Retrete 10 Independiente: entra y sale solo. Es capaz de quitarse y ponerse la ropa, limpiarse, prevenir el manchado de la ropa, vaciar y limpiar la cuña. Capaz de sentarse y levantarse sin ayuda. Puede utilizar barras de soporte. 5 Necesita ayuda: necesita ayuda para mantener el equilibrio, quitarse o ponerse la ropa o limpiarse. 0 Dependiente: incapaz de manejarse sin asistencia mayor
Vestido 10 Independiente: capaz de ponerse, quitarse y fijar la ropa. Se ata los zapatos, abrocha los botones, etc. Se coloca el braquero o el corsé si lo precisa. 5 Necesita ayuda: pero hace al menos la mitad de las tareas en un tiempo razonable. 0 Dependiente: incapaz de manejarse sin asistencia mayor	Traslado sillón-cama 15 Independiente: no necesita ayuda. Si utiliza silla deruedas, lo hace independientemente. 10 Mínima ayuda: incluye supervisión verbal o pequeña ayuda física (p. ej., la ofrecida por el cónyuge). 5 Gran ayuda: capaz de estar sentado sin ayuda, pero necesita mucha asistencia para entrar o salir de la cama. 0 Dependiente: necesita grúa o alzamiento completo por dos personas. Incapaz de permanecer sentado
Aseo 5 Independiente: realiza todas las tareas personales (lavarse las manos, la cara, peinarse, etc.). Incluye afeitarse y lavarse los dientes. No necesita ninguna ayuda. Incluye manejar el enchufe si la maquinilla es eléctrica. 0 Dependiente: necesita alguna ayuda	Deambulaci3n 15 Independiente: puede usar cualquier ayuda (pr3tesis, bastones, muletas, etc.), excepto andador. La velocidad no es importante. Puede caminar al menos 50 m o equivalente sin ayuda o supervisi3n. 10 Necesita ayuda: supervisi3n f3sica o verbal, incluyendo instrumentos u otras ayudas para permanecer de pie. Deambula 50 m. 5 Independiente en silla de ruedas: propulsa su silla de ruedas al menos 50 m. Gira esquinas solo. 0 Dependiente: requiere ayuda mayor.
Deposici3n 10 Continente, ning3n accidente: si necesita enema o supositorios se arregla por s3 solo. 5 Accidente ocasional: raro (menos de una vez por semana), o necesita ayuda para el enema o los supositorios. 0 Incontinente	Escalones 10 Independiente: capaz de subir y bajar un piso de escaleras sin ayuda o supervisi3n, aunque utilice barandilla o instrumentos de apoyo. 5 Necesita ayuda: supervisi3n f3sica o verbal. 0 Dependiente: necesita alzamiento (ascensor) o no puede salvar escalones.

ÍNDICE DE LAWTON (actividades instrumentales de la vida diaria)

CAPACIDAD PARA USAR EL TELÉFONO:		LAVADO DE LA ROPA(SOLO MUJERES):	
Utiliza el teléfono por iniciativa propia	1	Lava por sí solo toda su ropa	1
Es capaz de marcar bien algunos números familiares	1	Lava por sí solo pequeñas prendas	1
Es capaz de contestar al teléfono, pero no de marcar	1	Todo el lavado de ropa debe ser realizado por otro	0
No es capaz de usar el teléfono	0		
HACER COMPRAS:		USO DE MEDIOS DE TRANSPORTE:	
Realiza todas las compras necesarias independientemente	1	Viaja solo en transporte público o conduce su propio coche	1
Realiza independientemente pequeñas compras	0	Es capaz de coger un taxi, pero no usa otro medio de transporte	1
Necesita ir acompañado para hacer cualquier compra	0	Viaja en transporte público cuando va acompañado por otra persona	1
Totalmente incapaz de comprar	0	Sólo utiliza el taxi o el automóvil con ayuda de otros	0
		No viaja	0
PREPARACIÓN DE LA COMIDA (SOLO MUJERES):		RESPONSABILIDAD RESPECTO A SU MEDICACIÓN:	
Organiza, prepara y sirve las comidas por sí solo adecuadamente	1	Es capaz de tomar su medicación a la hora y con la dosis correcta	1
Prepara adecuadamente las comidas si se le proporcionan los ingredientes	0	Toma medicación si la dosis le es preparada previamente	0
Prepara, calienta y sirve las comidas, pero no sigue una dieta adecuada	0	No es capaz de administrarse su medicación	0
Necesita que le preparen y sirvan las comidas	0		
CUIDADO DE LA CASA (SOLO MUJERES):		MANEJO DE SUS ASUNTOS ECONÓMICOS:	
Mantiene la casa solo o con ayuda ocasional (para trabajos pesados)	1	Se encarga de sus asuntos económicos por sí solo	1
Realiza tareas ligeras, como lavar los platos o hacer las camas	1	- Realiza las compras de cada día, pero necesita ayuda en las grandes compras, bancos...	1
Realiza tareas ligeras, pero no puede mantener un adecuado nivel de limpieza	1	- Incapaz de manejar dinero	0
Necesita ayuda en todas las labores de la casa	1		
No participa en ninguna labor de la casa	0		

Matrices de correlaciones

	Edad	Urea	Filtrado Glomerular	Colecterol total	Albumina	Calcio	PCR	Vit. D	PTH	Hemoglobina	Leucocitos	Neutrofilos	Linfocitos	Monocitos	CD4+ IL2+ IFN γ	CD4+ IL2+ IFN γ	CD4+ IL2+ IFN γ	CD4+ IL2+ IFN γ	CD4+ TNF α IFN γ	CD4+ TNF α IFN γ	CD4+ TNF α IFN γ	CD4+ TNF α IFN γ	CD8+ IL2+ IFN γ	CD8+ IL2+ IFN γ	CD8+ IL2+ IFN γ	CD8+ IL2+ IFN γ	CD8+ TNF α IFN γ	CD8+ TNF α IFN γ	CD8+ TNF α IFN γ	CD8+ TNF α IFN γ
Edad	1	0.4233	-0.5697	-0.2369	-0.3975	-0.34	0.4463	-0.2518	0.3683	-0.2628	0.4018	0.4542	-0.1062	0.2984	-0.0954	0.1411	-0.1388	0.0546	-0.2692	-0.2262	-0.3923	0.1444	-0.0664	-0.2846	-0.3382	0.1493	-0.3414	-0.2883	-0.357	0.1714
Urea	0.4233	1	-0.7102	-0.3195	-0.3406	-0.2249	0.363	-0.1889	0.443	-0.1055	0.3956	0.3371	0.0808	0.3645	-0.0837	0.12	-0.2036	0.1443	-0.0617	-0.0447	-0.1158	0.0922	-0.0297	-0.0712	-0.0971	0.083	-0.0796	-0.1306	-0.1497	0.0962
Filtrado Glomerular	-0.5697	-0.7102	1	0.326	0.2352	0.1862	-0.3329	0.2156	-0.6007	0.172	-0.4653	-0.418	-0.1197	-0.4117	0.1276	-0.1527	0.1775	-0.2468	-0.0253	0.0823	0.1951	-0.3	-0.1489	0.0746	0.171	-0.1575	0.1202	0.1799	0.2736	-0.1756
Colecterol total	-0.2369	-0.3195	0.326	1	0.496	0.487	-0.4505	0.2783	-0.1829	-0.0801	-0.48	-0.4683	0.0128	-0.293	0.0749	0.131	0.073	-0.017	0.1047	0.0808	0.1229	-0.0401	-0.0937	-0.0961	0.0186	-0.112	0.0634	-0.0329	0.0441	-0.1172
Albumina	-0.3975	-0.3406	0.2352	0.496	1	0.8334	-0.774	0.2394	-0.1208	0.2647	-0.5076	-0.5184	0.0263	-0.2888	0.1396	-0.0741	0.2129	-0.1805	0.0535	0.2103	0.3091	-0.1889	-0.1233	0.1229	0.0903	-0.1987	0.1825	0.1108	0.2697	-0.2353
Calcio	-0.34	-0.2249	0.1862	0.487	0.8334	1	-0.7076	0.3923	-0.1339	0.2032	-0.5331	-0.5441	-0.0566	-0.2779	0.0673	-0.1075	0.1776	-0.2334	-0.0111	0.1579	0.2427	-0.2147	-0.1576	0.0766	0.0391	-0.1671	0.1593	0.0821	0.2162	-0.1832
PCR	0.4463	0.363	-0.3329	-0.4505	-0.774	-0.7076	1	-0.3027	0.2811	-0.2721	0.6635	0.6937	-0.154	0.479	-0.0886	-0.1191	-0.2023	0.026	-0.0563	-0.3616	-0.3689	0.1833	0.3018	-0.1681	-0.0314	0.2085	-0.0881	-0.2167	-0.2631	0.2692
Vit. D	-0.2518	-0.1889	0.2156	0.2783	0.2394	0.3923	-0.3027	1	-0.2418	0.1957	-0.3825	-0.3764	-0.0235	-0.2383	0.0554	-0.014	0.0381	0.0185	-0.075	0.1128	0.0681	0.0929	-0.0788	-0.0333	0.0042	0.0436	0.1343	0.0538	0.0859	0.0136
PTH	0.3683	0.443	-0.6007	-0.1829	-0.3268	-0.3359	0.2811	-0.2418	1	-0.1902	0.2405	0.2549	0.0508	0.0436	-0.043	0.0903	-0.2212	0.1723	-0.1153	-0.055	-0.1732	0.1724	0.0154	-0.1398	0.0709	-0.0867	-0.2669	-0.1653	0.0853	
Hemoglobina	-0.2628	-0.1055	0.172	-0.0501	0.2647	0.2032	-0.2721	0.1957	-0.1902	1	-0.4655	-0.4308	-0.086	-0.4063	0.151	-0.085	0.2137	-0.0216	-0.0362	0.177	0.2542	-0.1257	-0.1682	0.1915	0.2069	-0.1129	0.1907	0.1725	0.2897	-0.1752
Leucocitos	0.4018	0.3956	-0.4653	-0.48	-0.5076	-0.5331	0.6635	-0.3825	0.2405	-0.4655	1	0.9682	0.0758	0.6865	-0.0073	-0.0288	-0.1048	0.0462	-0.0625	-0.1401	-0.1924	0.1479	0.1633	0.0349	0.048	0.2546	-0.1351	-0.0133	-0.1447	0.2912
Neutrofilos	0.4542	0.3371	-0.418	-0.4683	-0.5184	-0.5441	0.6937	-0.3764	0.2549	-0.4308	0.9682	1	-0.1138	0.194	-0.0829	-0.1227	-0.2006	-0.0559	-0.1399	-0.2665	-0.3888	0.1171	0.1398	-0.1148	-0.0563	0.1393	-0.2222	-0.164	-0.2285	0.2081
Linfocitos	-0.1062	0.0808	-0.1197	0.0128	0.0263	-0.0166	-0.154	-0.0235	0.0508	-0.086	0.0758	-0.1138	1	0.2055	0.4169	0.4938	0.3898	0.5973	0.541	0.5819	0.4757	0.2549	0.1591	0.4789	0.3695	0.4984	0.4816	0.4821	0.3902	0.3764
Monocitos	0.2984	0.3645	-0.4117	-0.293	-0.2888	-0.2779	0.479	-0.2383	0.0436	-0.4061	0.6865	0.194	0.2055	1	-0.0246	0.0918	0.1188	0.0926	-0.0281	0.0453	-0.0525	0.1987	0.128	0.2121	0.228	0.2703	-0.0728	0.1215	-0.0625	0.2823
CD4+ IL2+ IFN γ	-0.0954	-0.0837	0.1276	0.0749	0.1396	0.0673	-0.0886	0.0554	-0.043	0.151	-0.0073	-0.0829	0.4169	-0.0246	1	0.1766	0.2851	0.1206	0.2721	0.2189	0.2954	0.0039	0.3695	0.3398	0.3927	0.1367	0.6122	0.3806	0.4765	0.4341
CD4+ IL2+ IFN γ	0.1411	0.12	-0.1527	0.131	-0.0741	-0.1075	-0.1591	-0.014	0.0903	-0.085	-0.0088	-0.1227	0.4938	0.0918	0.1766	1	0.0416	0.6919	0.124	0.4096	0.1197	0.3928	-0.1961	0.0988	-0.0718	0.3451	-0.1333	0.097	-0.0471	0.2029
CD4+ IL2+ IFN γ	-0.2388	-0.2036	0.1775	0.073	0.2129	0.1776	-0.2023	0.0581	-0.2212	0.2337	-0.1048	-0.2006	0.3898	0.1188	0.2851	0.0416	1	-0.2233	0.1565	0.6617	0.7233	-0.4401	-0.129	0.7858	0.8682	-0.058	0.4557	0.6262	0.6386	-0.1856
CD4+ IL2+ IFN γ	0.0546	0.1443	-0.2468	-0.017	-0.1805	-0.2334	0.026	0.0185	0.1723	-0.0216	0.0462	-0.0559	0.5973	0.1206	0.6919	-0.2233	1	0.4179	0.2182	0.0049	0.7661	0.1339	-0.0899	-0.2508	0.4727	0.0593	-0.0215	-0.1665	0.4024	
CD4+ TNF α IFN γ	-0.2692	-0.0617	-0.0253	0.1047	0.0535	-0.0111	-0.0563	-0.075	-0.1153	-0.0362	-0.0625	-0.1399	0.541	-0.0281	0.2721	0.124	0.1565	0.4179	1	0.1946	0.4359	0.1581	0.5128	0.0416	0.0666	0.0287	0.6336	0.126	0.3046	-0.0405
CD4+ TNF α IFN γ	-0.2262	-0.0447	0.0823	0.0808	0.2103	0.1579	-0.3616	0.1128	-0.205	0.177	-0.1401	-0.2665	0.3819	0.0433	0.2189	0.4096	0.6617	0.2182	0.1946	1	0.8322	-0.2919	-0.419	0.6095	0.5455	0.0224	0.3978	0.728	0.7121	-0.1809
CD4+ TNF α IFN γ	-0.3923	-0.1158	0.1951	0.1229	0.3093	0.2427	-0.3689	0.0881	-0.1732	0.2542	-0.1924	-0.2888	0.4757	-0.0525	0.2934	0.1197	0.7233	0.0049	0.4359	0.8322	1	-0.4724	-0.2085	0.5375	0.5711	-0.1167	0.6183	0.6933	0.8763	-0.1184
CD4+ TNF α IFN γ	0.1444	0.0922	-0.3	-0.0401	-0.1889	-0.2147	0.1833	0.0303	0.1734	-0.1257	0.1479	0.1171	0.2549	0.1987	0.0039	0.3928	-0.4401	0.7661	0.1581	-0.2919	-0.4724	1	0.3848	-0.3002	-0.3853	0.4597	-0.2021	-0.3968	-0.5669	0.543
CD8+ IL2+ IFN γ	-0.0664	-0.0297	-0.1489	-0.0937	-0.1233	-0.1576	0.3018	-0.0788	0.0134	-0.1682	0.1633	0.1398	0.1591	0.128	0.3695	-0.1961	-0.129	0.1339	0.5128	-0.419	-0.2085	0.3848	1	-0.0463	0.0348	0.3556	0.4065	-0.1138	-0.1189	0.43
CD8+ IL2+ IFN γ	-0.2846	-0.0712	0.0746	-0.0961	0.1229	0.0766	-0.1681	-0.0533	-0.2031	0.1915	0.0349	-0.1148	0.4789	0.2121	0.3598	0.0988	0.7858	-0.0899	0.0416	0.6095	0.5375	-0.3002	-0.0463	1	0.8437	0.222	0.3094	0.851	0.5154	0.1109
CD8+ IL2+ IFN γ	-0.3821	-0.0971	0.171	0.0186	0.0903	0.0391	-0.0314	0.0242	-0.1948	0.2609	0.048	-0.0563	0.3695	0.228	0.3927	-0.0718	0.0662	-0.5008	0.0666	0.5455	0.1571	-0.3853	0.0248	0.8437	1	0.0949	0.4789	0.6854	0.6386	0.037
CD8+ IL2+ IFN γ	0.1493	0.083	-0.1575	-0.112	-0.1987	-0.1671	0.2085	0.0436	0.0709	-0.1129	0.2546	0.1393	0.4984	0.2703	0.5367	0.3451	-0.098	0.4727	0.0267	0.0234	-0.1167	0.4597	0.3556	0.222	0.0949	1	0.1374	0.2488	-0.0059	0.9422
CD8+ TNF α IFN γ	-0.3414	-0.0796	0.1202	0.0634	0.1825	0.1593	-0.0881	0.1343	-0.0867	0.1907	-0.1151	-0.2222	0.4816	-0.0728	0.6122	-0.1333	0.4197	0.0593	0.6336	0.3978	0.6183	-0.2021	0.4065	0.3394	0.4789	0.1374	1	0.4281	0.7591	0.0204
CD8+ TNF α IFN γ	-0.2883	-0.1306	0.1799	-0.0329	0.1598	0.0821	-0.2167	0.0558	-0.2669	0.1725	-0.0533	-0.164	0.4821	0.1215	0.3806	0.097	0.0262	-0.0215	0.126	0.738	0.6933	-0.3968	-0.1338	0.851	0.6854	0.4281	1	0.7568	0.0204	
CD8+ TNF α IFN γ	-0.357	-0.1497	0.2736	0.0441	0.2697	0.2162	-0.2631	0.0859	-0.1653	0.2897	-0.1447	-0.2285	0.3902	-0.0605	0.4765	-0.0471	0.6186	-0.1665	0.3046	0.7121	0.8763	-0.5689	-0.1169	0.5154	0.6186	-0.0059	0.7591	0.7168	1	-0.2547
CD8+ TNF α IFN γ	0.1714	0.0962	-0.1756	-0.1172	-0.2353	-0.1832	0.2692	0.0136	0.0853	-0.1752	0.2912	0.2081	0.3764	0.2823	0.4341	0.2929	-0.1856	0.4024	-0.0405	-0.1809	-0.1184	0.543	0.43	0.1109	0.017	0.9422	0.0054	0.0244	-0.2047	1

Tabla 18. Matriz de correlación de las variables aplicando el test de Spearman

Anexos

	Edad	Urea	Filtrado glomerular	Colesterol total	Albumina	Calcio	PCR	Vit. D	PTH	Hemoglobina	Leucocitos	Neutrofilos	Linfocitos	Monocitos	CD4+ IL2+ IFNγ+	CD4+ IL2+ IFNγ+	CD4+ IL2+ IFNγ+	CD4+ IL2+ IFNγ+	CD4+ TNFα+ IFNγ+	CD4+ TNFα+ IFNγ+	CD4+ TNFα+ IFNγ+	CD4+ TNFα+ IFNγ+	CD8+ IL2+ IFNγ+	CD8+ IL2+ IFNγ+	CD8+ IL2+ IFNγ+	CD8+ IL2+ IFNγ+	CD8+ TNFα+ IFNγ+	CD8+ TNFα+ IFNγ+	CD8+ TNFα+ IFNγ+	CD8+ TNFα+ IFNγ+
Edad		0,0022	0	0,0976	0,0043	0,0537	0,0012	0,0777	0,0085	0,0652	0,0038	0,0009	0,4628	0,0053	0,5099	0,3384	0,0161	0,7067	0,0587	0,1142	0,0048	0,317	0,5467	0,0461	0,0563	0,3007	0,0152	0,0423	0,0309	0,234
Urea	0,0022		0	0,0237	0,0155	0,1564	0,0096	0,2409	0,0013	0,0262	0,0045	0,0167	0,8318	0,0092	0,5631	0,4566	0,1561	0,3173	0,6704	0,758	0,4231	0,5242	0,8378	0,6232	0,5025	0,5665	0,5826	0,366	0,2994	0,5564
Filtrado glomerular	0	0		0,0209	0,1001	0,3954	0,0182	0,1326	0	0,0078	0,0007	0,0025	0,4077	0,003	0,3774	0,2898	0,2175	0,084	0,8614	0,5698	0,1745	0,0343	0,3029	0,6065	0,235	0,2747	0,4055	0,2111	0,0545	0,2226
Colesterol total	0,0976	0,0237	0,0209		0,0002	0,0003	0,001	0,0504	0,2057	0,8356	0,0004	0,0006	0,9295	0,0389	0,6053	0,3646	0,6146	0,907	0,4695	0,5768	0,3953	0,7824	0,5174	0,5069	0,898	0,4389	0,662	0,8208	0,7611	0,4174
Albumina	0,0043	0,0155	0,1001	0,0002		0	0	0,0941	0,0205	0,0632	0,0002	0,0001	0,8562	0,042	0,3338	0,609	0,1376	0,2096	0,7119	0,1427	0,0288	0,189	0,9937	0,9952	0,5329	0,1665	0,2047	0,2676	0,0562	0,0999
Calcio	0,0537	0,1564	0,1954	0,0003	0		0	0,0048	0,0171	0,157	0,0003	0	0,909	0,0907	0,6423	0,4572	0,2174	0,1029	0,9391	0,3733	0,0895	0,1344	0,2743	0,1969	0,7873	0,246	0,2692	0,571	0,1336	0,2029
PCR	0,0012	0,0096	0,0182	0,001	0	0		0,0326	0,048	0,0509	0	0	0,2856	0,0004	0,5408	0,2697	0,1589	0,8378	0,6978	0,0099	0,0364	0,2025	0,0332	0,2434	0,0286	0,1462	0,543	0,1306	0,0649	0,0587
Vit. D	0,0777	0,2409	0,1326	0,0504	0,0941	0,0048	0,0326		0,0907	0,1733	0,0061	0,0071	0,8714	0,0956	0,7023	0,9231	0,7925	0,8987	0,6047	0,4352	0,6394	0,8345	0,5865	0,8182	0,977	0,7638	0,3524	0,7006	0,553	0,9255
PTH	0,0085	0,0013	0	0,2037	0,0205	0,0171	0,048	0,0907		0,1858	0,0925	0,074	0,9407	0,7638	0,7671	0,5328	0,1226	0,2315	0,4252	0,7044	0,229	0,2311	0,9156	0,1572	0,1752	0,6246	0,5495	0,0609	0,2554	0,556
Hemoglobina	0,0652	0,0282	0,0078	0,8356	0,0632	0,157	0,0509	0,1733	0,1858		0,0007	0,0018	0,5525	0,0394	0,2952	0,5573	0,1024	0,8818	0,803	0,2189	0,0749	0,3842	0,2431	0,1827	0,1493	0,4352	0,1846	0,2308	0,0413	0,2235
Leucocitos	0,0038	0,0045	0,0007	0,0004	0,0002	0,0001	0	0,0061	0,0925	0,0007		0	0,6011	0	0,9599	0,8428	0,469	0,7502	0,6661	0,3318	0,1807	0,3053	0,2571	0,8097	0,7407	0,0743	0,3495	0,9269	0,3361	0,0402
Neutrofilos	0,0009	0,0167	0,0025	0,0006	0,0001	0	0	0,0071	0,074	0,0018	0		0,4313	0	0,5673	0,3958	0,1624	0,6997	0,3326	0,0614	0,0419	0,418	0,3329	0,4274	0,698	0,3348	0,121	0,2551	0,1305	0,147
Linfocitos	0,4628	0,8318	0,4077	0,9295	0,8562	0,909	0,2856	0,8714	0,9407	0,5525	0,6011	0,4313		0,1521	0,0026	0,0003	0,0051	0	0	0	0,0035	0,074	0,2697	0,0004	0,0083	0,0002	0,0004	0,0004	0,0051	0,0071
Monocitos	0,0353	0,0092	0,003	0,0389	0,042	0,0507	0,0004	0,0956	0,7638	0,0034	0	0	0,1521		0,8654	0,5261	0,4193	0,5225	0,8465	0,7548	0,7172	0,1665	0,3756	0,1393	0,1113	0,0576	0,6152	0,4007	0,6746	0,047
CD4+ IL2+ IFNγ+	0,5099	0,5631	0,3774	0,6053	0,3338	0,6423	0,5408	0,7023	0,7671	0,2952	0,9599	0,5673	0,0026	0,8654		0,22	0,0448	0,4042	0,0559	0,1267	0,0386	0,9786	0,0083	0,0103	0,0048	0,0001	0	0,0064	0,0005	0,0016
CD4+ IL2+ IFNγ+	0,2384	0,4066	0,2898	0,3646	0,609	0,4572	0,2697	0,9231	0,5328	0,5573	0,8428	0,2958	0,0003	0,5261	0,22		0,7741	0	0,2908	0,0051	0,4076	0,0048	0,1774	0,495	0,6203	0,0141	0,3562	0,5025	0,7453	0,039
CD4+ IL2 IFNγ+	0,0161	0,1561	0,2175	0,6146	0,1376	0,2174	0,1589	0,7925	0,1226	0,1024	0,469	0,1624	0,0051	0,4193	0,0448	0,7741		0,119	0,2778	0	0	0,0014	0,3718	0	0	0,4983	0,0016	0	0	0,1569
CD4+ IL2 IFNγ+	0,7067	0,3173	0,084	0,907	0,2096	0,3029	0,8578	0,8987	0,2315	0,8818	0,7502	0,6997	0	0,1525	0,4042	0	0,119		0,0025	0,1279	0,9728	0	0,3538	0,5345	0,079	0,0005	0,6825	0,8804	0,2479	0,0038
CD4+ TNFα+ IFNγ+	0,0587	0,6704	0,8614	0,4695	0,7119	0,9991	0,6978	0,6047	0,4252	0,803	0,6661	0,3326	0	0,9465	0,0559	0,3908	0,2778	0,0025		0,1756	0,0316	0,2777	0,0001	0,7741	0,6458	0,8542	0	0,3834	0,0315	0,7802
CD4+ TNFα+ IFNγ+	0,1142	0,758	0,5698	0,5768	0,1427	0,2733	0,0099	0,4352	0,7044	0,2189	0,3318	0,0614	0	0,7548	0,1267	0,0031	0	0,1279	0,1756		0	0,0397	0,0025	0	0	0,8772	0,0042	0	0	0,2087
CD4+ TNFα+ IFNγ+	0,0048	0,4231	0,1745	0,3953	0,0288	0,0895	0,0084	0,6384	0,229	0,0749	0,1807	0,0419	0,0005	0,7172	0,0386	0,4076	0	0,9728	0,0056	0		0,0005	0,1463	0,0001	0	0,4195	0	0	0	0,0242
CD4+ TNFα+ IFNγ+	0,317	0,5242	0,0343	0,7824	0,189	0,1344	0,0525	0,8345	0,2311	0,8642	0,3053	0,418	0,074	0,1665	0,9786	0,0048	0,0014	0	0,7727	0,0397	0,0005		0,0058	0,0342	0,0057	0,0008	0,1593	0,0043	0	0
CD8+ IL2+ IFNγ+	0,6467	0,8378	0,3019	0,5174	0,3937	0,2743	0,0332	0,5865	0,9156	0,2431	0,2571	0,3329	0,2697	0,3756	0,0083	0,1724	0,3718	0,3538	0,0001	0,0025	0,1463	0,0058		0,7493	0,8641	0,0113	0,0034	0,3542	0,4387	0,0018
CD8+ IL2+ IFNγ+	0,0451	0,6232	0,0605	0,5069	0,3952	0,5969	0,2434	0,8382	0,1572	0,1827	0,8097	0,4274	0,0004	0,1393	0,0103	0,495	0	0,5345	0,7741	0	0,0003	0,0342	0,7493	0	0	0,1213	0,0288	0	0,0001	0,4433
CD8+ IL2 IFNγ+	0,0163	0,5025	0,235	0,898	0,5129	0,7873	0,8286	0,977	0,1752	0,1493	0,7407	0,698	0,0083	0,1113	0,0048	0,6203	0	0,079	0,6458	0	0	0,0057	0,8641	0	0	0,512	0,0004	0	0	0,7985
CD8+ IL2 IFNγ+	0,3007	0,5665	0,2747	0,4389	0,1665	0,246	0,1462	0,7638	0,6246	0,4352	0,0743	0,3348	0,0002	0,0076	0,0001	0,0141	0,4983	0,0005	0,8542	0,8772	0,4195	0,0008	0,0113	0,1213	0,512	0,3414	0,0815	0,9675	0	
CD8+ TNFα+ IFNγ+	0,0152	0,5826	0,4055	0,662	0,2047	0,2692	0,543	0,3524	0,5495	0,1846	0,121	0,0004	0,6352	0	0,3562	0,0016	0,6825	0	0,0042	0	0	0,1593	0,0034	0,0288	0,0004	0,3414		0,0019	0	0,9702
CD8+ TNFα+ IFNγ+	0,0423	0,366	0,2111	0,6208	0,2676	0,171	0,1306	0,7006	0,0609	0,2308	0,9269	0,2551	0,0004	0,4007	0,0064	0,5026	0	0,8824	0,3834	0	0	0,0043	0,9142	0	0	0,0815	0,0019	0	0	0,8662
CD8+ TNFα+ IFNγ+	0,0309	0,2994	0,0545	0,7611	0,0582	0,1316	0,0649	0,553	0,2514	0,0413	0,3361	0,1105	0,0051	0,6766	0,0005	0,7493	0	0,2479	0,0155	0	0	0	0,4387	0,0001	0	0,9675	0	0	0	0,1539
CD8+ TNFα+ IFNγ+	0,234	0,5064	0,2226	0,4174	0,0999	0,2029	0,0587	0,9255	0,556	0,2235	0,0402	0,147	0,0071	0,047	0,0016	0,039	0,1969	0,0038	0,7802	0,2087	0,0242	0	0,0018	0,4433	0,7985	0	0,9702	0,8662	0,1539	

Tabla 19. Significación estadística de la matriz de correlación de las variables

Tabla Taxones tras análisis con MetadeconfoundR

	Filo	Clase	Orden	Familia	Género	Especie
sp14	Firmicutes	Clostridia	Oscillospirales	Ruminococcaceae	Faecalibacterium	Faecalibacterium
sp20	Firmicutes	Clostridia	Oscillospirales	Oscillospiraceae	UCG-002	uncultured rumen
sp23	<i>Bacteroidota</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Bacteroidales</i>	<i>Porphyromonadaceae</i>	<i>Porphyromonas</i>	<i>Porphyromonas</i>
sp24	Firmicutes	Clostridia	Oscillospirales	Ruminococcaceae	Subdoligranulum	Subdoligranulum
sp26	Firmicutes	Clostridia	Lachnospirales	Lachnospiraceae	Agathobacter	Agathobacter
sp34	Firmicutes	Clostridia	Lachnospirales	Lachnospiraceae	Roseburia	Roseburia
sp36	Firmicutes	Clostridia	Oscillospirales	Ruminococcaceae	Ruminococcus	Ruminococcus bicirculans
sp51	Firmicutes	Clostridia	Lachnospirales	Lachnospiraceae		
sp52	Firmicutes	Clostridia	Lachnospirales	Lachnospiraceae	Dorea	Dorea
sp73	Fusobacteriota	Fusobacteriia	Fusobacteriales	Fusobacteriaceae	Fusobacterium	Fusobacterium
sp78	Firmicutes	Clostridia	Lachnospirales	Lachnospiraceae	Blautia	Blautia
sp80	Firmicutes	Clostridia	Lachnospirales	Lachnospiraceae	Fusicatenibacter	Fusicatenibacter
sp81	Firmicutes	Clostridia	Oscillospirales	Oscillospiraceae	UCG-003	UCG-003
sp89	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Porphyromonadaceae	Porphyromonas	Porphyromonas uenonis
sp96	Firmicutes	Clostridia	Lachnospirales	Lachnospiraceae	Lachnospira	uncultured bacterium
sp118	Firmicutes	Clostridia	Oscillospirales	Oscillospiraceae	NK4A214	NK4A214 group
sp119	Firmicutes	Bacilli	Erysipelotrichales	Erysipelotrichaceae	Holdemanella	Holdemanella
sp120	Firmicutes	Clostridia	Oscillospirales	Oscillospiraceae	UCG-002	uncultured bacterium
sp122	Firmicutes	Clostridia	Monoglobales	Monoglobaceae	Monoglobus	Monoglobus

sp128	Firmicutes	Bacilli	Erysipelotrichales	Erysipelatoclostridiaceae	Erysipelotrichaceae	Erysipelotrichaceae UCG-003
sp142	Firmicutes	Clostridia	Christensenellales	Christensenellaceae	Christensenellaceae	uncultured prokaryote
sp187	Firmicutes	Clostridia	Lachnospirales	Lachnospiraceae	Anaerostipes	Anaerostipes
sp202	Firmicutes	Clostridia	Lachnospirales	Lachnospiraceae	Lachnospiraceae	Lachnospiraceae UCG-004
sp205	Firmicutes	Clostridia	Oscillospirales	Oscillospiraceae	uncultured	Clostridium sp.
sp252	Firmicutes	Clostridia	Lachnospirales	Lachnospiraceae	Lachnospiraceae	Lachnospiraceae UCG-001
sp264	Firmicutes	Clostridia	Peptostreptococcales-Tissierellales	Anaerovoracaceae	Family	uncultured organism
sp309	Firmicutes	Clostridia	Lachnospirales	Lachnospiraceae	[Eubacterium]	[Eubacterium] hallii group
sp311	Firmicutes	Clostridia	Oscillospirales	Ruminococcaceae	uncultured	human gut
sp341	Firmicutes	Bacilli	RF39	RF39	RF39	RF39
sp359	Firmicutes	Clostridia	Oscillospirales	UCG-010	UCG-010	metagenome
sp395	Desulfobacterota	Desulfovibrionia	Desulfovibrionales	Desulfovibrionaceae	uncultured	uncultured
sp411	Firmicutes	Clostridia	Oscillospirales	UCG-010	UCG-010	unidentified
sp521	Firmicutes	Clostridia	Lachnospirales	Lachnospiraceae	Lachnospiraceae	uncultured bacterium

Tabla 20. Tabla taxones metadeconfoundR. Se expone la taxonomía de los grupos bacterianos que han mostrado correlaciones significativas al realizar el análisis mediante metadeconfoundR

Análisis diversidad según sexo

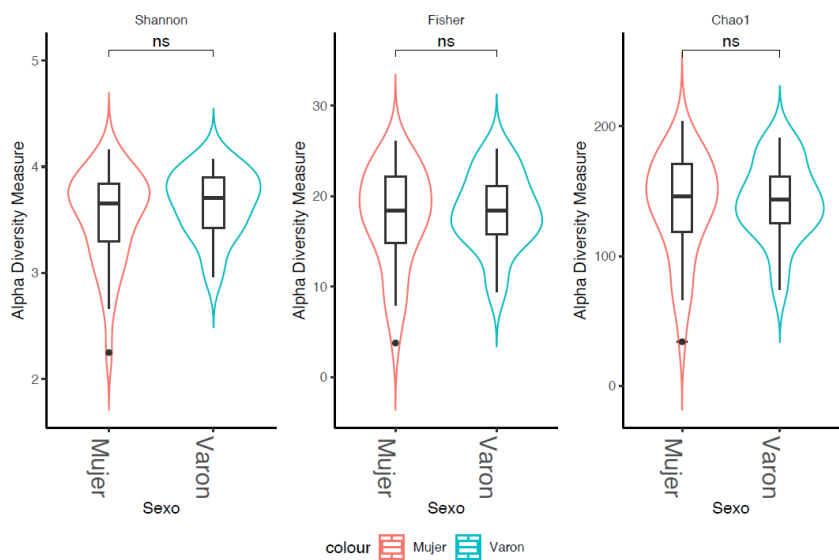


Ilustración 28. Estimadores de α -diversidad Shannon, Fisher y Chao1 según la distribución por sexo

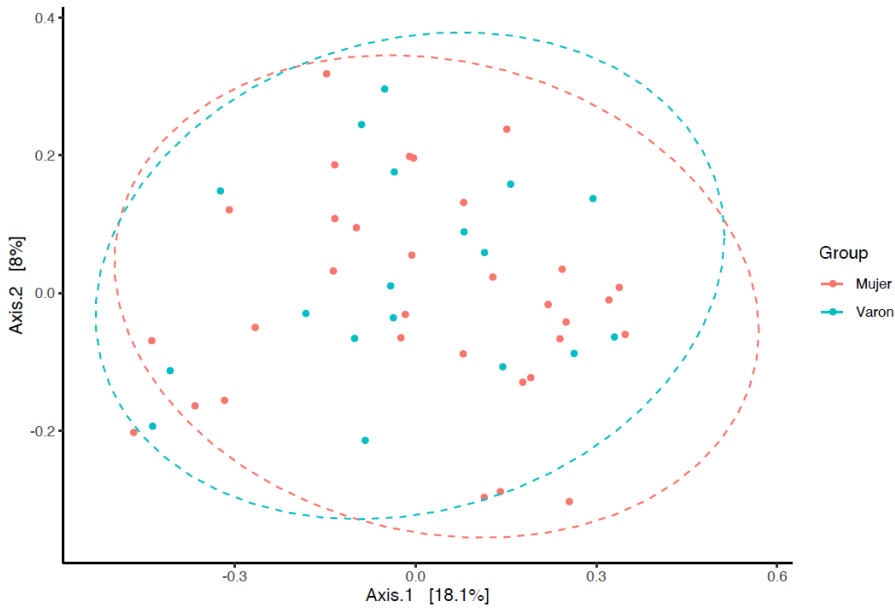


Ilustración 29. Análisis de coordenadas principales (PCoA) basado en la distancia Bray-Curtis entre mujeres y varones.