09

CASO PRÁCTICO

El microbioma y su función protectora de la piel: diferencias en las especies bacterianas entre población con piel sana y acnéica

En un estudio llevado a cabo entre voluntarios con distintas condiciones dermatológicas, Bionos Biotech observa un cambio de comensales a patógenos oportunistas, que podría resultar en la colonización de nichos normalmente ocupados por otros miembros del microbioma facial.

Por *Pedro Salvador*, unidad de genómica de Bionos Biotech

LA RELEVANCIA DEL MICROBIOMA DE LA PIEL RESIDE EN SU ACCIÓN PROTECTORA contra agentes infecciosos externos llevada a cabo junto con la propia piel. El equilibrio entre las diferentes poblaciones microbianas que lo componen es crucial para mantener esta función barrera, y su alteración, conocida como disbiosis, puede llevar a la aparición de patologías cutáneas.

El acné, por ejemplo, es una enfermedad inflamatoria de la piel que involucra al sistema inmunitario. La actividad de los andrógenos desencadena un aumento de la producción de sebo dentro del folículo pilosebáceo, generando un entorno favorable para el desarrollo de *Cutibacterium acnes* y otras especies patógenas oportunistas que desencadenan la inflamación.

De entre las bacterias que componen el microbioma normal de la piel, las pertenecientes al género *Cutibacterium* han sido asociadas con las pieles sanas, aunque estas mismas bacterias pueden llegar a formar parte de procesos patogénicos bajo ciertas circunstancias. En concreto, los desequilibrios entre las especies *Cutibacterium acnes* y *Staphylococcus epidermidis* se relacionan con los procesos patogénicos que derivan en la aparición del acné.

'DE ENTRE LAS BACTERIAS QUE COMPONEN EL MICROBIOMA NORMAL DE LA PIEL, LAS PERTENECIENTES AL GÉNERO *CUTIBACTERIUM* HAN SIDO ASOCIADAS CON LAS PIELES SANAS'

A la hora de llevar a cabo un estudio sobre el microbioma de la piel y las diferentes alteraciones del mismo que pueden dar lugar a procesos patogénicos, Bionos Biotech llevó a cabo una serie de experimentos en sus instalaciones.

Para ellos se seleccionaron como grupos experimentales 22 voluntarios con piel acneica y 16 individuos sanos, de los que se recolectaron muestras del microbioma cutáneo mediante frotis de piel en las áreas de las mejillas y la frente. Tras realizar la lisis bacteriana de las

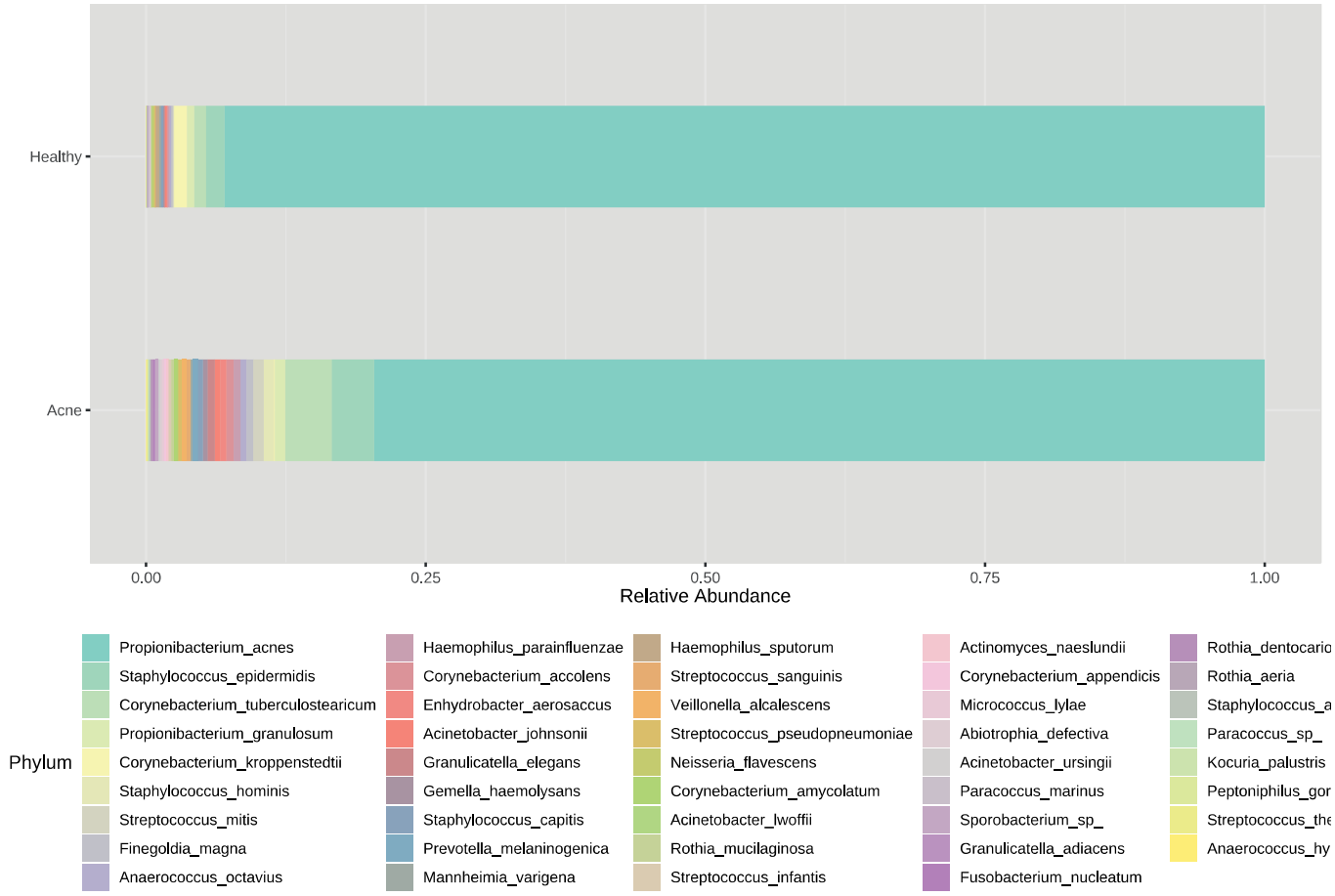

Figura 1. Representación de la abundancia relativa de las diferentes especies que componen el microbioma en los 22 voluntarios con piel acneica y 16 individuos sanos incluidos en el estudio.

muestras, se realizó la extracción del ADN. El ADN microbiano extraído se utilizó entonces como molde para la amplificación por PCR de las regiones hipervariables del gen bacteriano 16S. Estos amplicones se purificaron y se usaron para construir librerías genómicas indexadas. Las librerías se combinaron en cantidades equimoleculares para generar una librería combinada adecuada para su templado en chips de secuenciación. Después, la librería combinada se templó en un chip Ion 520 utilizando el sistema Ion Chef y el chip se secuenció en un secuenciador Ion S5 plus.

Los datos de secuenciación obtenidos fueron sometidos a un control de calidad, extrayendo las lecturas con una calidad apropiada para su posterior análisis. Estas lecturas, fueron analizadas con el *software* Ion reporter, el cual las asignó a las correspondientes unidades taxonómicas operativas (OTUs) al menor nivel taxonómico posible mediante su comparación con las bases de datos Curated MicroSEQ 16S Reference Library v2013.1 y Curated Greengenes v13.5.

La diversidad microbiana dentro de las muestras se evaluó mediante el cálculo de la diversidad α, parámetro que evalúa la diversidad dentro de cada muestra teniendo en cuenta tanto el número total de especies como su abundancia relativa; y la diversidad β, que evalúa las diferencias en la composición de la comunidad microbiana entre muestras. Las estimaciones de diversidad β resultantes pudieron combinarse en una matriz de distancias entre muestras y usarse para visualizar patrones, de forma que las muestras cercanas entre sí son más similares en sus perfiles de comunidad microbiana.

El análisis de las especies bacterianas particularmente afectadas en cada grupo se realizó mediante análisis univariante clásico utilizando pruebas t. Se consideraron significativas aquellas diferencias

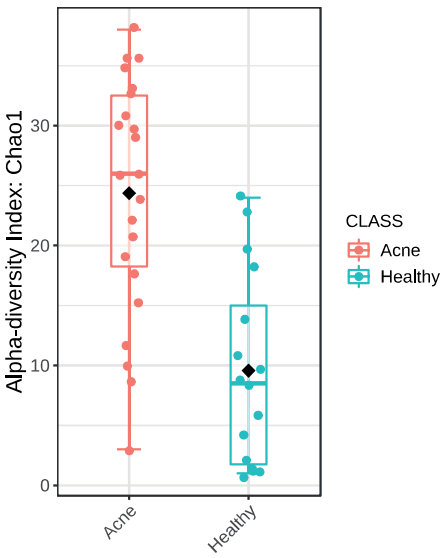

Figura 2. Diagrama de cajas de diversidad α que compara grupos de sujetos sanos y con acné para el índice Chao1.

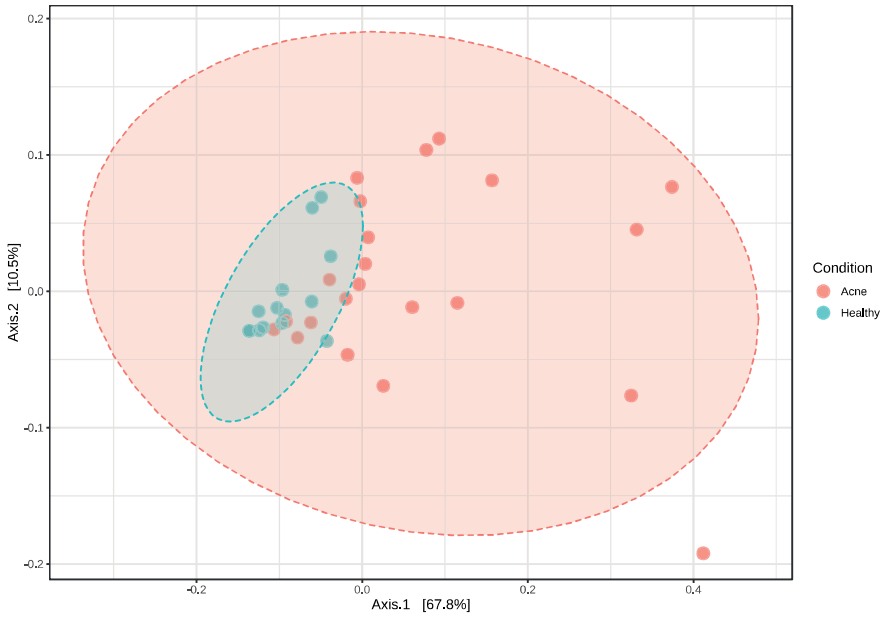

Figura 3. Análisis de coordenadas principales basado en distancias de Bray Curtis.

en la tasa de falso descubrimiento (FDR) con un valor p ajustado < 0.05.

En el análisis de los resultados, aunque en ambos grupos de voluntarios se observó una predominancia de *Cutibacterium acnes* sobre el resto de especies. En el grupo de voluntarios con acné se observó un incremento en la abundancia relativa de las especies minoritariamente representadas en los voluntarios sanos (Figura 1).

Este aumento se corroboró mediante el análisis de la diversidad α a nivel de especie entre los dos grupos, que reveló un claro aumento en los individuos con piel acnéica (índice chao1 24.4 y 9.6 para acné y cohortes sanas, respectivamente; valor p 1.2486e-05) (Figura 2).

Por otro lado, el análisis de la diversidad β se llevó a cabo mediante agrupaciones jerárquicas y PCoA. Y el análisis de PCoA basado en distancias de Bray-Curtis seguido por el análisis estadístico de Permanova mostró un cambio significativo en la composición del microbioma asociado con el acné (valor F: 10,625; R-cuadrado: 0,22788; valor p <0,001). Así, las muestras de acné se encontraron muy repartidas en las dos coordenadas, generando un espacio que incluye muestras sanas (Figura 3), lo que indica una composición diferencial del microbioma entre los dos grupos.

Bacterial species	Relative abundance Acne (%)	Relative abundance Healthy (%)	P values	FDR	Statistics
Cutibacterium acnes	**76,0** ± 16,01%	**94,0** ± 5,66%	**3,91E-01**	**0.00172**	**-4.884**
Corynebacterium tuberculostearicum	**5,48** ± 4,84%	**1,15** ± 1,78%	**0.00060701**	**0.013354**	**38.589**
Streptococcus pseudopneumoniae	**0,36** ± 0,46%	**0,03** ± 0,07%	**0.002965**	**0.042337**	**33.353**
Staphylococcus auricularis	**0,11** ± 0,16%	**0,00** ± 0,01%	**0.0044441**	**0.042337**	**31.846**
Streptococcus mitis	**0,98** ± 1,40%	**0,04** ± 0,11%	**0.004811**	**0.042337**	**3.146**
Staphylococcus capitis	**0,43** ± 0,45%	**0,11** ± 0,20%	**0.006239**	**0.045753**	**29.383**

Tabla 1. Resultados del análisis univariante. Las muestras se clasificaron según sus valores p ajustados al FDR. Se consideraron cambios estadísticamente significativos aquellos con un valor p <0,05.

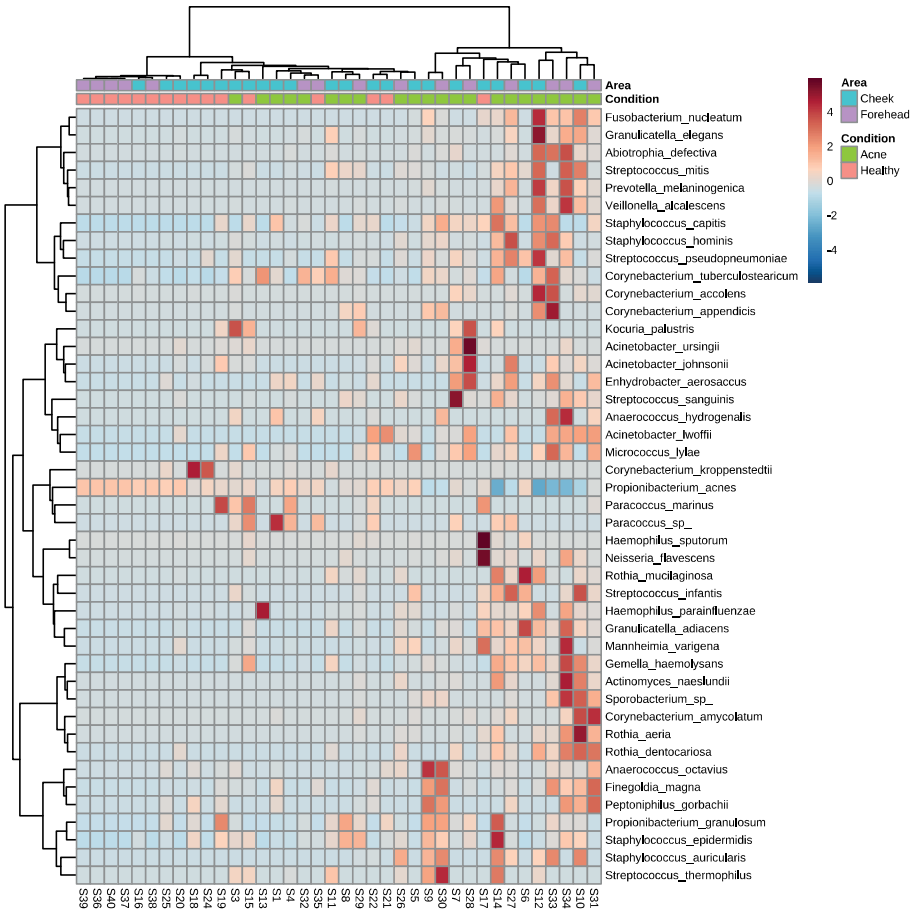

Figura 4. Heat-map que muestra la composición taxonómica de las muestras a nivel de especie. Se realizaron correlaciones de Spearman seguidas de agrupamiento de Ward. Solo se consideraron las especies presentes en al menos el 20% de las muestras.

El análisis de clúster jerárquico por el método de Ward resultó en dos agrupaciones. Todas las muestras encontradas en el Cluster 1 se correspondieron a individuos sanos, mientras que el 70% de las muestras encontradas en el Cluster 2 se obtuvieron de individuos con acné. Al tener en cuenta el área facial definida para el muestreo del microbioma, no se observaron diferencias obvias enrte los grupos (figura 4).

El análisis univariante mostró que el aumento de diversidad encontrado en las muestras de acné viene acompañado de la aparición de especies bacterianas marginalmente representadas en piel sana, o directamente ausentes, como *Corynebacterium tuberculostearicum*, *Streptococcus pseudopneumoniae*, *Staphylococcus auricularis*, *Streptococcus mitis* y *Staphylococcus capitis* (Tabla 1).

'EL ESTUDIO DE LA COMPOSICIÓN DEL MICROBIOMA EN 22 VOLUNTARIOS CON PIEL ACNEICA EN LA ZONA FACIAL INDICÓ UNA CLARA DISBIOSIS CON RESPECTO A UNA COHORTE DE VOLUNTARIOS DE PIEL SANA'

A pesar de estos cambios, varias especies bacterianas siguieron siendo claramente predominantes en las muestras de ambos grupos, acné y sanas. Entre ellas encontramos *Cutibacterium acnes*, *Staphylococcus epidermidis*, *Corynebacterium tuberculostearicum* y *Cutibacterium granulosum*; de manera similar a lo encontrado en análisis metagenómicos anteriores. Para el caso de *Cutibacterium acnes*, los resultados mostraron una reducción significativa de su abundancia en individuos con piel acneica, indicando disbiosis y sugiriendo eventos de competencia con especies patógenas oportunistas para este nicho.

En conclusión, el estudio de la composición del microbioma en 22 voluntarios con piel acneica en la zona facial indicó una clara disbiosis con respecto a una cohorte de voluntarios de piel sana, corroborada en un aumento significativo de la diversidad α y diferencias significativas de agrupamiento al evaluar diversidad β. Las especies bacterianas significativamente modificadas incluyen una reducción significativa en la abundancia relativa de *Cutibacterium acnes* y un aumento significativo en la abundancia de *Corynebacterium tuberculostearicum*, *Streptococcus pseudopneumoniae*, *Staphylococcus auricularis*, *Streptococcus mitis* y *Staphylococcus capitis*. La disbiosis observada sugiere un cambio de comensales a patógenos oportunistas, lo que podría resultar en la colonización de nichos normalmente ocupados por otros miembros del microbioma facial como *Cutibacterium acnes*