



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**CAMBIOS EN LA MICROBIOTA INTESTINAL Y ÁCIDOS GRASOS DE CADENA
CORTA (AGCC) DE PACIENTES MEXICANOS CON LEUCEMIA AGUDA
SOMETIDOS A TRASPLANTE DE CÉLULAS PRECURSORAS HEMATOPOYÉTICAS
(TCPH)**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

ALINNE VENEGAS OLVERA

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. ALEJANDRO MANUEL GARCÍA CARRANCÁ
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. YOLANDA LÓPEZ VIDAL

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

DR. FELIPE VACA PANIAGUA

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., SEPTIEMBRE

2021



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**CAMBIOS EN LA MICROBIOTA INTESTINAL Y ÁCIDOS GRASOS DE CADENA
CORTA (AGCC) DE PACIENTES MEXICANOS CON LEUCEMIA AGUDA
SOMETIDOS A TRASPLANTE DE CÉLULAS PRECURSORAS HEMATOPOYÉTICAS
(TCPH)**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

ALINNE VENEGAS OLVERA

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. ALEJANDRO MANUEL GARCÍA CARRANCÁ
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. YOLANDA LÓPEZ VIDAL
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

DR. FELIPE VACA PANIAGUA
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
ENTIDAD INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

OFICIO CPCB/498/2021

ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
P r e s e n t e

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 26 de abril de 2021 se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de Biología Experimental de la estudiante **VENEGAS OLVERA ALINNE** con número de cuenta **308111811** con la tesis titulada **“Cambios en la microbiota intestinal y ácidos grasos de cadena corta (AGCC) de pacientes mexicanos con Leucemia Aguda sometidos a Trasplante de Células Precursoras Hematopoyéticas (TCPH)”**, realizada bajo la dirección del **DR. ALEJANDRO MANUEL GARCÍA CARRANCÁ**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DR. ARMANDO ROBERTO TOVAR PALACIO
Vocal: DRA. NIMBE TORRES Y TORRES
Vocal: DRA. KIRVIS JANNETH TORRES POVEDA
Vocal: DR. VICENTE MADRID MARINA
Secretario: DRA. YOLANDA LÓPEZ VIDAL

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 17 de agosto de 2021

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Unidad de Posgrado, Edificio D, 1° Piso. Circuito de Posgrados, Ciudad Universitaria
Alcaldía Coyoacán. C. P. 04510 CDMX. Tel. (+5255)5623 7002 <http://pbiol.posgrado.unam.mx/>

Agradecimientos institucionales

Se reconoce con agradecimientos a los siguientes programas y proyectos que permitieron llevar a cabo este trabajo.

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por aceptarme en el programa.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por otorgarme la beca de maestría.

Y por último y no menos importante, quisiera agradecer a mi comité tutor conformado por el Dr. Alejandro García Carrancá, la Dra. Yolanda López Vidal y por el Dr. Felipe Vaca Paniagua, quienes de la mano me llevaron a lo largo de estos dos años a desenvolverme de una mejor manera, a ser más acertiva, crítica y analítica, compartiendo conmigo su enorme experiencia académica como investigadores, gracias por su dedicación, paciencia, consejos y sobre todo por permitirme tener el honor de crecer como investigadora a su lado.

Agradecimientos a título personal

Se reconoce y agradece a los siguientes investigadores, Dra. Elizabeth Hernández Urzúa por el apoyo brindado y la invitación a participar en el Proyecto, a la Dra. Brenda Acosta y al Dr. Aguilar Ponce de León del Instituto Nacional de Cancerología (INCan), por el apoyo académico y la confianza brindada para la realización de este proyecto.

Al Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, en particular a la Dra. Nimbe Torres y a la Dra Mónica Todd S. por su gran apoyo para el análisis de datos de secuenciación y al Dr. Omar Granados por su enorme experiencia en el análisis de ácidos grasos de cadena corta. Así mismo quisiera agradecer infinitamente al biólogo Alberto Barrón por su gran apoyo en el análisis de datos de secuenciación.

Dedicatoria

A mi padre Fortino Venegas Pérez. Gracias por todo, y por tanto papito mío. Gracias por apoyarme siempre, por siempre tener las palabras de aliento exactas para tu cría, gracias infinitas por inculcarme los mejores valores para la vida. Nunca tendré las palabras y acciones exactas para agradecerte todo lo que has hecho por mi y por mis hermanas, TE AMO para siempre Pa.

Tita, Esperanza Salinas, gracias por creer en mí y en lo que soy y por emocionarse de la manera en que lo hace por cada uno de mis logros, gracias por ese inmenso amor puro y noble que comparte conmigo, y que, apesar de no llevar tu sangre siempre me ha tratado como una hija.

A mis mejores amigos, gracias por estar a mi lado, gracias por siempre estar en los mejores y peores momentos, gracias por los maravillosos momentos y carcajadas compartidas que tendré siempre en mi memoria, Caro, Cipa, Vale, Mony, San, Manuel, Isaac, Lula, Emi, Albert y a mi Pável son la familia que yo elejí y me siento sumamente afortunada de tenerlos a mi lado, compartiendo nuestras metas y sueños, deseo que de la forma que sea ustedes siempre permanezcan en mi vida.

Gracias infinitas!!!.

ÍNDICE

Resumen.....	1
Abstract.....	1
I. Introducción.....	2
II. Antecedentes.....	3
2.1 Microbiota, dieta, salud y enfermedad.....	3
2.2 Trasplante de Células Precursoras Hematopoyéticas (TCPH).....	7
2.3 Microbiota, trasplante de células precursoras hematopoyéticas (TCPH) e inmunidad.....	7
2.4 Leucemia	12
2.5 Leucemia mieloide y linfóide aguda.....	12
2.6 Identificación de la microbiota mediante secuenciación del Gen 16S Ribosomal	13
2.7 Identificación de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) mediante cromatografía de gases.....	14
III. Justificación.....	15
IV. Hipótesis	15
V. Objetivo.....	15
5.1 Objetivo general.....	15
5.2 Objetivos particulares.....	15
VI. Materiales y métodos.....	16
6.1 Población de estudio.....	16
6.2 Criterios de inclusión, exclusión y eliminación.....	16
6.3 Recolección de muestras.....	16
6.4 Extracción de DNA bacteriano y amplificación por PCR.....	17
6.5 Secuenciación del Gen 16S ribosomal	17
6.6 Análisis bioinformático.....	19
6.7 Análisis ácidos grasos de cadena corta (AGCC) en materia fecal (MF) por cromatografía de gases.....	20
6.8 Análisis estadístico.....	21
VII. Resultados.....	21
7.1 Secuenciación del Gen 16S rRNA regiones V3-V4.....	21
7.2 Composición de las comunidades microbianas en el grupo control y pacientes	24
7.3 Diversidad de las comunidades microbianas en el grupo control y pacientes.....	27
7.4 Método de análisis de discriminante lineal (LDA).....	29
7.5 Especies bacterianas más cambiantes (Heatmap).....	31
7.6 Cambios en los ácidos grasos de cadena corta en pacientes con leucemia aguda sometidos a trasplante de progenitores hematopoyéticos.....	32
VIII. Discusión.....	37
IX. Conclusión.....	40
X. Perspectivas.....	41
XI. Referencias bibliográficas.....	42

XII. Anexo.....	50
Anexo 1.....	50
Anexo 2.....	55
ANEXO 1.....	50
Mapping file.....	50
Prueba post-hoc de Tukey multiple para datos de diversidad alfa.....	51
Abundancias relativas (%) a nivel de phylum, género y especie para grupo control y pacientes.....	51
ANEXO 2.....	55
Cuantificación de ácidos grasos de cadena corta (acetato, propionato y butirato).....	55
Cuantificación de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) por cromatografía de gases.....	55

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Interacciones multidireccionales de los ácidos grasos de cadena corta (AGCC).....	6
Figura 2. Interacciones entre la microbiota intestinal y la mucosa en pacientes sometidos a trasplante de precursores hematopoyéticos.....	10
Figura 3. El metabolismo epitelial da forma a la microbiota colónica.....	11
Figura 4. Diagrama del Gen ribosomal 16s (16S rRNA).....	14
Figura 5. Diagrama de flujo de Trabajo para la preparación de bibliotecas para la secuenciación de las regiones variables V3 y V4 16S	18
Figura 6. Amplificación en puente mediante el método de Illumina®.....	18
Figura 7. Amplicones de DNA bacteriano ≈550pb provenientes de las muestras de MF sujetos control y pacientes.....	21
Figura 8. Análisis de calidad de las bibliotecas a secuenciar mediante el perfil Bioanalyzer.....	22
Figura 9. Nivel de calidad Phred.....	23
Figura 10. Curvas de rarefacción de la diversidad de OTUs extrapoladas a partir de 44 muestras, grupo control y pacientes.....	24
Figura 11. Diferencias en la abundancia relativa de los Phylum bacterianos intestinales más representativos (abundancia relativa > 1%).	25
Figura 12. Diferencias en la abundancia relativa de géneros bacterianos intestinales más representativos (abundancia relativa > 1).....	26
Figura 13. Diferencias en la abundancia relativa de especies bacterianas intestinales más representativas (abundancia relativa > 1%).	27
Figura 14. Diversidad alfa de OTUS	28
Figura 15. Análisis de componentes principales (PCoA) de comunidades bacterianas intestinales en grupo control y pacientes.....	29
Figura 16. Análisis de discriminante lineal (LDA) para especies bacterianas características del grupo control y pacientes.....	30

Figura 17. Análisis de discriminante lineal (LDA) para especies bacterianas características del grupo control y pacientes.....	31
Figura 18. Mapa de calor de las 32 especies bacterianas diferencialmente abundantes para el grupo control y para cada uno de los puntos de toma de muestra de pacientes.....	32
Figura 19. Cuantificación de ácidos grasos de cadena corta (acetato) en pacientes mexicanos con leucemia aguda, antes, durante y después de la intervención.....	33
Figura 20. Cuantificación de ácidos grasos de cadena corta (propionato) en pacientes mexicanos con leucemia aguda, antes, durante y después de la intervención.....	33
Figura 21. Cuantificación de ácidos grasos de cadena corta (butirato) en pacientes mexicanos con leucemia aguda, antes, durante y después de la intervención.....	34
Figura 22. Cuantificación de ácidos grasos de cadena corta (acetato, propionato y butirato) en pacientes mexicanos con leucemia aguda al inicio del tratamiento, durante el tratamiento (neutropenia) y treinta días después de la intervención respectivamente.....	35
Figura 23. Cuantificación de ácidos grasos de cadena corta: acetato, propionato y butirato, en pacientes mexicanos con leucemia aguda al inicio del tratamiento, durante el tratamiento (neutropenia) y treinta días después de la intervención respectivamente	36

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

AGCC	=ácidos grasos de cadena corta
AGCL	=ácidos grasos de cadena larga
ALL	=leucemia linfocítica aguda
ARG	=genes de resistencia a antibióticos
CCR	=cáncer colorrectal
CDI	=infección por Clostridioides difficile
CEI	=células epiteliales intestinales
CG	=cromatografía de gases
CHC	=carcinoma hepatocelular
GI	=tracto gastrointestinal
CP	=células de Paneth
CU	=cordón umbilical
DAMP	=patrones moleculares asociados a peligro
DNA	=ácido desoxiribonucleico
EC	=enfermedad celiaca
EICH	=enfermedad injerto contra hospedero
EII	=enfermedad inflamatoria intestinal
EM	=esclerosis múltiple
HDAC	=desacetilasas de histonas
IgA	=inmunoglobulina A

IL	=interleucina
ILC	=células linfoides innatas
LDA	=análisis discriminante lineal
LMA	=leucemia mieloide aguda
LPS	=lipopolisacárido
MF	=materia fecal
MO	=médula ósea
NO	=óxido nítrico
NO₃	=nitrato
OTU	=unidad taxonómica operacional
PAMP	=patrones moleculares asociados a patógenos
PCoA	=análisis de componentes principales
PCR	=reacción en cadena de la polimerasa
PRR	=receptores de reconocimiento de patrones
RNA	=ácido ribonucleico
SBS	=Secuenciación por síntesis
SII	=síndrome del intestino irritable
SP	=sangre periférica
TAloCPH	=trasplante alogénico de células progenitoras hematopoyéticas
TCPH	=Trasplante de Células Precursoras Hematopoyéticas
TMO	=trasplante de médula ósea
TNF	=factor de necrosis tumoral
Treg	=células T reguladoras
16S rRNA	=ácido ribonucleico ribosomal 16s

Resumen

El Trasplante de Células Precursoras Hematopoyéticas (TCPH) es una terapia que puede salvar vidas de pacientes con neoplasias hematológicas como la leucemia aguda. Los regímenes preparatorios como las dosis elevadas de quimioterapia, radioterapia y el uso de antibióticos profilácticos, afectan directamente a las comunidades bacterianas comensales y al sistema gastrointestinal en general, generando una disbiosis intestinal, caracterizada por alteraciones en la estructura y función de la microbiota, así como sus subproductos, incluyendo ácidos grasos de cadena corta (AGCC). El objetivo de este estudio fue caracterizar la microbiota intestinal y la producción de AGCC en pacientes mexicanos con leucemia aguda sometidos a TCPH. Se utilizó la secuenciación de las regiones variables V3-V4 16S a partir de DNA bacteriano obtenido de materia fecal en tres puntos de toma de muestra, así como la cromatografía de gases para el análisis de AGCC. Los resultados mostraron cambios significativos en la composición de la microbiota intestinal durante y después del tratamiento. El método de análisis discriminante lineal (LDA) efecto (LEfSe) reveló que las especies bacterianas *P. copri*, *E. coli* y *F. prausnitzii* fueron las de mayor abundancia para cada uno de los casos (control, neutropenia y treinta días después del trasplante, respectivamente ($p < 0.05$, LDA score > 1). Los resultados de cuantificación de AGCC arrojaron que los tres ácidos grasos evaluados (acetato, propionato y butirato) presentaron una disminución en neutropenia. Sin embargo, solo el propionato y el butirato presentaron una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$). Estos resultados confirman que tras el tratamiento, los pacientes presentan una disminución en la diversidad de las poblaciones bacterias comensales y sus metabolitos y un aumento de especies bacterianas potencialmente patógenas.

Palabras clave: microbiota, disbiosis, AGCC, neutropenia

Abstract

Hematopoietic Stem Cell Transplantation (HPCT) is a life-saving therapy for patients with hematological neoplasms such as acute leukemia. Preparatory regimens like high doses of chemotherapy, radiotherapy and the use of prophylactic antibiotics, affects directly the commensal bacterial communities and the system in general, developing intestinal dysbiosis, characterized by alterations in the structure and function of the microbiota and their byproducts including the short chain fatty acids (SCFAs). The aim of this study was characterize the intestinal microbiota and the production of SCFAs in Mexican patients with acute leukemia treated with HPCT. The sequencing of the regional variables V3-V4 16S was used coming from bacterial DNA obtained from fecal matter at three sampling points, as well as gas chromatography to analyze AGCC. The results showed significant changes in the composition of the gut microbiota during and after the treatment. The linear discriminant analysis (LDA) effect (LEfSe) demonstrates that the bacterial species *P. copri*, *E. coli* and *F. prausnitzii* were the species with the highest abundance for each of the cases (control, neutropenia and thirty days after the transplantation, respectively ($p < 0.05$, LDA score > 1). The SCFAs quantification results showed that the three fatty acids evaluated (acetate, propionate and butyrate) had a decrease in neutropenia, however only propionate and butyrate presented a statistically significant difference ($p < 0.05$). These results confirm that after the treatment, the patients present a decrease in the diversity of commensal bacteria populations and in their metabolites, also an increase in potentially pathogenic bacterial species.

Key words: microbiota, dysbiosis, SCFAs, neutropenia

I. Introducción

El cuerpo humano es un ecosistema complejo compuesto por una gran diversidad de organismos microbianos, incluyendo bacterias, arqueas, virus, hongos y protistas, que existen en simbiosis con el hospedero humano (Gill *et al.*, 2006; Turnbaugh *et al.*, 2007). A esta comunidad de microorganismos que se encuentra en el humano se le conoce como microbiota y al conjunto de genomas de esta comunidad se le llama microbioma (Hooper y Gordon, 2001), aunque muchos autores ya los consideran sinónimos.

El proceso de colonización bacteriana en el cuerpo humano comienza durante nacimiento (Costello *et al.*, 2012), y se va diversificando a lo largo de nuestra vida. Se sabe que la composición varía y se modifica dependiendo de factores como, la dieta, estado nutricional, edad, sexo genética propia del hospedero, enfermedad, uso de antibióticos, hábitos, actividad física, estado social, industrialización, factores ambientales, entre otros (Ley *et al.*, 2006), existiendo un margen considerable para la variación interindividual entre individuos fenotípicamente similares y sanos (Tuddenham and Sears, 2015), lo que sugiere una relación extremadamente estrecha entre la microbiota y el hospedero y mucho más compleja y dinámica que una simple causa y efecto.

Se conocen cinco Phylum principales encontrados en el tracto gastrointestinal para contribuir a la salud humana y a la enfermedad: Firmicutes (Gram positivos), Bacteroidetes (Gram negativos), con una abundancia menor pero considerable de Actinobacteria (Gram positivos), Verrucomicrobia (Gram negativos) y Proteobacterias (Gram negativos), con la mayoría de las especies no patógenas (Eckburg *et al.*, 2005). La microbiota intestinal comprende aproximadamente 3.8×10^{13} células bacterianas que generalmente exhiben comensalismo con el hospedero, generando una relación e interacción equilibrada mutuamente beneficiosa, conocida como homeostasis o también llamada eubiosis intestinal, ejerciendo y modulando efectos funcionales metabólicos, fisiológicos e inmunológicos, tanto localmente como en sitios remotos del origen (Yu and Schwabe, 2017); perturbaciones de la microbiota intestinal, denominada disbiosis, se han asociado con múltiples enfermedades. El tracto gastrointestinal se encuentra dividido en dos partes principales, el cuerpo (fundus) y el antro, las cuales presentan diferentes funciones y, por ende, diferentes tipos celulares, lo que permite que diferentes poblaciones bacterianas comensales colonicen, generando complejas interacciones intercelulares (Sobala *et al.*, 1991).

Los avances de las técnicas de secuenciación genómica microbiana de próxima generación (NGS) han facilitado el estudio de las asociaciones e interacciones entre la microbiota intestinal y el hospedero dando una nueva visión integradora de la contribución potencial de la microbiota intestinal a la salud y la enfermedad (Allegretti *et al.*, 2019) para llegar a conclusiones biológicamente factibles y clínicamente útiles.

II. Antecedentes

2.1 Microbiota, dieta, salud y enfermedad

El cuerpo humano está continuamente expuesto a células microbianas, tanto residentes como transitorias, así como a sus subproductos, incluidos los metabolitos tóxicos. La circulación de metabolitos tóxicos puede contribuir al inicio o a la progresión del cáncer en ubicaciones anatómicas distantes de donde reside un microorganismo en particular. Por otra parte, los microbios pueden migrar a otras ubicaciones en el cuerpo humano, asociándolos con el desarrollo de tumores (Rajagopala *et al.*, 2017).

El tracto gastrointestinal contiene un ecosistema microbiano abundante y diverso formado por más de 100 billones de microorganismos (Holleran *et al.*, 2017), que expresan más de 2 millones de genes, los cuales codifican las rutas metabólicas que finalmente producen miles de metabolitos (Gilbert *et al.*, 2018). En contraste, es sorprendente observar que el genoma humano está compuesto por solo 23,000 genes (Duffy *et al.*, 2015).

La microbiota intestinal modula diversos procesos fisiológicos en el hospedero que son críticos para la salud y función del mismo entre las que se encuentran: la función fisiológica, homeostasis de la mucosa, secreción gastrointestinal, arquitectura intestinal, integridad de la barrera epitelial, secreción y motilidad del tracto gastrointestinal, inflamación, comunicación entre el eje bidireccional microbioma-intestino-cerebro, funciones neuro-siquiátricas, ambiente tumoral y sobre todo una influencia sustancial en el desarrollo y regulación de la inmunidad innata y adaptativa (Hooper y Gordon, 2001). La separación anatómica de la microbiota intestinal del hospedero y las células epiteliales es fundamental para regular la activación inmune y mantener las asociaciones microbianas mutualistas.

La función de barrera intestinal interrumpida o deteriorada puede desencadenar un desequilibrio en la composición de la microbiota intestinal induciendo, prolongando y exacerbando efectos perjudiciales para la salud como la inflamación crónica, un factor clave para la carcinogénesis (Garrett, 2015; Lloyd-Price *et al.*, 2016). A este desequilibrio se le conoce como disbiosis. La disbiosis o alteración del equilibrio microbiano en el intestino es caracterizada por alteraciones en la estructura y función de la microbiota intestinal y puede aumentar la susceptibilidad a una variedad de enfermedades inmunomediadas, incluidas el cáncer colorrectal (CCR), carcinoma hepatocelular (CHC), cáncer gástrico (GC), síndrome del intestino irritable (SII), enfermedad inflamatoria intestinal (EII), esclerosis múltiple (EM), diabetes mellitus, obesidad, asma/alergias, enfermedad celiaca (EC) y salud mental (Guarner and Malagelada, 2003; Riiser, 2015). Una comunidad microbiana disbiótica, en general, produce un ambiente propenso a enfermedades con propiedades pro- o antiinflamatorias. Hay 10 agentes biológicos específicos que han sido designados por la Agencia Internacional para la investigación del cáncer como carcinógeno para los humanos (de Martel *et al.*, 2012). Un ejemplo de asociación de infección bacteriana y el cáncer está clásicamente representado por *Helicobacter pylori* y su participación en el desarrollo del adenocarcinoma gástrico.

La colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn son ejemplos bien conocidos de disfunción de la barrera intestinal contribuyendo al riesgo de cáncer de colon. Uno de los tipos de cáncer más mortales es el cáncer de esófago, caracterizado por evolucionar de la inflamación debido a la

esofagitis por reflujo a la metaplasia. Estudios recientes muestran un papel potencial de la microbiota en condiciones de salud y de enfermedad (Snider *et al.*, 2016).

La dieta juega un papel importante como modulador y regulador de la estructura, función y en la determinación de la composición de la microbiota. Existen reportes que sugieren que es un determinante crítico de la variación de la microbiota intestinal, superando incluso la genética del hospedero. La evidencia creciente sugiere un vínculo entre la dieta, la microbiota y los resultados clínicos (Lawrence *et al.*, 2014), ya que las bacterias intestinales facilitan la digestión de la fibra insoluble, producen vitaminas como la vitamina K y elaboran compuestos tróficos e inmunomoduladores como los ácidos grasos de cadena corta (Bibbò *et al.*, 2016). Para ejercer su efecto, los ácidos grasos de cadena corta (AGCC) interactúan con receptores específicos expresados en la superficie del epitelio intestinal, tejido adiposo, páncreas y en células inmunes como macrófagos y células dendríticas, estos receptores son acoplados a proteína G (FFAR3 también conocido como GPR41, FFAR2 o GPR43 y GPR109A también conocido como receptor de ácido hidroxicarboxílico 2 o HCA2; Brown *et al.*, 2003), cuya función es la detección de los metabolitos producidos por las bacterias intestinales comensales. Estas interacciones inducen mecanismos que juegan un papel clave en el mantenimiento de la homeostasis en el intestino y otros órganos, cumpliendo funciones protectoras para promover la supresión de la inflamación y la carcinogénesis en el intestino y otros órganos mediada por fibras dietéticas, microbiota intestinal y AGCC, favoreciendo la salud intestinal del hospedero (Hamer *et al.*, 2008).

La microbiota intestinal residente puede mediar los efectos antiinflamatorios mediante la producción de metabolitos, incluidos los AGCC, a partir de prebióticos, ya que se ha visto que pueden suprimir la respuesta inmunitaria y regular la permeabilidad intestinal. Los elementos específicos de nuestra dieta llamados prebióticos son particularmente influyentes en la estructura y función de la microbiota. Sus efectos beneficiosos pueden estar relacionados con los prebióticos contenidos en la fibra y almidones de algunas frutas, verduras y tubérculos (Andermann *et al.*, 2016). Los prebióticos, son hidratos de carbono no digeribles o también llamados carbohidratos complejos que, al igual que los almidones, son fermentados por las bacterias comensales intestinales anaerobias obligadas para producir AGCC. Aunque la fermentación de carbohidratos en el colon es el principal origen de los AGCC, estos también pueden producirse de forma natural a través de las vías metabólicas del hospedero, especialmente en el hígado a partir de la oxidación de ácidos grasos y a partir de proteínas que se hidrolizan en aminoácidos, que luego son fermentados por el ecosistema bacteriano en AGCC. Por lo tanto, la producción de AGCC que se produce en el intestino a menudo se denomina fuente exógena de AGCC, y AGCC producido durante el metabolismo celular como la fuente endógena (Pouteau *et al.*, 2003). Los AGCC son ácidos orgánicos carboxílicos definidos por la presencia de una cola alifática de dos a seis carbonos que les confieren la característica de ser volátiles, por ejemplo, el acetato (C₂), propionato (C₃) y butirato (C₄), cuya relación molecular en individuos sanos es 60:20:20 respectivamente. Las proporciones pueden variar en función de factores como la dieta, la composición de la microbiota intestinal, lugar de fermentación y genotipo del hospedero (Hamer *et al.*, 2008). Los AGCC se utilizan como fuente de energía y nutrientes por las células epiteliales intestinales (CEI), de tal manera que mejoran la salud general y son particularmente influyentes en la estructura y función de la microbiota (Smith *et al.*, 2013).

El proceso de producción de AGCC a partir de fibra involucra vías enzimáticas complejas que están activas en una gran cantidad de especies bacterianas. La vía más general de producción

de AGCC en bacterias es a través de la vía glucolítica, aunque ciertos grupos de bacterias como las bifidobacterias pueden utilizar la vía de las pentosas fosfato para producir los mismos metabolitos (Cronin *et al.*, 2011; Macfarlane and Macfarlane, 2003). La vía Wood-Ljungdahl sensible al oxígeno se considera como la vía más eficiente de producción de acetato, donde la mayoría de bacterias pertenecen al phylum Firmicutes (Fast and Papoutsakis, 2012). Otras vías, como la vía de las bifidobacterias (vía de la fructosa-6-fosfato fosfocetolasa) que se encuentran en el género *Bifidobacterium* son capaces de utilizar monosacáridos en una manera única de generar en última instancia AGCC (Pokusaeva *et al.*, 2011). Especies de bacterias caracterizadas por sus altos niveles de producción de butirato incluyen, *Clostridium leptum*, *Faecalibacterium prausnitzii* y especies de Coprococcus (Guilloteau *et al.*, 2010). El género *Bifidobacterium* fermenta vigorosamente las fibras dietéticas para producir acetato. Géneros pertenecientes al phylum Firmicutes como *Roseburia*, *Eubacterium*, *Anaerostipes* contribuyen también a la producción de altas cantidades de AGCC (Litvak *et al.*, 2018). La producción de AGCC es un proceso muy complejo y dinámico, por ejemplo, el butirato y el propionato se pueden degradar en acetato por bacterias acetogénicas reductoras de sulfato o nitrato tales como especies de *Acetobacterium*, *Acetogenium*, *Eubacterium* y *Clostridium*. Sin embargo, una mayor proporción de especies productoras o consumidoras de butirato como *F. prausnitzii* y especies de *Roseburia* puede revertir este proceso (Duncan *et al.*, 2004). Por tanto, la compleja y delicada interacción dentro de la microbiota también puede controlar la proporción y los niveles de AGCC en la luz intestinal (Tan *et al.*, 2014).

Las bacterias intestinales y sus productos influyen en la activación y diferenciación de poblaciones de células como por ejemplo las inmunes. Esta influencia se produce no sólo en el intestino, sino también en sitios distantes que incluyen la médula ósea. Algunos AGCC son fundamentales en las vías antiinflamatorias a través de la inducción de Células T reguladoras (Tregs) a través de interacciones con receptores acoplados a proteína G, produciendo citocinas antiinflamatorias (por ejemplo IL-10). Lo anterior puede modular la incidencia y la gravedad de la enfermedad injerto contra hospedero (EICH) además de la regulación general de la función y mantenimiento de la homeostasis inmune en el intestino (Narushima *et al.*, 2014; Smith *et al.*, 2013).

El butirato es una molécula terapéutica atractiva debido a su amplia gama de funciones biológicas, tiene propiedades antiinflamatorias, es un metabolito energético importante en la producción de ATP, funciona como fuente importante de energía para los colonocitos (células epiteliales del colon), además promueve la función de la barrera intestinal aumentando la resistencia transepitelial eléctrica y disminuyendo así la permeabilidad de inulina y al aumentar la expresión de las proteínas de unión, lo que disminuye la permeabilidad epitelial intestinal. Además, el butirato junto con el propionato son inhibidores de las desacetilasas de histonas (HDAC), por lo tanto, epigenéticamente influye en la función de las células inmunes innatas y adaptativas (Woo and Alenghat, 2017), provocando hiperacetilación de histonas, lo que finalmente resulta en la activación de genes antiinflamatorios (Schilderink *et al.*, 2013). Adicionalmente, el butirato presenta función inmunomoduladora, ya que ayuda a las células T a diferenciarse hacia células Treg (Sun *et al.*, 2017). Un ejemplo de esto último, es la producción de butirato por *Eubacterium limosum* (Corrêa-Oliveira *et al.*, 2016). Las principales bacterias productoras de butirato son anaerobias obligadas, las bajas concentraciones de O₂ en el colon crean un nicho favorable para ellos. Además, el butirato absorbido y metabolizado por el epitelio consume O₂ (local) y, por lo tanto, estabiliza el factor inducible por hipoxia (HIF, un factor de transcripción que coordina la protección de barrera; Kelly and Colgan, 2016). Por otra parte, el acetato producido por bacterias acetogénicas es un protector contra patógenos del intestino.

Otra de sus funciones es aumentar la amortiguación de algunos tipos de factores alimenticios. También funciona como sustrato para la síntesis de colesterol y de ácidos grasos de cadena larga (AGCL), mientras que el propionato se toma como un sustrato para la gluconeogénesis en el hígado, contituyendo un 45-60% a la síntesis de glucosa. Tanto el acetato como el propionato se encuentran en la sangre portal y eventualmente son metabolizados por el hígado o los tejidos periféricos. (Fig. 1; Josefsdottir *et al.*, 2017).

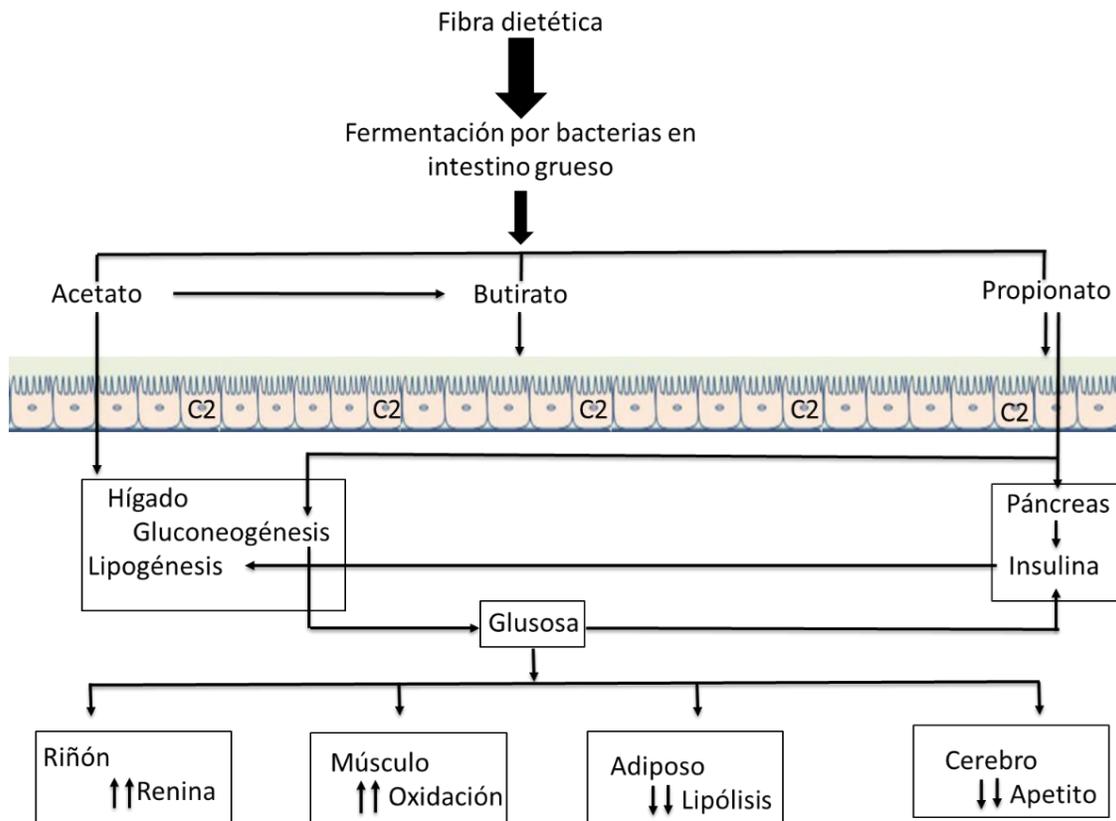


Figura 1. Interacciones multidireccionales de los ácidos grasos de cadena corta (AGCC). Las flechas indican las posibles rutas y participación que pueden tener los ácidos grasos (acetato, propionato y butirato) en los diferentes tejidos y órganos del cuerpo (Imagen modificada de Shallis *et al.*, 2017).

Dado que la capa de moco que recubre el epitelio es un depósito de péptidos antimicrobianos e inmunoglobulinas y proporciona la primera línea de defensa contra las bacterias intestinales, a su vez esta capa de moco es rica en composición de polisacáridos, que pueden servir como fuente de nutrientes para subconjuntos de bacterias. Por lo tanto, si existe un consumo en la dieta reducido en hidratos de carbono y fibra puede aumentar la dependencia microbiana hacia los polisacáridos mucosos, lo que resultaría en una degradación de la capa mucosa y aumento de la susceptibilidad a los patógenos oportunistas, translocación bacteriana y a la inflamación (Desai *et al.*, 2016; Johansson *et al.*, 2014). La relación de la microbiota intestinal y la salud o enfermedad del hospedero, está estrechamente relacionada con las rutas metabólicas de estas bacterias, los metabolitos secundarios y la actividad enzimática que estas presentan. Por lo tanto, la producción de AGCC a partir de la dieta es necesaria para el mantenimiento y función de una mucosa intestinal íntegra y sana.

2.2 Trasplante de Células Precursoras Hematopoyéticas (TCPH)

Estudios realizados en 1959 en modelos de ratón llevaron al reconocimiento de que células vivas de médula ósea podían ser trasplantadas de un animal a otro. A finales de los años 60 inició la época moderna del Trasplante de Células Precursoras Hematopoyéticas (TCPH) cuando se realizaron TCPH en Leucemias avanzadas, Inmunodeficiencia severa, y Síndrome Wiskott Aldrich. En la actualidad ha incrementado la aceptación del TCPH para el tratamiento de enfermedades genéticas como aquellas que afectan la función del eritrocito (talasemia, enfermedad de células falciformes), la función de los granulocitos (agranulocitosis y enfermedad granulomatosa crónica), la función plaquetaria (Síndrome de Wiskott Aldrich, megacariocitosis congénita) y errores innatos del metabolismo. Como la primera fuente tisular para la obtención de las células progenitoras hematopoyéticas fue la médula ósea (MO). El trasplante de células progenitoras hematopoyéticas (TCPH) fue llamado persistentemente trasplante de médula ósea (TMO), sin embargo, después de un largo tiempo, el término resultó inadecuado cuando esas células se obtuvieron de otras fuentes, como la sangre periférica (SP) y el cordón umbilical (CU). Con el avance del conocimiento y la purificación de diversos tipos de células madre, ese campo terapéutico creció y se denomina actualmente terapia celular. Esta rama de la medicina comprende, todos aquellos tratamientos que utilizan células progenitoras para la reconstrucción estructural o funcional del organismo afectado. Aunque la MO, SP y CU siguen siendo las fuentes principales de células madre, desde la perspectiva del TCPH, la terapia celular ha incorporado otras células, por ejemplo, las células progenitoras mesenquimatosas y de la misma manera se han incorporado otras fuentes de tejido adiposo. El TCPH es una terapia que puede salvar vidas para pacientes con trastornos hematológicos malignos y no malignos, en el cuál se administran dosis muy elevadas de quimioterapia que puede estar o no acompañada de radioterapia. Dado que es un procedimiento que consiste básicamente en reemplazar la médula ósea dañada por una sana y que conlleva a la eliminación de células cancerosas y no cancerosas, tras el tratamiento es indispensable suministrar progenitores hematopoyéticos que son células inmaduras en la médula ósea que dan origen a todas las células sanguíneas diferentes para que de esta manera reemplacen aquellas células que fueron eliminadas. Existen tres tipos básicos de trasplantes que se denominan en función de la fuente de donde provienen las células madre: autólogo o autotrasplante, cuando las células provienen del mismo paciente a trasplantar; alogénico o alotrasplante, donde las células provienen de un donante compatible con o sin parentesco con el paciente y por último el trasplante singénico o isotrasplante, cuando las células provienen de un hermano(a), gemelo(a) o trillizo(a) idéntico(a) (Duarte, 2012).

2.3 Microbiota, Trasplante de células precursoras hematopoyéticas (TCPH) e inmunidad

En los receptores de trasplante de células precursoras hematopoyéticas (TCPH) la disbiosis, ha sido directamente asociada y caracterizada por complicaciones que incluyen inflamación intestinal, expansiones de bacterianas potencialmente patógenas que causan infecciones cuyas afecciones son una amenaza a la salud pública principalmente dada por *Clostridioides difficile* (anteriormente llamado *Clostridium difficile*), desarrollo de la enfermedad injerto contra hospedero (EICH), rechazo, recaída de la enfermedad, daño a la mucosa intestinal y diarrea que son comunes después del TCPH, y que a menudo son causas importantes de morbilidad y mortalidad en estos pacientes consecuentes de los regímenes preparatorios administrados que incluyen, altas dosis de quimioterapia, radiación y la exposición extensa a los antibióticos sistémicos generando perturbaciones en las comunidades bacterianas, lo cual conduce a

alteraciones profundas en la diversidad de especies bacterianas existentes, provocando una disminución en la riqueza, diversidad y uniformidad de las comunidades bacterianas comensales o peor aún una erradicación notable de estas (Dethlefsen *et al.*, 2008), o inclusive surgimiento de especies bacterianas, incluido el crecimiento excesivo de especies patógenas con genes de resistencia a antibióticos (ARG), causando un impacto negativo en la homeostasis inmunológica, aumentando la susceptibilidad y derivando a agentes disbióticos y a enfermedades inmunomediadas del tracto gastrointestinal y en otros sitios del cuerpo, creando microambientes susceptibles a enfermedades. Una estrategia central utilizada por el hospedero para mantener su relación homeostática con la microbiota es minimizar el contacto entre microorganismos y la superficie celular epitelial, lo que limita la inflamación del tejido y la translocación microbiana. En el tracto gastrointestinal, hogar de la mayor densidad de comensales, esta segregación se logra mediante la acción combinada de las células epiteliales, moco, inmunoglobulina A (IgA) el cual es el isotipo más abundante secretado en mamíferos y juega un papel fundamental en dar forma a las interacciones tempranas con la microbiota, así como a mantener la diversidad, compartimentación y equilibrio de la microbiota a través de la vida, además se ha visto que previene la adhesión de bacterias comensales a las superficies epiteliales, péptidos antimicrobianos y células inmunes. Las IgA producidas por el tejido linfático asociado al intestino (GALT) también contribuyen al mantenimiento de la barrera intestinal, la selección de microbiomas y la disminución de la activación de la inmunidad innata. Las bacterias comensales también cumplen función homeostática produciendo compuestos antimicrobianos, lo que permite controlar las poblaciones bacterianas patógenas. La producción de moco intestinal proporciona un escudo primario que limita el contacto entre la microbiota y el tejido del hospedero, previniendo también la translocación microbiana. El daño a la mucosa y como tal a la integridad de la barrera de defensa a nivel intestinal y a sus componentes celulares propios como las células de Paneth (CP) que son un tipo de células del epitelio del intestino delgado, células caliciformes (colonocitos) asociadas al epitelio del intestino grueso o colon, células neuroendocrinas y las células propias del sistema inmune asociado al intestino inducido por estos tres principales regímenes preparatorios los cuales, tienen una considerable actividad contra comensales de protección, lleva a grandes cambios en la microbiota intestinal de los pacientes permitiendo que las bacterias puedan penetrar la lámina translocándose, lo que puede activar al sistema inmunitario innato e iniciar una inflamación local y sistémica (Taur and Pamer, 2013; Andermann *et al.*, 2016; Cammarota *et al.*, 2017; Fig. 2). La inflamación transitoria es una respuesta inmunológica defensiva que restaura la lesión del tejido y elimina los agentes patógenos, cuando se rompe el equilibrio en las comunidades bacterianas, y el dominio de los patógenos se hace persistente dará como resultado una respuesta inflamatoria crónica que puede generar severos daños, inclusive cáncer (Cruz and Balkwill, 2015).

El daño a la cripta intestinal del intestino delgado inducido por los regímenes preparatorios del trasplante afecta la producción de péptidos antimicrobianos de las células de Paneth que juegan un papel importante en limitar la exposición a la microbiota comensal. Estas proteínas pueden ejercer funciones, incluido el ataque enzimático de la pared celular bacteriana o disrupción de la membrana interna bacteriana. Algunas de estas moléculas como las α -defensinas, son expresadas constitutivamente por las células epiteliales, mientras que en otros casos la participación de receptores de reconocimiento de patrones (PRR) requieren productos derivados de comensales para su producción. Uno de los péptidos antimicrobianos de la mucosa mejor caracterizado es Reg3 α . La producción de esta lectina está estrechamente controlada por la microbiota de una manera dependiente de MyD88 y tiene un efecto microbicida directo sobre las bacterias grampositivas, por ejemplo limita el crecimiento excesivo de enterococos. La acumulación de péptidos antimicrobianos contribuye al mantenimiento de la segregación entre

la microbiota y el hospedero, manteniendo una mucosa intestinal sana e intacta. En parte, estas respuestas son controladas por detección directa de microbios o sus productos por las células epiteliales que integran múltiples señales para garantizar la integridad de la barrera y de la homeostasis, incluidas las de los receptores Toll-like y receptores de ácidos grasos de cadena corta (AGCC; Kinnebrew *et al.*, 2012; Macia *et al.*, 2015). Los productos del metabolismo de bacterias comensales que alcanzan la circulación impactan el desarrollo y, además, en el sistema inmune del hospedero, también pueden influir en la hematopoyesis y la función de las células hematopoyéticas. Recientemente han surgido pistas sobre las funciones inmunes importantes para equilibrar la microbiota al ver la coevolución de las comunidades microbianas con su hospedero desde una perspectiva ecológica, lo que sugiere que el sistema inmune mantiene la homeostasis al dar forma a la microbiota para que sea beneficiosa. Las células linfoides innatas (ILC) se enriquecen en sitios de barrera y en la mucosa, varios subconjuntos de ILC se han identificado. Sin embargo, se ha prestado especial atención a ILC3 por su estrecha interacción con la microbiota. Entre otros factores, estas células producen IL-22, una citocina de importancia central en el mantenimiento de la inmunidad y fisiología del tejido a través de su acción pleiotrópica en la promoción de la producción de péptidos antimicrobianos, mejorando la regeneración epitelial, aumentando la producción de moco, y regulando la reparación de heridas. La producción de IL-22 por ILC puede promover la contención de miembros específicos de la comunidad microbiana que reside en las estructuras linfoides de las mucosas (Qiu *et al.*, 2013).

La mayoría de las células Th17 y Th1 se encuentran en sitios de barrera como el tracto gastrointestinal (GI) y se desarrollan en respuestas derivadas de la microbiota. Las citocinas características de las células Th17, IL-17A, IL-17F e IL-22 pueden promover la producción de péptidos antimicrobianos por células epiteliales reforzando las uniones estrechas de células epiteliales (Bevins and Salzman, 2011). Por otra parte, las células T reguladoras (Treg), un subconjunto de células TCD4 juegan un papel dominante en el control del complejo equilibrio inmunológico, ya que mantienen la homeostasis en la periferia y la mucosa a lo largo de la vida del hospedero, una interrupción de la homeostasis de estas células en el GI da como resultado la pérdida de tolerancia y desarrollo de respuestas efectoras aberrantes en el intestino, ya que son responsables de mantener la respuesta inmune a antígenos extraños. Las bacterias intestinales participan con el sistema inmune en mamíferos regulando la diferenciación de células T pro- y antiinflamatorias a través de diversas vías, entre las cuales se encuentra la vía TLR (Cully, 2019). El polisacárido A, producido por distintas bacterias comensales como *Bacteroides fragilis* puede desencadenar la señalización de TLR2, la cual cumple una función de barrera y regulación intestinal y la expansión de las células Treg que producen la citocina antiinflamatoria IL-10, ayudando a mantener la homeostasis inmune regulando así las poblaciones de células Th1, Th2 y Th17 que si se ven aumentadas pueden desencadenar enfermedades autoinmunes, inflamación y patogénesis. Por ejemplo, un perfil alto de citocinas tipo Th1 puede generar una respuesta proinflamatoria que puede contribuir a un aumento de la permeabilidad en el epitelio intestinal favoreciendo el acceso de mayores cargas de antígenos a la submucosa. Por otra parte, cantidades minúsculas de lipopolisacárido (LPS), componente importante de la pared celular de bacterias Gram negativas, liberadas por patógenos infecciosos pueden iniciar potentes respuestas inmunitarias innatas y adaptativas que preparan al sistema inmunológico contra infecciones posteriores. Sin embargo, cuando la respuesta al LPS no se controla adecuadamente, generalmente debido a una proliferación excesiva de poblaciones bacterianas patógenas ante un suceso disbiótico puede provocar un síndrome de choque séptico fatal (Park and Lee, 2013).

Cuando la complicación es dada por infección, las bacterias oportunistas, por ejemplo *C. difficile* o *Enterococcus*, pueden expandirse, adquiriendo características patógenas y por lo tanto ejercer efectos patobiológicos. La infección por *C. difficile* (CDI) bacteria Gram-positiva, es una de las infecciones asociadas a la atención de salud más comunes en todo el mundo y es una de las principales causas hospitalarias que provoca colitis y diarreas severas debido a las toxinas dañinas que produce. La incidencia por CDI se asocia principalmente al uso inadecuado de antibióticos que agota la comunidad microbiana sana, lo que lleva a la disbiosis permitiendo un mayor crecimiento de *C. difficile* (Warny et al., 2005).

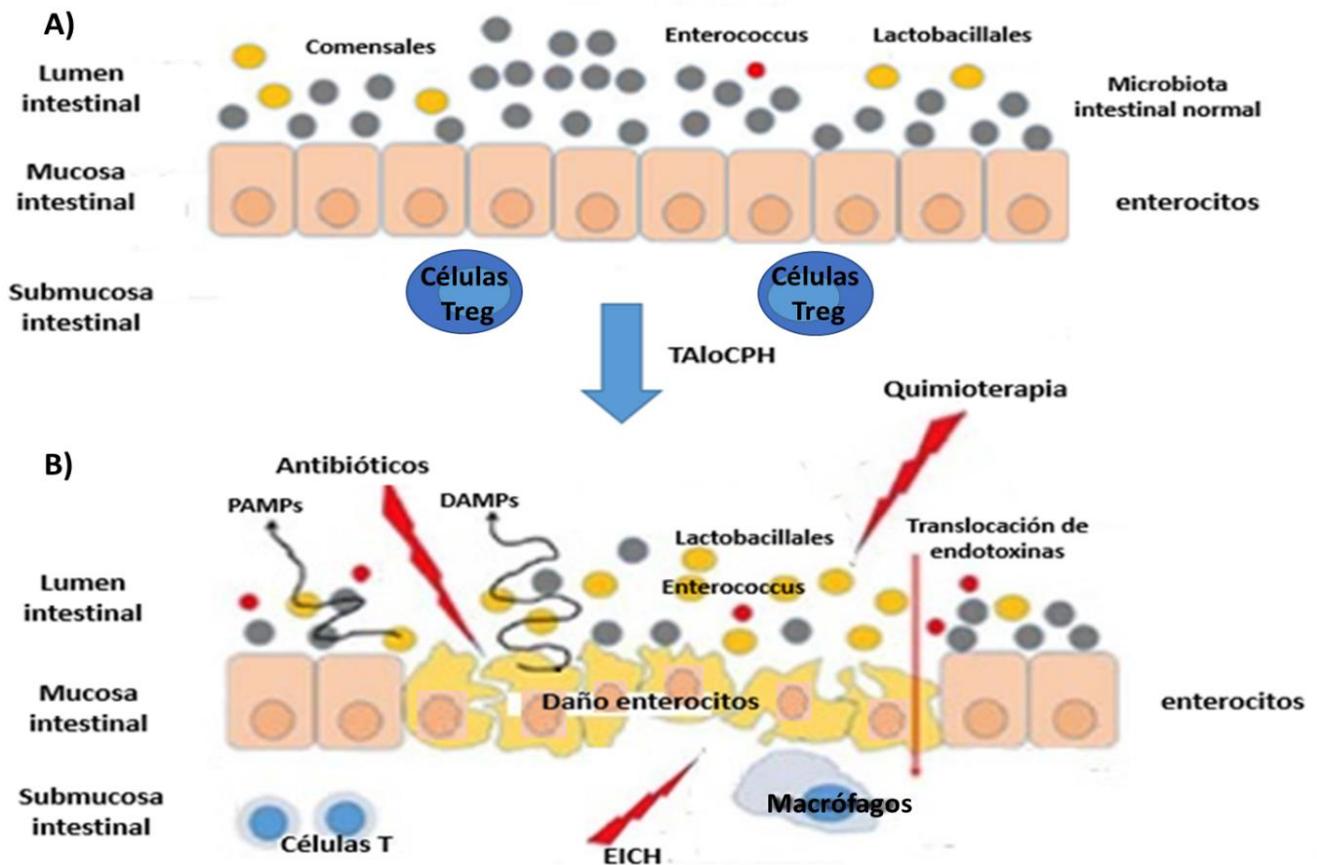


Figura 2. Interacciones entre la microbiota intestinal y la mucosa en pacientes sometidos a trasplante de precursores hematopoyéticos (Imagen modificada de Shallis *et al.*, 2017). En la imagen A) se puede observar la relación homeostática entre la microbiota, las células epiteliales intestinales y las células inmunes. La imagen B) muestra una condición disbiótica dada durante y después del tratamiento, caracterizada principalmente por expansiones de bacterias potencialmente patógenas, daño a la integridad de la barrera intestinal y a sus componentes celulares propios, inducidos por los regímenes preparatorios los cuales, tienen una considerable actividad contra comensales de protección, llevando a grandes cambios en la microbiota intestinal de estos pacientes permitiendo que las bacterias puedan penetrar la lámina translocándose, producción de PAMPs y DAMPs, lo que conlleva a una activación del sistema inmune innato y una posterior activación del sistema inmune adaptativo que producirá una inflamación local crónica.

Cuando existe una homeostasis en el intestino grueso, los colonocitos sanos mantienen condiciones anaeróbicas en la luz intestinal ya que su metabolismo asegura un rápido y alto consumo de oxígeno epitelial debido a la fosforilación oxidativa y a la oxidación de ácidos grasos. Dichas condiciones de hipoxia epitelial ayudan a mantener una comunidad microbiana dominada por organismos anaerobios obligados que son considerados como simbioses comensales. Estos tienden a ser aquellos que proporcionan beneficios al consumir fibra dietética convirtiéndola en productos de fermentación como los ácidos grasos de cadena corta (AGCC) que son absorbidos por las células del hospedero y son beneficiosos para su salud proveyéndolo de nutrientes. Si hay un cambio en el metabolismo de los colonocitos debido a un daño consecuente de la enfermedad misma o de los regímenes preparatorios, como el uso de antibióticos, el epitelio se oxigena. El aumento de oxígeno en la luz intestinal produce disbiosis permitiendo la expansión de organismos anaerobios facultativos (tolerantes al oxígeno) que incluyen géneros patógenos oportunistas, esto a su vez generará un aumento en la producción de óxido nítrico (NO) que posteriormente se convertirá en nitrato (NO_3^- ; Litvak *et al.*, 2018. Fig. 3).

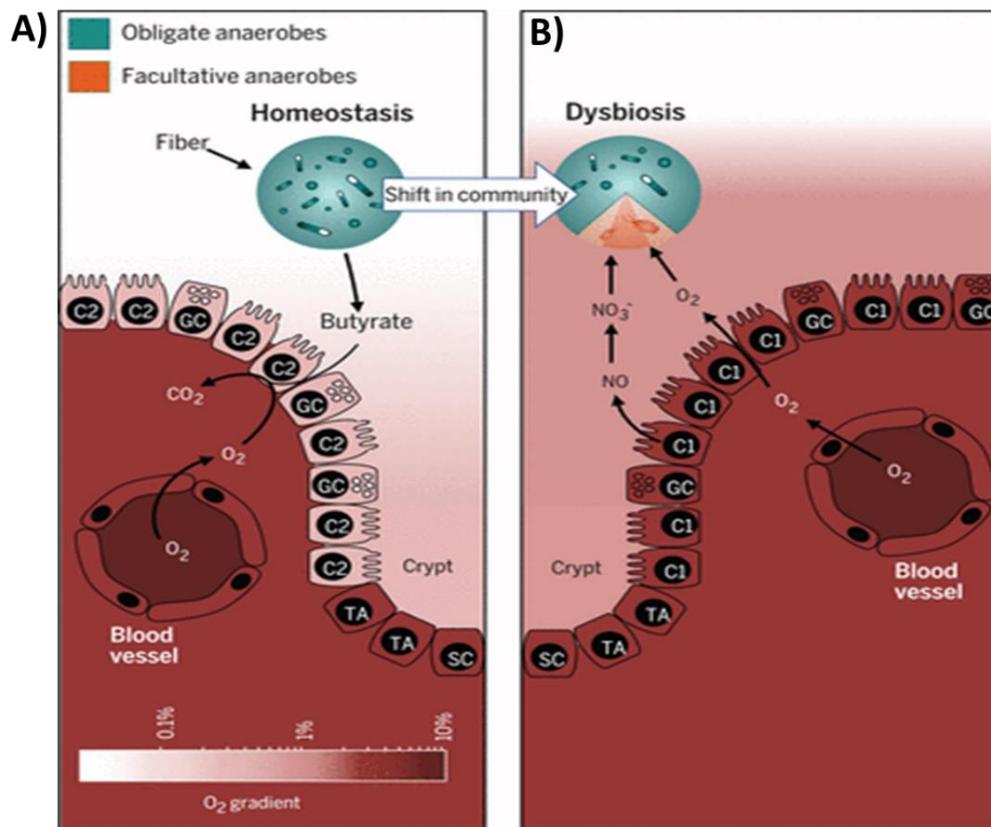


Figura 3. El metabolismo epitelial da forma a la microbiota colónica. El panel A) muestra una condición de homeostasis en el intestino, donde los colonocitos con un metabolismo eficiente (C2) mantienen condiciones anaeróbicas (hipoxia intestinal) en la luz intestinal manteniendo una comunidad microbiana dominada por bacterias anaerobias obligadas consideradas como simbioses comensales, los cuales proporcionan beneficios para la salud. B) un daño en la cripta intestinal consecuente de los regímenes preparatorios para tratar la enfermedad, propicia que el epitelio se oxigene, debido a que los colonocitos cambian de metabolismo a tipo C1, lo cual significa que su eficiencia para la captación de oxígeno se ve drásticamente disminuida. Este aumento de oxígeno en la luz intestinal produce disbiosis permitiendo la expansión de organismos anaerobios facultativos que particularmente incluye géneros patógenos oportunistas, esto a su vez generará un aumento en la producción de óxido nítrico (NO) que posteriormente se convertirá en nitrato, el cual es perjudicial para la salud. La escala de colores en la parte inferior indica los niveles de oxígeno (O_2 ; Litvak *et al.*, 2018).

Antes del trasplante se inicia una cascada de liberación de citocinas inflamatorias, que incluyen el factor de necrosis tumoral (TNF), los interferones de tipo I e interleucina IL-1 e IL-6 (Xun *et al.*, 1994). Estas citocinas no solo modifican directamente la composición intestinal, sino también regulan la expresión del complejo principal de histocompatibilidad y moléculas coestimuladoras inmunes, creando las condiciones óptimas para el desarrollo de EICH. El aumento de la permeabilidad intestinal inducida por el daño tisular permite la translocación de endotoxinas a través de la mucosa intestinal, amplificando además la activación del sistema inmune innato del hospedero (Teshima *et al.*, 2002).

En los últimos años diversos estudios han mostrado el papel de la microbiota después del TCPH mostrando la importancia de la pérdida de diversidad de la microbiota del intestino haciendo énfasis en la función, con un aumento significativo en la mortalidad y una disminución en la supervivencia en aquellos individuos con una baja diversidad α de bacterias, resaltando así las complejas interacciones entre la microbiota intestinal y los pacientes sometidos a TCPH (Taur *et al.*, 2014).

2.4 Leucemia

Las leucemias son cánceres que se originan en las células que normalmente madurarían hacia los diferentes tipos de células sanguíneas. Con más frecuencia, la leucemia se origina en formas tempranas de glóbulos blancos, pero algunas leucemias comienzan en otros tipos de células sanguíneas. Existen varios tipos de leucemia que se dividen basándose principalmente en si la leucemia es aguda (repentino y rápido crecimiento) o crónica (crecimiento más lento). En la leucemia aguda, las células cancerosas se multiplican rápidamente. En la leucemia crónica, la enfermedad progresa lentamente y los primeros síntomas pueden ser muy leves. La leucemia también se clasifica según el tipo de célula. La leucemia que afecta a las células mieloides se denomina leucemia mielógena. Las células mieloides son células sanguíneas inmaduras que normalmente se convertirían en granulocitos o monocitos. A la leucemia que afecta a los linfocitos se llama leucemia linfocítica. Hay cuatro tipos principales de leucemia: leucemia mielógena aguda (LMA), leucemia linfocítica aguda (ALL); leucemia mielógena crónica (LMC) y leucemia linfocítica crónica (CLL).

2.5 Leucemia mieloide y linfoide aguda

Las leucemias agudas son proliferaciones neoplásicas de células hematopoyéticas inmaduras cuya acumulación progresiva se acompaña de una disminución de la producción de las células sanguíneas normales (disminución de leucocitos, eritrocitos y plaquetas). Son el resultado de una mutación somática en una única célula madre hematopoyética, que desencadena una proliferación clonal de células leucémicas inmaduras. La célula en la que se produce la transformación leucémica es un precursor que pierde la capacidad de seguir su proceso normal de maduración (Merino, 2010).

Dentro de las leucemias agudas existen dos grandes grupos, dependiendo del tipo de célula que prolifera (*leucemia linfoblástica* si la célula neoplásica tiene un origen linfoide, o *leucemia mieloblástica* si la célula neoplásica es de origen mieloide).

A la leucemia linfocítica aguda (ALL) también conocida como leucemialinfoblástica aguda significa que se origina de las formas tempranas (inmaduras) de los linfocitos, un tipo de glóbulo blanco. Cuando el precursor es de origen mieloide, se desarrolla una leucemia mieloide aguda

(LMA). AL igual que ALL la LMA es un desorden caracterizado por células progenitoras de la médula ósea, infiltración de la sangre periférica y otros tejidos por células neoplásicas del sistema hematopoyético; así como la interrupción de la hematopoyesis normal ocasionando la disminución de los componentes linfoides y mieloides de la sangre (Head, 2002).

Existen diversas complicaciones debido al trasplante de progenitores hematopoyéticos, entre las cuales se puede mencionar las reacciones por toxicidad a medicamentos inmunosupresores, las infecciones y la enfermedad de injerto contra hospederio (EICH; Castro *et al.*, 2003).

EICH es un síndrome clínico derivado de la reacción de las células inmunocompetentes del donador contra los tejidos del receptor, siendo una de las principales complicaciones en el trasplante de células progenitoras hematopoyéticas alogénicas. Este síndrome se puede clasificar de acuerdo con el tiempo de evolución y las manifestaciones clínicas que se presenten. Se puede presentar forma aguda o crónica. En la forma aguda, el principal compromiso es cutáneo semejando las formas severas a la necrosis tóxica epidérmica. También puede ser digestivo, caracterizado principalmente por síndrome diarreico, náuseas, vómitos, dolor abdominal y hepático con alza de la bilirrubina. En la forma crónica existen diversas complicaciones, entre ellas la esclerodermia y la disfunción hepática (Castro *et al.*, 2003, Skert *et al.*, 2006). Tanto la terapia inmunosupresora como el EICH ponen en peligro serio al paciente de contraer infecciones severas, siendo las más frecuentes por citomegalovirus como Herpes zóster y Varicelle zóster.

2.6 Identificación de la microbiota mediante secuenciación del Gen 16S Ribosomal

En las últimas décadas, uno de los principales avances en el campo de los estudios de microbiomas ha sido la capacidad de aplicar enfoques independientes del cultivo para determinar la composición del microbioma (Costa and Weese, 2019). Estas tecnologías permiten la identificación y cuantificación de componentes de la microbiota humana mediante el estudio de ácidos nucleicos (DNA y RNA) de muestras fecales u otras muestras biológicas (Amrane *et al.*, 2018), a partir de secuenciación de alto rendimiento, tecnología que dio paso a enfoques moleculares que han abierto nuevas fronteras en el análisis de la comunidad microbiana al proporcionar un medio rentable no solo para identificar y caracterizar los filotipos de microbios presentes en las muestras, sino también para proporcionar información sobre las funciones y la estrecha relación hospederio-microbiota, reemplazado más allá a los cultivos tradicionales que solo identifican especies específicas de la microbiota intestinal, permitiendo una ventana a la diversidad de comunidades microbianas y un avance significativo en el análisis de microbiomas. Estos estudios han revolucionado la comprensión de las comunidades microbianas en nuestros cuerpos y han ayudado a investigar el papel que desempeñan estos microorganismos en los procesos de salud y enfermedad humana (Fuks *et al.*, 2018).

Los estudios metagenómicos se realizan comúnmente mediante el análisis del gen ribosomal procariótico 16S (16S rRNA) que es un componente de la subunidad pequeña 30S, el cual tiene aproximadamente 1.500 pb de longitud y contiene nueve regiones variables intercaladas entre regiones altamente conservadas entre diferentes especies de bacterias.

Las regiones variables de 16S rRNA son frecuentemente utilizadas en clasificaciones filogenéticas como el género o inclusive la especie en diversas muestras (Fig. 4). Aunque el gen rRNA 16S ha sido el pilar de análisis bacteriano basado en las secuencias durante décadas, la secuenciación de alto rendimiento del gen completo se ha convertido recientemente en una

realidad perspectiva, ya que las secuencias de lectura corta no pueden lograr la resolución taxonómica que se tiene secuenciando el gen completo, con esta técnica se pueden detectar con precisión variantes de un solo nucleótido en todo el gen, por lo tanto es suficiente para resolver diferencias intragenómicas (Johnson *et al.*, 2019).

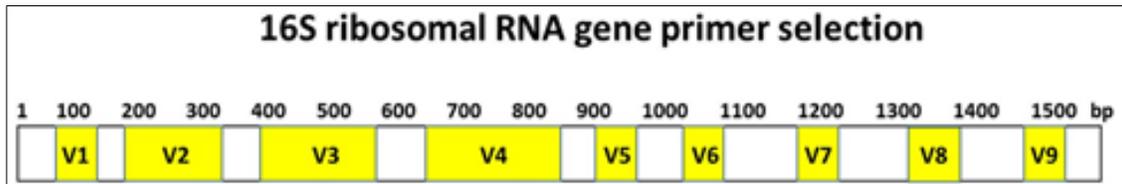


Figura 4. Diagrama del Gen ribosomal 16s (16S rRNA). Constituido por aproximadamente 1.500 pb. El gen 16S rRNA se encuentra formado por nueve regiones variables intercaladas entre regiones altamente conservadas entre diferentes especies de bacterias. Los recuadros amarillos corresponden a las 9 regiones variables, los blancos a las regiones altamente conservadas. Tomada de: <http://omegabioservices.com/index.php/16s-reference/>

Esta revolución en la tecnología de secuenciación, combinada con el desarrollo de herramientas computacionales avanzadas que explotan los metadatos para relacionar cientos de muestras entre sí en formas que revelan claros patrones biológicos, ha revitalizado los estudios del gen 16S rRNA (Tringe and Hugenholtz, 2008). Los estudios de 16S rRNA proporcionan una vista de qué taxones microbianos están presentes en una muestra dada porque es un excelente marcador filogenético. La transición de la secuenciación de Sanger a la secuenciación de Illumina ha abierto nuevos horizontes en el análisis de la comunidad microbiana al permitir recopilar cientos de miles de secuencias que abarcan cientos de muestras (Lazarevic *et al.*, 2009).

Gracias a las técnicas actuales de secuenciación de próxima generación para la secuenciación genómica masiva, se descubrió que, el microbioma es un factor de riesgo independiente para el aumento mortalidad después de TCPH alogénico (Jenq *et al.*, 2012; Taur *et al.*, 2014).

2.7 Identificación de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) mediante cromatografía de gases

La cromatografía es un método físico de separación, en el cual los componentes que se van a separar se distribuyen entre dos fases; una de estas fases constituye una capa estacionaria de gran área superficial, la otra es un fluido que eluye a través o a lo largo de la fase estacionaria. La fase estacionaria puede ser un sólido o un líquido y la fase móvil puede ser un líquido o un gas. De este modo, todos los tipos de cromatografía que se conocen caen en cuatro categorías: líquido-sólido, gas-sólido, líquido-líquido y gas-líquido. Su gran capacidad para resolver muestras complejas ha conducido a utilizarla cada vez más como técnica analítica, utilizando siempre la separación por elución. Entre las técnicas cromatográficas utilizadas con fines analíticos, la cromatografía de gases (CG) o también llamada cromatografía de partición gas-líquido (CGL), es probablemente la técnica más utilizada; ninguna técnica analítica puede ofrecer su capacidad de separación o su sensibilidad a la hora de analizar compuestos volátiles. Por lo general, la utilización de la cromatografía de gases está restringida a la separación de compuestos con un peso molecular menor de 1000 a una temperatura máxima de trabajo de aproximadamente 44°C, la única limitación existente será la estabilidad térmica de la muestra (Day and Underwood, 1986).

Por lo tanto, debido a la complejidad de la estructura de los ácidos grasos y a la dificultad de determinar exactamente la composición de una grasa mediante los análisis tradicionales, la cromatografía de gases se ha convertido en una herramienta indispensable para establecer el perfil de ácidos grasos.

III. Justificación

Según lo reportado por Globocan en 2020 las leucemias se encuentran en el noveno lugar de incidencia, mortalidad y prevalencia, si bien no se encuentran en los primeros cinco lugares, se ha visto que la población más afectada a causa de esta neoplasia es la población económicamente activa (20-50 años). Estudios realizados en otros países han demostrado que la composición de la microbiota intestinal influye en la respuesta al tratamiento en estos pacientes. Dada la importancia de la composición y diversidad de la microbiota intestinal pretendemos caracterizar la población bacteriana en pacientes mexicanos con Leucemias Agudas y la presencia de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) asociados con dichas poblaciones bacterianas.

IV. Hipótesis:

Después de un trasplante de células precursoras hematopoyéticas la composición de la microbiota intestinal en pacientes se verá modificada con un mayor dominio de *Enterococcus*, *Streptococcus* o bacterias gramnegativas anaerobias facultativas pertenecientes al phylum Proteobacteria así como la producción de AGCC.

V. Objetivos

5.1 Objetivo General

Identificar la composición y diversidad de la microbiota intestinal en pacientes mexicanos con leucemia aguda sometidos a TCPH y su relación con la respuesta al tratamiento.

5.2 Objetivos particulares

1. Identificar la composición y diversidad bacteriana intestinal de los pacientes con Leucemias agudas sometidos a trasplante antes, durante y después del tratamiento.
2. Comparar la diversidad de poblaciones bacterianas en el mismo paciente y entre pacientes.
3. Comparar la composición y diversidad de las poblaciones bacterianas entre pacientes y controles.
4. Identificar y determinar los niveles de (AGCC, Butirato, acetato y propionato) en los diferentes tiempos de toma de muestra.

VI. Materiales y métodos

6.1 Población de estudio

Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética en Investigación y el Comité de Investigación del Instituto Nacional de Cancerología (INCan) y se obtuvo el consentimiento informado por escrito de todos los sujetos, tanto pacientes como controles. En el INCan se trasplantan en promedio 40 pacientes de los cuales en promedio son 15 de tipo Alogénico. La población total para este estudio fue de 22 sujetos (9 hombres y 13 mujeres), de los cuales 11 fueron pacientes con Leucemias Agudas (mieloide y linfoide) sometidos a Trasplante de Células Precursoras Hematopoyéticas (TCPH) (6 hombres y 5 mujeres) y 11 sujetos fueron considerados como grupo control (3 hombres y 8 mujeres; los cuales eran cuidadores directos del paciente). La población de estudio fue captada por el Servicio de Trasplante de Médula Ósea del INCan.

6.2 Criterios de inclusión, exclusión y eliminación

Para la población de estudio se utilizaron los siguientes criterios de inclusión: 1) mayores de 18 años (pacientes y controles), 2) para el caso de los pacientes tenían que ser candidatos a TCPH, 3) No tener algún trasplante previo y 4) aceptar participar de forma voluntaria, para el caso del grupo control era necesario que 1) no presenta enfermedades crónicas o algún proceso infeccioso, 2) habitar en el mismo domicilio que el paciente, 3) sin toxicomanías y 4) aceptar participar de forma voluntaria.

Los criterios de exclusión fueron los siguientes: 1) los pacientes habían usado recientemente (<1 mes) antibióticos, 2) pacientes con diagnóstico previo de patología maligna diferente 3) pacientes y controles presentaran algún proceso infeccioso y 4) pacientes y controles con alguna afectación cognitiva que les impidiera aceptar participar de forma voluntaria

Y por último para los criterios de eliminación se consideró lo siguiente: 1) abandono del estudio y/o tratamiento y 2) muerte.

6.3 Recolección de muestras

Para el análisis bacteriano se colectaron 3 muestras de heces correspondientes a diferentes tiempos (antes del tratamiento/inicio, en la neutropenia y 30 días después del trasplante/recuperación) con un total de 3 muestras por paciente, mientras que del grupo control solo se tomó una muestra al inicio del estudio. Después de la recolección, las muestras de materia fecal (MF) se almacenaron a -80°C en el laboratorio de microbiología hasta la extracción de DNA.

6.4 Extracción de DNA bacteriano y amplificación por PCR

El DNA bacteriano se extrajo usando el kit de extracción de DNA de QIAGEN (QIAamp® PowerFecal® DNA Kit), la concentración y la pureza fueron medidas por dos metodologías la primera mediante un espectrofotómetro EPOCH y la segunda medición se realizó mediante fluorometría para confirmar la concentración de DNA previo a la secuenciación. Siguiendo las instrucciones del fabricante, después de la extracción de DNA, se agregaron 100 µl de solución de agua inyectable y las muestras fueron almacenadas a -80°C hasta el análisis de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La amplificación de fragmentos de DNA bacteriano 16S rRNA se llevó a cabo a partir de las regiones variables V3-V4 proveniente de las muestras de MF tanto de pacientes como de sujetos control empleando un control interno (*E. coli*). Los primers utilizados fueron:

16S Amplicon PCR Forward Primer = 5' TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG
16S Amplicon PCR Reverse Primer = 5' GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC

Los productos de PCR se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 1% y luego fueron secuenciados utilizando la plataforma Illumina Miseq en el Laboratorio Nacional en Salud de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala de la UNAM. La obtención de los primeros amplicones ≈550pb, fue necesaria para la posterior preparación de bibliotecas de DNA (amplicones ≈630pb).

6.5 Secuenciación del gen 16s ribosomal

Para la Secuenciación de las muestras de pacientes y controles se empleó la plataforma Illumina Miseq, la cual se dividió en 3 etapas según el protocolo:

- 1) Preparación de bibliotecas:** Donde los fragmentos de DNA unidos con los adaptadores son amplificados y purificados obteniendo amplicones ≈550pb. Después de esta primera amplificación y purificación se precede a una segunda en donde los amplicones son indexados obteniendo amplicones de un tamaño ≈630pb, en este paso cuando los amplicones son indexados se les considera bibliotecas, los cuales después de ser normalizados se cerciora de que el pool de las bibliotecas presenta una distribución adecuada para su posterior secuenciación (Fig. 5). La indexación permite distinguir una muestra de otra.

Amplificación por PCR a partir de DNA genómico utilizando primers específicos de la región de interés con adaptadores

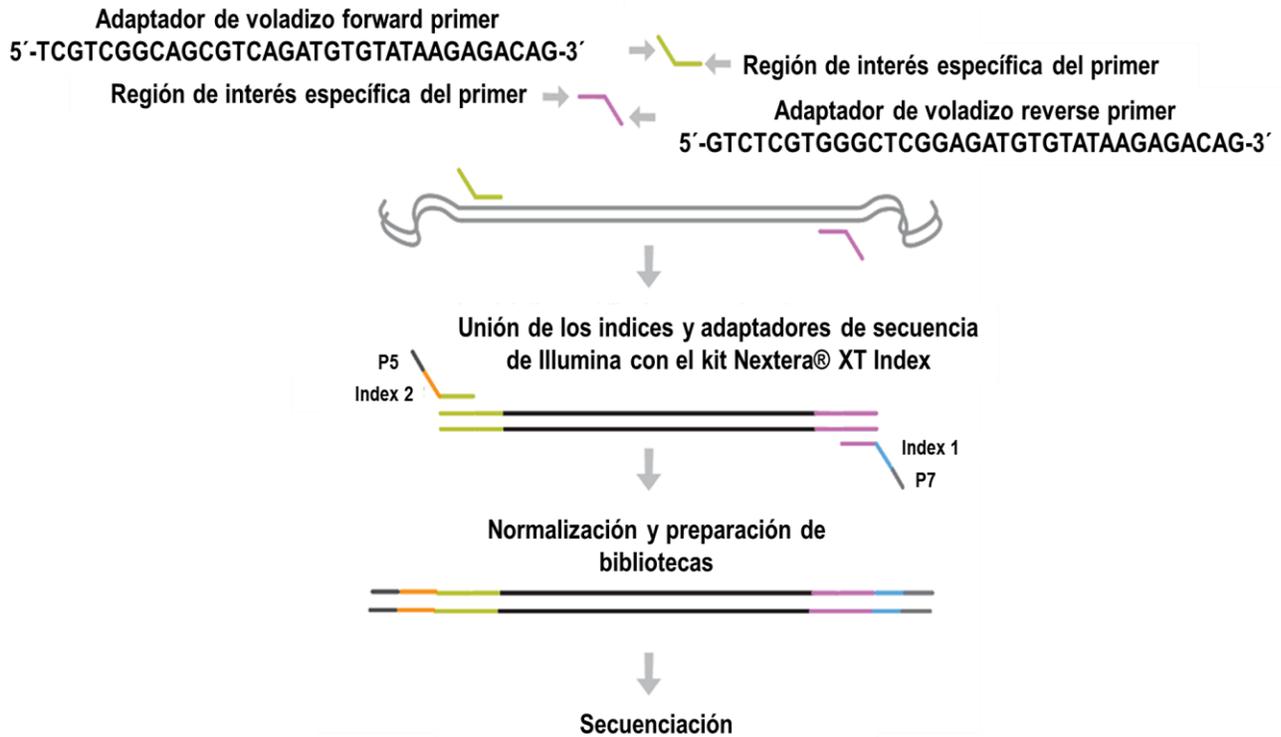


Figura 5. Diagrama de flujo de Trabajo para la preparación de bibliotecas para la secuenciación de las regiones variables V3 y V4 16S. Tomada de: support.illumina.com

- 2) **Generación de cluster:** Cada fragmento es amplificado y la amplificación en fase sólida crea hasta 1.000 copias idénticas de cada molde de moléculas. La amplificación se realiza por PCR de puente (Fig. 6. Illumina.com).

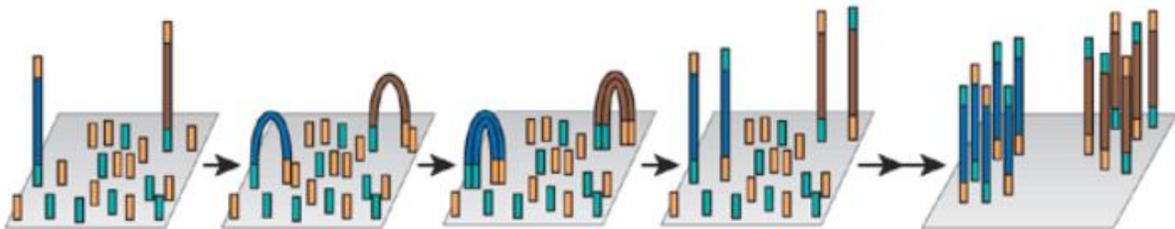


Figura 6. Amplificación en puente mediante el método de Illumina®. Los fragmentos se amplifican a partir de unos cebadores unidos a una superficie sólida/flow cell. Para la secuenciación de las cadenas sencillas se añade un cebador, mientras que para el DNA de doble cadena se elimina la cadena original, dejando la cadena complementaria como molde para la segunda secuenciación. (Tomada de: Shendure and Ji, 2008; Bentley *et al.*, 2008)

- 3) Secuenciación por síntesis (SBS):** Se secuencian cadenas molde de DNA por ciclos repetidos en los que se va añadiendo cada base de forma individual. La tecnología SBS de Illumina utiliza cuatro terminadores reversibles, cada uno marcado con un fluoróforo diferente, de forma que se detecta en el equipo cada base cuando son incorporadas a las cadenas moldes de DNA. Los cuatro terminadores reversibles se encuentran ligados a los nucleótidos y bloquean la polimerización, por lo que la enzima polimerasa sólo puede añadir una base a cada cadena de DNA que se está sintetizando. Al añadirse los cuatro nucleótidos simultáneamente y no secuencialmente, se produce una competencia por lo que se minimizan los errores de incorporación. Después de cada ciclo de incorporación, se eliminan los terminadores y se determina la identidad de la base insertada por la excitación inducida por láser de los fluoróforos y la consiguiente formación de imágenes que se registran (Bentley *et al.*, 2008).

6.6 Análisis bioinformático

Las secuencias para el análisis de composición taxonómica se analizaron utilizando el paquete de software Quantitative Insights Into Microbial Ecology (QIIME) software pipeline V1.9 se utilizaron para procesar los archivos de secuenciación (Caporaso *et al.*, 2010). Los criterios para filtrar las salidas de secuencias para secuencias de baja calidad fueron: cualquier secuencia que sea <200 bp o > 620 bp, secuencias con cualquier desajuste de nucleótidos con el código de barras o el cebador, secuencias con una puntuación de calidad media de <30 (valor de Fred) y secuencias con bases ambiguas >0. Se verificaron las secuencias en busca de quimeras con Gold.fa y se filtraron las secuencias quiméricas. El 94.2% de las secuencias pasaron el filtrado, lo que resultó en 1,678,450 ± 38146.51 secuencias / muestra.

Para mostrar las abundancias relativas de bacterias en muestras de sujetos control y pacientes, se realizó un análisis de rarefacción de las secuencias de 16S rRNA bacteriano con base en la tabla de OTUS, y los resultados se mostraron usando el software R. La diversidad dentro de la muestra se estimó a una profundidad de rarefacción de >6429 lecturas por muestra. La taxonomía se asignó en función de la base de datos de taxonomía de referencia de GreenGenes. Así, el 99.9%, 99.9%, 99.9%, 98.7%, 76.6% y 43.8% de las lecturas se asignaron al nivel de filo, clase, orden, familia, género y especie, respectivamente. Se calculó la medida de diversidad alfa (Shannon).

Se calcularon índices de diversidad beta UniFrac ponderados y no ponderados utilizando el software QIIME, para realizar el análisis de componentes principales (PCoA) para visualizar datos complejos y multidimensionales. Los PCoA se produjeron utilizando Emperor. Este análisis es informativo en el sentido que puede dar lugar a diferentes percepciones sobre los factores que dan forma a la composición de las comunidades bacterianas (García-Mazcorro *et al.*, 2018).

Para determinar la diferencia en la abundancia relativa OTU de géneros y especies entre los diferentes grupos, se generaron mapas de calor a nivel de especie utilizando el script de QIIME “otu_ca-tegory_significance.py”, que usa un ANOVA para determinar si la abundancia relativa de OTU es diferente entre los diferentes puntos de toma de muestra; finalmente, se utilizaron las 32 y 10 especies bacterianas más significativas y se calculó la matriz de distancia de Bray-Curtis.

El tamaño del efecto del análisis discriminante lineal (LDA/LEfSe) se utilizó con el fin de analizar y determinar la contribución y variabilidad de las bacterias que explican las diferencias en la microbiota del grupo control y de los pacientes con leucemia aguda. Este tipo de análisis realiza una prueba de Wilcoxon que sirve para comparar el rango medio de dos muestras relacionadas y determinar si existen diferencias entre ellas, en este caso basándose en las abundancias relativas de aquellas especies que realmente son significativas tanto para el grupo control como para los diferentes puntos de toma de muestra en los pacientes. Este estudio es muy informativo ya que determina la importancia de la magnitud de la variación en especies bacterianas entre los dos grupos, de esta manera las especies bacterianas que estén contribuyendo o aportan un LDA score ≥ 1 podrían ser consideradas como posibles biomarcadores específicos {"https://es.wikipedia.org/wiki/Estad%C3%ADstica_no_param%C3%A9trica" \o "Estadística no paramétrica"}.

6.7 Análisis de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) en materia fecal (MF) por cromatografía de gases (GC)

La evaluación del perfil de ácidos grasos se llevó a cabo en un cromatógrafo de gases (GC). La identificación de ácidos grasos se realizó con base en las curvas de calibración y el tiempo de retención de estándares individuales de ácidos grasos. Se identificaron los principales AGCC (acetato, propionato y butirato) en cada una de las muestras de pacientes y grupo control

El análisis cromatográfico se llevó a cabo utilizando un sistema GC Agilent 6890N equipado con un detector de ionización de llama (FID) y un N10149 muestreador automático de líquidos (Agilent, EE. UU.). Una columna capilar de sílice fundida con una fase ácida libre de grasa (Agilent DB-225MS de 30 m, 0.25 mm y 0.25 μ m). Se suministró hidrógeno como gas portador a un caudal de 1.4 ml / min. La sobretemperatura inicial fue de 100°C, se mantuvo durante 0,5 min, se elevó a 145°C a 8°C/min y se mantuvo durante 1,0 min, luego aumentó la temperatura a 200°C a 40°C / min y finalmente se mantuvo a 200°C durante 5 min. Detector 225°C con un flujo de H₂ 35 ml/min y de Aire 400 ml/min. El volumen de muestra inyectado para el análisis de GC fue de 1 μ l y el tiempo de ejecución para cada análisis fue de 17,5 min. Se preparó una solución de ácido 2-etilbutírico que contenía ácido fórmico al 12% como solución madre de patrón interno. La solución patrón madre se almacenó a -20°C hasta su uso.

Muestras y su preparación: Se utilizaron muestras de heces de pacientes mexicanos con leucemia aguda y del grupo control. Se descongelaron alícuotas de aproximadamente 1g, dado que la MF se encontraba diluída con agua inyectable, se procedió a realizar los cálculos correspondientes de la cantidad en gramos de MF contenida en dichas alícuotas (los cálculos se muestran en el anexo 2). Después, el pH de la suspensión se ajustó a 2-3 mediante la adición de 4 a 5 gotas de HCl concentrado, posteriormente las muestras se disgregaron y homogenizaron a temperatura ambiente por 6 min. en el equipo Tissue lyser. La suspensión se transfirió a un tubo de polipropileno y se centrifugó durante 20 min a 5000 rpm, dando un sobrenadante transparente. Una vez extraído el sobrenadante (600 μ l aprox), se tomaron alícuotas de 198 μ l, se añadió al sobrenadante 2 μ l de solución de ácido 2-etilbutírico, a una concentración final de 1 mm, se verificó que el pH fuera ácido (2-3) y posteriormente el sobrenadante se inyectó en el GC para su análisis. La acidificación fue necesaria para asegurar la protonación de los AGCC antes del análisis por GC. Se ha reportado que la acidificación podría disminuir las interacciones entre los AGCC y otras sustancias presentes en las heces, lo que da como resultado una mayor disponibilidad de AGCC por determinar (Tomaino *et al.*, 2001).

6.8 Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando GraphPad Prism v7.0 utilizando ANOVA de una vía seguido de una prueba de Tukey post hoc.

Los datos obtenidos a partir de la Cromatografía de gases para el análisis de AGCC fueron analizados con la prueba de normalidad Shapiro-Wilks, para determinar si los datos se comportaban de manera normal y realizar así las pruebas estadísticas correspondientes, dado que los datos no se comportaban de manera normal se realizó la prueba estadística no paramétrica de U-Mann Whitney.

VII. Resultados

7.1 Secuenciación del gen 16s rRNA regiones V3-V4

Los amplicones obtenidos del primer PCR se muestran a continuación, de algunas muestras no se logra observar banda (Fig. 7) esto se debió probablemente a que el gel era demasiado grueso, dado que estas muestras pudieron ser secuenciadas, por lo cual se recomienda que se realice por medio de capilaridad en donde se utiliza un mínimo de muestra (1µl) y es un método mucho más sensible.

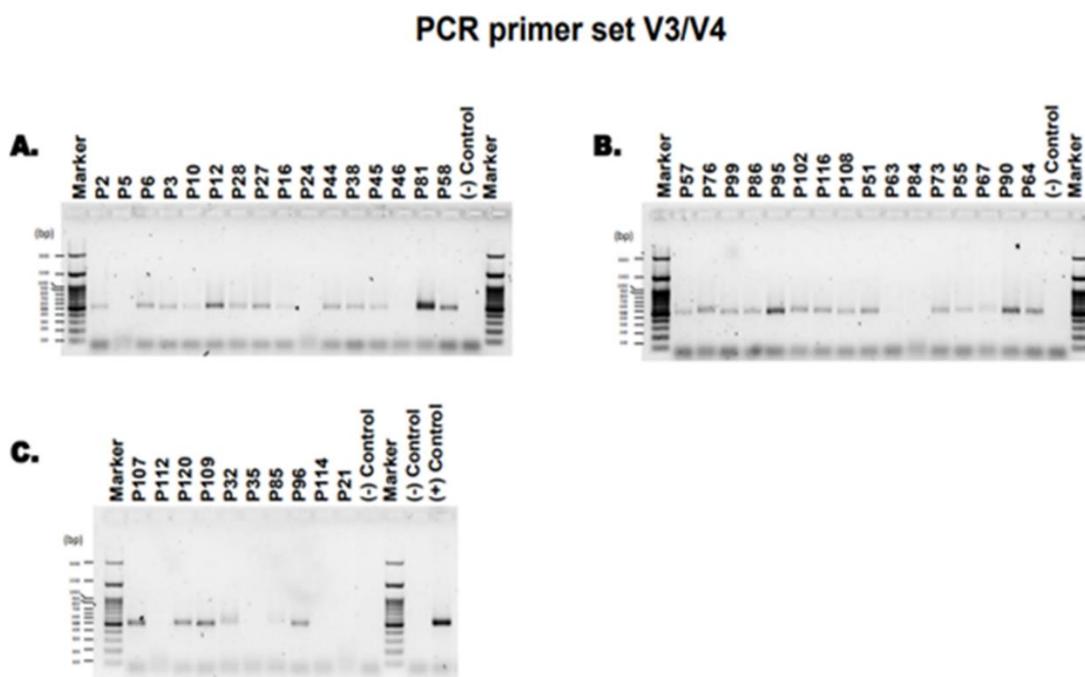


Figura 7. Amplicones de DNA bacteriano ≈ 550 pb provenientes de las muestras de heces de pacientes y controles. El DNA se corrió en un gel de agarosa al 1%. El panel A, B y C muestran la respectiva banda para cada una de las muestras para el grupo control y pacientes. Como control interno positivo se utilizó DNA de *Escherichia Coli*. De las muestras P5, 24, 46, 63, 84, 112, 35 y 114 no se logró visualizar banda.

Este paso fue necesario para generar las bibliotecas de DNA provenientes de las muestras, la validación de las mismas se llevó a cabo mediante el análisis en el equipo de electroforesis de alta resolución Bioanalyzer, mostrando una distribución de tamaños adecuada para su secuenciación (Fig. 8).

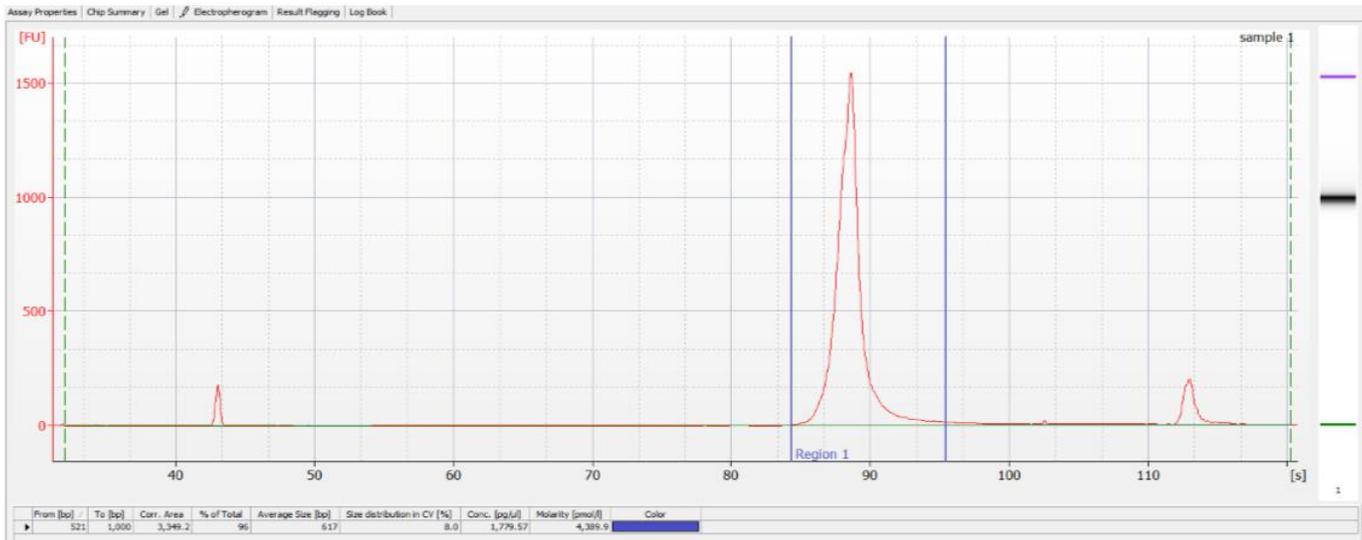


Figura 8. Análisis de calidad de las bibliotecas a secuenciar mediante el perfil Bioanalyzer. En la imagen se puede observar que todas las muestras presentaron una distribución adecuada para secuenciar.

El análisis profundo de secuenciación del gen 16S rRNA se utilizó específicamente para estudiar la microbiota intestinal del sistema operativo mediante la eliminación de 16S rRNA de unidades taxonómicas operacionales (OTUs) de baja calidad (“raras”), secuenciación quimérica (dímeros de primers) y singletons. Se logró asignar las mismas OTU después de la eliminación, un total de secuenciación de 1,782,013 de lecturas del gen 16S rRNA (Tabla 1).

Se realizó una visualización de forma estadística de las lecturas totales obtenidas, mediante el programa FastQC. En donde se asignó un valor de Phred ≥ 30 , por lo que fueron eliminadas todas aquellas lecturas que no cumplían con el valor de calidad asignado (Fig. 9), finalmente se obtuvieron 1,678,450 secuencias de genes de 16S rRNA de alta calidad (94.2% del total de lecturas).

Total de lecturas iniciales	1,782,013
Total de Lecturas filtradas	1, 678,450 (94.2%)
Lecturas promedio por muestra	38146.591
Mínimo	6429.0
Máximo	105706.0
Secuencias representativas	975 OTUS

Tabla 1. Lecturas obtenidas a partir de la secuenciación del gen 16S rRNA. Se muestran las lecturas totales obtenidas, el promedio, el máximo y mínimo así como las secuencias representativas de las mismas.

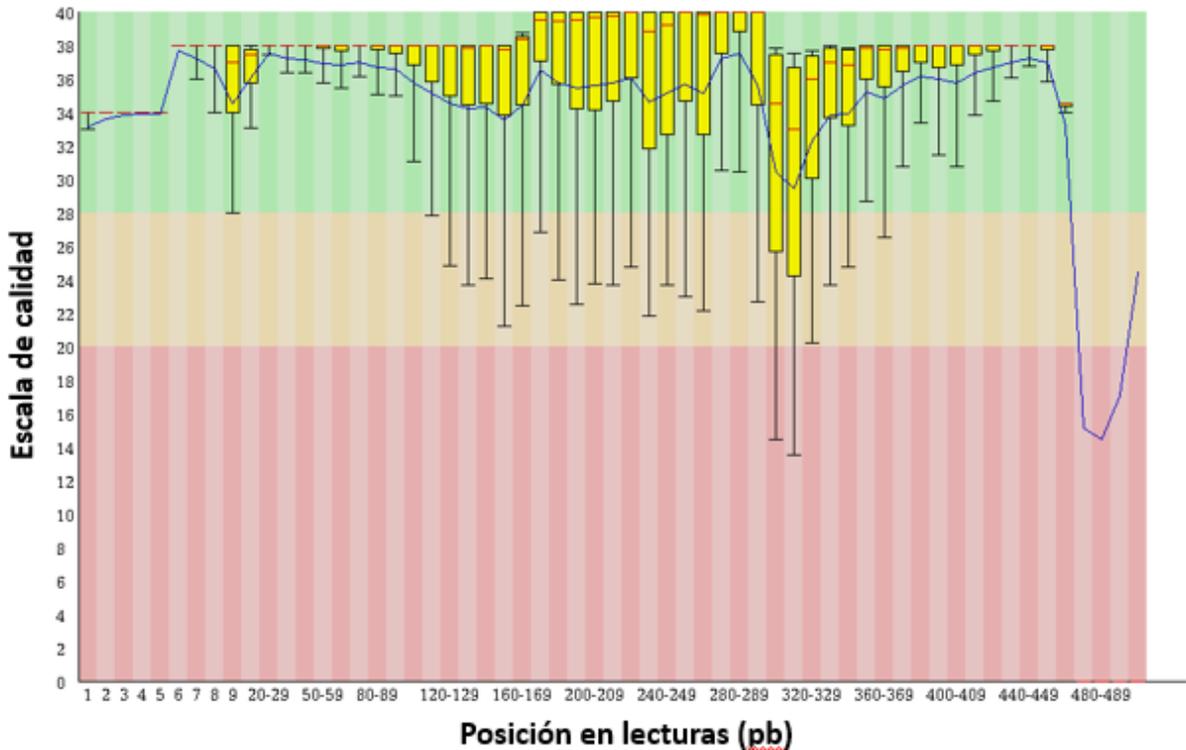


Figura 9. Nivel de calidad Phred. Determinación automática de secuencias consenso precisas basadas en la calidad de secuenciación. Rojo: mala calidad, naranja: mediana calidad, verde: buena calidad. La distribución indica que la calidad de la secuenciación fue buena.

Las secuencias representativas seleccionadas se compararon con la base de datos Green genes para asignar la taxonomía. La asignación del porcentaje de lecturas para los niveles taxonómicos se puede visualizar en la Tabla 2.

Nivel	Lecturas	%
Total de lecturas filtradas	1, 678,450	100%
Phylum	1,678,450	100%
Class	1,678,026	99.97%
Order	1,676,813	99.90%
Family	1,657,051	98.72%
Genus	1,286,740	76.66%
Specie	736,404	43.87%

Tabla 2. Porcentajes de la taxonomía asignada para phylum, clase, orden, familia, género y especie.

Considerando la variabilidad de las lecturas (máximo y mínimo) se realizó el análisis de rarefacción para visualizar las muestras individualmente y ver su profundidad individual. Las curvas de rarefacción mostraron que a pesar de la variación en el número de secuencias obtenidas por muestra, todas las muestras lograron alcanzar la asíntota. Esto fue posible visualizarlo al momento en el que se realizó un corte al número mínimo de lecturas obtenidas (6426) por lo cual, todos los análisis de diversidad subsecuetes se realizaron sobre una tabla rarificada al mismo número de lecturas, con una profundidad de secuenciación de 6426 (Fig. 10), por lo tanto, esto con la fialidad de poder realizar comparaciones en cuanto a la diversidad que existe entre las muestras.

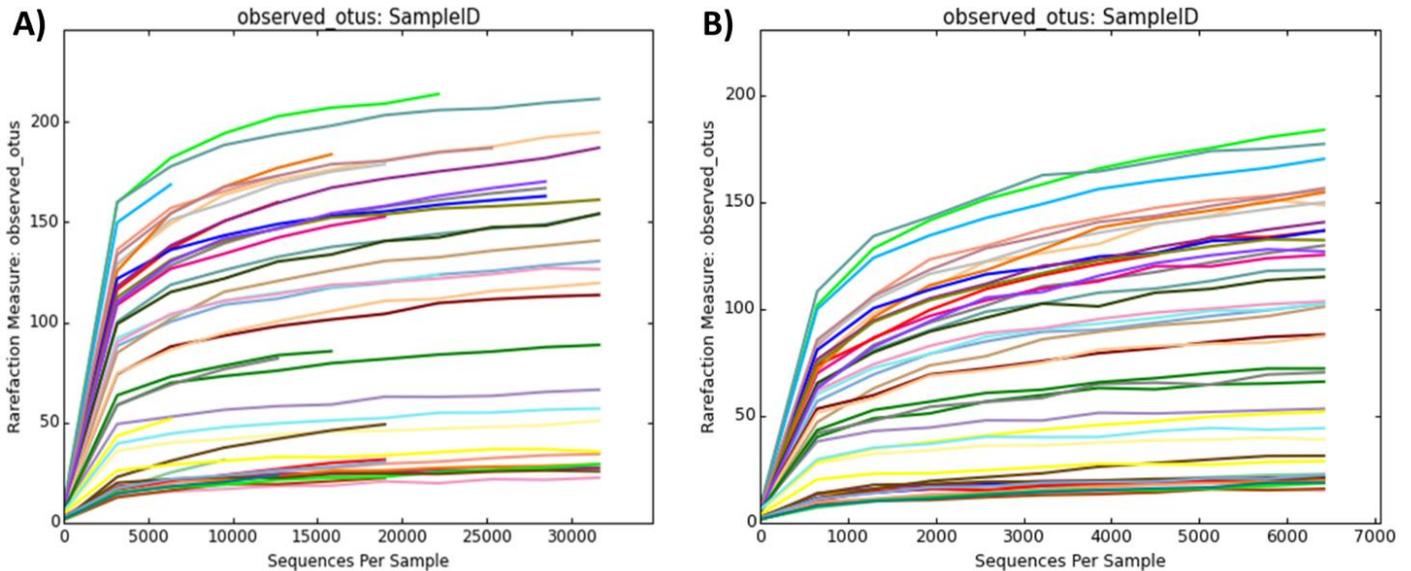


Figura 10. Curvas de rarefacción de la diversidad de OTUs extrapoladas a partir de 44 muestras, grupo control y pacientes. A) Se puede observar que todas las muestras al final de la secuenciación alcanzaron la rarefacción, también se puede observar una gran variabilidad en cuanto al número de secuencias/lecturas obtenidas por muestras. B) Se realizó un corte al número mínimo de lecturas, por lo tanto la profundidad de secuenciación del estudio fue de 6426 lecturas por muestra.

7.2 Composición de las comunidades microbianas en el grupo control y pacientes

Las comunidades microbianas intestinales se clasificaron en 11 phylas en el grupo control, para el caso de los pacientes dado que la toma de muestra se dividió en tres tiempos (inicial, neutropenia y después del trasplante) se pudieron clasificar 9, 5 y 7 phyla respectivamente. Como se muestra la Figura 11, para las abundancias relativas de los taxones a nivel de phylum bacterianos entre el grupo control y los diferentes puntos de toma de muestra, los sistemas operativos estaban dominados de manera similar por 5 filos principales tanto en el grupo control como en pacientes en sus tres puntos de toma de muestra inicial, neutropenia y después del trasplante, incluidos Bacteroidetes (promedio: 49, 43.3, 3.5 y 8%), Firmicutes (44.3, 37.9, 52.5 y 59.7), Proteobacteria (2.5, 18.1, 40.2 y 31.1%), Verrucomicrobia (2.9, 0.1, 0 y 0%), Actinobacteria (0.6, 0.3, 3.5 y 1%). Los cambios taxonómicos más drásticos observados fueron, la disminución

del phylum Bacteroidetes, y el aumento significativo del phylum Proteobacteria para la toma de muestra correspondiente a Neutropenia.

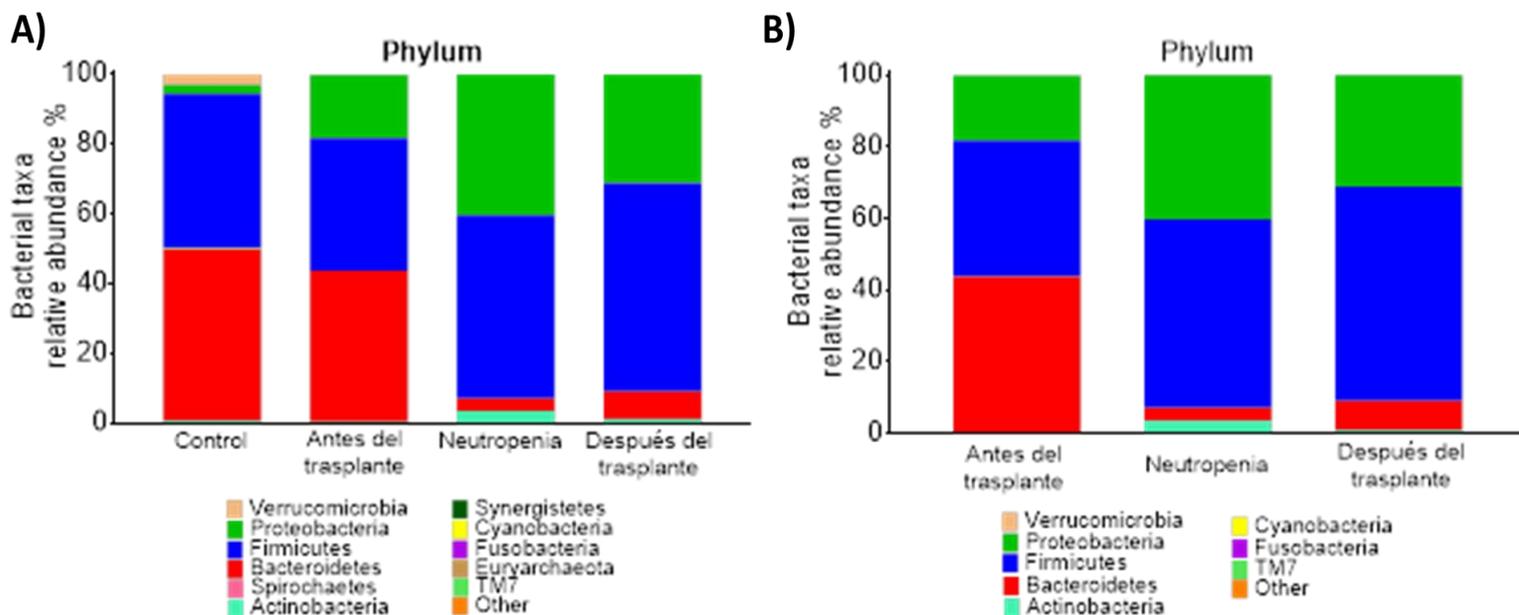


Figura 11. Diferencias en la abundancia relativa de los Phylum bacterianos intestinales más representativos (abundancia relativa > 1%). A) Comparación grupo control y pacientes con leucemia aguda en los tres puntos de toma de muestra. B) Efecto del tratamiento sobre la abundancia relativa bacteriana a nivel de phylum en pacientes con leucemia aguda. Cada phylum está representado con un color diferente. Para los pacientes se muestran los 3 diferentes tiempos de toma de muestra (antes del trasplante, neutropenia y 30 días después del trasplante, n=22). Tabla de abundancia relativa % completa disponible en Anexo 1.

La microbiota intestinal en el grupo control y en los tres puntos de toma de muestra de los pacientes se clasificó en 66 géneros bacterianos, y *Faecalibacterium* (promedio: 11.2, 8, 0.05 y 11.4%), *Prevotella* (34.4, 14.7, 0.2 y 0.1%), *Bacteroides* (17.2, 26.9, 4 y 8.1%), *Escherichia* (0.7, 15.7, 47.7 y 28.6%), *Streptococcus* (0.3, 0, 17.1 y 4.1%), *Roseburia* (5.8, 5.9, 0.4 y 2.2%) y *Lactobacillus* (0, 0, 13.5 y 3.5%, respectivamente) fueron los siete géneros bacterianos abundantes que variaron significativamente en las diferentes muestras. El género *Escherichia* y *Streptococcus* aumentaron en la muestra de neutropenia, para la muestra correspondiente a después del trasplante su abundancia comenzó a disminuir, mientras que el género *Bacteroides* y *Prevotella* disminuyeron significativamente en la toma de muestra correspondiente a Neutropenia y después del trasplante al igual que el género *Faecalibacterium* disminuyó significativamente en Neutropenia. La abundancia de géneros anaerobios facultativos como por ejemplo *Escherichia* y *Streptococcus* fueron los cambios taxonómicos más drásticos y evidentes en neutropenia con un aumento significativo de estos géneros y una disminución de géneros anaerobios obligados como *Bacteroides* y *Prevotella* (Fig. 12).

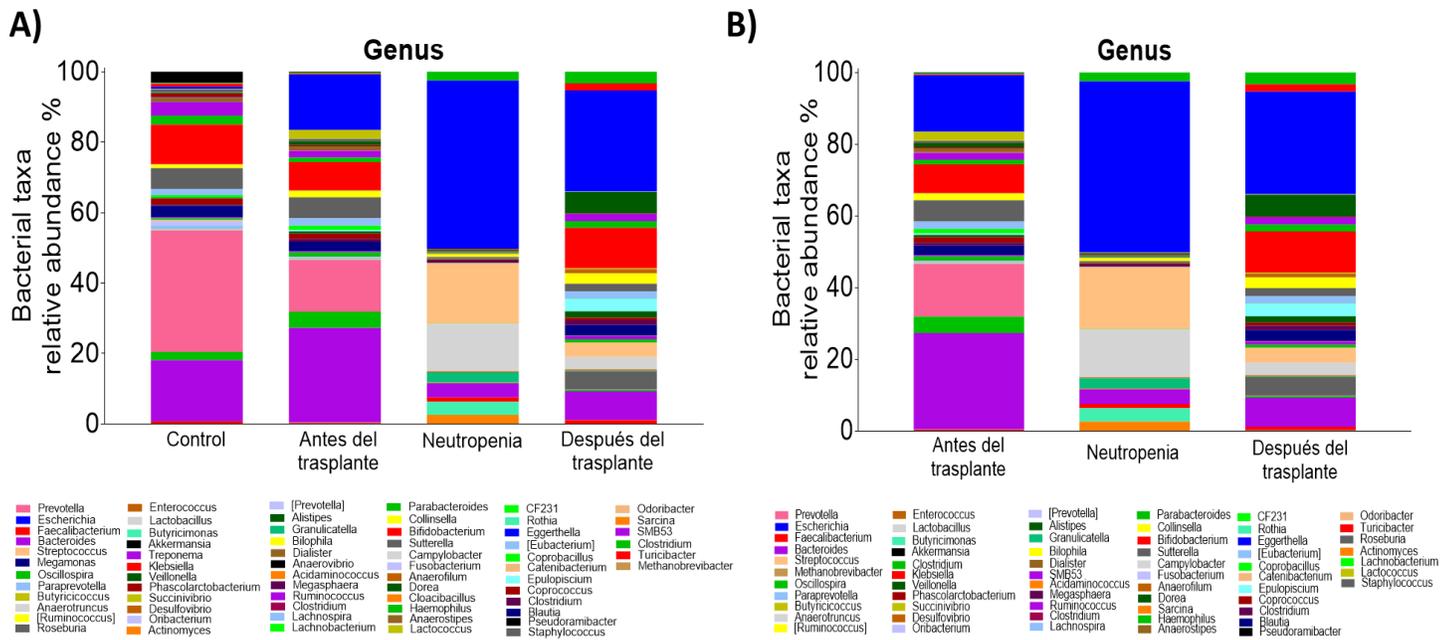


Figura 12. Diferencias en la abundancia relativa de géneros bacterianos intestinales más representativos (abundancia relativa > 1). A) Comparación grupo control y pacientes con leucemia aguda en los tres puntos de toma de muestra. B) Efecto del tratamiento sobre la abundancia relativa bacteriana a nivel de género en pacientes con leucemia aguda. Cada género está representado con un color diferente. Para los pacientes se muestran los 3 diferentes tiempos de toma de muestra (antes del trasplante, neutropenia y 30 días después del trasplante, n=22). Tabla de abundancia relativa % completa disponible en Anexo 1.

La abundancia relativa a nivel de especie en el grupo control y en los tres puntos de toma de muestra de los pacientes se clasificó en 42 especies bacterianas de las cuales, *Faecalibacterium prausnitzii* (promedio: 21.2, 18.0, 0.0 y 20.4%), *Prevotella copri* (41.6, 20.7, 0.2 y 0.3%), *Escherichia coli* (1.3, 22.1, 55.8 y 39.5%), *Bacteroides ovatus* (3.1, 8.4, 0.6 y 1.0%), *Bacteroides caccae* (1.7, 6.2, 0.0, 0.8%), *Rothia mucilaginosa* (0.0, 0.0, 13.6 y 0.1%) y *Veillonella dispar* (0.5, 1.4, 0.5 y 4.5%) fueron las 7 especies principales con mayor significancia estadística ($p < 0.05$; Figura 13).

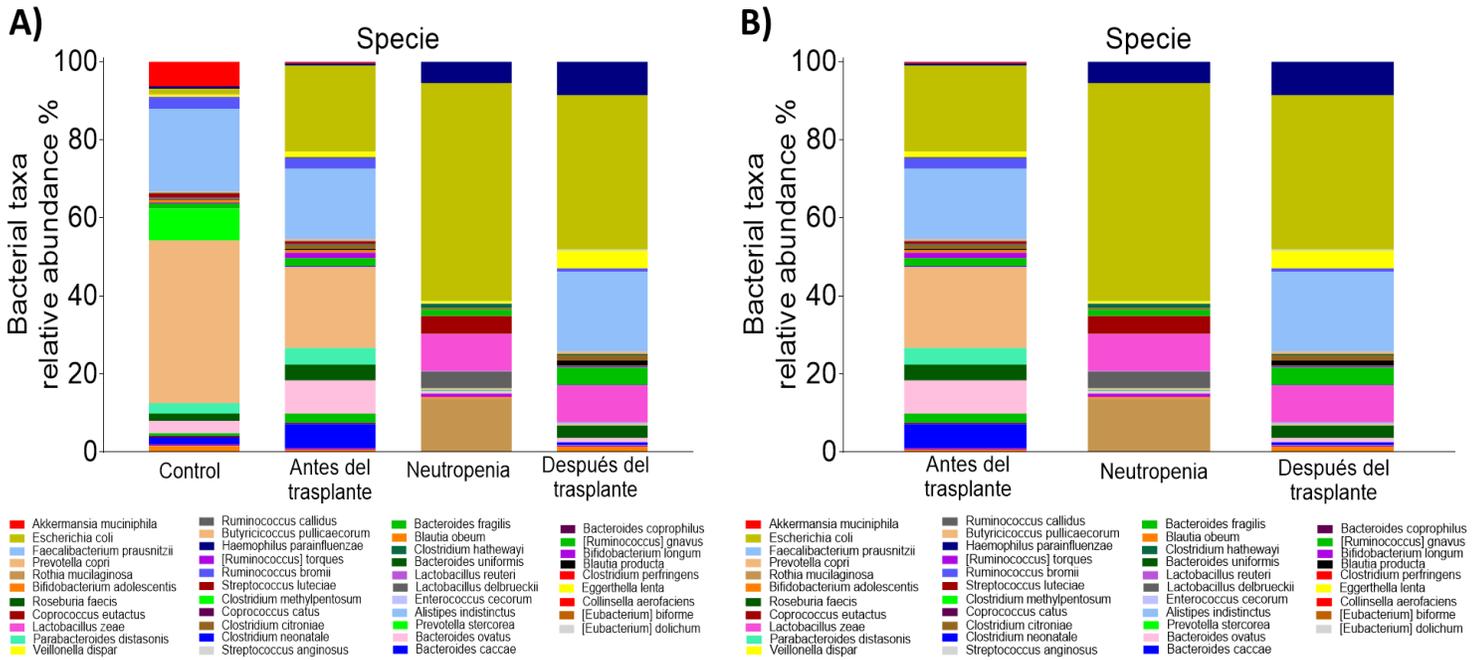


Figura 13. Diferencias en la abundancia relativa de especies bacterianas intestinales más representativas (abundancia relativa > 1%). A) Comparación grupo control y pacientes con leucemia aguda en los tres puntos de toma de muestra. B) Efecto del tratamiento sobre la abundancia relativa bacteriana a nivel de especie en pacientes con leucemia aguda. Cada especie está representada con un color diferente. Para los pacientes se muestran los 3 diferentes tiempos de toma de muestra (antes del trasplante, neutropenia y 30 días después del trasplante, n=22). Tabla de abundancia relativa % completa disponible en Anexo 1.

7.3 Diversidad de las comunidades microbianas en el grupo control y pacientes

La diversidad alfa bacteriana del grupo control y la toma de muestra inicial de los pacientes medida por el índice de diversidad de Shannon no mostraron diferencias estadísticamente significativas, lo que indica que la comunidad microbiana del grupo control y de los pacientes al ingreso del tratamiento (inicio) presentan una riqueza y uniformidad bacteriana similar. Si bien el análisis no arrojó diferencias significativas se puede observar que la diversidad bacteriana en el grupo control fue ligeramente mayor en comparación con los pacientes. Al comparar los tres puntos de toma de muestra de los pacientes se presentan diferencias estadísticamente significativas, inicial-neutropenia, neutropenia-30 días después del tratamiento e inicial-30 días después del tratamiento ($p < 0.01$, $p < 0.0001$, $p < 0.0001$ respectivamente). Los cambios significativos ocurrieron durante el trasplante en los puntos de toma de muestra neutropenia y treinta días después, mostrando una marcada reducción en la diversidad alfa bacteriana (Fig. 14). Para neutropenia se puede observar un aumento significativo en la abundancia de géneros y especies principalmente patógenos; sin embargo, para la toma de muestra correspondiente a

treinta días después del trasplante se puede observar que la diversidad comienza a recuperarse (Fig. 12, 13 y 14).

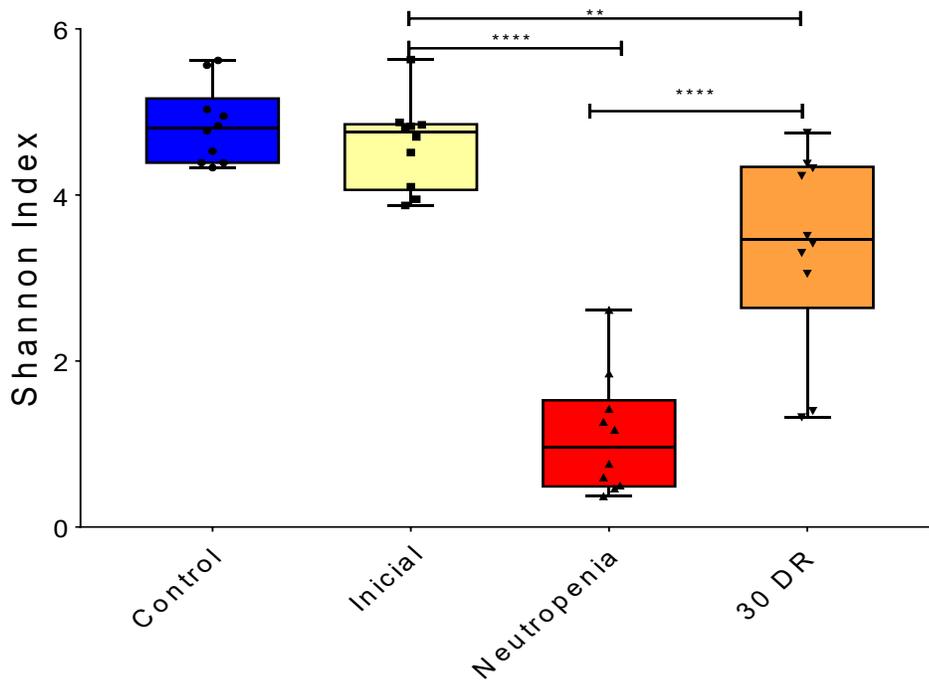


Figura 14. Diversidad alfa de OTUS. Gráfico de caja que muestra que entre el grupo control y la muestra de toma inicial no hay diferencias estadísticamente significativas. La muestra de toma antes del trasplante (inicial), neutropenia y 30 DR (después del trasplante) mostraron diferencias estadísticamente significativas. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas y corresponden a $p < 0.01$ (**) y $p < 0.0001$ (****) $N=22$. La línea central en los diagramas de caja corresponden a la mediana, el cuadro delimitador es el rango intercuartil (IQR) y los bigotes se definen como 1.5 veces IQR.

Con respecto al análisis de diversidad beta se realizó un análisis de componentes principales PCoA sobre una matriz de distancias de Bray-Curtis. Los resultados de PCoA se muestran en la Figura 15, donde se muestran las relaciones entre las comunidades bacterianas. Se puede observar claramente los cambios dinámicos en la microbiota intestinal a través de los diferentes puntos de toma de muestra. Este análisis reveló una distinción y un patrón de agrupación en cada uno de los puntos de toma de muestra, donde se puede visualizar que los controles y los pacientes al inicio del estudio muestran una similitud y se ven claramente agrupados en el componente principal 1 el cual explica el 40.2% y 59.29% de la varianza de los datos (Unweighted_Unifrac_PCoA y Weighted_Unifrac_PCoA, respectivamente), lo que confirmó que las composiciones microbianas eran similares entre ambos grupos. Para la muestra de neutropenia se puede ver claramente que se aleja completamente de la toma de muestra inicial agrupándose el componente principal 2 el cual explica el 8.78% y 13.09% de la varianza de los datos, respectivamente, mientras que la muestra que corresponde a treinta días después del trasplante se agrupa en el componente principal 3 con un 6.99% y 10.51% de la varianza, con una clara tendencia a agruparse el componente principal 1 junto con las muestras del grupo control y la toma de muestra inicial. La posición relativa de cada muestra en el espacio definido por los ejes de componentes principales puede ser usada para describir el grado de similitud en composición de la comunidad entre las muestras, lo cual indicaría una mayor similitud entre las muestras de cada sitio a pesar de los OTUs compartidos. Lo que reitera los resultados obtenidos en el índice de diversidad alfa donde la composición de microbiota intestinal es similar en el grupo control y los pacientes.

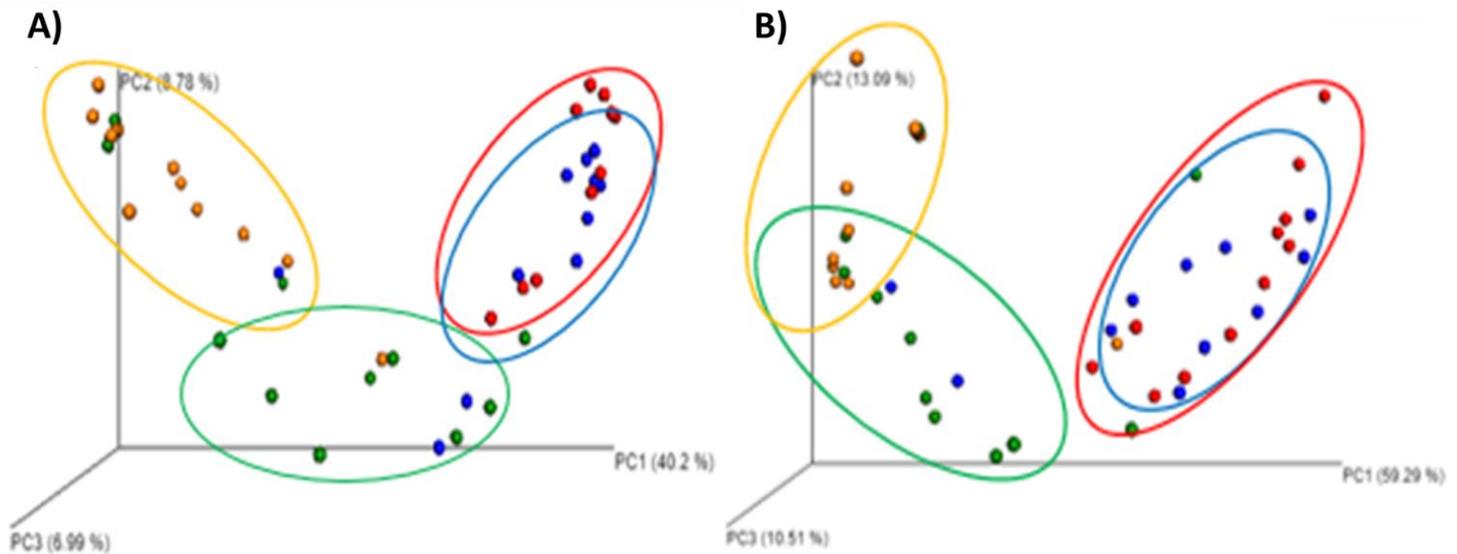


Figura 15. Análisis de componentes principales (PCoA) de comunidades bacterianas intestinales en grupo control y pacientes. El diagrama de PCoA se contruyó utilizando el método ponderado UniFrac. Los puntos representan las comunidades bacterianas de grupos control y pacientes con leucemia aguda. A) Unweighted_Unifrac_PCoA entre el grupo control (puntos azules) y los tres diferentes puntos de muestra de los pacientes, inicial, neutropenia y treinta días después del trasplante (rojo, amarillo y verde, respectivamente). B) Weighted_Unifrac_PCoA entre el grupo control (puntos azules) y los tres diferentes puntos de muestra de los pacientes, inicial, neutropenia y treinta días después del trasplante (rojo, amarillo y verde, respectivamente). En ambos gráficos se puede observar que los la mayoría puntos azules y rojos se agrupan de forma muy similar. Los puntos naranjas y verdes se presentan en un grupo separado aunque estos últimos presentan una tendencia a agruparse junto con los puntos rojos y azules a diferencia de los puntos color naranja que se encuentran mucho más separados. La varianza total explicada de PC1 es de 40.2% y 59.2%, para PC2 8.7% y 13% y para PC3 6.9% y 10.5% respectivamente.

7.4 Método de análisis discriminante lineal (LDA)

El análisis de discriminante lineal (LDA) se realizó con el fin de analizar la contribución y variabilidad entre grupos y de esta manera identificar los biomarcadores que pueden diferenciar a los pacientes mexicanos con leucemia aguda. El análisis confirmó el hallazgo de diferencias estadísticamente significativas en varios grupos bacterianos a nivel de especie y permitió la identificación de especies bacterianas diferencialmente abundantes entre cada uno de los puntos de toma de muestra para pacientes y grupo control (Fig. 16). Se encontró un total de 32 taxones bacterianos que estaban significativamente asociados en cada uno de los grupos. De estos, las especies bacterianas *P. copri*, *P. stercorea*, *A. muciniphila*, *R. bromii*, *B. adolescentis*, *C. eutactus*, *C. catus*, *E. biforme* y *A. indistinctus* fueron significativamente mayores en el grupo control que en los pacientes. Para el caso de toma de la toma de muestra inicial en los pacientes, *B. ovatus*, *B. caccae*, *P. distasonis*, *B. uniformis*, *B. fragilis*, *R. torques*, *C. Citroniae*, *B. obeum*, *B. pullicaecorum*, *D. forsicgenerans*, *R. callidus*, *R. faecis* y *C. aerofaciens* fueron significativamente mayores, para neutropenia se enriquecieron significativamente *E. coli*, *R. mucilaginoso*, *L. zae* y *S. luteciae* y por último para la toma de muestra correspondiente a treinta días después del trasplante las especies *F. prausnitzii*, *V. dispar*, *R. gnavus*, *B. producta*, *E. dolichum* y *C. hathewayi* fueron las especies bacterianas más abundantes.

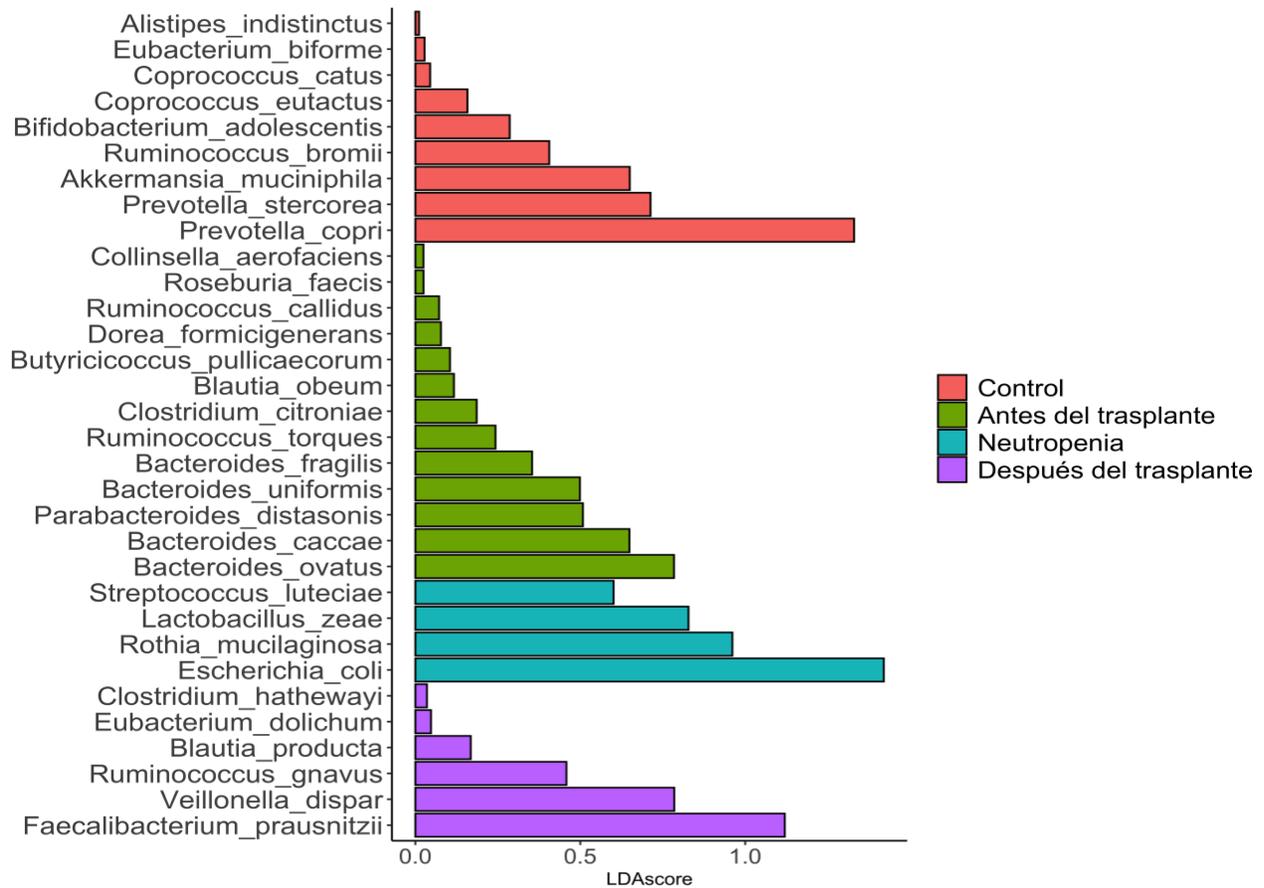


Figura 16. Análisis de discriminante lineal (LDA) para especies bacterianas características del grupo control y pacientes. Cuanto mayor sea el puntaje LDA score, mayor será la contribución a la magnitud de la variación. (n=22, p<0.05).

Para identificar y visualizar aún más los biomarcadores que puedan diferenciar a los pacientes mexicanos con leucemia aguda se realizó un segundo filtrado como parte del análisis LEfSe donde se seleccionaron solo aquellas especies bacterianas con un puntaje de análisis LDA score ≥ 1 . Para este análisis el punto de toma de muestra inicial no fue graficado, dado el valor de LDA score asignado para el análisis. Las especies bacterianas *P. copri*, *E. coli* y *F. prausnitzii* fueron las especies que significativamente aportaban mayor variación a los datos para cada uno de los casos (control, neutropenia y treinta días después del trasplante, respectivamente; Fig. 17).

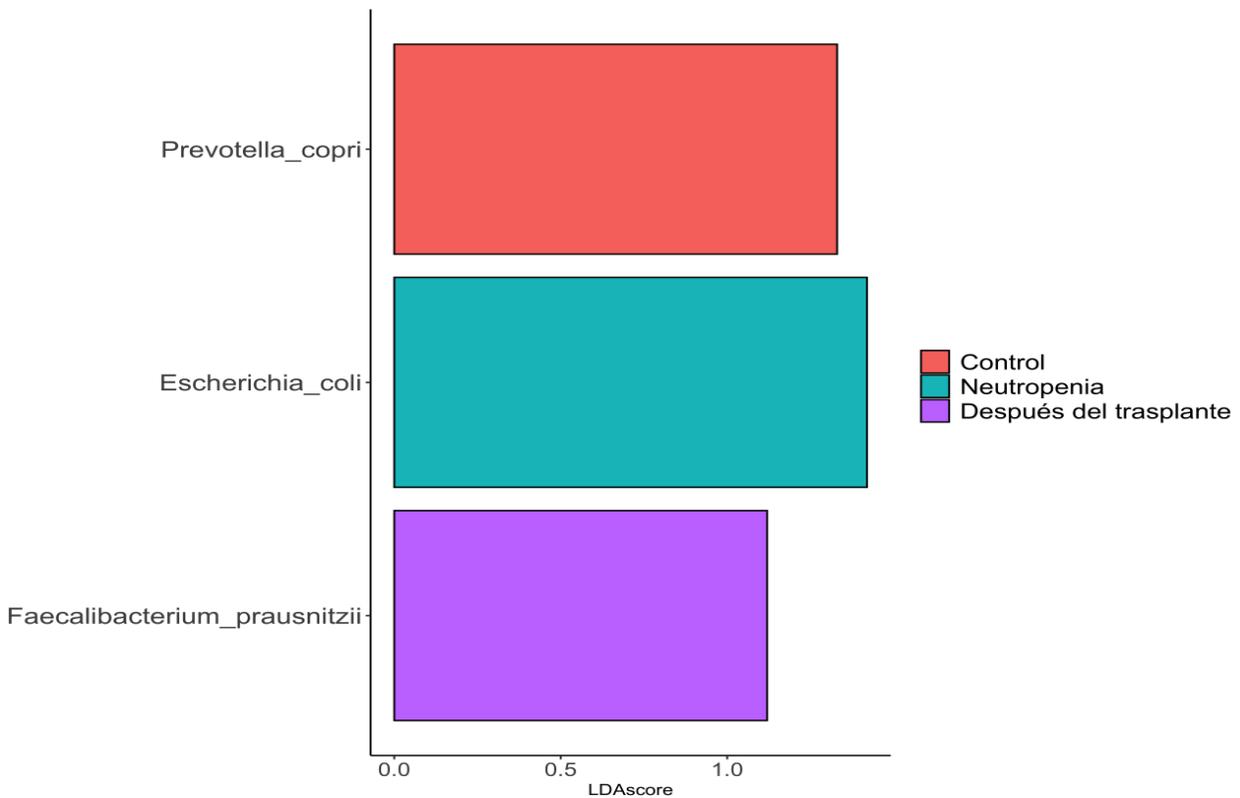


Figura 17. Análisis de discriminante lineal (LDA) para especies bacterianas características del grupo control y pacientes (Neutropenia y después del trasplante). Los valores del análisis fueron LDA score ≥ 1 , con una $p < 0.05$.

7.5 Especies bacterianas mas cambiantes (Heatmap)

Al igual que para el de análisis discriminante lineal (LDA) para realizar el Heatmap se tomaron en cuenta aquellas especies bacterianas estadísticamente significativas ($p < 0.05$). Se puede observar que el grupo control y la toma de muestra inicial siguen agrupándose, al igual que la toma de muestra correspondiente a neutropenia y a treinta días después del trasplante, lo cual nos corroborará los resultados obtenidos en los análisis anteriores. Se puede visualizar también las especies que son mayormente abundantes para el grupo control y los pacientes en cada uno de los puntos de toma de muestra, las cuales están marcadas en color rojo (Fig 18).

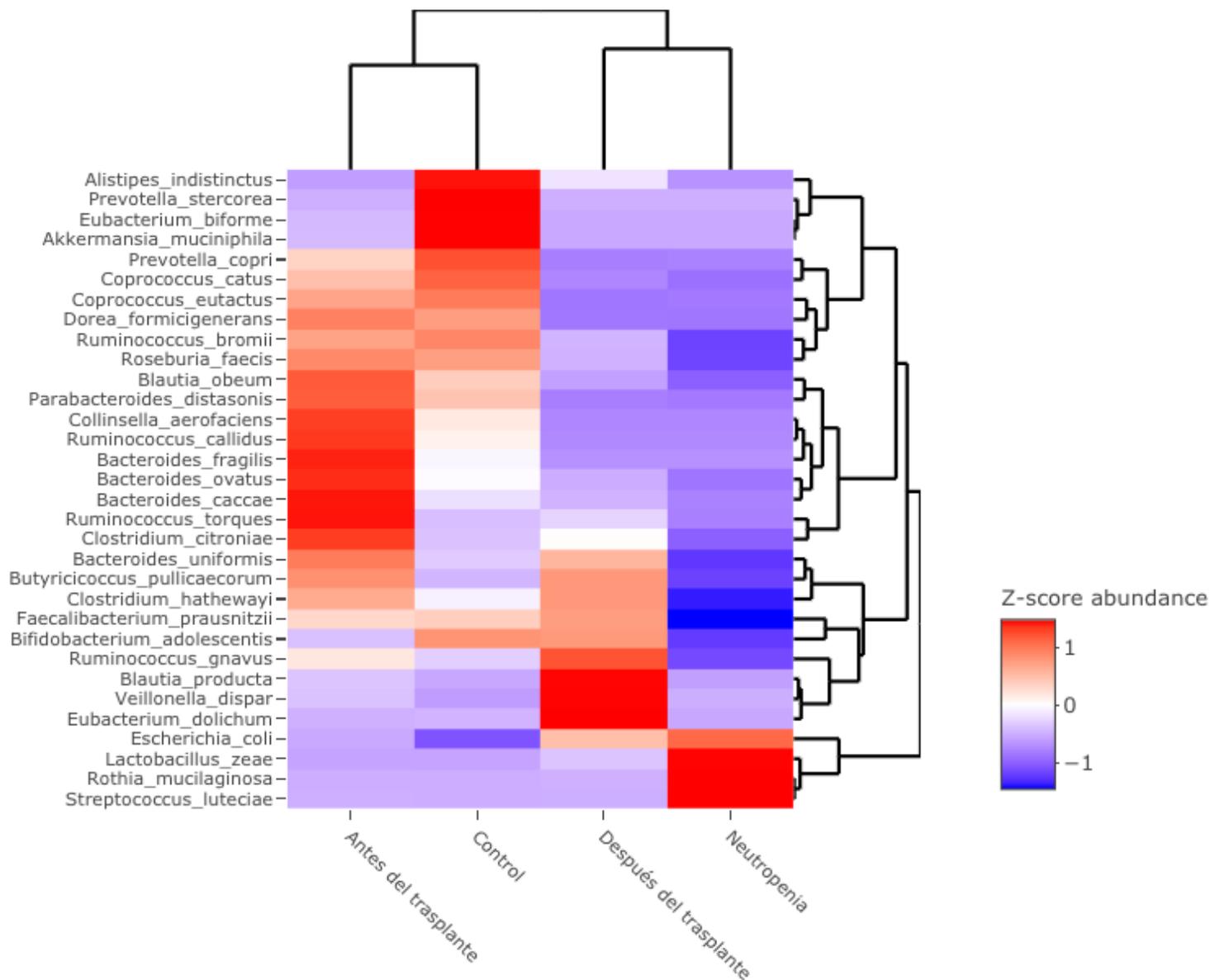


Figura 18. Mapa de calor de las 32 especies bacterianas diferencialmente abundantes para el grupo control y para cada uno de los puntos de toma de muestra de pacientes. La escala de color indica la abundancia promedio de las especies bacterianas en las diferentes muestras, se puede visualizar claramente como va cambiando esta abundancia a lo largo del tratamiento. Un valor de Z-score > 1 (rojo) significa que la especie bacteriana es muy abundante y un valor de Z-score de -1 (morado/azul) significa que la especie bacteriana es menos abundante ($p < 0.05$).

7.6 Cambios en los ácidos grasos de cadena corta en pacientes con leucemia aguda sometidos a trasplante de progenitores hematopoyéticos

Al comparar la concentración (mM/g) total de AGCC en los valores iniciales y finales en cada uno de los puntos de toma de muestras de MF entre los pacientes (inicial, neutropenia y 30 días después del trasplante) no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el acetato (Fig. 19); sin embargo, se observó que para el caso del propionato y butirato si presentaron

diferencias estadísticamente significativas (Fig. 20 y 21; $p < 0.05$), en ambos casos estas diferencias solo se presentaron al comparar la toma de muestra inicial y neutropenia.

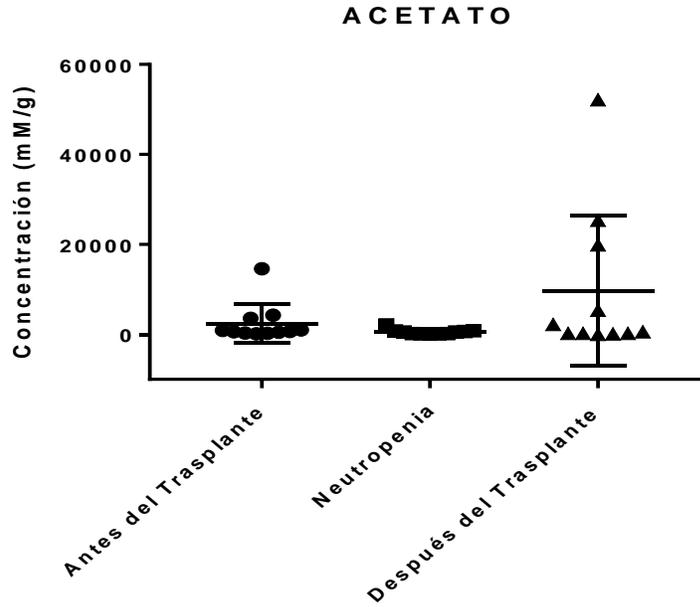


Figura 19. Cuantificación de ácidos grasos de cadena corta (acetato) en pacientes mexicanos con leucemia aguda, antes, durante y después de la intervención. (n=11; $p < 0.05$)

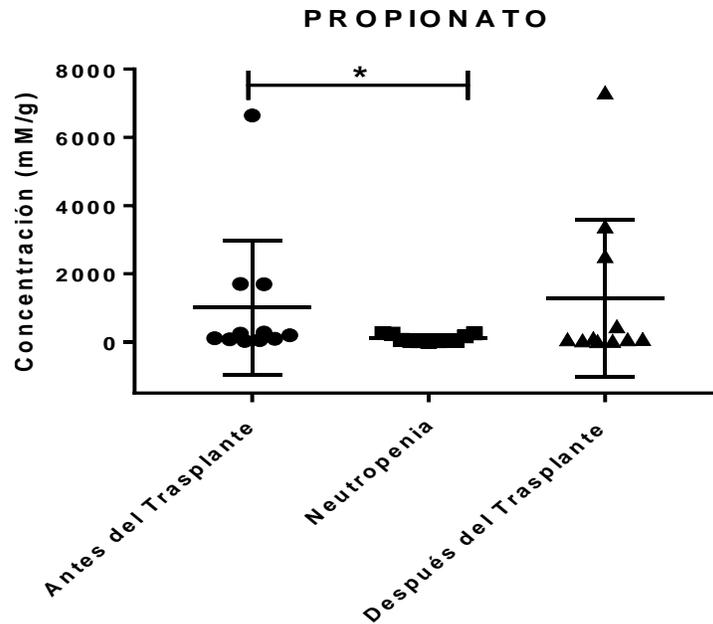


Figura 20. Cuantificación de ácidos grasos de cadena corta (propionato) en pacientes mexicanos con leucemia aguda, antes, durante y después de la intervención. (n=11; $p < 0.05$).

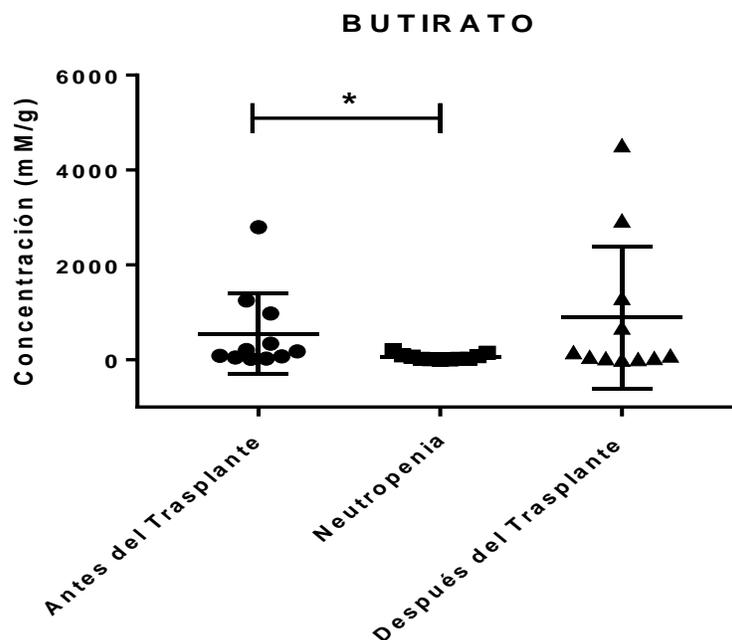


Figura 21. Cuantificación de ácidos grasos de cadena corta (butirato) en pacientes mexicanos con leucemia aguda, antes, durante y después de la intervención. (n=11; p<0.05).

Por otra parte, se puede observar que, de los tres AGCC evaluados el acetato en el 100% de las muestras de pacientes es el AGCC que se encuentra en mayor concentración en los tres puntos de toma de muestra (Fig. 22). Además, en el 72.7% de los pacientes se mostró una reducción en la concentración de acetato correspondiente a la muestra de neutropenia en comparación con la toma de muestra inicial, mientras que el 27.2% restante mostró un aumento en la concentración de acetato en este punto de toma de muestra (Fig. 23).

Para el propionato el 90.9% de las muestras mostraron una reducción de este AGCC en la toma de muestra correspondiente a neutropenia mientras que el 9% restante mostró un aumento. En la toma de muestra correspondiente a treinta días después del trasplante se observa que hay una tendencia hacia una recuperación de propionato, inclusive se puede observar que algunas muestras rebasaron la concentración de propionato en comparación con la toma de muestra inicial (Fig. 21).

El 81.8% de las muestras para el butirato mostraron una reducción de este AGCC en la toma de muestra correspondiente a neutropenia, mientras que el 18.1% restante mostró un aumento de butirato en este punto de toma de muestra, al igual que el propionato se puede observar una tendencia de recuperación de este AGCC en la toma de muestra correspondiente a treinta días después del trasplante, inclusive en algunos casos la concentración de butirato en este punto de toma de muestra rebasa la concentración inicial (Fig. 23). Además en el 90% de las muestras correspondientes a los diferentes puntos de toma de muestra el butirato se encontraba en menor concentración a comparación con el acetato y propionato. Es claro que durante la neutropenia tanto el propionato como el butirato disminuyen significativamente, mientras que el acetato parece mantenerse relativamente constante a excepción de tres muestras que disminuyeron

drásticamente en este punto. Para la toma de muestra correspondiente a treinta días después se puede observar claramente una tendencia hacia el aumento de AGCC (Fig. 22).

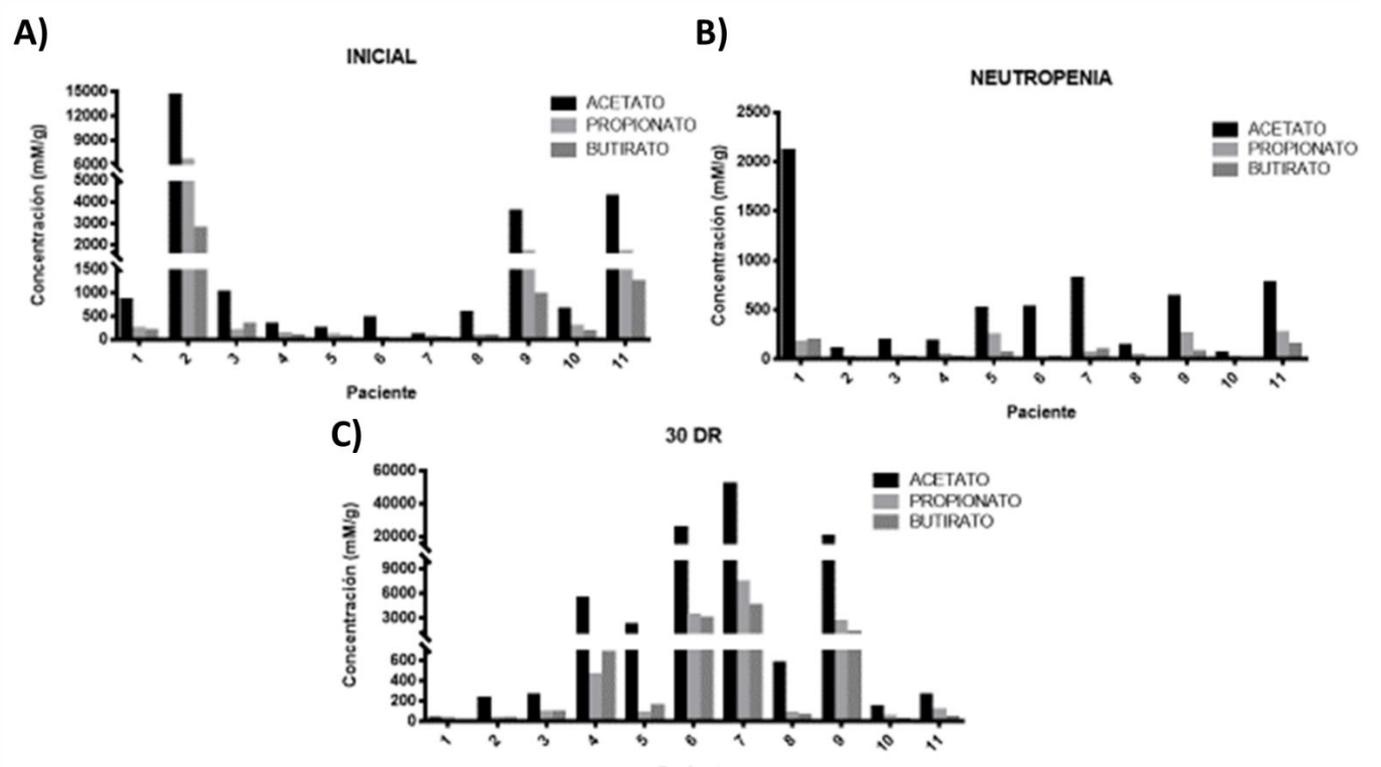


Figura 22. Cuantificación de ácidos grasos de cadena corta (acetato, propionato y butirato) en pacientes mexicanos con leucemia aguda al inicio del tratamiento, durante el tratamiento (neutropenia) y treinta días después de la intervención respectivamente. (n=11)

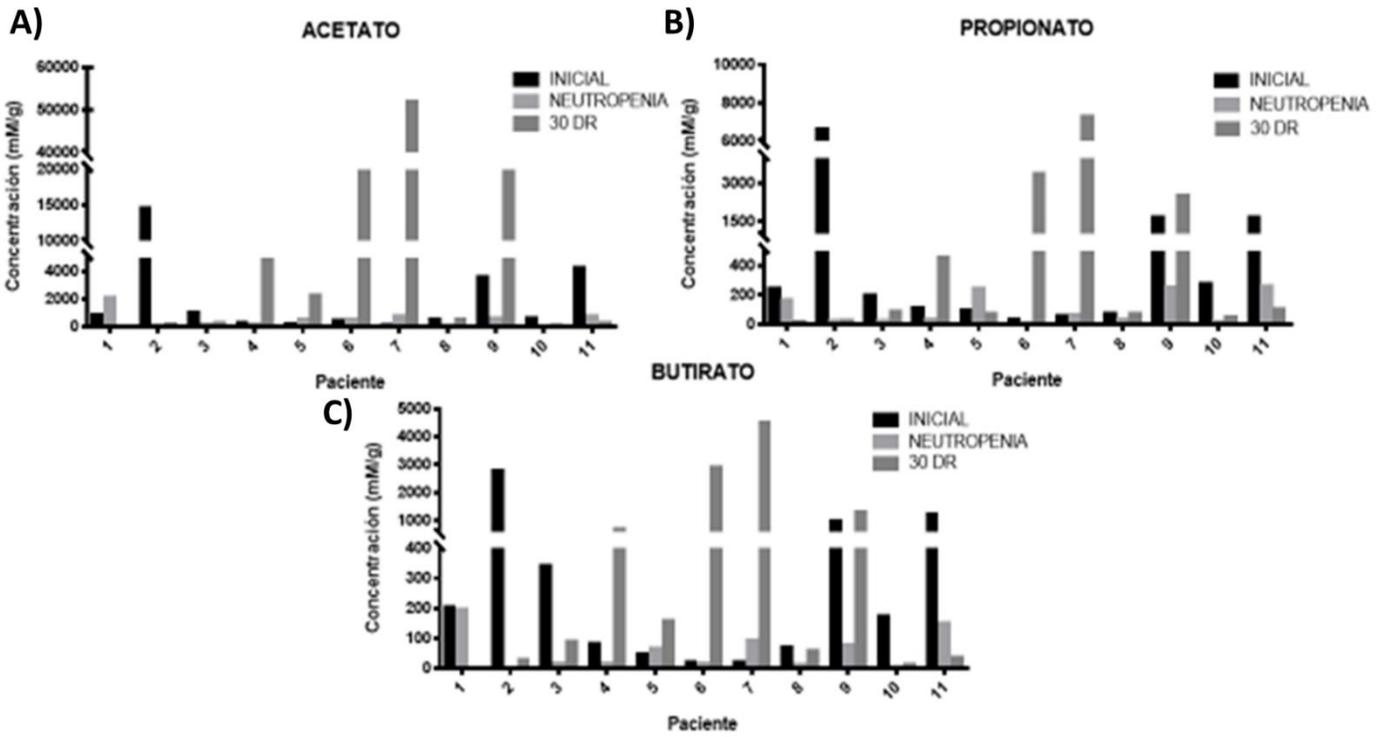


Figura 23. Cuantificación de ácidos grasos de cadena corta: acetato, propionato y butirato, en pacientes mexicanos con leucemia aguda al inicio del tratamiento, durante el tratamiento (neutropenia) y treinta días después de la intervención respectivamente. (n=11)

VIII. Discusión

La alta diversidad bacteriana juega un papel esencial en la respuesta al tratamiento en pacientes con leucemia aguda. Estos resultados confirman experimentalmente lo ya descrito por diversos autores, tanto en modelos murinos como estudios en humanos, en donde el uso de antibióticos, combinado con quimioterapia producen disbiosis que conlleva a impactos variables y cambios significativos en diversidad, estructura y composición de las comunidades bacterianas comensales del intestino, provocando una ausencia completa o parcial de bacterias benéficas lo que repercute directamente en la homeostasis del sistema, aumentando la susceptibilidad a infecciones (Dethlefsen *et al.*, 2008; Dethlefsen y Relman, 2011, Korry *et al.*, 2020; Peled *et al.*, 2020).

Se ha observado que de las principales consecuencias tras los regímenes preparatorios en estos pacientes son la afectación en la función de la barrera intestinal que conlleva a un aumento en la permeabilidad de la misma y el favorecimiento para el crecimiento y proliferación de especies bacterianas patógenas que generalmente exhiben una resistencia a los antibióticos y traslocación de las mismas, lo que genera una exacerbación de la respuesta inmune innata y por consecuente de la adaptativa, provocando una inflamación crónica que afectará de forma directa la señalización por parte de las células epiteliales y el metabolismo de las mismas (Jernberg *et al.*, 2010; Shallis *et al.*, 2017; Fyhrquist *et al.*, 2019), así como la composición y función de las comunidades bacterianas intestinales.

Estudios han demostrado el impacto de la microbiota intestinal sobre la inmunidad de la mucosa por la evidencia de defectos en los tejidos linfoides con un número reducido de parches de Peyer de la mucosa y ganglios linfáticos mesentéricos más pequeños además, de una producción comprometida de anticuerpos, esto visto en modelos animales libres de gérmenes (Macpherson and Harris, 2004). Por lo tanto, una microbiota saludable favorecerá la resistencia a la colonización, es decir, presentará la capacidad de competir por los nutrientes con las especies bacterianas patógenas oportunistas, estimulando de esta manera la secreción de moléculas antimicrobianas por parte del epitelio en la capa de la mucosa proporcionando un mayor defensa contra los patógenos (Shen *et al.*, 2019), esta importante interacción hospedero-microbiota se ve claramente afectada con el uso de antibióticos profilácticos, dado que la diversidad bacteriana comensal se ve drásticamente disminuida y con ello las funciones benéficas que estas ejercen.

A través del análisis de diversidad alfa, se encontró que al inicio del estudio la diversidad de la microbiota intestinal en el grupo control y los pacientes era similar y diversa, ya que no presentaron diferencias estadísticamente significativas. Lo anterior contrasta con lo reportado por Peled y colaboradores (2020), en donde los controles diferían en composición y diversidad con los pacientes, siendo estos últimos menos diversos. Los hallazgos mediante el uso de secuenciación del gen 16S rRNA ribosomal para pacientes con leucemia aguda fueron consistentes con informes anteriores, en donde el uso antibióticos profilácticos son un determinante importante de la composición de la microbiota, incluso en pacientes sometidos a trasplante alogénico de células hematopoyéticas en donde claramente hubo una disminución en la diversidad bacteriana y una dominancia de taxones únicos durante el trasplante de células hematopoyéticas (Taur *et al.*, 2014; Golob *et al.*, 2017; Peled *et al.*, 2020). En términos de la composición de la microbiota intestinal, hubo disminución significativa de poblaciones bacterianas comensales anaerobias obligadas, favoreciendo la abundancia de bacterias

patógenas, con un aumento significativo de géneros anaerobios facultativos tales como *Escherichia*, *Rhotia*, *Lactobacillus* y *Streptococcus* pertenecientes al phylum Proteobacteria, Actinobacteria y Firmicutes respectivamente, que generalmente conllevará a una respuesta de defensa inflamatoria en el cuerpo. El análisis LEfSe a nivel de especie confirma estos resultados donde, los taxones bacterianos con poca abundancia al inicio del estudio pero que, durante la intervención presentaron aumentos significativos en los pacientes mexicanos con leucemia aguda fueron *E. coli*, *R. mucilaginosa*, *L. zeae* y *S. luteciae*. Estos resultados confirman una disbiosis en la composición de la microbiota intestinal en estos pacientes a causa del uso de antibióticos promoviendo la proliferación y dominancia de especies bacterianas potencialmente patógenas.

Estudios previos han demostrado que el aumento de bacterias gram negativas como, por ejemplo, *E. coli*, la especie bacteriana con mayor significancia estadística en este estudio en neutropenia según los resultados del análisis de LDA, puede representar un mayor riesgo de complicaciones en estos pacientes, dado que la protección del hospedero contra patógenos exógenos por parte de bacterias comensales, a través de la producción de péptidos antimicrobianos y la competencia por metabolitos definidos, fenómeno conocido como resistencia a la colonización, se ven afectados, trayendo consigo la proliferación de géneros bacterianos con especies principalmente patógenas como por ejemplo *Escherichia*, *Clostridioides* y *Lactobacillus* (van der Waaij *et al.*, 1971; Buffie y Pamer, 2013; Kamada *et al.*, 2013; Hammami *et al.*, 2013). Otros estudios han demostrado que los géneros *Escherichia* y *Lactobacillus* pueden producir compuestos N-nitrosos potencialmente cancerígenos (NOCs; Wang *et al.*, 2016), además se ha descrito que *Lactobacillus* spp. puede actuar como un agente causal en infecciones graves, especialmente en individuos inmunodeprimidos con hospitalización prolongada (Mandell *et al.*, 2015). En pacientes con cáncer colorrectal se ha visto que la especie bacteriana *B. ovatus* ha sido asociada en la patogénesis de la enfermedad del intestino irritable (EI; Saitoh *et al.*, 2002).

En este estudio *P. copri* se asoció con un estado de no enfermedad (neoplasia), ya que fue la especie bacteriana que estaba significativamente enriquecida en el grupo control. Interesantemente, Pianta y col. en 2017 demostraron que esta especie bacteriana está relacionada en la patogénesis de la artritis reumatoide. *E. coli*, un patógeno oportunista, se asoció con una alteración en la composición de la microbiota intestinal en pacientes mexicanos con leucemia aguda, ya que fue la bacteria que más se enriqueció durante la intervención. Se ha reportado que las cepas de *E. coli* diarreogénicas (ECD) se caracterizan por su plasticidad génica y capacidad de generar diarrea. Estas cepas se han agrupado en distintos patotipos, distinguiéndose cada uno por sus factores de virulencia y mecanismos de patogenicidad para colonizar el intestino y generar un aumento en la respuesta inflamatoria por la elevación de mediadores proinflamatorios como IL-6, IL-8, IL-12, TNF- α e iNOS, y disminución de mediadores antiinflamatorios (p. ej., IL-10). Byndloss y col. (2017) mostraron en modelos murinos que después del suministro de antibióticos existe una expansión de *E. coli* potencialmente patógena. También mostraron que la susceptibilidad por el agotamiento de bacterias anaerobias obligadas (inducida por antibióticos) está asociada a una reducción de los niveles de butirato, promoviendo así un ambiente rico en oxígeno que favorece la expansión de bacterias aeróbicas como *Salmonella typhimurium*, en este estudio se mostró que tras la administración de antibióticos hubo un aumento significativo de bacterias anaerobias facultativas (*E. coli*), lo que a su vez conllevó a una disminución de bacterias comensales productoras de butirato. En dicho estudio también se observó un agotamiento de estas bacterias por el tratamiento antibiótico que reduce la señalización intracelular de butirato/PPAR γ , lo que ocasiona aumento en los niveles de iNOS y nitrato, favoreciendo la expansión Enterobacteriaceae, familia dentro de la cual se encuentra

la especie *E. coli*. Otros estudios han demostrado que el reconocimiento de los AGCC derivados de comensales por las células inmunes innatas es fundamental para la regulación de la inflamación en respuesta no solo a la lesión intestinal (Maslowski *et al.*, 2009).

Por otra parte *V. dispar* como anaerobio gramnegativo proinflamatorio fue una de las dos especies que más se enriqueció en la muestra correspondiente a treinta días después del trasplante, se ha visto que esta especie bacteriana está involucrada en solo unas pocas enfermedades humanas dentro de las que se han reportado bacteremias en personas de la tercera edad (Cobo *et al.*, 2020) e infecciones articulares (Marchandin *et al.*, 2001), la forma probablemente patógena en la que puede estar actuando esta bacteria en los pacientes mexicanos con leucemia aguda puede estar siendo contrarrestada por la presencia de *F. prausnitzii*, la bacteria que más se enriqueció en este punto de toma de muestra según el análisis LEfSe, dado su importante papel en la promoción de la salud intestinal ya que se ha informado sistemáticamente que *F. prausnitzii* es uno de los principales productores de butirato que se encuentran en el intestino (Barcenilla *et al.*, 2000; Duncan *et al.*, 2002), AGCC cuya función es regular el tamaño y la función de la red de células Treg al promover su inducción y generación mejorada en el entorno colónico (Arpaia *et al.*, 2013; Furusawa *et al.*, 2013). A esta especie bacteriana también se le han atribuido propiedades antiinflamatorias adicionales, a través de su capacidad para inducir un perfil de citocinas tolerogénicas (con muy baja secreción de citocinas proinflamatorias como IL-12 e IFN- γ , y mediante una secreción elevada de la citocina antiinflamatoria IL-10; Sokol *et al.*, 2008; Qiu *et al.*, 2013). De acuerdo con estos hallazgos, se ha informado que las células de *F. prausnitzii* o su sobrenadante libre de células reducen la gravedad de las enfermedades agudas (Sokol *et al.*, 2008), crónicas y de bajo grado (Martin *et al.*, 2014; Martin *et al.*, 2015) inflamación inducida por sustancias químicas en modelos murinos.

Bacteroides y Firmicutes son los dos principales phylum en las comunidades bacterianas del intestino del grupo control y pacientes. Sin embargo, para los pacientes puede observarse que desde el inicio del estudio hay una abundancia mayor del phylum Proteobacteria en comparación con el grupo control. Estudios en enfermedad celiaca han demostrado que la expansión del phylum Proteobacteria y en particular de la familia Enterobacteria causan un daño intestinal severo, produciendo traslocación de bacterias y permeabilidad intestinal a toxinas, exacerbando la producción de citocinas proinflamatorias (De Palma *et al.*, 2012; Jakobsson *et al.*, 2015). Si bien no se ha reconocido una firma microbiana específica para esta población si se puede asegurar que durante la intervención existe una disminución en la diversidad microbiana comensal y un aumento significativo del phylum Proteobacteria. Es por ello la importancia de caracterizar el microbioma antes y durante la intervención.

Peled y colaboradores (2020) identificaron una asociación entre la diversidad microbiana durante el trasplante de células hematopoyéticas y la supervivencia general y mortalidad relacionada con el trasplante, demostrando que una mayor diversidad intestinal se asocia con un menor riesgo de muerte y mayor supervivencia relacionada con el trasplante.

En cuanto a los AGCC evaluados, era de esperarse que el acetato se encontrara en mayor concentración en los tres puntos de toma de muestra, dado que es el AGCC más abundante desde el colon proximal hasta el colon distal en comparación con el propionato y butirato (Yamada *et al.*, 2015). A causa de la reducción de bacterias comensales en neutropenia era también de esperarse que la producción de AGCC se vería disminuida, dado que las abundancias de las poblaciones bacterianas comensales productoras de AGCC disminuyeron significativamente. Tal es el caso de los géneros *Butyricoccus* y *Ruminococcus* específicamente las especies *B. pullicaecorum* y *R. torques* respectivamente, productoras de

butirato. El género *Bacteroides* productor de acetato y propionato también presentó una disminución significativa de especies como *B. ovatus*, *B. caccae*, *B. uniformis*, *B. fragilis* (Eckhaut *et al.*, 2008; Walker *et al.*, 2005; Nagao-Kitamoto and Kamada, 2017). Es importante mencionar que se observó un ligero aumento en la concentración de butirato en las muestras correspondientes a treinta días después del trasplante, este efecto podría estar dado por la presencia de la especie bacteriana *Faecalibacterium prausnitzii*, caracterizada por su alto nivel de producción de butirato. Otra forma de explicar las altas concentraciones de acetato y las bajas concentraciones de butirato y propionato es la capacidad de degradación de estos dos AGCC por parte de bacterias acetogénicas por ejemplo *Eubacterium* y *Clostridium* para convertirlos en acetato, se ha visto que el acetato puede funcionar como sustrato para las bacterias productoras de butirato como por ejemplo *F. prausnitzii* y especies de *Roseburia* (Duncan *et al.*, 2004), proceso denominado como alimentación cruzada (Sivaprakasam *et al.*, 2016). Por lo tanto la concentración de acetato siempre resulta de la diferencia entre la producción y el consumo, por lo cual es de esperarse que al disminuir las poblaciones bacterias productoras de butirato, el acetato tiende a aumentar.

IX. Conclusión

Se concluye que durante y después de la intervención terapéutica las poblaciones bacterianas comensales disminuyen significativamente, presentando un incremento en la abundancia de especies bacterianas potencialmente patógenas, así mismo se presentó una disminución en la producción de AGCC.

De los cuatro pacientes fallecidos, dos mujeres y dos hombres con un tipo de trasplante alogénico 100% idéntico y haplo idéntico respectivamente, se pudo observar que además de presentar una abundancia significativa de *E. coli* en el punto de toma de muestra correspondiente a neutropenia estos también mostraron una baja diversidad bacteriana 30 días después del trasplante, el fallecimiento de los cuatro pacientes pudo deberse a esta baja recuperación en la diversidad y a complicaciones como el desarrollo de EICH agudo y fiebre.

Una vez restablecida la microbiota intestinal es probable que los efectos se reviertan, al menos los resultados obtenidos en este estudio muestran esa tendencia de recuperación de las poblaciones bacterianas comensales y por ende la producción de AGCC. Estudios han demostrado que la producción de AGCC es regulada por factores relacionados tanto con el hospedero, el ambiente, la dieta así como con la disponibilidad de sustratos y composición de la microbiota, por lo tanto, es de esperarse que al recuperarse la comunidades bacterianas comensales el efecto de disminución de AGCC se contrarreste, recupere y permanezca relativamente estable como ocurre en individuos sanos (60:20:20; Yamada *et al.* 2015).

Estos resultados facilitarán la comprensión de la composición de la microbiota intestinal y las complejas interacciones hospedero-microbiota en pacientes mexicanos con leucemia aguda, identificando especies bacterianas con efectos benéficos así como las poblaciones bacterianas potencialmente patógenas, que podrían sentar las bases para el uso adecuado de antibióticos en estos pacientes e inclusive iniciar estudios de intervención para la posible utilización de enfoques terapéuticos con el fin de restaurar la integridad de la microbiota intestinal, como por ejemplo la administración del trasplante de microbiota fecal (FTM), probióticos, prebióticos o simbióticos para mejorar la respuesta al tratamiento, disminuir la gravedad de la enfermedad, aumentar la supervivencia y disminuir la mortalidad (Cully, 2019; Peled *et al.*, 2020). Para ello se

recomienda realizar estudios a largo plazo, sobre todo para asegurar la funcionalidad, seguridad, duración, dosis y el método de administración más eficiente de los mismos para esta población.

X. Perspectivas

Pese a los resultados satisfactorios obtenidos se recomienda para los siguientes estudios un enfoque integrado basado en análisis basados en las tecnologías “ómicas” tales como metagenómica, metatranscriptómica y metabolómica dado que son métodos más completos que proporcionan una comprensión más profunda, ya que, no solo funcionan para la detección, sino también proporcionan información sobre la participación en las diferentes vías las cuales cumplen una función dentro del sistema tanto de las bacterias como de los demás componentes que constituyen al microbioma intestinal tales como: los virus, hongos y arqueas, se propone este punto dado que la secuenciación del 16S rRNA no aplica para detectarlos, aunado que este tipo de estudios arroja resultados más precisos a nivel de cepa esto es un punto muy importante ya que, algunas cepas presentan propiedades inmunomoduladoras o proinflamatorias, o por otra parte existen grupos bacterianos altamente heterogéneos que pueden incluir o no cepas patógenas; además estas tecnologías permiten la detección de genes y funciones de los mismos involucrados en la homeostasis, fenotipificando el sistema de una manera más precisa (Dunn *et al.*, 2011; Pastar *et al.*, 2018). A su vez es indispensable el estudio y la visualización del microambiente y la red de la biología del sistema que incluye las complejas y múltiples interacciones moleculares e intercelulares que incluyen células intestinales neurales, inmunes, nerviosas entéricas, mesenquimales, estromales, endoteliales, fibroblastos, he inclusive los vasos sanguíneos. Esto conllevará a una comprensión integrada de las diversas interacciones intestinales microbiota-hospedero que ayudarán a dilucidar los mecanismos de la patología y a su vez comprender los efectos y participación de la microbiota intestinal en pacientes con leucemia aguda, para idealmente llegar en un futuro a terapias personalizadas (Valitutti *et al.*, 2019; Allegretti *et al.*, 2019; Min *et al.*, 2020).

Hubo algunas limitaciones en este estudio. Primero, el tamaño de muestra del estudio fue muy pequeño, principalmente debido a los criterios de inclusión que se emplearon y a la casuística tan reducida de este tipo de pacientes. Segundo, los pacientes provinieron de un solo Instituto de Salud de la Ciudad de México, Instituto Nacional de Cancerología INCan, reduciendo el nivel de reclutamiento. Tercero, sería relevante tomar muestras de seguimiento a tiempos más prolongados después de la intervención, para poder asegurarnos que la microbiota intestinal se restablece por completo y definir de manera más detallada su plasticidad. Cuarto, la secuenciación 16s no informa sobre la interacción del sistema inmune microbiano a nivel celular. Finalmente, la taxonomía a nivel de especie estuvo limitada en cierta medida porque solo se secuenciaron las regiones V3-V4 del gen 16S rRNA. En este sentido, lo conveniente sería la secuenciación del amplicón del gen 16S rRNA de longitud completa, o bien realizar estudios metagenómicos que brinden una información mucho más completa de la compleja relación hospedero-microbiota. En general los resultados demostraron una disminución en la diversidad bacteriana durante y después del tratamiento, con una tendencia a la recuperación de estas diversidades bacterianas.

XI. Referencias bibliográficas

- Amrane S., Raoult D., Lagier J.C. 2018. Metagenomics, culturomics, and the human gut microbiota. *Expert Rev. Anti-Infect. Ther.* 16:373–375.
- Andermann T.M., Rezvani A., Bhatt A. S. 2016. Microbiota manipulation with prebiotics and probiotics in patients undergoing stem cell transplantation. *Curr Hematol Malig Rep.* 11:19–28.
- Allegretti J.R., Mullish B. H., Kelly C., Fischer M. 2019. The evolution of the use of faecal microbiota transplantation and emerging therapeutic indications. *Lancet.* 394(10196):420-431.
- Arpaia N., Campbell C., Fan X., Dikiy S., van der Veecken J., Deroos P., Liu H., Cross J.R., Pfeffer K., Coffey P.J., et al. 2013. Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation. *Nature.* 504(7480):451-455.
- Barcenilla A., Pryde S. E., Martin J. C., Duncan S. H., Stewart C. S., Henderson C. et al. 2000. Phylogenetic relationships of butyrate-producing bacteria from the human gut. *Appl Environ Microbiol.* 66: 1654–1661.
- Bevins C. L. and Salzman N. H. Paneth Cells, Antimicrobial Peptides and Maintenance of Intestinal Homeostasis. *Nat. Rev. Microbiol.* 2011, 9, 356-368.
- Bentley D. R., Balasubramanian S., Swedlow H. P., et al. 2008. Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. *Nature.* 456(7218):53-59.
- Bibbò S., Ianiro G., Giorgio V., Scaldaferrì F., Masucci L., Gasbarrini A., Cammarota G. 2016. The role of diet on gut microbiota composition. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 20:4742–4749.
- Buffie C. G, Pamer E. G. 2013. Microbiota-mediated colonization resistance against intestinal pathogens. *Nature reviews Immunology.* 13:790–801.
- Brown A. J, Goldsworthy S. M, Barnes AA, et al. 2003. The Orphan G protein-coupled receptors GPR41 and GPR43 are activated by propionate and other short chain carboxylic acids. *J Biol Chem.* 278:11312–11319.
- Byndloss M.X., Olsan E.E., Rivera-Chávez F., Tiffany C.R., Cevallos S.A., Lokken K.L., et al. 2017. Microbiota-activated PPAR- γ signaling inhibits dysbiotic Enterobacteriaceae expansion. *Science.* 357:570–575.
- Cammarota G., Ianiro G., Tilg H., et al. 2017. European FMT Working Group. European consensus conference on faecal microbiota transplantation in clinical practice. *Gut.* 66(4):569-580.
- Caporaso J.G., Kuczynski J., Stombaugh J., Bittinger K., Bushman F.D., Costello E.K., Fierer N., Pena A.G., Goodrich J.K., Gordon J.I., et al. 2010. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods.* 7(5):335–336.
- Castro C. G., Gregianin L. J., Brunetto A. L. 2003 Clinical and epidemiological analysis of bone marrow transplantation in a pediatric oncology unit. *J Pediatr.* 79: 413-22.
- Corrêa-Oliveira R., Fachi J. L., Vieira A., Sato F. T., Vinolo M. A. R. 2016. Regulation of immune cell function by short-chain fatty acids. *Clin Transl Immunol.* 5:73.

- Costello E. K., Keaton S., Les Dethlefsen, Brendan J. M. B., David A. Relman. 2012. The Application of Ecological Theory Toward an Understanding of the Human Microbiome. *Science* 336:1255.
- Cully M. 2019. Antibiotics alter the gut microbiome and host health. *Nature Milestones*.
- Costa M. and Weese J.S. 2019. Methods and basic concepts for microbiota assessment. *Vet. J.* 249:10–15.
- Cobo F., Pérez C. V., García S. A., Navarro M. J. 2020. BACTEREMIA caused by VEILLONELLA DISPAR in an oncological patient. *Anaerobe*. 20: 30141-4.
- Cronin M., Ventura M., Fitzgerald G. F. and vanSinderen D. 2011. Progressing genomics, metabolism and biotechnology of bifidobacteria. *International Journal of Food Microbiology*. 149: 4.
- Crusz S. M. and Balkwill F. R. 2015. Inflammation and cancer: advances and new agents. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 12: 584–596.
- Day R. and Underwood A. 1986. *Química Analítica Cuantitativa. Cromatografía gas-líquido.* (Quinta ed.). PEARSON Prentice Hall.
- Dethlefsen L. and Relman D. 2011. Incomplete recovery and individualized responses of the human distal gut microbiota to repeated antibiotic perturbation. *Proc Natl Acad Sci.* 108:4554-4561.
- Dethlefsen L., Huse S., Sogin M.L., Relman D.A. 2008. The Pervasive Effects of an Antibiotic on the Human Gut Microbiota, as Revealed by Deep 16S rRNA Sequencing. *PLoS Biol.* 6:11
- Duarte M. 2012. Trasplante autólogo de médula ósea. Bogotá, D.c. 37(4)
- Dunn W.B., Broadhurst D.I., Atherton H.J., Goodacre R., Griffin J.L. 2011. Systems level studies of mammalian metabolomes: the roles of mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Chem Soc Rev* 40: 387–426.
- Duncan S. H., Hold G. L., Harmsen H. J., Stewart C. S., Flint H. J. 2002. 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.* 52: 2141–2146.
- Duncan S. H., Holtrop G., Lobley G. E., Calder A. G., Stewart C. S., Flint H. J. 2004. Contribution of acetate to butyrate formation by human faecal bacteria. *Br. J. Nutr.* 91: 915–923.
- De Palma G., Kamanova J., Cinova J., Olivares M., Drasarova H., Tuckova L., Sanz Y. 2012. Modulation of phenotypic and functional maturation of dendritic cells by intestinal bacteria and gliadin: Relevance for celiac disease. *J. Leukoc. Biol.* 92:1043–1054.
- Desai M. S, Seekatz A. M, Koropatkin N. M, et al. 2016. A dietary fiber-deprived gut microbiota degrades the colonic mucus barrier and enhances pathogen susceptibility. *Cell.* 167:1339–1353.
- Duffy L. C., Raiten D. J., Hubbard V. S., Starke-Reed P. 2015. Progress and challenges in developing metabolic footprints from diet in human gut microbial cometabolism. *J. Nutr.* 2015;145:1123–1130.

- Eeckhaut V., Van Immerseel F., Teirlynck E., Pasmans F., Fievez V., Snauwaert C., Haesebrouck F., Ducatelle R., Louis P., Vandamme P. 2008. *Butyricoccus pullicaecorum* gen. nov., sp. nov., an anaerobic, butyrate-producing bacterium isolated from the caecal content of a broiler chicken. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 58 (12): 2799–2802.
- Eckburg P. B., Bik E. M., Bernstein C. N., Purdom E., Dethlefsen L., Sargent M., et al. 2005. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*. 308:1635–8.
- Fast A. G. and Papoutsakis E. T. 2012. Stoichiometric and energetic analyses of non-photosynthetic CO₂-fixation pathways to support synthetic biology strategies for production of fuels and chemicals. *Current Opinion in Chemical Engineering*. 1:380.
- Fuks Garold, Michael E., Amnon A., Amit Z., Peter J. Turnbaugh, Yoav S. and Noam Shental. 2018. Combining 16S rRNA gene variable regions enables high-resolution microbial community profiling. *Microbiome*. 6:17.
- Furusawa Y., Obata Y., Fukuda S., Endo T.A., Nakato G., Takahashi D., Nakanishi Y., Uetake C., Kato K., Kato T., et al. 2013. Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature*. 504(7480):446-450.
- Fyhrquist N., Muirhead G., Prast-Nielsen S., Jeanmougin M., Olah p., Skoog T., et al. 2019. Microbe-host interplay in atopic dermatitis and psoriasis. *Nat Commun*.10: 4703
- Garcia-Mazcorro J. F., Mills D. A., Murphy K., Noratto G. 2018. Effect of barley supplementation on the fecal microbiota, caecal biochemistry, and key biomarkers of obesity and inflammation in obese db/db mice. *Eur. J. Nutr.* 57(7):2513-2528
- Garrett W. S. 2015. Cancer and the microbiota. *Science*. 348:80–86.
- Gill S. R., Pop M., Deboy R. T., Eckburg P. B., Turnbaugh P. J., Samuel B. S., et al. 2006. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science*. 312:1355–9.
- Gilbert J. A., Blaser M. J., Caporaso J. G., Jansson J. K., Lynch S. V., Knight R. 2018. Current understanding of the human microbiome. *Nat. Med.* 24:392–400.
- Guarner F., Malagelada J. R. 2003. Gut flora in health and disease. *The Lancet*. 361(9356): 512-519.
- Guilloteau P., Martin L., Eeckhaut V., Ducatelle R., Zabielski R., Van Immerseel F. 2010. From the gut to the peripheral tissues: The multiple effects of butyrate. *Nutrition Research Reviews*. 23:366.
- Golob J. L, Pergam S. A, Srinivasan S., et al. 2017. Stool microbiota at neutrophil recovery is predictive for severe acute graft vs host disease after hematopoietic cell transplantation. *Clin Infect Dis*. 65:1984-1991.
- Hammami R., Fernandez B., Lacroix C., Fliss I. 2013. Anti-infective properties of bacteriocins: an update. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*. 70:2947–2967.
- Hamer H. M, Jonkers D., Venema K., Vanhoutvin S., Troost F.J, Brummer R.J. 2008. Review article: the role of butyrate on colonic function. *Aliment Pharmacol Ther*. 27(2):104-119.

- Head D. R. 2002. Proposed changes in the definitions of Acute Myeloid Leukemia and Myelodysplastic syndrome: are they helpful?. *Curr Opin Oncol.* 14:19-23.
- Holleran G., Lopetuso L. R., Ianaro G., Pecere S., Pizzoferrato M., Petito V., Graziani C., McNamara D., Gasbarrini A., Scaldaferrri F. 2017. Gut microbiota and inflammatory bowel disease: So far so gut! *Minerva Gastroenterol. Dietol.* 63:373–384.
- Hooper L. V. and Gordon J. I. 2001. Commensal host–bacterial relationships in the gut. *Science.* 292 (5519):1115–1118.
- Illumina.com. 2010. Technology spotlight: Illumina Sequencing [Sede Web]. Illumina. 2010. Disponible en: http://www.illumina.com/documents/products/techspotlights/techspotlight_sequencing.pdf
- Jakobsson H. E., Rodríguez-Piñeiro A. M., Schütte A., Ermund A., Boysen P., Bemark M., Sommer F., Bäckhed F., Hansson G. C., Johansson M. E. 2015. The composition of the gut microbiota shapes the colon mucus barrier. *EMBO Rep.* 16:164–177.
- Jenq R. R., Ubeda C., Taur Y., et al. 2012. Regulation of intestinal inflammation by microbiota following allogeneic bone marrow transplantation. *J Exp Med.* 209:903–911.
- Jernberg C, et al. 2010. Long-term impacts of antibiotic exposure on the human intestinal microbiota. *Microbiology.* 156(11):3216–3223.
- Johnson J. S., Spakowicz D. J., Hong B. et al. Evaluation of 16S rRNA gene sequencing for species and strain-level microbiome analysis. 2019. *Nat Commun* 10:5029
- Josefsdottir K. S., Baldrige M. T., Kadmon C. S., King K. Y. 2017. Antibiotics impair murine hematopoiesis by depleting intestinal microbiota. *Blood.* 129: 729–739.
- Kamada N., Chen G. Y, Inohara N, Nunez G. 2013. Control of pathogens and pathobionts by the gut microbiota. *Nature immunology.* 2013;14:685–690.
- Kelly C.J. and Colgan S.P. 2016. Breathless in the Gut: implications of luminal O₂ for microbial pathogenicity. *Cell Host Microbe.* 19:427–428.
- Kinnebrew M. A., Buffie C. G., Diehl G. E., Zenewicz L. A., Leiner I., Hohl T. M., Flavell R. A., Littman D. R. and Pamer E. G. 2012. Interleukin 23 production by intestinal CD103(+)CD11b(+) dendritic cells in response to bacterial flagellin enhances mucosal innate immune defense. *Immunity* 36:276–287.
- Korry B.J., Cabral D.J., Belenky P. 2020. Metatranscriptomics Reveals Antibiotic-Induced Resistance Gene Expression in the Murine Gut Microbiota. *Frontiers in Microbiology.* 11:322.
- Lawrence D. A., Maurice C. F., Carmody R. N., et al. 2014. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature.* 505:559–563.
- Lazarevic V, et al. 2009. Metagenomic study of the oral microbiota by Illumina highthroughput sequencing. *J Microbiol Methods* 79:266–271.
- Ley R. E., Turnbaugh P. J., Klein S. et al. 2006. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature.* 444:1022–1023.
- Litvak Y., Byndloss X. M., Bäumlér J. A. 2018. Colonocyte metabolism shapes the gut microbiota. *Science.* 362:1-6.

- Lloyd Price J., Abu Ali G., Huttenhower C. 2016. The healthy human microbiome. *Genome Med.* 8:51.
- Macia L., Tan J., Vieira A. T., Leach K., Stanley D., Luong S., Maruya M., Ian McKenzie C., Hijikata A., Wong C., et al. 2015. Metabolite-sensing receptors GPR43 and GPR109A facilitate dietary fibre-induced gut homeostasis through regulation of the inflammasome. *Nat. Commun.* 6:6734.
- Macpherson A., Harris N. 2004. Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. *Nat Rev Immunol* 4, 478–485
- Macfarlane S. and Macfarlane G. T. 2003. Regulation of short-chain fatty acid production. *The Proceedings of the Nutrition Society.* pp. 62-67.
- Martin R., Chain F., Miquel S., Lu J., Gratadoux J. J, Sokol H. et al. 2014. The commensal bacterium *Faecalibacterium prausnitzii* is protective in DNBS-induced chronic moderate and severe colitis models. *Inflamm Bowel Dis.* 20: 417–430.
- Martin R., Miquel S., Chain F., Natividad J. M., Jury J., Lu J. et al. 2015. *Faecalibacterium prausnitzii* prevents physiological damages in a chronic low-grade inflammation murine model. *BMC Microbiol* 15: 67.
- Marchandin H., Jean-Pierre H., Carrière C., Canovas F., Darbas H. Jumas-Bilak E. 2001. Prosthetic Joint Infection due to *Veillonella dispar*. *European Society of Clinical Microbiology.* 20. 340-342.
- Maslowski K. M., Vieira A. T., Ng A., Kranich J., Sierro F., Yu D., Schilter H. C., Rolph M. S., Mackay F., Artis D., et al. 2009. Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43. *Nature.* 461:1282–1286.
- de Martel C., Ferlay J., Franceschi S., Vignat J., Bray F., Forman D, et al. 2012. Global burden of cancers attributable to infection. *Lancet Oncol.* 13:607–615.
- Merino A. 2010. Clasificación de las leucemias agudas mieloides. *Revista Del Laboratorio Clínico*, 3(3), 139–147.
- Mandell, Douglas, and Bennett's. 2015. *Principles and Practice of Infectious Diseases*, Volumen 2. pp. 2929-2933
- Min S., Kim S. & Cho S. 2020. Gastrointestinal tract modeling using organoids engineered with cellular and microbiota niches. *Exp Mol Med* 52, 227–237.
- Nagao-Kitamoto H. and Kamada N. 2017. Host-microbial cross-talk in inflammatory bowel disease. *Immune Netw.* 17(1):1-12.
- Narushima S., Sugiura Y., Oshima K., et al. 2014. Characterization of the 17 strains of regulatory T cell-inducing human-derived *Clostridia*. *Gut Microbes.* 5:333–339.
- Park B. S. and Lee J. O. 2013. Recognition of lipopolysaccharide pattern by TLR4 complexes. *Exp. Mol. Med.* 45:66.

- Pastar I., Wong L. L., Egger A. N, Tomic-Canic M. 2018. Descriptive versus mechanistic scientific approach to study wound healing and its inhibition: is there a value of translational research involving human subjects? *Exp Dermatol*.
- Peled J. U., M. D., Ph. D., Antonio L. C. Gomes, Ph. D., Sean M. Devlin, Ph.D., Eric R. Littmann, B.A., Ying Taur, M.D., Anthony D. Sung, M.D., et al. 2020. Microbiota as Predictor of Mortality in Allogeneic Hematopoietic-Cell Transplantation. *N Engl J Med*. 382:822-834.
- Pianta A., Arvikar S., Strle K., Drouin E. E., Wang Q., Costello C. E., Steere A. C. 2017. Evidence of the immune relevance of *Prevotella copri*, a gut microbe, in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheumatol*. 69:964–975.
- Pokusaeva K., Fitzgerald G. F. and van Sinderen D. 2011. Carbohydrate metabolism in *Bifidobacteria*. *Genes & Nutrition*. 6: 285.
- Pouteau E., Nguyen P., Balleve O., Krempf M. 2003. Production rates and metabolism of short-chain fatty acids in the colon and whole body using stable isotopes. *Proc Nutr Soc*. 62:87–93.
- Qiu X., Zhang M., Yang X., Hong N., Yu C. 2013. *Faecalibacterium prausnitzii* upregulates regulatory T cells and anti-inflammatory cytokines in treating TNBS-induced colitis. *J Crohns Colitis*. 7: 558–568.
- Rajagopala V. S., Vashee S., Lauren M. Oldfield, Yo Suzuki, J. Craig Venter, A. Telenti, y K. E. Nelson. 2017. The Human Microbiome and Cancer. *Cancer Prev Res*.10:226-234.
- Riiser A. 2015. The human microbiome, asthma, and allergy. *Allergy Asthma Clin Immunol*. 11:35.
- Saitoh S, et al. 2002. *Bacteroides ovatus* as the predominant commensal intestinal microbe causing a systemic antibody response in inflammatory bowel disease. *Clin Diagn Lab Immunol*. 9(1):54-59.
- Sears C. L., Geis A. L., Housseau F. 2014. *Bacteroides fragilis* subverts mucosal biology: from symbiont to colon carcinogenesis. *J Clin Invest*. 124(10):4166-4172.
- Sivaprakasam S, Prasad PD, Singh N. 2016. Benefits of short-chain fatty acids and their receptors in inflammation and carcinogenesis. *Pharmacol Ther*. 164:144-151.
- Sokol H., Pigneur B., Watterlot L., Lakhdari O., Bermudez-Humaran L. G., Gratadoux J. J. et al. 2008. *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 16731–16736.
- Sobala G. M. et al. 1991. Acute *Helicobacter pylori* infection: clinical features, local and systemic immune response, gastric mucosal histology, and gastric juice ascorbic acid concentrations. *Gut*. 32,1415–1418.
- Sun M., Wu W., Liu Z., Cong Y. 2017. Microbiota metabolite short chain fatty acids, GPCR, and inflammatory bowel diseases. *J. Gastroenterol*. 52:1–8.
- Schilderink R., Verseijden C., De Jonge W. J. 2013. Dietary inhibitors of histone deacetylases in intestinal immunity and homeostasis. *Front. Immunol*. 4:226.

- Shallis R. M., Christopher M. Terry, Seah H. Lim. 2017. Changes in intestinal microbiota and their effects on allogeneic stem cell transplantation. *Am J Hematol.* 93:122–128.
- Shendure J., Ji H. 2008. Next-generation DNA sequencing. *Nature.* 26(19):1135-1145.
- Shen X., Cui H., Xu X. 2019. Orally administered *Lactobacillus casei* exhibited several probiotic properties in artificially suckling rabbits. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.*
- Skert C., Patriarca F., Sperotto A., Cerno M., Filí C., Zaja F. et al. 2006. Sclerodermatous chronic graft-versus-host disease alter allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: Incidence, predictors and outcome. *Haematologica.* 91: 258-61.
- Smith P. M., Howitt M. R., Panikov N., et al. 2013. The microbial metabolites, short chain fatty acids, regulate colonic Treg cell homeostasis. *Science.* 341:569–573.
- Snider E. J., Freedberg D. E., Abrams J. A. 2016. Potential role of the microbiome in Barrett's Esophagus and esophageal adenocarcinoma. *Dig Dis Sci.* 61:2217–2225.
- Tan J., McKenzie C., Potamitis M., Thorburn A., Mackay C and Macia L. 2014. The Role of Short-Chain Fatty Acids in Health and Disease. *Advances in immunology.* 121:91-119.
- Taur Y., Jenq R. R., Perales M. A., et al. 2014. The effects of intestinal tract bacterial diversity on mortality following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood.* 124:1174–1182.
- Taur Y., Pamer E. G. 2013. The intestinal microbiota and susceptibility to infection in immunocompromised patients. *Curr Opin Infect Dis.* 26:332–7.
- Teshima T., Ordemann R., Reddy P., et al. 2002. Acute graft-versus-host disease does not require alloantigen expression on host epithelium. *Nat Med.* 8:575–581.
- Tomaino R. M., Parker J. D. and Larick D. K. 2001. Analysis of free acids in whey products by solid-phase microextraction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 49: 3993.
- Tringe S. G, Hugenholtz P. 2008. A renaissance for the pioneering 16S rRNA gene. *Curr Opin Microbiol* 11:442–446.
- Tuddenham S. and Sears L. C. 2015. The Intestinal Microbiome and Health. *Curr Opin Infect Dis.* (5):464-70
- Turnbaugh P. J, Ley R. E., Hamady M., Fraser-Liggett C. M., Knight R., Gordon J. I. 2007. The human microbiome project. *Nature.* 449:804–10.
- Valitutti F., Cucchiara S., Fasano A. 2019. Celiac Disease and the Microbiome. *Nutrients.* 11(10):2403.
- van der Waaij D, Berghuis-de Vries J. M., Lekkerkerk L. 1971. Colonization resistance of the digestive tract in conventional and antibiotic-treated mice. *The Journal of hygiene.* 69:405–411.
- Wang L., J. Zhou, Y. Xin, et al. 2016. Bacterial overgrowth and diversification of microbiota in gastric cancer. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 28(3):261-266.

- Walker A. W., Duncan S. H., McWilliam Leitch E. C., Child M. W., Flint H. J. 2005. pH and peptide supply can radically alter bacterial populations and short-chain fatty acid ratios within microbial communities from the human colon. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 3692–3700.
- Warny M., Pepin J., Fang A., et al. 2005. Toxin production by an emerging strain of *Clostridium difficile* associated with outbreaks of severe disease in North America and Europe. *Lancet.* 366(9491):1079-1084.
- Woo V. and Alenghat T. 2017. Host-microbiota interactions: Epigenomic regulation. *Curr. Opin. Immunol.* 44:52–60.
- Xun C. Q., Thompson J. S., Jennings C. D., Brown S. A., Widmer M. B. 1994. Effect of total body irradiation, busulfan-cyclophosphamide, or cyclophosphamide conditioning on inflammatory cytokine release and development of acute and chronic graft-versus-host disease in H-2-incompatible transplanted SCID mice. *Blood.* 83:2360–2367.
- Yu L. X. and Schwabe R. F. 2017. The gut microbiome and liver cancer: mechanisms and clinical translation. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 14(9):527-39.
- Yamada T., Shimizu K., Ogura H., Asahara T., Nomoto K., Yamakawa K., et al. 2015. Rapid and sustained long-term decrease of fecal short-chain fatty acids in critically ill patients with systemic inflammatory response syndrome. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 39:569-77.

XII. ANEXO

ANEXO 1

Mappingfile

#SampleID	LinkerPrimerSequence	Origin	Sex	Sample_time	Subject	Type_of_trasplant	EICH	Age	Status	Description
1	CTGTCTCTTATACACATCT	EDO_MEX	Female	Initial	subject-1	Alogenico	No	25	Vivo	p2
2	CTGTCTCTTATACACATCT	EDO_MEX	Male	Initial	subject-3	Alogenico	Si	33	Vivo	p16
3	CTGTCTCTTATACACATCT	Queretaro	Male	Initial	subject-5	Haploidentico	Si	21	Muerto	p51
4	CTGTCTCTTATACACATCT	EDO_MEX	Female	Initial	subject-7	Alogenico	Si	29	Vivo	p57
5	CTGTCTCTTATACACATCT	Michoacan	Male	Initial	subject-9	Haploidentico	Si	22	Vivo	p107
6	CTGTCTCTTATACACATCT	Michoacan	Male	30	subject-6	Alogenico	Si	26	Vivo	p90
7	CTGTCTCTTATACACATCT	Puebla	Female	30	subject-4	Alogenico	No	23	Vivo	p81
8	CTGTCTCTTATACACATCT	Oaxaca	Female	30	subject-11	Haploidentico	No	18	Vivo	p169
9	CTGTCTCTTATACACATCT	Oaxaca	Female	Ct	subject-11	NA	NA	45	NA	p140
10	CTGTCTCTTATACACATCT	EDO_MEX	Female	Neutropenia	subject-1	Alogenico	No	25	Vivo	p5
11	CTGTCTCTTATACACATCT	Queretaro	Male	Neutropenia	subject-5	Haploidentico	Si	21	Muerto	p63
12	CTGTCTCTTATACACATCT	EDO_MEX	Female	Neutropenia	subject-7	Alogenico	Si	29	Vivo	p76
13	CTGTCTCTTATACACATCT	Michoacan	Male	Neutropenia	subject-9	Haploidentico	Si	22	Vivo	p112
18	CTGTCTCTTATACACATCT	EDO_MEX	Female	30	subject-1	Alogenico	No	25	Vivo	p6
19	CTGTCTCTTATACACATCT	EDO_MEX	Male	30	subject-3	Alogenico	Si	33	Vivo	p44
20	CTGTCTCTTATACACATCT	Queretaro	Male	30	subject-5	Haploidentico	Si	21	Muerto	p84
21	CTGTCTCTTATACACATCT	EDO_MEX	Female	30	subject-7	Alogenico	Si	29	Vivo	p99
22	CTGTCTCTTATACACATCT	Michoacan	Male	30	subject-9	Haploidentico	Si	22	Vivo	p120
26	CTGTCTCTTATACACATCT	EDO_MEX	Male	Ct	subject-1	NA	NA	18	NA	p3
27	CTGTCTCTTATACACATCT	Puebla	Female	Initial	subject-4	Alogenico	No	23	Vivo	p38
28	CTGTCTCTTATACACATCT	Queretaro	Female	Ct	subject-5	NA	NA	59	NA	p73
29	CTGTCTCTTATACACATCT	EDO_MEX	Female	Ct	subject-7	NA	NA	24	NA	p86
30	CTGTCTCTTATACACATCT	Michoacan	Female	Ct	subject-9	NA	NA	48	NA	p109
35	CTGTCTCTTATACACATCT	Guerrero	Male	Initial	subject-2	Alogenico	Si	20	Vivo	p10
36	CTGTCTCTTATACACATCT	EDO_MEX	Female	Ct	subject-3	NA	NA	34	NA	p45
37	CTGTCTCTTATACACATCT	Michoacan	Male	Initial	subject-6	Alogenico	Si	26	Vivo	p55
38	CTGTCTCTTATACACATCT	Morelos	Female	Initial	subject-8	Alogenico	Si	43	Vivo	p95
39	CTGTCTCTTATACACATCT	Michoacan	Male	Initial	subject-10	Haploidentico	Si	35	Muerto	p32
44	CTGTCTCTTATACACATCT	Guerrero	Male	Neutropenia	subject-2	Alogenico	Si	20	Vivo	p12
45	CTGTCTCTTATACACATCT	Puebla	Female	Neutropenia	subject-4	Alogenico	No	23	Vivo	p46
46	CTGTCTCTTATACACATCT	Michoacan	Male	Neutropenia	subject-6	Alogenico	Si	26	Vivo	p67
47	CTGTCTCTTATACACATCT	Morelos	Female	Neutropenia	subject-8	Alogenico	Si	43	Vivo	p102
52	CTGTCTCTTATACACATCT	Guerrero	Male	30	subject-2	Alogenico	Si	20	Vivo	p28
53	CTGTCTCTTATACACATCT	EDO_MEX	Male	Neutropenia	subject-3	Alogenico	Si	33	Vivo	p24
54	CTGTCTCTTATACACATCT	Michoacan	Male	Neutropenia	subject-10	Haploidentico	Si	35	Muerto	p35
55	CTGTCTCTTATACACATCT	Morelos	Female	30	subject-8	Alogenico	Si	43	Vivo	p117
56	CTGTCTCTTATACACATCT	Michoacan	Male	30	subject-10	Haploidentico	Si	35	Muerto	p85

Prueba post-hoc de Tukey multiple para datos de diversidad alfa

Tukey multiple test de comparación	Diferencia	Valor de P	Sumario
Control vs Inicial	0.2277	0.9138	ns
Inicial vs Neutropenia	3.512	<0.0001	****
Inicial vs 30 DR	1.243	<0.0056	**
Neutropenia vs 30 DR	-2.27	<0.0001	****

Abundancias relativas (%) a nivel de phylum, género y especie para grupo control y pacientes

PHYLUM	Euryarchaeota	Other	Actinobacteria	Bacteroidetes	Cyanobacteria	Firmicutes
Control	0.02232316	0.09117889	0.67344859	49.0383626	0.25716616	44.3320635
Inicial	0.00000000	0.00101343	0.33997829	43.3677325	0.04095676	37.9680621
Neutropenia	0.00000000	0.00000000	3.52836693	3.57052155	0.00000000	52.5815225
30 DT	0.00000000	0.00000000	1.03250822	8.08971656	0.00000000	59.7288515
PHYLUM	Fusobacteria	Proteobacteria	Spirochaetes	Synergistetes	TM7	Verrucomicrobia
Control	0.00083076	2.56532834	0.02703639	0.01530619	0.00013789	2.97681744
Inicial	0.00974037	18.1343612	0.00000000	0.00000000	0.00285771	0.1352976
Neutropenia	0.00085157	40.207204	0.00000000	0.00000000	0.1115335	0.00000000
30 días DT	0.01761212	31.1309173	0.00000000	0.00000000	0.00028053	0.00011383

GENUS	<i>Methanobrevibacter</i>	<i>Actinomyces</i>	<i>Rothia</i>	<i>Bifidobacterium</i>	<i>Collinsella</i>
Control	0.03360859	0.00104058	0.00618978	0.75998291	0.02906514
Inicial	0.0000000	0.00318742	0.00084731	0.33004224	0.05036323
Neutropenia	0.0000000	2.58870352	3.74293491	1.22193141	0.0000000
30 días DT	0.0000000	0.03325461	0.09487739	1.02596659	0.0000000
GENUS	<i>Eggerthella</i>	<i>Bacteroides</i>	<i>Parabacteroides</i>	<i>Prevotella</i>	<i>Alistipes</i>
Control	0.0080294	17.2876377	2.3333648	34.4964810	0.0303398
Inicial	0.0032750	26.9067708	4.5894866	14.7196416	0.0007909
Neutropenia	0.0000000	4.0126191	0.1333629	0.2210186	0.0000000
30 días DT	0.0126200	8.1239742	0.4060216	0.1018746	0.0054832
GENUS	<i>Butyricimonas</i>	<i>Odoribacter</i>	<i>CF231</i>	<i>Paraprevotella</i>	<i>[Prevotella]</i>
Control	0.0747403	0.1507179	0.0792257	1.1342277	1.1718551
Inicial	0.0924455	0.2309515	0.0000000	0.4974831	0.0000000
Neutropenia	0.0000000	0.0002301	0.0000000	0.0000000	0.0000000
30 días DT	0.0000000	0.0000000	0.0000000	0.0000000	0.0000000
GENUS	<i>Staphylococcus</i>	<i>Granulicatella</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactococcus</i>
Control	0.0000000	0.0000000	0.0000000	0.0112954	0.0057270
Inicial	0.0007909	0.0015682	0.0000000	0.0206402	0.0081557
Neutropenia	0.0385208	2.7349077	0.2639830	13.5092667	0.1456527
30 días DT	5.2256573	0.1428967	0.3287456	3.5477277	0.0032134
GENUS	<i>Streptococcus</i>	<i>Turicibacter</i>	<i>Clostridium</i>	<i>SMB53</i>	<i>Sarcina</i>
Control	0.3163529	0.0135503	0.4352862	0.2031567	0.0007042
Inicial	0.0411179	0.0524898	1.1194959	0.3619123	0.0050475
Neutropenia	17.1297026	0.0000000	0.0025681	0.0052348	0.0000000
30 días DT	4.1441470	0.0052197	0.8653501	0.9111978	0.1160271
GENUS	<i>Pseudoramibacter</i>	<i>Anaerostipes</i>	<i>Blautia</i>	<i>Clostridium</i>	<i>Coprococcus</i>
Control	0.0295660	0.0516259	3.3792116	0.1681154	1.8243307
Inicial	0.0015819	0.0775352	2.6423537	0.7810171	1.5571194
Neutropenia	0.0000000	0.0000987	0.1706823	0.5157476	0.3166545
30 días DT	0.0000000	0.0042281	3.0284108	1.3083322	0.7773135
GENUS	<i>Dorea</i>	<i>Epulopiscium</i>	<i>Lachnobacterium</i>	<i>Lachnospira</i>	<i>Oribacterium</i>
Control	0.2067388	0.0000000	0.7496311	1.7464361	0.0396222
Inicial	0.5916828	0.4706508	1.1756251	2.0966022	0.0000000
Neutropenia	0.1711527	0.0130671	0.0112440	0.0055815	0.0000000
30 días DT	1.7586547	3.5185423	0.0986491	2.0251821	0.0000000
GENUS	<i>Roseburia</i>	<i>[Ruminococcus]</i>	<i>Anaerofilum</i>	<i>Anaerotruncus</i>	<i>Butyricicoccus</i>
Control	5.8609938	0.9687105	0.0000000	0.0031569	0.1311977
Inicial	5.9080954	1.8032186	0.0000000	0.0069050	0.1703340
Neutropenia	0.4565134	0.8117672	0.0000000	0.0000000	0.0124935
30 días DT	2.2153368	2.9710526	1.1146212	0.0113747	0.3198830
GENUS	<i>Clostridium</i>	<i>Faecalibacterium</i>	<i>Oscillospira</i>	<i>Ruminococcus</i>	<i>Acidaminococcus</i>
Control	0.0007142	11.2487509	2.5857216	3.8126656	0.0000000
Inicial	0.0290901	8.0466125	1.2839095	1.9316071	0.1044023
Neutropenia	0.0000000	0.0548570	0.3294184	0.1589804	0.0000000
30 días DT	0.0002333	11.4087379	1.9196213	2.0650477	0.0000000
GENUS	<i>Anaerovibrio</i>	<i>Dialister</i>	<i>Megamonas</i>	<i>Megasphaera</i>	<i>Phascolarctobacterium</i>
Control	0.0355015	1.1499402	0.1478581	0.0777451	1.0892206
Inicial	0.0000000	1.0894842	0.0000000	0.0188401	0.3647934
Neutropenia	0.0000000	0.3652608	0.0000000	0.0000000	0.0001151
30 días DT	0.0000000	0.0000000	0.0000000	0.0199908	0.1144352

GENUS	<i>Veillonella</i>	<i>Catenibacterium</i>	<i>Coprobacillus</i>	<i>[Eubacterium]</i>	<i>Fusobacterium</i>
Control	0.2287924	0.0475995	0.0235051	0.0616321	0.0010095
Inicial	1.0944301	0.0023728	0.0021454	0.0050132	0.0107666
Neutropenia	0.4011072	0.0000000	0.0000000	0.0000000	0.0180375
30 días DT	6.1456707	0.0000000	0.0012833	0.0745403	0.0232293
GENUS	<i>Sutterella</i>	<i>Bilophila</i>	<i>Desulfovibrio</i>	<i>Campylobacter</i>	<i>Succinivibrio</i>
Control	0.6838043	0.0841859	0.0006340	0.0000000	0.0166957
Inicial	0.6624442	0.0270179	0.0111649	0.0003849	2.4803419
Neutropenia	0.0007444	0.0000000	0.2073183	0.0144043	0.0000000
30 días DT	0.0002289	0.0137208	0.0000000	0.0168632	0.0000000
GENUS	<i>Escherichia</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Haemophilus</i>	<i>Treponema</i>	<i>Cloacibacillus</i>
Control	0.7171230	0.8198759	0.2576453	0.0282110	0.0158542
Inicial	15.7544527	0.3049712	0.2829611	0.0000000	0.0000000
Neutropenia	47.7285896	0.0055815	2.4799464	0.0000000	0.0000000
30 días DT	28.6415239	2.0425843	3.2663372	0.0000000	0.0000000
GENUS	<i>Akkermansia</i>				
Control	3.1233990				
Inicial	0.1735694				
Neutropenia	0.0000000				
30 días DT	0.0001167				

SPECIE	<i>Rothia mucilaginosa</i>	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	<i>Bifidobacterium longum</i>	<i>Collinsella aerofaciens</i>	<i>Eggerthella lenta</i>
Control	0.01164862	1.6202702	0.25914201	0.04978931	0.02196186
Inicial	0.0012934	0.66241911	0.16413757	0.10557337	0.00680698
Neutropenia	13.6865008	0.4348917	0.83198545	0.00000000	0.00000000
30 días DT	0.16545151	1.31592395	0.27154269	0.00000000	0.0252211
SPECIE	<i>Bacteroides fragilis</i>	<i>Bacteroides ovatus</i>	<i>Bacteroides uniformis</i>	<i>Parabacteroides distasonis</i>	<i>Prevotella copri</i>
Control	0.70960761	3.15314847	1.83514642	2.67863731	41.6960509
Inicial	2.37882346	8.43484289	4.0487217	4.26612707	20.7288515
Neutropenia	0.00000000	0.65675164	0.03869418	0.34317383	0.29988111
30 días DT	0.00000000	1.0354433	3.16823606	0.05670249	0.3202149
SPECIE	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	<i>Lactobacillus reuteri</i>	<i>Lactobacillus zeae</i>	<i>Streptococcus anginosus</i>	<i>Streptococcus luteciae</i>
Control	0.00070686	0.01491361	0.00075821	0.00725662	0.00085684
Inicial	0.00000000	0.00054214	0.00521402	0.00326427	0.01266988
Neutropenia	4.28463047	0.26787833	9.30877155	0.06270529	4.59052273
30 días DT	0.04557364	0.10820652	9.31793786	0.09765597	0.0107151
SPECIE	<i>Blautia obeum</i>	<i>Blautia producta</i>	<i>Clostridium citroniae</i>	<i>Clostridium hathewayi</i>	<i>Coprococcus catus</i>
Control	0.51188168	0.10795948	0.26372666	0.13029709	0.21801117
Inicial	0.65603603	0.2862379	1.00512609	0.18226948	0.13261439
Neutropenia	0.02131514	0.00040204	0.46071669	1.04002684	0.00000000
30 días DT	0.04330936	1.3359568	1.46341805	0.22866498	0.01217571
SPECIE	<i>Butyricicoccus pullicaecorum</i>	<i>Clostridium methylpentosum</i>	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	<i>Ruminococcus bromii</i>	<i>Ruminococcus callidus</i>
Control	0.25041298	0.00146576	21.2729359	2.96117008	0.14718141
Inicial	0.37196185	0.03954002	18.0780644	2.63050638	0.32911852
Neutropenia	0.06941644	0.00000000	0.0670549	0.01530909	0.00000000
30 días DT	0.56658667	0.00046862	20.4215119	0.8837278	0.00000000
SPECIE	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	<i>Akkermansia muciniphila</i>	<i>[Eubacterium] bifforme</i>	<i>[Eubacterium] dolichum</i>	<i>Roseburia faecis</i>
Control	0.6726992	6.23815713	0.13009321	0.00818562	0.12808692
Inicial	0.54543534	0.35800467	0.00627658	0.00585218	0.11470579
Neutropenia	5.45966537	0.00000000	0.00000000	0.00000000	0.00213151
30 días DT	8.56596322	0.00023431	0.00000000	0.24261807	0.04813734
SPECIE	<i>Bacteroides caccae</i>	<i>Bacteroides coprophilus</i>	<i>Prevotella stercorea</i>	<i>Alistipes indistinctus</i>	<i>Clostridium neonatale</i>
Control	1.79927939	0.40488286	8.13271769	0.04807693	0.00000000
Inicial	6.24539899	0.35843687	0.00000000	0.00163329	0.21116433
Neutropenia	0.01090358	0.04418425	0.00180225	0.00000000	0.00000000
30 dr	0.80695613	0.00000000	0.0452284	0.01101247	0.10863864
SPECIE	<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Coprococcus eutactus</i>	<i>[Ruminococcus] torques</i>	<i>Veillonella dispar</i>	<i>Enterococcus cecorum</i>
Control	0.00787912	1.05934924	0.25763494	0.52837306	0.00000000
Inicial	0.07694626	0.67300616	1.37158551	1.4022635	0.00000000
Neutropenia	0.01575548	0.01104606	0.00000000	0.50866967	0.01104606
30 dr	0.01285536	0.00000000	0.30863129	4.56285935	0.33652512
SPECIE	<i>Escherichia coli</i>	<i>[Ruminococcus] gnavus</i>			
Control	1.35070098	1.30894669			
Inicial	22.1081492	1.99037889			
Neutropenia	55.8553878	1.59877977			
30 dr	39.5453669	4.51032847			

ANEXO 2

Cuantificación de ácidos grasos de cadena corta (acetato, propionato y butirato)

Paciente	# DE ALCUOTA	PESO	OBSERVACIONES	Coloración de la MF	PROMEDIO DE LOS 10 TUBOS CON 800 µl	RESTA (gr)	ACETATO (mM/g)	PROPIONATO (mM/g)	BUTIRATO (mM/g)	ACETATO (mM/g)	PROPIONATO (mM/g)	BUTIRATO (mM/g)
1	2	1.8984		café claro	1.879	0.0184	16.74	4.72	3.98	862.89	243.30	205.15
2	10	1.8814		café claro	1.879	0.0024	34.97	15.94	6.7	14570.83	6641.67	2791.67
3	16	1.9380		café claro	1.879	0.059	59.8	11.76	20.07	1013.56	199.32	340.17
4	38	2.0792		café claro	1.879	0.2002	64.55	22.69	16.83	322.43	113.34	84.07
5	51	2.0563		café claro	1.879	0.1773	41.5	16.76	8.42	234.07	94.53	47.49
6	55	1.9342		verde claro	1.879	0.0552	25.43	1.83	1.11	460.69	33.15	20.11
7	57	2.0395		café claro	1.879	0.1605	17.2	9.31	3.61	107.17	58.01	22.49
8	95	1.9412		café claro	1.879	0.0622	35.77	4.71	4.35	575.08	75.72	69.94
9	107	1.8888		café oscuro	1.879	0.0098	35.15	16.6	9.57	3586.73	1693.88	976.53
10	32	1.9534		café claro	1.879	0.0734	47.75	20.55	12.82	650.54	279.97	174.66
11	139	1.9287		café fuerte y turbio	1.879	0.0497	212.35	84.64	61.92	4272.64	1703.02	1245.88
1	5	1.8885		verde fuerte	1.879	0.0095	20.09	1.6	1.87	2114.74	168.42	196.84
2	12	1.9722		café claro	1.879	0.0932	9.98	2.24	0.23	107.08	24.03	2.47
3	24	2.0891		verde claro	1.879	0.2101	41.6	6.5	3.71	198.00	30.94	17.66
4	46	2.0528		verde claro	1.879	0.1738	32.42	6.81	2.92	186.54	39.18	16.80
5	63	1.9480		café claro	1.879	0.069	35.5	16.89	4.54	514.49	244.78	65.80
6	67	1.9500		verde fuerte	1.879	0.071	37.57	0.85	1.16	529.15	11.97	16.34
7	76	1.8875	MUESTRA RARA	transparente	1.879	0.0085	6.98	0.54	0.8	821.18	63.53	94.12
8	102	1.9923		verde claro	1.879	0.1133	15.98	4.42	1.46	141.04	39.01	12.89
9	112	1.9000		verde fuerte	1.879	0.021	13.32	5.32	1.64	634.29	263.33	78.10
10	35	2.2207		verde claro	1.879	0.3417	21.34	7.66	2.5	62.45	22.42	7.32
11	143	1.9224		verde fuerte	1.879	0.0434	33.92	11.44	6.47	781.57	263.59	149.08
1	6	1.9769		café claro	1.879	0.0979	2.75	2.29	0.27	28.09	23.39	2.76
2	28	2.0056		café claro	1.879	0.1266	28.32	3.83	3.68	223.70	30.25	29.07
3	44	1.9444		verde claro	1.879	0.0654	16.81	5.9	5.77	257.03	90.21	88.23
4	81	1.8957		café claro	1.879	0.0167	89.7	7.7	11.35	5371.26	461.08	679.64
5	84	1.8843		café claro	1.879	0.0093	11.9	0.4	0.84	2245.28	75.47	158.49
6	90	1.8816		café claro	1.879	0.0026	65.99	8.8	7.63	25380.77	3384.62	2934.62
7	99	1.8811	TUVO MUY POCO SOBRENADANTE	café claro	1.879	0.0021	109.47	15.36	9.5	52128.57	7314.29	4523.81
8	117	1.9348		café claro	1.879	0.0558	32.26	4.29	3.26	578.14	76.88	58.42
9	120	1.8836		café claro	1.879	0.0046	91.4	11.59	5.99	19869.57	2519.57	1302.17
10	85	1.9902		verde fuerte	1.879	0.1112	16.35	5.41	1.44	147.03	48.65	12.95
11	169	1.9768		café claro	1.879	0.0978	24.92	10.71	3.56	254.81	109.51	36.40
1	3	1.8842	TUVO MUY POCO SOBRENADANTE	café claro	1.879	0.0052	40.49	16.57	17.95	7786.54	3186.54	3451.92
2	27	2.1076		café claro	1.879	0.2286	38.61	23.79	10.64	168.90	104.07	46.54
3	45	1.8830		café claro	1.879	0.004	61.7	9.66	4.9	15425.00	2415.00	1225.00
4	58	1.9196		café claro	1.879	0.0406	36.44	11.28	5.82	897.54	277.83	143.35
5	73	1.8920		café claro	1.879	0.013	15.32	1.97	2.33	1178.46	151.54	179.23
6	64	1.9302		café claro	1.879	0.0512	24.05	8.75	4.43	469.73	170.90	86.52
7	86	1.9184		café claro	1.879	0.0394	61.68	25.39	15.96	1565.48	644.42	405.08
8	108	1.9934		café claro	1.879	0.1144	22.36	11.18	4.46	195.45	97.73	38.99
9	109	1.9021		café claro	1.879	0.0231	67.52	24.89	11.88	2922.94	1077.49	514.29
10	96	1.9281		café claro	1.879	0.0491	95.46	51.22	34.95	1944.20	1043.18	711.81
11	140	1.8804		café claro	1.879	0.0014	131.58	49.54	7.91	93985.71	35385.71	5650.00

Los colores corresponden al punto de toma de muestra inicial, neutropenia, treinta días después del trasplante y grupo control respectivamente. n=44

Cuantificaciones de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) por cromatografía de gases

ACETATO (mM/g)			PROPIONATO (mM/g)			BUTIRATO (mM/g)		
Inicial	Neutropenia	30 DR	Inicial	Neutropenia	30 DR	Inicial	Neutropenia	30 DR
862.89	2114.74	28.09	243.3	168.42	23.39	205.15	196.84	2.76
14570.83	107.08	223.7	6641.67	24.03	30.25	2791.67	2.47	29.07
1013.56	198	257.03	199.32	30.94	90.21	340.17	17.66	88.23
322.43	186.54	5371.26	113.34	39.18	461.08	84.07	16.8	679.64
234.07	514.49	2245.28	94.53	244.78	75.47	47.49	65.8	158.49
460.69	529.15	25380.77	33.15	11.97	3384.62	20.11	16.34	2934.62
107.17	821.18	52128.57	58.01	63.53	7314.29	22.49	94.12	4523.81
575.08	141.04	578.14	75.72	39.01	76.88	69.94	12.89	58.42
3586.73	634.29	19869.57	1693.88	253.33	2519.57	976.53	78.1	1302.17
650.54	62.45	147.03	279.97	22.42	48.65	174.66	7.32	12.95
4272.64	781.57	254.81	1703.02	263.59	109.51	1245.88	149.08	36.4