



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

BIOMEDICINA

**CARACTERIZACIÓN DEL MICROBIOMA INTESTINAL DE INDIVIDUOS INFECTADOS
POR EL VIRUS DE INMUNODEFICIENCIA HUMANA, MEDIANTE SECUENCIACIÓN DE
SIGUIENTE GENERACIÓN**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

SELMA NAYELY ALVA HERNÁNDEZ

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. SANTIAGO ÁVILA RÍOS
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM**

**COMITÉ TUTOR: DRA. LEONOR HUERTA HERNÁNDEZ
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM
DR. LUIS GUILLERMO LLORENTE PETERS
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM**

MÉXICO, D.F. AGOSTO 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.



Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 11 de mayo de 2015, aprobó el jurado para la presentación de su examen para obtener el grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **ALVA HERNÁNDEZ SELMA NAYELY** con número de cuenta **305587590**, con la tesis titulada **"CARACTERIZACIÓN DEL MICROBIOMA INTestinal DE INDIVIDUOS INFECTADOS POR EL VIRUS DE INMUNODEFICIENCIA HUMANA, MEDIANTE SECUENCIACIÓN DE SIGUIENTE GENERACIÓN"**, realizada bajo la dirección del **DR. SANTIAGO ÁVILA RIOS**:

Presidente: DRA. YOLANDA LOPEZ VIDAL
Vocal: DR. SANTIAGO PÉREZ PATRIGEON
Secretario: DR. LUIS GUILLERMO LLORENTE PETERS
Suplente: DR. GABRIEL LÓPEZ VELÁZQUEZ
Suplente: DRA. LEONOR HUERTA HERNÁNDEZ

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

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 25 de junio de 2015

M. del Coro Ariz

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



AGRADECIMIENTOS

Primeramente gracias al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México por el apoyo recibido y por la excelencia en su plan de estudios de maestría.

A continuación al apoyo recibido por parte de CONACYT con el número de apoyo 355531, el número de becario 288662 y CVU 507955.

Finalmente, a los miembros de mi Comité Tutor. A la Dra. Leonor Huerta y al Dr. Luis Llorente por todos sus buenos consejos e interés en el proyecto.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES.

A mis padres: Alfonso y Fermina. Sin su apoyo esto simplemente hubiera sido imposible. Gracias por cada palabra de ánimo y sacrificio que han hecho por mí y por mi hermana. Su ejemplo de lucha y forma tan bella de ver la vida es un motor para nosotras. Gracias por siempre ayudarme a aligerar las cargas pesadas. Un logro más de ustedes a través de mí. Los amo.

A mi hermana Perla por escucharme y soportar cada tontería e innumerables días de mal humor. Por mostrarme que tienes que amar lo que haces y hacer lo que amas. Por desvelarse conmigo y con Nala durante las noches de insomnio, regalándome cantidad inconmensurable de risas.

A ti Ernesto por ser mi compañero en una muy importante parte de este camino. Por jalarme las orejas cuando era necesario y nunca dejarme vencer. Por robarme tantas sonrisas y recordarme que un día malo nunca es tan malo. Por enseñarme tantas cosas y dejarme compartir mi mundo contigo. Por un incontable número de cosas, GRACIAS.

A mi familia: mis abuelos, tíos, primos y sobrinos por siempre animarme y hacerme vivir momentos inolvidables. Por entender mis ausencias e interesarse cuando les platicaba sobre lo que hago. Por impulsarme a nunca darme por vencida.

A mis amigos: Fernanda, Paola, Berenice, Miguel, Roberto, Hugo, Laurita. Por motivarme en cada altibajo y mostrarme con su propio ejemplo de vida que nunca debo darme por vencida. Las cosas difíciles cuestan pero merecen cada segundo de ser vividas. Por crecer conmigo y vivir cada momento a mi lado. Ustedes mi familia elegida.

Al Dr. Santiago Ávila Ríos que además de ser un excelente profesor y tutor, es una excelente persona. Gracias por la paciencia y el conocimiento compartido.

A la Dra. Sandra Pinto por permitirme compartir parte del valioso conocimiento del que es poseedora. Por hacerme crecer como estudiante y científica. Por siempre exigir un poco más. Y por probar mi habilidad para entender múltiples idiomas al mismo tiempo.

Gracias al CIENI y al Dr. Gustavo Reyes por abrir sus puertas a los estudiantes y permitirnos tener los recursos para seguir aprendiendo. A todas las personas que me he encontrado en sus instalaciones, por compartir sus conocimientos conmigo. En especial a Tania, Oli, Marissa, Humberto, Dani G, Thaly, Dani T, Maribel, Maggie, Clau, Juan, Verito, Ana, Paloma. Gracias por hacer el trabajo menos pesado.

Gracias a la vida por cada una de las personas y experiencias que me ha puesto en el camino, pues cada una ha influido para que yo llegara a estar donde estoy ahora.

¡México, Pumas, Universidad!

"Un científico en su laboratorio no es sólo un técnico: es también un niño colocado ante fenómenos naturales que le impresionan como un cuento de hadas."

"La ciencia la hacen personas, donde sea, en una buhardilla, cuando tienen el genio investigador, y no los laboratorios, por ricos que se construyan y se doten."

Marie Curie

ÍNDICE.

LISTADO DE FIGURAS.....	x
LISTADO DE TABLAS.....	xii
LISTADO DE ABREVIATURAS.....	xiii
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN.....	3
1. Microbiota.....	3
1.1. Generalidades.....	3
1.2. Estudio de la microbiota.....	5
1.3. Microbiota intestinal.....	7
2. VIH.....	10
2.1. Generalidades.....	10
2.2. Actualidad y futuro.....	11
2.2.1. En el mundo.....	11
2.2.1. En México.....	12
2.3. Origen y epidemiología molecular del VIH.....	13
2.4. Estructura del VIH: genoma y proteínas.....	14
2.5. Ciclo de replicación.....	16
2.6. Historia natural de la enfermedad.....	18
2.7. Respuesta inmune contra el VIH.....	20
2.7.1. Respuesta innata.....	20
2.7.2. Linfocitos T CD4 ⁺	20
2.7.3. Linfocitos T CD8 ⁺	21
2.7.4. Anticuerpos.....	21
3. VIH y Microbiota.....	22
3.1. Relación entre VIH y la microbiota intestinal.....	22
3.2. Terapia antirretroviral y la microbiota intestinal.....	27
CAPÍTULO II. ANTECEDENTES.....	30
1. Antecedentes.....	30

CAPÍTULO III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	32
1. Hipótesis.	32
2. Objetivos.....	32
2.1. Generales.....	32
2.2. Particulares.....	32
CAPÍTULO IV. METODOLOGÍA.	33
1. Selección del grupo de estudio.....	33
2. Extracción de DNA.	33
3. Cuantificación del DNA.	34
4. Amplificación de regiones hipervariables del gen 16S.....	34
5. Visualización de los productos de amplificación.....	36
6. Purificación de los productos de amplificación.....	36
7. Cuantificación de los productos de amplificación.....	36
8. Secuenciación.	37
9. Análisis bioinformático.	37
CAPÍTULO V. RESULTADOS.	39
1. Estandarización de la técnica	39
2. Descripción del grupo de estudio.....	43
3. Cambios en la microbiota.....	44
3.1. Efecto de la infección por VIH.....	44
3.2 Efecto de la TAR.....	53
3.3. Efecto del control de la infección	59
3.4. Beta-diversidad	64
CAPÍTULO VI. DISCUSIÓN.....	67
CAPÍTULO VII. CONCLUSIÓN Y PERSPECTIVAS.....	78
1. Conclusión.....	78
2. Perspectivas.	79
CAPÍTULO VIII. LITERATURA CITADA.	81
Anexo A: Aprobación del Comité de Ciencia y Bioética en Investigación.	90
Anexo B: Carta de Consentimiento informado.....	91

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Microbiota Humana.	1
Figura 2. Factores que afectan la microbiota.....	3
Figura 3. Esquema del RNA ribosomal 16S bacteriano.	4
Figura 4. Microbiota intestinal	6
Figura 5. Composición de la microbiota a lo largo del intestino.....	7
Figura 6. VIH en el mundo.....	10
Figura 7. Organización del genoma del VIH-I.....	13
Figura 8. Representación de una partícula madura del VIH.	13
Figura 9. Descripción esquemática de los eventos que ocurren durante el ciclo de replicación del VIH.....	15
Figura 10. Historia natural de la enfermedad causada por VIH.....	17
Figura 11. Desequilibrio inmunológico asociado a la disbiosis de la microbiota	21
Figura 12. Circulo vicioso en la infección por VIH.	22
Figura 13. Algunas alteraciones en la microbiota asociados a la infección por VIH.....	24
Figura 14. La activación inmune mantiene la persistencia viral durante el uso de TAR.....	26
Figura 15. Representación esquemática de la técnica de fusion primers.	32
Figura 16. Diversidad encontrada a nivel Phylum para cada región hipervariable	38
Figura 17. Curvas de rarefacción para V3 y V6	40
Figura 18. Alfa diversidad para individuos VIH+ TAR- e individuos VIH-	42
Figura 19. Abundancia de diversos phyla para individuos VIH+ TAR- e individuos VIH-	43
Figura 20. Comparación de abundancia de diversos phyla para individuos VIH+ TAR- e individuos VIH-	44
Figura 21. Abundancia de diversas familias para individuos VIH+ TAR- e individuos VIH-	45

Figura 22. Comparación de abundancia de diversas familias para individuos VIH+ TAR- e individuos VIH-	46
Figura 23. Abundancia de diversos géneros para individuos VIH+ TAR- e individuos VIH-	47
Figura 24. Comparación de abundancia de diversos géneros para individuos VIH+ TAR- e individuos VIH-	48
Figura 25. Alfa diversidad para individuos VIH+ TAR- con CD4 >200 células e individuos VIH-	49
Figura 26. Comparación de la abundancia de dos familias para individuos VIH+ TAR- con CD4 >200 células e individuos VIH-	50
Figura 27. Alfa diversidad para individuos VIH+ sin TAR, VIH+ con TAR e individuos VIH-	52
Figura 28. Abundancia de diversos phyla para individuos VIH+ sin TAR, VIH+ con TAR e individuos VIH-	53
Figura 29. Comparación de abundancia de diversas familias para individuos VIH+ TAR-, TAR+ e individuos VIH-	55
Figura 30. Comparación de abundancia de diversos géneros para individuos VIH+ TAR-, TAR+ e individuos VIH-	56
Figura 31. Alfa diversidad para individuos VIH+ sin TAR, VIH+ con TAR, controladores e individuos VIH-	57
Figura 32. Abundancia de diversos phyla para individuos VIH+ sin TAR, VIH+ con TAR, controladores e individuos VIH-	58
Figura 33. Comparación de abundancia de diversas familias para individuos VIH+ TAR-, TAR+, controladores e individuos VIH-	60
Figura 34. Comparación de abundancia de diversos géneros para individuos VIH+ TAR-, TAR+, controladores e individuos VIH-	61
Figura 35. Abundancia de diversos géneros para los individuos del grupo de estudio	62
Figura 36. Gráfico de componentes principales para el grupo de estudio	63
Figura 37. Gráfico de componentes principales para los individuos VIH+ TAR-	64

LISTADO DE TABLAS.

Tabla 1. Grupos, subtipos y distribución geográfica del VIH.	12
Tabla 2. Primers para amplificación de regiones hipervariables del gen DNAr 16s.	33
Tabla 3. Mezcla de amplificación para las regiones hipervariables.....	33
Tabla 4. Secuencias obtenidas para cada región hipervariable.	36
Tabla 5. Datos descriptivos del grupo de estudio	40

LISTADO DE ABREVIATURAS.

APC	Célula Presentadora de Antígeno, en inglés.
CA	Cápside.
DC	Célula Dendrítica, en inglés.
CRF	Forma Recombinante Circulante, en inglés.
CTL	Linfocito T Citotóxico, en inglés.
CV	Carga Viral.
DE	Desviación Estándar.
DNA	Ácido Desoxirribonucleico, en inglés.
DNAr	Ácido Desoxirribonucleico ribosomal, en inglés.
GALT	Tejido Linfoide Asociado al Intestino, en inglés.
IN	Integrasa, en inglés.
IP	Inhibidor de la Proteasa, en inglés.
LAV	Virus Asociado a Linfadenopatía, en inglés.
LPS	Lipopolisacárido.
LT	Linfocito T.
LTR	Secuencias Largas Repetitivas, en inglés.
NAbs	Anticuerpos Neutralizantes, en inglés.
NC	Nucleocápside.
NK	Célula Asesina Natural, en inglés.
ORF	Fragmentos de Lectura Abierta, en inglés.
OTU	Unidades Taxonómicas Operacionales, en inglés.
Pb	Pares de bases.
PBMC	Célula Mononuclear de Sangre Periférica, en inglés.
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa, en inglés.
PGM	“Personal Genome Machine”.
PIC	Complejo de Pre-Integración, en inglés.
PR	Proteasa.
RDP	Proyecto Base de datos Ribosomal, en inglés.
RNA	Ácido Ribonucleico, en inglés.
RNAm	Ácido Ribonucleico Mensajero, en inglés.
RT	Transcriptasa Inversa, en inglés.
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida.
SIVcpz	Virus de Inmunodeficiencia Simiana (chimpancé), en inglés.
TAR	Terapia Antirretroviral.
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana.

RESUMEN

ANTECEDENTES.

Identificar el origen de la inflamación crónica del sistema inmunológico es de gran importancia en la lucha contra la infección por VIH. Numerosos estudios han demostrado una relación directa entre la activación del sistema inmune y la translocación microbiana, pero la fuente y el tipo de factores desencadenantes siguen siendo motivo de investigación. La gran cantidad de marcadores inflamatorios asociados a la patogénesis del VIH y las interacciones moleculares y celulares entre el sistema inmunológico y la microbiota intestinal son factores de integración que podrían ofrecer un mecanismo. La mayoría de los estudios se han centrado en el impacto de la translocación microbiana en la activación crónica del sistema inmune en la enfermedad del VIH. Este estudio se centrará en investigar la composición de la microbiota intestinal como candidato para poder aclarar cómo la translocación microbiana afecta la infección por VIH y su progresión.

METODOLOGÍA.

Todos los participantes firmaron un consentimiento informado. Se extrajo el DNA de muestras de heces de 25 individuos infectados con el VIH sin terapia antirretroviral (TAR), 20 individuos crónicamente infectados bajo una terapia basada en Efavirenz, 17 individuos crónicamente infectados bajo una terapia basada en inhibidores de proteasa, 6 individuos controladores (definidos por cargas virales debajo de 2,000 copias de RNA/ml) y 9 individuos no infectados. La región V3 del gen 16S rRNA se amplificó por PCR y se secuenció utilizando el secuenciador Ion PGM. Después de filtrar por calidad, la asignación taxonómica y la alfa diversidad se determinaron utilizando el software QIIME 1.8.0. Las comparaciones entre grupos se realizaron mediante las pruebas U de Mann-Whitney y Kruskal-Wallis (GraphPad Prism 5).

RESULTADOS.

Como se ha reportado previamente, encontramos una menor diversidad en la microbiota de los individuos VIH + TAR- al compararlos contra individuos VIH- ($p=0.04$). Una disminución de la diversidad se observó en la microbiota de personas VIH+ Efavirenz+ cuando se compara contra individuos VIH+ IPs+ ($p=0.03$) e individuos VIH- ($p=0.004$). De forma interesante, no se observaron diferencias en la diversidad de la microbiota entre los controladores y el grupo VIH- ($p=0.689$). Encontramos tres phyla predominantes: Bacteroidetes, Firmicutes y Proteobacteria con una media de abundancia relativa general de $83,9\% \pm 17,7\%$, $11,9 \pm 11,6\%$ y $2,0\% \pm 11,0\%$, respectivamente. No se observaron diferencias globales significativas a nivel de phylum entre el grupo VIH+ TAR- y los VIH-. Sin embargo, a nivel familia, se encontró una disminución de Ruminococcaceae y Lachnospiraceae ($p=0.028$ y 0.008 , respectivamente). Se encontró una disminución significativa de Bacteroidetes en individuos Efavirenz+ al comparar con los otros grupos ($p < 0,05$). Esta disminución se asoció con una disminución en el género Prevotella y el phylum Proteobacteria, y con un aumento en los géneros Bacteroides y Fusobacterium. Ningún taxón mostró diferencias entre los controladores y el grupo de VIH-.

CONCLUSIÓN

Encontramos algunas de las alteraciones en la composición de la microbiota previamente reportadas entre grupos VIH+ TAR- y VIH-. Sin embargo, también encontramos alteraciones específicas que no se han reportado y que están asociadas con el uso de Efavirenz y que no se observan en la terapia basada en IPs. Encontramos que los controladores no tienen alteraciones significativas en la composición de la microbiota intestinal y que esta se asemeja a la de los individuos VIH-.

ABSTRACT

BACKGROUND.

Identifying the cause of chronic inflammation of the immune system is of great importance in the fight against HIV infection. Several studies have shown a direct relationship between activation of the immune system and microbial translocation, but the source and type of triggers remain under investigation. The large number of inflammatory markers associated with HIV pathogenesis and the molecular and cellular interactions between the immune system and the intestinal microbiota are integrating factors that could provide a mechanism. Most studies have focused on the impact of microbial translocation in chronic activation of the immune system in HIV infection. The aim of this study was to investigate the composition of the intestinal microbiota as a candidate to clarify how the microbial translocation affects HIV infection and its progression.

METHODS.

All participants gave written informed consent. DNA was extracted from stool samples collected from 25 chronically HIV infected individuals without antiretroviral therapy (ART), 20 chronically HIV infected individuals with an Efavirenz-based therapy, 17 chronically HIV infected individuals with a protease-inhibitor-based therapy (PIs), 6 HIV controllers (defined by viral loads below of 2,000 copies of RNA/mL) and 9 non-HIV-infected individuals. The V3 region of the 16S rRNA gene was PCR amplified and sequenced using an Ion PGM sequencer. After quality filtering, taxonomic assignment and alpha diversity were computed using QIIME 1.8.0. Comparisons between groups were performed using Mann-Whitney U-test and Kruskal-Wallis test (GraphPad Prism 5).

RESULTS.

As previously reported, we found lower microbiota diversity in HIV+ ART- than in HIV- individuals ($p=0.04$). Decreased diversity was observed in HIV+ Efavirenz+ individuals when compared against HIV+ PIs+ ($p=0.03$) and HIV- individuals ($p=0.004$). Interestingly, no differences in microbiota diversity were observed between controllers and HIV- ($p=0.689$). We found three predominant phyla: Bacteroidetes, Firmicutes and Proteobacteria with an overall median relative abundance of $83.9\% \pm 17.7\%$, $11.9 \pm 11.6\%$ and $2.0\% \pm 11.0\%$, respectively. No significant overall differences were observed at phylum level between HIV+ ART- and HIV-. However, at family level, we found a significantly lower abundance of both Ruminococcaceae and Lachnospiraceae ($p=0.028$ and 0.008 , respectively). We found a significant decrease of Bacteroidetes in Efavirenz+ individuals when compared against the other groups ($p<0.05$). This decrease was associated with a decrease in Prevotella genus and Proteobacteria phylum, and with an increase with Bacteroides and Fusobacterium genera. Neither taxon showed differences between controllers and HIV- group.

CONCLUSION

We found some of the previously reported alterations in microbiota composition between HIV+ ART and HIV- groups. However, we also found some specific alterations that are associated with Efavirenz use and that are not observed in PIs-based therapy and have not been reported. We found that controllers do not have significant alterations in gut microbiota composition and that it resembles that of non-HIV-infected individuals.

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN.

1. Microbiota.

1.1. Generalidades.

Actualmente se ha observado que la biología humana no debe centrarse únicamente al estudio de las células humanas, debido a que los microorganismos que habitan a lo largo del cuerpo humano tienen una relación tan cercana con el hospedero que han llegado a ser considerados parte del sistema biológico [1].

Comunidades complejas de microorganismos habitan las superficies corporales de todos los vertebrados [2]. Estas comunidades llegan a superar el número de células humanas en hasta un factor de 10 veces y globalmente se conocen como microbiota [3]. Con el paso del tiempo se ha observado que más que tener una lucha constante entre microorganismos y hospedero, existe un estado neutral en el cual cada parte necesita a la otra. El hospedero proporcionará un nicho ecológico y nutrientes, mientras que el microorganismo contribuye a la fisiología del hospedero: procesando nutrientes, protegiendo de patógenos exógenos, etcétera (Figura 1) [4].

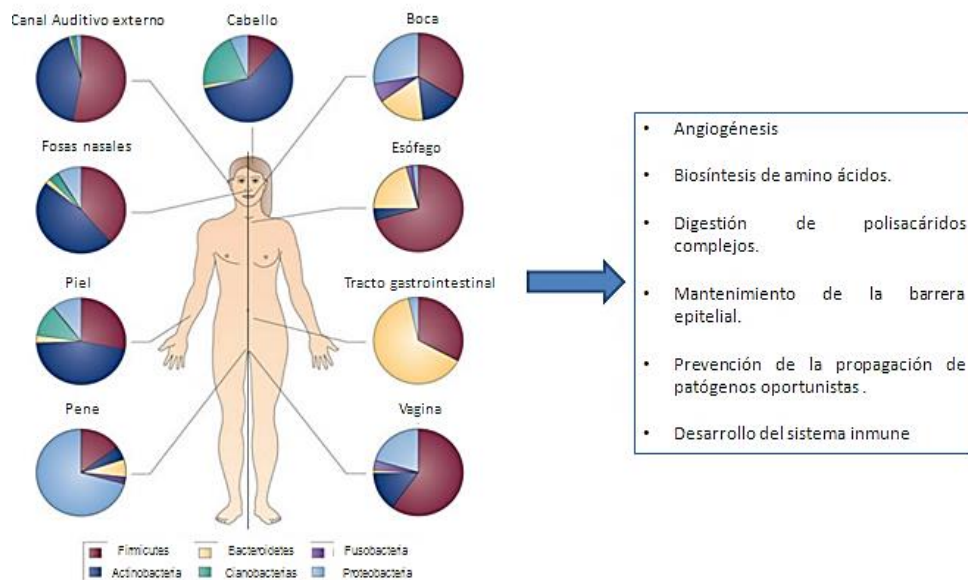


Figura 1. Microbiota Humana. Se muestra la composición de la microbiota en diferentes partes del cuerpo humano a nivel phylum y algunas de las funciones con las que contribuyen dentro del hospedero. Modificada de [5].

Millones de años de co-evolución han extendido estas interconexiones fisiológicas entre microbiota y hospedero más allá de las funciones metabólicas. Un ejemplo muy importante es el efecto de estos microorganismos en la estimulación y maduración del sistema inmunológico [6].

Sin embargo, la microbiota no es totalmente inocua, y bajo condiciones que comprometan el equilibrio entre su composición y la respuesta inmune del hospedero, algunas especies podrán colonizar tejidos o proliferar causando enfermedad.

La microbiota presenta una composición específica dependiendo de las diferentes zonas corporales de las que se trate (Figura 1), favoreciendo un estado de balance con el hospedero [7]. Este balance en el sistema es bastante delicado y una perturbación en el mismo (proceso llamado disbiosis) resultará en una alteración de la microbiota, lo cual podría predisponer potencialmente al hospedero a una serie de diferentes enfermedades caracterizadas por respuestas inmunes aberrantes. Tal es el caso de la artritis reumatoide, enfermedad en la cual se están estudiando las posibles alteraciones en la microbiota que podrían traducirse en peores escenarios de progresión de la enfermedad [6].

Existen diversos factores que pueden causar cambios sostenidos en la composición de la microbiota: uso de antibióticos, la edad, la dieta, la genética del hospedero, la forma de nacimiento, entre otros (Figura 2) [8-12]. Estos factores contribuyen de gran manera a la variabilidad inter-individuos. No obstante, varios estudios han examinado variaciones en la microbiota de individuos con y sin cierto estado de enfermedad, encontrando, de manera interesante, que la microbiota se encuentra alterada entre los grupos que se comparan. Incluso al hacer correcciones por los diversos factores que podrían estar alterando la microbiota de manera independiente a la enfermedad, estos cambios se mantienen. Algunos ejemplos de enfermedades asociadas con alteraciones en la microbiota se encuentran: asma, enfermedad celiaca, diabetes, enfermedad inflamatoria del intestino, gastroenteritis, entre otras [13].

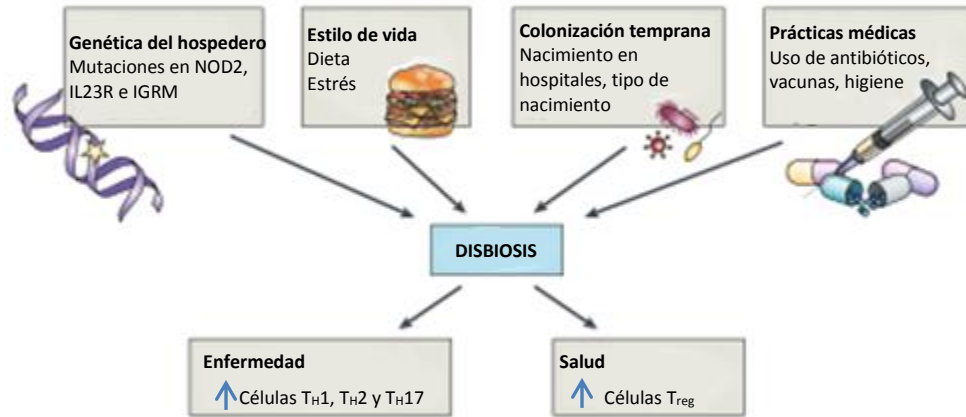


Figura 2. Factores que afectan la microbiota. Existen diversos factores que podrán alterar la microbiota del hospedero llevándolo a un estado de disbiosis y a posibles estados de salud y enfermedad. Modificada de [11].

La aparición de nuevas y avanzadas técnicas, como la metagenómica (estudio del conjunto de genomas de un determinado entorno directamente de las muestras del ambiente, sin necesidad de aislar y cultivar), ha resultado en la generación de una vasta cantidad de datos sobre genes de microorganismos. Aunado a esto, la cooperación de varios equipos de investigación permitió el desarrollo en 2008 del Proyecto Microbioma Humano; cuyo objetivo principal era caracterizar y obtener la composición de la microbiota de individuos sanos [14]. Este proyecto, permitió observar las diferencias entre los diferentes grupos microbianos que habitan las distintas partes de cuerpo y que contribuyen de esta manera a la función de órganos y tejidos [1]. Estudios posteriores dentro de este proyecto y fuera de él han permitido estudiar la microbiota humana en diversas condiciones y/o estados (diferentes tipos de alimentación, diferentes grupos de edad, diferentes vías de nacimiento, presencia o ausencia de alguna enfermedad, entre otros) [6]. La determinación de comunidades microbianas específicas podría proveer información valiosa con respecto a la salud humana, la predisposición hacia enfermedades, su diagnóstico y posibles terapias [15, 16].

1.2. Estudio de la microbiota.

Los primeros acercamientos para el estudio de la microbiota se realizaban a través del aislamiento, cultivo y caracterización bioquímica de la misma. Sin embargo, existen cientos de especies diferentes; muchas de las cuales, nunca han logrado ser cultivadas y

algunas nuevas especies de las cuales incluso, sus características de cultivo no se conocen. Aunado a lo anterior, muchos de estos microorganismos pueden estar presentes en órdenes de magnitud tan altos que enmascaren la presencia de miembros menos abundantes [17, 18]. Debido a la dificultad de estas primeras técnicas para poder identificar a todos los microorganismos presentes y a la necesidad de tener técnicas de muestreo a profundidad, los investigadores empezaron a explorar metodologías basadas en huellas moleculares [19].

De manera particular se generalizó el uso del gen que codifica para el RNA ribosomal 16S y en específico nueve zonas dentro del gen que son altamente variables (V1-V9) [20]. Este gen está presente en todas las bacterias y debido a que presenta zonas altamente conservadas que flanquean a las regiones hipervariables, se pueden generar primers degenerados que permiten la identificación de los microorganismos (Figura 3) [21]. De forma interesante, las regiones que son amplificadas, al tener un alto grado de variación, no sólo permiten la identificación sino también la diferenciación y clasificación de los diversos microorganismos encontrados [22-24].

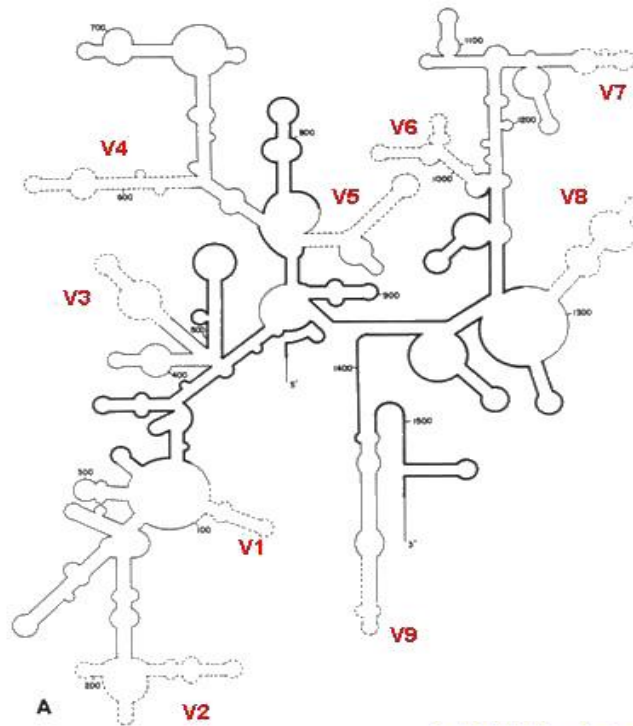


Figura 3. Esquema del RNA ribosomal 16S bacteriano. Se muestran las regiones que presentan variabilidad entre las distintas especies de bacterias (regiones V). En la secuencia de DNA de estas regiones se basa el diseño de los oligonucleótidos empleados para la PCR utilizada en la identificación y clasificación taxonómica [25].

Métodos poderosos se han vuelto accesibles para el estudio de estas comunidades microbianas de formas más rápidas y sencillas. Los microarreglos, la PCR en tiempo real y la clonación junto con secuenciación tipo Sanger son algunas de las que se han utilizado [26]. Sin embargo, la secuenciación de alto rendimiento o secuenciación masiva es una técnica que ha ido ganando importancia debido a que permite aprovechar las características de análisis mediante el gen 16S y obtener la clasificación de las comunidades microbianas de un alto número de muestras en un corto periodo de tiempo y a costos accesibles (aproximadamente 2,000 pesos por muestra) [27].

Las secuencias obtenidas mediante esta metodología permiten la identificación y clasificación de los microorganismos al utilizar programas bioinformáticos como QIIME (Quantitative Insights Into Microbial Ecology). Las secuencias son agrupadas en conjuntos que tienen entre sí una similitud alta (97% equivale a género y 99% a especie) y son llamadas unidades taxonómicas operacionales (OTUs). Estos OTUs son comparados contra bases de datos (e.g., Greengenes y RDP) que tienen una amplia colección de secuencias reportadas y asignadas a clasificaciones taxonómicas específicas, permitiendo así la clasificación de las muestras analizadas [14, 28].

El avance en el estudio de la microbiota ha permitido esclarecer la importancia de estos microorganismos, su influencia en los seres vivos y de qué manera podrían estar dirigiendo el estado de salud o enfermedad.

1.3. Microbiota Intestinal.

La microbiota intestinal ha sido una de la más estudiadas debido a que juega un papel clave para el hospedero tanto en la salud como en la enfermedad. En el intestino, la microbiota ha alcanzado densidades muy altas (hasta 100 trillones de bacterias) y ha evolucionado para poder degradar polisacáridos complejos y otras sustancias de la dieta diaria, estimulando así la eficiencia digestiva del hospedero y el suplemento de nutrientes para sí misma [29]. En el caso particular de la microbiota del intestino humano, la comunidad microbiana que lo conforma es diversa y compleja, y su genoma colectivo se conoce como microbioma.

A pesar de que aún no se llega a entender y caracterizar completamente el papel que juega la comunidad bacteriana se sabe de algunas funciones críticas que lleva a cabo, incluyendo: estimulación de la angiogénesis, la biosíntesis de aminoácidos, la digestión de polisacáridos complejos, el mantenimiento de la barrera epitelial intestinal, la prevención de la propagación de patógenos oportunistas y el desarrollo del sistema inmune de la mucosa intestinal [19]. Al cumplir con funciones tan importantes, una alteración de la composición de la microbiota (disbiosis) podría conllevar una desregulación de la homeostasis de estos procesos y asociarse con enfermedades (Figura 4).

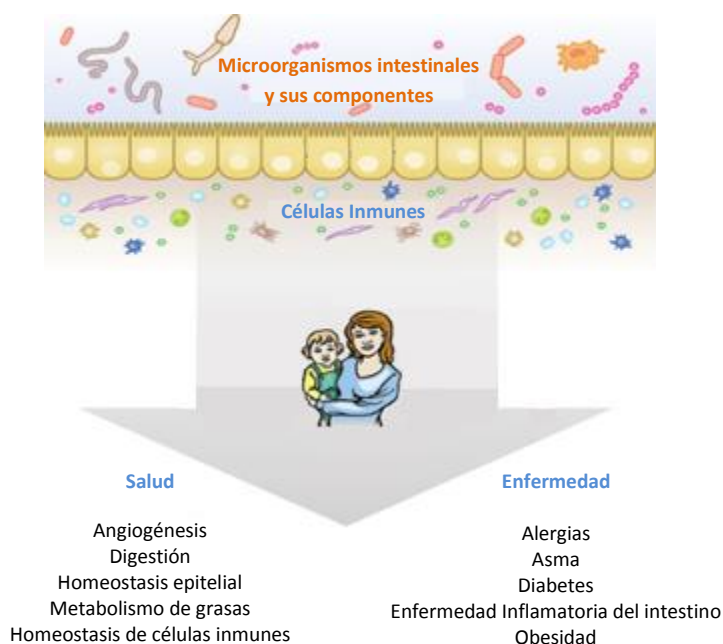


Figura 4. Microbiota intestinal. La microbiota intestinal tiene una estrecha relación con las células del cuerpo humano. Esta estrecha relación permite llevar a cabo funciones fundamentales para el hospedero y de igual manera, la alteración de la microbiota podrá asociarse con algunas enfermedades. Modificada de [30].

Como se mencionó previamente, existen cambios en la composición de la microbiota a lo largo de diferentes zonas del cuerpo humano. El intestino no es la excepción, evidenciando ciertas variaciones en las comunidades que se encuentran a lo largo de este órgano. Sin embargo, estas variaciones no llegan a ser tan dramáticas, permitiendo generalizar sobre la composición de la microbiota definida (Figura 5).

En estudios recientes se ha identificado que cada individuo puede llegar a contener más de 1000 especies diferentes en el intestino; la mayoría de las cuales, pertenecen sólo a

unos cuantos phyla. En general, los Firmicutes y Bacteroidetes se presentan como los phyla dominantes en el intestino [31]. De los Firmicutes el 95% pertenecen a la clase Clostridia (familias Ruminococcaceae y Lachnospiraceae). En el caso de los Bacteroidetes existe un poco más de variación entre los filotipos encontrados; sin embargo, la mayoría de ellos pertenecen a las familias Prevotellaceae y Bacteroidaceae. Además de estos phyla dominantes, existen otros en baja proporción, entre los que se encuentran: Proteobacteria, Actinobacteria, Fusobacteria y Verrucomicrobia (Figura 5) [30].

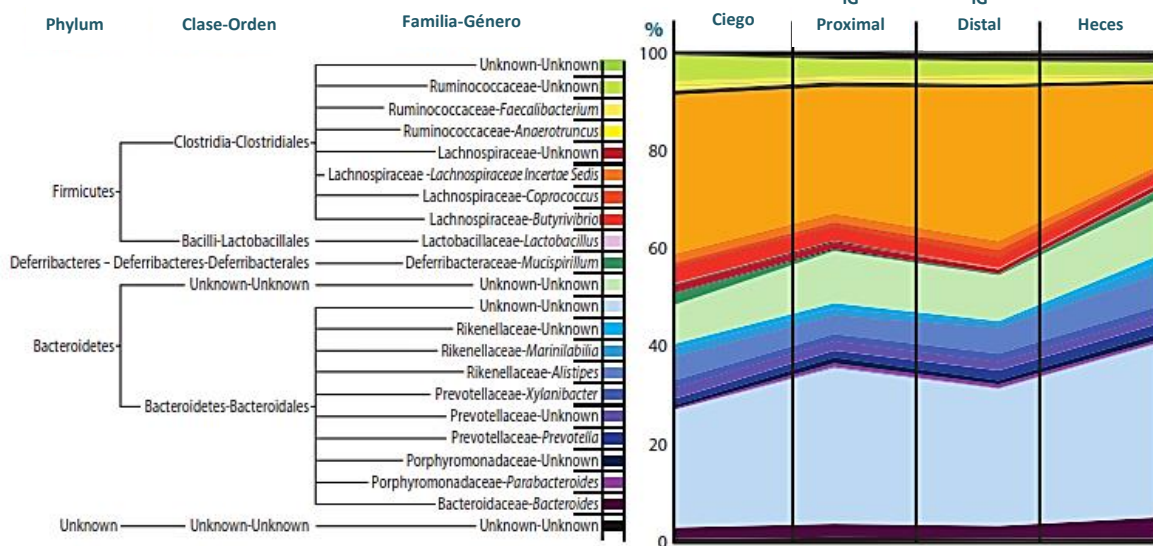


Figura 5. Composición de la microbiota a lo largo del intestino. Se observa en distintos colores diferentes clasificaciones taxonómicas y su abundancia relativa en diferentes partes del intestino y heces. IG, intestino grueso. Modificada de [30].

Las alteraciones en la microbiota intestinal, principalmente definidas por una disminución de la diversidad, han sido asociadas a diversas enfermedades con un importante factor inmunitario e inflamatorio: diabetes tipo 1 [32], artritis reumatoide [33], enfermedad Inflamatoria del Intestino [34], enfermedad de Crohn [35], obesidad [36-38] y lupus eritematoso sistémico [39].

La modificación de la microbiota a través de diversas metodologías se ha vislumbrado como posible terapia para diversos padecimientos: enfermedad de Crohn, infecciones constantes por Candida, dermatitis atópicas, obesidad, etcétera. El uso de antibióticos, probióticos (microorganismos benéficos) y prebióticos (material orgánico digerible por

microorganismos benéficos) son algunas de las técnicas utilizadas de manera común. De igual manera, el Trasplante Fecal (introducción de un filtrado líquido de heces de un donador sano al tracto gastrointestinal de un individuo enfermo) es otra alternativa que ha sido utilizada como tratamiento para algunas condiciones médicas como la infección por *Clostridium difficile* con resultados muy positivos, y se está visualizando como posible terapia a futuro para otras condiciones, como la enfermedad inflamatoria del intestino [40-43]. A pesar de los alcances positivos, estas técnicas deberán ser usadas con cuidado y será necesario obtener pruebas más contundentes.

De tal manera, se observa el importante papel que juega la microbiota intestinal en la salud, y cómo podría estar influenciando diversas enfermedades. La completa caracterización y estudio de la microbiota intestinal podría contribuir de gran manera al desarrollo de estrategias para el cuidado de la salud de manera personalizada y más efectiva [44].

2. VIH.

2.1. Generalidades.

Hace poco más de 30 años algunos grupos clínicos estadounidenses enfrentaron una enfermedad de causa desconocida que provocaba la destrucción del sistema inmunológico y por tanto, la muerte por enfermedades oportunistas [45]. Al inicio se observó que la enfermedad afectaba principalmente a hombres homosexuales y personas que usaban drogas intravenosas pero después de algunos meses se descubrió que también eran afectados otros grupos, incluyendo personas que habían recibido transfusiones y parejas sexuales e hijos de miembros de los distintos grupos de riesgo [46]. El patrón epidemiológico observado permitió proponer que la transmisión de este nuevo patógeno era por vía sanguínea o por vía sexual. La enfermedad, hasta ese entonces sin nombre, fue llamada: Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida o SIDA [46].

Posteriormente, en 1983 el Dr. Luc Montagnier y su grupo de colaboradores, aislaron de los nódulos linfáticos de un hombre que presentaba linfadenopatía un agente que

llamaron virus asociado a linfadenopatía (LAV). Al hacer cultivos celulares observaron que se producían altos títulos de viriones que contenían actividad de Transcriptasa Inversa (RT); lo cual, les permitió clasificarlo como un retrovirus. Aunado a lo anterior, se observó que el tropismo del virus era hacia células mononucleares de sangre periférica (PBMCs, siglas en inglés) y más específicamente hacia linfocitos T CD4⁺ [46].

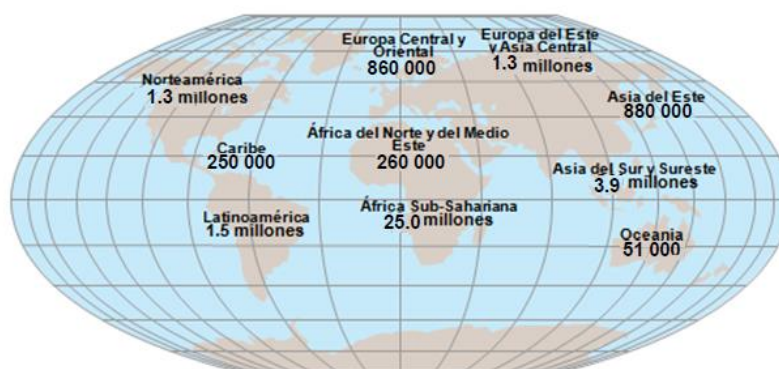
Simultáneamente, el grupo de investigación dirigido por el Dr. Robert Gallo aisló al mismo retrovirus y demostró que era el agente causal del SIDA. Este virus fue llamado Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) [46]. Para ese momento, muchos casos de la enfermedad ya habían sido detectados en diferentes partes del mundo, causando interés en diversos grupos; los cuales, empezaron el desarrollo de un tratamiento [47].

2.2. Actualidad y futuro.

2.2.1. En el Mundo.

Al aumentar de forma alarmante el número de personas infectadas por el VIH, se promovió que gobiernos de distintos países tomaran medidas para poder frenar este avance y mejoraran la calidad de vida de los pacientes existentes. Entre estas medidas están: campañas de educación y concientización sobre esta enfermedad, mejoramiento de la infraestructura y atención hospitalaria, ampliación en la cobertura y optimización de la Terapia Antirretroviral (TAR). En 2009, más de 5 millones de personas tuvieron la oportunidad de recibir una TAR, lo cual redujo el número de muertes asociadas con el SIDA en más del 20% en los últimos 5 años.

Sin embargo, el número de persona infectadas sigue en aumento con 35.0 millones de personas viviendo con el virus a nivel mundial y 2.1 millones de nuevas infecciones reportadas en julio del 2014 [48]. Entre las principales causas de transmisión en la actualidad se encuentran las prácticas sexuales de alto riesgo y el consumo de drogas intravenosas. Las zonas geográficas más afectadas por la enfermedad se encuentran en el continente africano, más precisamente la zona Sub-Sahariana y en segundo lugar el sureste asiático (Figura 6) [46].



Total: 35 millones

Figura 6. VIH en el mundo. Estimado de adultos y niños que viven con VIH en el mundo, reportado por la OMS en julio del 2014. Modificado de [49].

El uso de la TAR ha permitido tener un panorama más alentador sobre el manejo de la infección por VIH y el SIDA. Por ejemplo, tan sólo en Estados Unidos, a partir de la implementación de la terapia se obtuvo una reducción de más del 60% de la tasa de mortalidad en apenas 2 años (1995 a 1997). Cabe mencionar, que el tratamiento tiene sus propias limitaciones pues dependerá del acceso y del apego al mismo [45]. Tomando en cuenta esto se conoce que de los 35.0 millones de personas infectadas, 31.0 millones viven en países de mediano a bajo ingreso y sólo aproximadamente 7.6 millones están en la posibilidad de obtener acceso a la TAR [50].

Todo lo anterior nos lleva a pensar que la investigación en torno al VIH/SIDA deberá obtener los recursos materiales y humanos necesarios para permitir hacer frente al gran reto que representa.

2.2.2. En México.

Desde 1983, con la detección de los primeros casos de VIH/SIDA en México, el gobierno y diversas asociaciones no gubernamentales han tomado medidas para hacerle frente a esta enfermedad mediante el desarrollo de distintos planes nacionales. En 1986 se creó el primer Comité Nacional para Coordinar los Esfuerzos en VIH/SIDA, al cual le siguió la formación del Consejo Nacional para la Prevención y Control del VIH/SIDA (CONASIDA) y del Centro Nacional para la Prevención y Control del VIH/SIDA (CENSIDA). Aunado a esto,

se logró la creación de una red de clínicas para el cuidado y la prevención del VIH/SIDA y de Infecciones de Transmisión Sexual (CAPASITS) y la implementación de campañas de prevención especialmente orientadas a grupos vulnerables [45].

En cuanto a la Terapia Antirretroviral (TAR) el panorama fue más difícil, pues no fue sino entre los años 1997 y 1998 que se logró la aprobación de la compra de fármacos y hasta 2003 se logró su distribución a personas fuera de los grupos con seguridad social [45].

Según las proyecciones del ONUSIDA para México existe un intervalo de 140,000 - 230,000 personas viviendo con VIH. Se estima una prevalencia de VIH en adultos (15 a 49 años) de 0.2%, valor por debajo del porcentaje en América latina (0.4%) y en el mundo (0.8%); mientras que la cobertura de antirretrovirales es de aproximadamente el 60% del total de individuos infectados [51, 52]. Sin embargo, estas cifras podrían estar significativamente subestimadas.

A pesar de los grandes avances que ha logrado México en materia de prevención y tratamiento de la enfermedad es necesario continuar con campañas de gran impacto a nivel nacional para concientizar a la población sobre la gravedad de la infección y la progresión a SIDA; enfatizando la importancia de la prevención y de la detección temprana. Así como continuar con la investigación sobre VIH/SIDA, en el contexto de la población mexicana.

2.3. Origen y epidemiología molecular del VIH.

Actualmente se sabe que el VIH-1 se originó a partir de saltos zoonóticos de un lentivirus de chimpancés, el virus de inmunodeficiencia simiana (SIV_{cpz}). A partir de estudios de las secuencias nucleotídicas y de proteínas, además de análisis filogenéticos y de reloj molecular, se ha determinado que existen cuatro grupos de HIV-1: el grupo M (“main”), el O (“outlier”), el N (“new”) [53] y el grupo P. De estos grupos, el M es el más extendido en el mundo y presenta nueve subtipos (A, B, C, D, F, G, H, J, K), los cuales presentan entre sí algunas diferencias en su comportamiento biológico y en su distribución geográfica (Tabla 1) [46].

Tabla 1. Grupos, subtipos y distribución geográfica del VIH [53].

TIPO	GRUPO	SUBTIPOS	DISTRIBUCIÓN
	M	A - K	UNIVERSAL y endémicos en África
HIV-1	O	-	CAMERUN GABON CONGO GUINEA-ECUATORIAL
	N	-	CAMERUN

Actualmente se han caracterizado además algunas variantes que incluyen secuencias provenientes de la recombinación de genomas de distintos subtipos por una co-infección. Algunas de estas variantes se han diseminado dando lugar a las formas recombinantes circulantes (CRF). Aunado a lo anterior, se ha descrito también que gracias a la gran capacidad de variación del VIH se generan múltiples variantes ligeramente distintas entre sí, llamadas cuasiespecies virales, que coexisten en cualquier momento en un individuo infectado.

2.4. Estructura del VIH: genoma y proteínas.

El VIH es un virus envuelto que pertenece a la familia Retroviridae [54]. El genoma del Virus de Inmunodeficiencia Humana incluye a los tres genes característicos de los retrovirus que codifican para las proteínas estructurales y enzimas necesarias para infectar: *gag* (gen antígeno grupo-específico), *pol* (polimerasa) y *env* (envoltura). Este genoma también contiene marcos abiertos de lectura (ORF) que están traslapados y que codifican para proteínas reguladoras o accesorias: Vif, Vpu, Vpr, Tat, Rev y Nef, las cuales ahora se sabe que cumplen funciones fundamentales para la replicación del virus *in vivo*. Las secuencias largas repetitivas (LTRs) se localizan en cada extremo y sirven, entre otras cosas, de enlace con el genoma celular y para permitir la unión de factores para la transcripción de los genes virales (Figura 7) [46, 54].

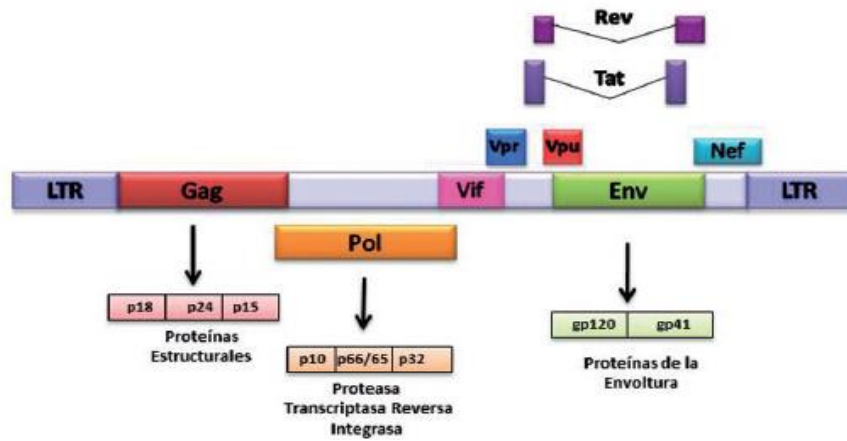


Figura 7. Organización del genoma del VIH-I. Se observan tres ORFs principales que comprenden a los genes *gag*, *pol* y *env*. Además, se observan seis ORF más que codifican para las proteínas accesorias/reguladoras. Existen dos secuencias de repetición terminales que flanquean el genoma, LTR5' y LTR3' que contienen secuencias promotoras y reguladoras de transcripción [55].

Haciendo un análisis en microscopio electrónico, se observa que este virus tiene una bicapa lipídica proveniente de la membrana celular [54]. En esta membrana se localizan dos glicoproteínas en forma de espículas: gp120, localizada en la superficie externa de la membrana y gp41, localizada de forma transmembranal. En la parte interna de esta membrana se encuentra la proteína de matriz (p17, MA), encargada de proveer estructura al virus. Dentro de la matriz está una cápside cónica (p24, CA) y un núcleo que contiene dos cadenas, no complementarias, de RNA (+) de 9.3 Kb que forman el genoma del virus y que se encuentran unidas a la nucleoproteína p7 (NC), y las enzimas del virus: integrasa (p32, IN), proteasa (p10, PR) y transcriptasa inversa (p66/p51, RT) (Figura 8) [46].

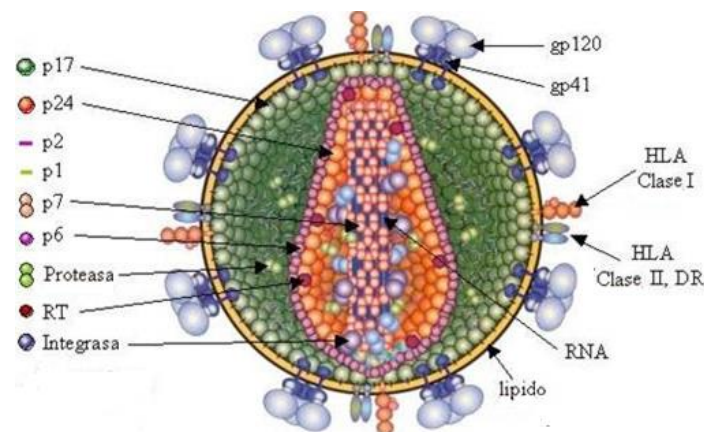


Figura 8. Representación de una partícula madura del VIH. Se muestran la localización aproximada de las proteínas estructurales, las enzimas y el genoma de este virus [56].

2.5 Ciclo de replicación.

La replicación del VIH inicia con la unión de gp120 y la molécula CD4 de la célula blanco, la cual funciona como receptor principal y está presente en linfocitos T cooperadores, macrófagos CD4⁺ y algunas células dendríticas. Posteriormente la entrada del VIH requiere de la unión de la región V3 de gp120 a un correceptor. Existen varias moléculas que se han identificado como posibles correceptores del virus, siendo los dos principales los receptores de quimiocinas CXCR4 y CCR5. Esta unión producirá cambios conformacionales exponiendo a gp41 que permitirá el acercamiento y fusión de la membrana viral con la membrana de la célula que es blanco. De esta manera la cápside viral entra al citoplasma del hospedero. A continuación el RNA viral se transcribe a DNA de doble cadena por medio de la RT. La inserción de este material genético se logra mediante la migración al núcleo del complejo de preintegración (PIC) que incluye a la IN, NC, Vpr y al DNA recién sintetizado. Una vez que el PIC se encuentra dentro del núcleo, la IN forma extremos cohesivos y una ligasa une el DNA viral con el DNA de la célula hospedera. Al DNA viral insertado en el genoma de la célula se le conoce como provirus y funciona como un gen celular durante el tiempo de vida de la célula infectada [46, 54].

Después de la integración y para comenzar la replicación del VIH es necesaria la inducción de sus genes por medio de factores de transcripción celular y proteínas virales reguladoras como Tat. Los primeros RNAm virales producidos sufren varios eventos de corte y empalme (splicing), formando, en la etapa temprana, las proteínas Tat, Rev, Nef, Vif, Vpr y Vpu. En la fase tardía de la infección se favorece la concentración de Rev, lo que favorece la salida de los RNAm virales del núcleo, evitando así los eventos de splicing. En consecuencia, los RNAm virales de la etapa tardía se caracterizan por tener uno o ningún evento de corte y empalme, lo que conlleva a la producción de las poliproteínas Pol, Env y Gag y los RNAs que se empaquetarán en las nuevas partículas virales [46, 54].

Los precursores Gag, Pol, Env y el nuevo genoma de RNA se dirigen a la superficie celular y son ensamblados para estructurar viriones. El transporte y salida de las nuevas partículas virales son dependientes de Vpu y las proteínas celulares del sistema ESCRT en unión con

p6. Al gemar los nuevos viriones, éstos adquieren parte de la membrana lipídica del hospedero y los productos del gen *env* (gp120 y gp41). Durante la maduración del nuevo virión, la enzima proteasa (autocatalizada) corta específicamente cada poliproteína para formar las proteínas virales funcionales. El VIH maduro será capaz de infectar a otras células y comenzar nuevamente su ciclo de replicación (Figura 9) [46, 54].

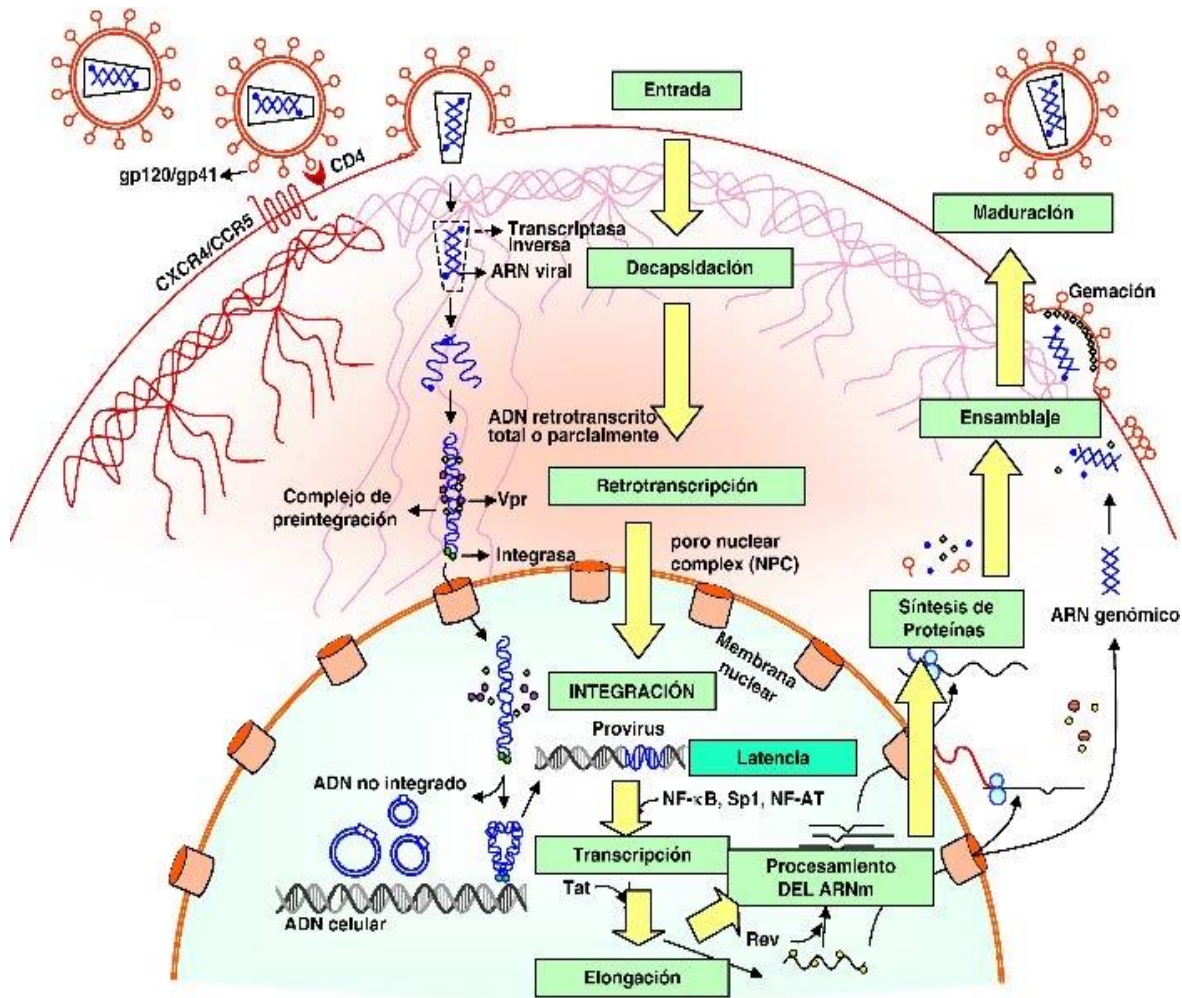


Figura 9. Descripción esquemática de los eventos que ocurren durante el ciclo de replicación del VIH. Interacción entre gp120, CD4 y el receptor de quimiocinas (CCR5 o CXCR4). Fusión de membranas gracias a gp41, entrada de la CA, desnudamiento del virión, transcripción inversa del genoma viral, formación del complejo de preintegración. Transporte del complejo de preintegración al interior del núcleo e integración del DNA viral formando el provirus. Durante la transcripción temprana del DNA viral se generan las proteínas reguladoras, mientras que en las etapas tardías, se producen las proteínas estructurales y los genomas de RNA viral que se empaquetarán en las nuevas partículas virales. Transporte de RNA viral y poliproteínas a la membrana plasmática, ensamblaje y liberación de nuevos viriones por gemación. Maduración del virión por el corte de precursores gracias a la PR. Inicio de nuevo ciclo de replicación [56].

2.6. Historia natural de la enfermedad.

Durante la infección por el VIH se distinguen diversas etapas que son inducidas y diferenciadas por la interacción entre el virus y la respuesta inmune del hospedero. La historia natural de la enfermedad se divide en las siguientes etapas sucesivas: etapa de infección primaria o aguda caracterizada por altas cargas virales, asociadas a una replicación descontrolada del virus, así como una caída temporal de la cuenta de Linfocitos T CD4⁺ en sangre; etapa intermedia o de latencia clínica, caracterizada por una estabilización de la carga viral y la cuenta de linfocitos T CD4⁺ en sangre, con concentraciones entre 200 a 500 células/ μ l; etapa tardía o crónica donde los pacientes presentan concentraciones por debajo de 200 células T CD4⁺/ μ l, perdiéndose el control parcial de la replicación viral con aumentos en la carga viral en sangre e incrementándose el riesgo de adquisición de infecciones oportunistas. Es en esta última etapa cuando se presenta el SIDA y resulta en la muerte del hospedero [54, 57].

Durante las primeras seis semanas después de la exposición, algunos individuos infectados desarrollan un síndrome agudo, caracterizado por valores elevados de viremia (carga viral) en la sangre periférica y síntomas de tipo gripal. La fuente principal de viremia parece ser los LT CD4⁺ CCR5⁺ de memoria, distribuidas principalmente en las mucosas y de manera importante en la mucosa intestinal. Al mismo tiempo ocurre una notable reducción de las células T CD4⁺ en circulación; pero no tan dramática como sucede en las mucosas [57].

Posteriormente (6 a 8 semanas) se monta una respuesta inmune específica, principalmente celular, contra el VIH que provoca un descenso importante en la viremia plasmática, aumentando también los niveles de linfocitos T CD4⁺ en sangre, pero muy rara vez hasta niveles de referencia; incluso, puede llegar a no observarse esta recuperación, como es el caso de la mucosa intestinal. En la fase subsiguiente, los individuos entran en una etapa asintomática clínicamente estable que, dependiendo de factores inmunológicos, virológicos y genéticos, puede durar un número variable de años [57]. En esta etapa las concentraciones del virus en la sangre periférica son relativamente bajas, aunque la producción de nuevos viriones, la muerte y renovación de células blanco

es constante y ocurre a alto nivel. La replicación del virus e infección de células hospederas son procesos dinámicos que se equilibran por los procesos de depuración viral, muerte de células infectadas y abastecimiento de nuevos linfocitos T CD4⁺, lo cual mantiene niveles plasmáticos estables de viremia y de células T CD4⁺ [57]. Sin embargo, esta viremia plasmática persistente aunada a varias estrategias del virus como la formación de reservorios de VIH latentes (LT CD4⁺, células dendríticas y macrófagos), su gran capacidad de variación genética, el cambio de fenotipo biológico durante el curso de la enfermedad y la extraordinaria tasa de replicación, provocan la reducción gradual de los linfocitos T CD4⁺, que invariablemente conduce a SIDA (Figura 10) [54].

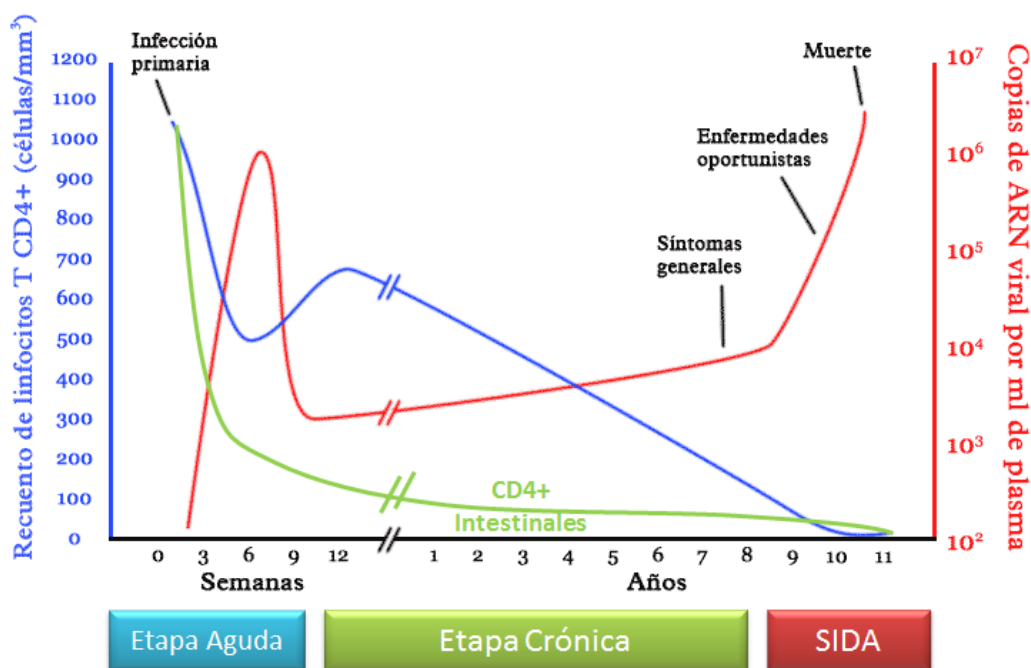


Figura 10. Historia natural de la enfermedad causada por VIH. Se observa la variación de los linfocitos T CD4⁺ y del número de copias de RNA del VIH a través de las diversas etapas en las que se divide la enfermedad. Modificada de [56].

La fase de SIDA se caracteriza por una inmunodeficiencia grave, lo que conlleva a una mayor susceptibilidad de contraer enfermedades oportunistas como tuberculosis, neumonía o histoplasmosis, que eventualmente ocasionan la muerte del individuo infectado. Con el objetivo de controlar la replicación del VIH, en la actualidad se utilizan combinaciones de fármacos que interfieren con diversos eventos en el ciclo de replicación del virus [56, 57]. La administración oportuna y ordenada de estos fármacos permite un

aumento en el número de LT CD4⁺ en sangre y una disminución hasta niveles indetectables de la carga viral en plasma, lo que detiene la progresión de la enfermedad y disminuye significativamente la incidencia de enfermedades oportunistas con una mejoría notable en la calidad de vida del individuo [54, 57].

2.7. Respuesta inmune contra el VIH.

2.7.1. Respuesta innata

La inmunidad innata es la primera línea de defensa durante la fase temprana de la infección por VIH. Las células del sistema inmune implicadas son: células asesinas naturales (NK), monocitos, linfocitos T gamma/delta (LT $\gamma\delta$) y células dendríticas (DC) [57]. Estas células tienen inicialmente funciones efectoras y posteriormente adquieren funciones reguladoras, ayudando a las células de la inmunidad adaptativa. Aunado a lo anterior, las células de la inmunidad innata tienen la capacidad de secretar citocinas como IL-2, IL-12, IL-4, IL-10 e IFN- γ , y quimiocinas como MCP-2, MIP-1 α , MIP-1 β e IFN α/β que ayudan al control de la infección [58].

Los linfocitos T $\gamma\delta$ se localizan en las mucosas y generalmente no reconocen antígenos peptídicos presentados por moléculas HLA, sino que interactúan directamente con antígenos no peptídicos o con proteínas de estrés celular. Los LT $\gamma\delta$ producen citocinas tipo T_{H1} y T_{H2}, además lisan a células blanco infectadas por VIH. Estas células también generan factores antivirales supresores como RANTES (Regulador durante la Activación Normal de linfocitos T Expresados y Secretados), MIP-1 α y MIP-1 β que se unen al co-receptor del virus, CCR5, disminuyendo su expresión [58].

2.7.2. Linfocitos T CD4⁺.

Los linfocitos T CD4⁺ o linfocitos T cooperadores (Th) son una población celular cuya función está determinada de acuerdo a las citocinas que producen y secretan. Por tanto, se pueden dividir en Th1, que activan macrófagos y producen citocinas con efectos proinflamatorios y citotóxicos; y las Th2, que producen citocinas promotoras de la síntesis de inmunoglobulinas, cambio de isotipo y reacciones anafilácticas. En el desarrollo de una

respuesta inmune se favorece uno u otro tipo; en el caso del VIH, se ven favorecidas las Th1 [57, 58].

2.7.3. Linfocitos T CD8⁺.

Los linfocitos T CD8⁺ o citotóxicos (CTL) son esenciales para el control de infecciones virales. Los CTL se estimulan por antígenos presentados a su receptor de células T en el contexto de moléculas HLA de una célula presentadora de antígeno (APC). Esto activa las funciones efectoras de los CTL, las cuales pueden dividirse en dos tipos: producción de factores solubles (citocinas y quimiocinas) y función citotóxica o lisis de la célula infectada [58].

En el caso de la liberación de factores solubles, los linfocitos CD8⁺ pueden secretar IFN- γ que tiene actividad antiviral pues, por una compleja cascada de activación, provoca que las células cercanas se vuelvan relativamente resistentes a una infección viral productiva. Además los CTL también producen y secretan β -quimiocinas (MIP-1 α , MIP-1 β y RANTES) que se unen a la molécula CCR5, bloqueando así la unión del VIH con su co-receptor, promoviendo la internalización de este co-receptor y disminuyendo la habilidad del VIH para infectar las células blanco [57, 58].

Por otro lado, se sabe que los CTL median la muerte de la célula que es blanco por dos vías principales: la primera es la vía gránulo-dependiente, donde son liberadas moléculas citotóxicas como perforinas y granzimas, causando la muerte de la célula infectada. La segunda vía es independiente de gránulos citotóxicos y en ésta la molécula FasL (ligando de Fas) presente en la membrana de los CTL encuentra al receptor Fas (CD95) en la célula infectada. Al unirse a su ligando el receptor es capaz de inducir la muerte por apoptosis de la célula [58].

2.7.4. Anticuerpos.

La respuesta inmune por parte de los linfocitos B se desarrolla dentro de la primera semana después de encontrar valores detectables de viremia y son determinados de forma inicial como complejos antígeno-anticuerpo. A esta fase le sigue la aparición de

anticuerpos anti-gp41 y anticuerpos anti-pg120. Sin embargo, estos anticuerpos no tienen efectos importantes sobre la viremia.

Por otro lado, no es sino hasta varios meses después que los anticuerpos neutralizantes (NAbs) aparecen. Los NAbs actuarán contra la cepa infectante y no son capaces de neutralizar virus divergentes. La habilidad del VIH para evadir la respuesta inmune y su amplia diversidad antigénica provoca que el control ejercido por los anticuerpos sea limitado.

Adicionalmente, los anticuerpos pueden actuar en forma conjunta con células efectoras para provocar citotoxicidad mediada por anticuerpos, eliminando de esta manera a las células infectadas. En cuanto al rol protector que juegan los anticuerpos en las mucosas se conoce poco y es necesario realizar más estudios [59].

3. VIH y Microbiota.

3.1 Relación entre VIH y la microbiota intestinal.

El sistema gastrointestinal es un punto de entrada común para microorganismos patógenos; sin embargo, los factores antimicrobianos secretados por la mucosa intestinal junto con la estructura específica de la misma (uniones estrechas y presencia de células inmunes) limitan la translocación de estos microorganismos a través de la barrera epitelial. Bajo condiciones normales, la microbiota proveerá señales al sistema inmune que favorecerán el mantenimiento de un estado inflamatorio saludable en la mucosa; lo cual, mejora la resistencia a la infección por patógenos. Durante una infección aguda, la barrera epitelial del intestino puede ser traspasada, y la detección de moléculas microbianas estimulará una respuesta exaltada del sistema inmunológico (Figura 11) [60].

Como se ha mencionado anteriormente, algunas características distintivas de la infección por VIH son un profundo agotamiento de los linfocitos T CD4+ y la activación crónica del sistema inmunológico, dejando a los individuos infectados por VIH susceptibles a infecciones oportunistas potencialmente fatales [61, 62].

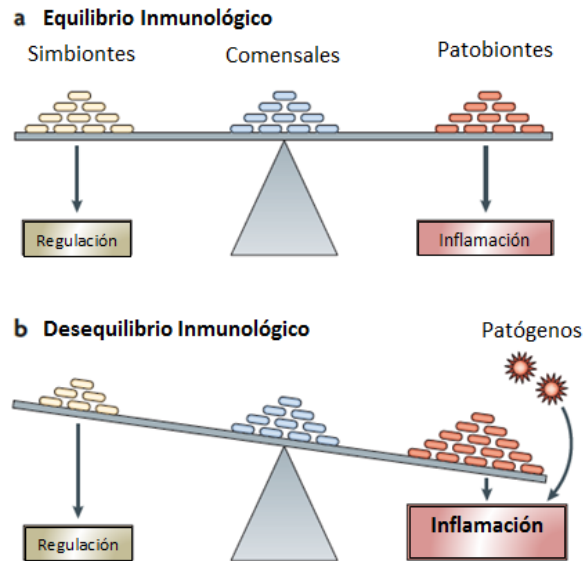


Figura 11. Desequilibrio inmunológico asociado a la disbiosis de la microbiota. a) Una microbiota saludable tiene una composición balanceada de diferentes microorganismos. Los simbioses son aquellos con una función que promueve el estado de salud. Los comensales son residentes permanentes que no tienen una función benéfica o dañina conocida. Los Patobiontes son residentes permanentes de la microbiota que bajo ciertas condiciones tienen el potencial de causar alguna patología. b) Bajo condiciones de disbiosis hay una alteración en la composición de la microbiota, lo que desencadena un proceso inflamatorio no específico. Esto predispone al hospedero a una enfermedad de causa inflamatoria posiblemente causada por patógenos. Modificada de [11].

Ahora bien, el tracto intestinal es un sitio importante para la replicación del VIH y probablemente un reservorio importante para la persistencia viral [63]. Esto se da debido a que el tejido linfóide asociado al intestino o GALT, alberga a cerca del 60% de todos los linfocitos CD4+ de memoria encontrados en el cuerpo; los cuales, son un objetivo temprano del virus durante la fase aguda de la enfermedad [7]. Por tanto, durante la fase aguda de la infección por VIH, las defensas inmunes de la mucosa intestinal se ven profundamente afectadas.

Se cree que la masiva y rápida depleción de los linfocitos en el GALT es la causa subyacente del progresivo deterioro de las funciones del sistema inmune intestinal y del sistema digestivo, que colectivamente se conocen como enteropatía [63]. Esta enteropatía está caracterizada por un proceso de mala absorción, aumento de la permeabilidad intestinal y la translocación microbiana, lo que en conjunto dará como resultado clínico: diarrea y desnutrición. Este proceso tiene un devastador impacto en la calidad de vida de los individuos infectados por el VIH [64].

En la infección por VIH, tanto la enteropatía como otras comorbilidades no asociadas con SIDA (e.g., enfermedad cardiovascular, osteoporosis, desordenes neurocognitivos) son causadas por los niveles anormales de activación del sistema inmune y de inflamación [62]. La replicación residual que existe del VIH en el contexto de un ambiente inflamatorio perpetuará este estado de inflamación, debilitando la integridad de la barrera epitelial; lo que favorecerá la translocación de productos bacterianos (como LPS y DNAr 16S) a la periferia (Figura 12). Diversos estudios han observado esta asociación de la infección crónica por el VIH con la translocación de productos microbianos en la circulación sistemática debido a una ruptura de la barrera epitelial de la mucosa [62, 65-67].

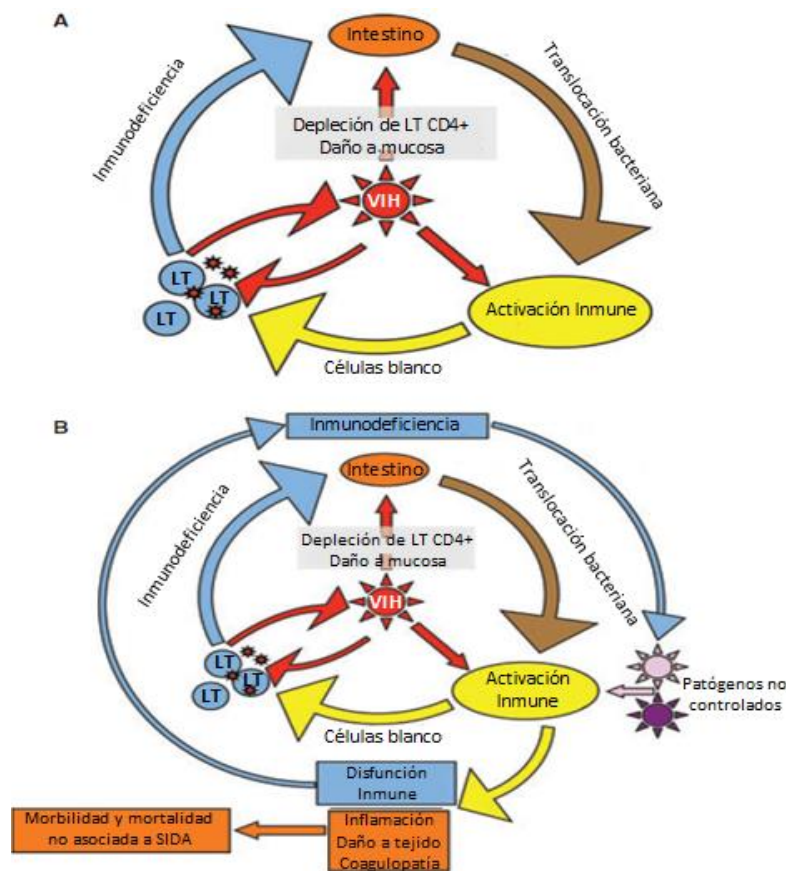


Figura 12. Ciclo vicioso en la infección por VIH. a) La infección por el virus causa daño en la integridad de la mucosa del tracto gastrointestinal, resultando en una continua y sistémica exposición a los productos microbianos. El VIH y los productos microbianos causarán activación de los linfocitos T CD4+, provocando que se tengan más células blanco y altos niveles de replicación viral. Mecanismos directos e indirectos favorecerán la pérdida de estos linfocitos, ampliando la inmunodeficiencia y provocando mayores niveles de translocación. **b)** La activación crónica del sistema inmunológico resulta en daño a tejidos linfoides, lo que a su vez causa una disfunción inmune. Esta inmunodeficiencia provocada resulta en un exceso de patógenos no controlados y, por lo tanto, mayor activación inmune. Este estado de inflamación crónica predice y acelera el desarrollo de SIDA y de condiciones no asociadas a SIDA, como enfermedad cardiovascular. Modificada de [68].

Esta translocación sistemática se correlaciona con la producción de citocinas pro-inflamatorias y la activación del sistema inmune [65, 69]. En los individuos infectados por VIH los niveles de los marcadores de la translocación bacteriana, inflamación y activación (e.g., CD14s, I-FABP, EndoCab) son anormales en comparación con individuos no infectados [67, 70-73]. Esto estimula y prolonga aún más este proceso de activación e inflamación, generando un círculo vicioso y contribuyendo con la apoptosis de los linfocitos T CD4+. Actualmente, se ha podido establecer un vínculo directo entre este daño a la barrera epitelial, la activación crónica del sistema inmune y la progresión de la enfermedad a SIDA (Figura 12) [74].

Conociendo que la infección por VIH está asociada con inflamación intestinal y que la microbiota intestinal puede ser alterada en enfermedades inflamatorias, cambios en la composición de la microbiota pueden ser esperados en los individuos VIH+. Algunos estudios ya han logrado observar estas asociaciones.

Gori y colaboradores fueron los primeros en reportar evidencias sobre una disbiosis en los individuos infectados, observando un aumento de *Pseudomonas aeruginosa* y *Candida albicans* y la disminución de Bifidobacteria y lactobacilos [71, 75]. En 2011, un estudio conducido por Ellis y colaboradores describió una asociación positiva entre la activación de linfocitos T CD8+ y Bacteroidales y una asociación negativa entre el conteo de linfocitos T CD4+ y Enterobacteriales en individuos VIH+ sin tratamiento [67]. En estudios posteriores se mostró que la microbiota de individuos infectados que presentan un perfil inflamatorio, tienen un patrón de especies bacterianas distinto al de otras enfermedades con características inflamatorias y presenta similitudes con los perfiles observados en la microbiota de una alimentación rica en carbohidratos y deficiente en grasas y proteínas (disminución de la diversidad microbiana y comunidades ricas en *Prevotella*) [76].

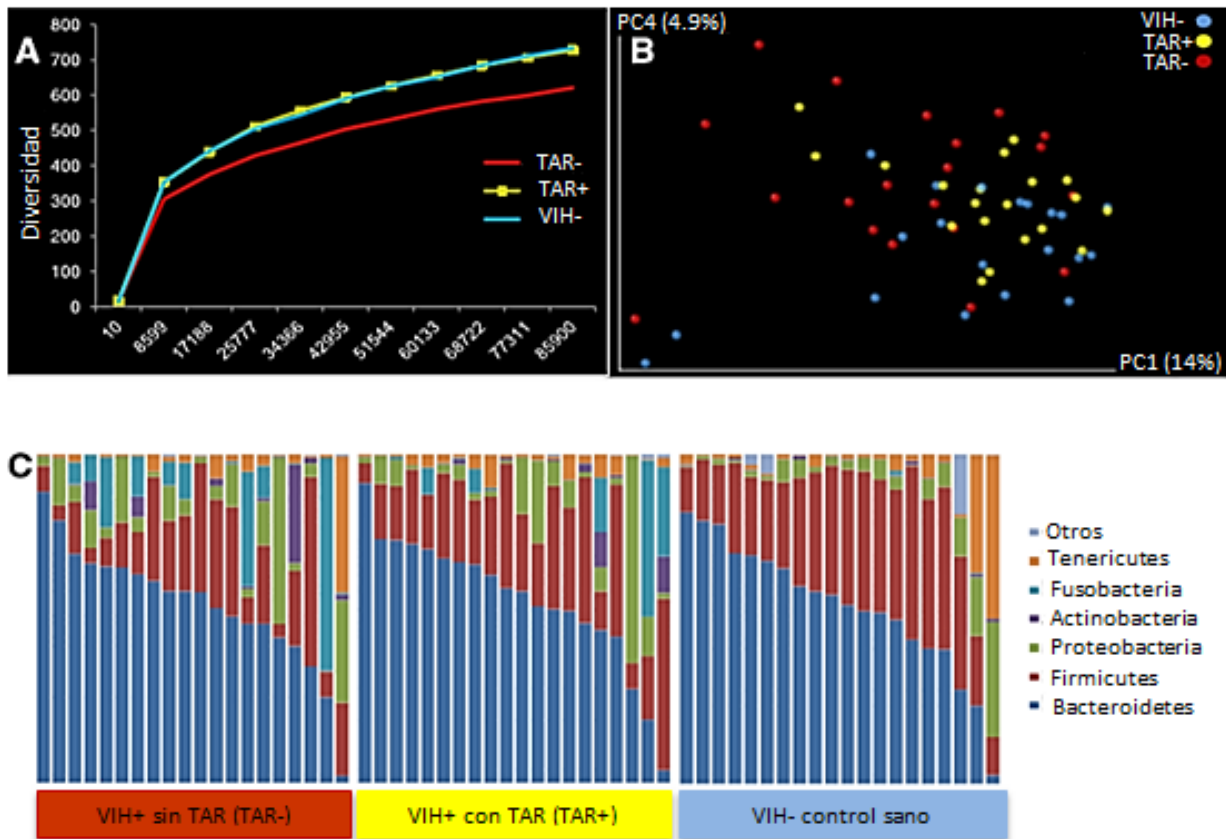


Figura 13. Algunas alteraciones en la microbiota asociados a la infección por VIH. A) La diversidad en los individuos VIH+ sin TAR (TAR-) es menor que la de los individuos no infectados (VIH-) e individuos VIH+ con TAR (TAR+), pero sólo la comparación con los VIH- fue significativa ($p < 0.05$). B) En este gráfico de componentes principales se observa que los individuos TAR+ tienden a agruparse más con los individuos VIH-, mientras que los TAR- están más dispersos a lo largo del gráfico. C) A nivel de Phylum la abundancia de Firmicutes esta significativamente reducida en individuos TAR- comparado con VIH- (ANOVA, $q = 0.06$), mientras que Fusobacteria está enriquecida (ANOVA, $q = 0.11$). Modificada de [77].

De forma interesante, un par de estudios del 2013 mostraron que la disbiosis observada en la infección por VIH está asociada con altos niveles de catabolismo del triptófano y de producción de ácido butírico; lo que en parte, podría explicar bioquímicamente el incremento de los marcadores de inflamación y progresión de la enfermedad [78, 79]. Posteriormente, Dillon y su equipo de trabajo demostraron una elevación en el número de células inmunes activadas y translocación bacteriana, asociados a un aumento de Proteobacteria y disminución de Firmicutes. A nivel género, observaron esta asociación significativa con el aumento de *Prevotella* y la disminución de *Bacteroides* [70]. McHardy por su parte observó cambios en algunos de los géneros menos abundantes, depleción de *Ruminococcus* y *Lachnospira* y enriquecimiento de *Fusobacteria*, asociados con

alteraciones en algunos procesos bioquímicos (metabolismo de aminoácidos, síntesis de vitaminas, entre otros) (Figura 13) [77].

De forma colectiva, y a pesar de que han sido realizados mediante diversas metodologías, muestras y cohortes, todos estos estudios muestran que la infección por VIH está asociada, de forma consistente, con una alteración en el estado homeostático de las comunidades microbianas a través de todo el tracto gastrointestinal.

3.2. Terapia antirretroviral y la microbiota intestinal.

La llegada de la terapia antirretroviral (TAR) mejoró significativamente el pronóstico de los individuos infectados por el VIH. Sin embargo, se ha observado que los individuos que han estado bajo tratamiento de larga duración todavía presentan una mayor tasa de mortalidad al ser comparados con individuos no infectados. Esta mortalidad aumentada está asociada con los procesos de inflamación y activación descritos arriba, los cuales persisten a pesar de tener niveles indetectables de viremia [68]. Aunado a esto, la restauración de los linfocitos T CD4+ asociada al uso de la TAR, y que es observada en sangre periférica, no es evidente en los linfocitos del GALT debido a una replicación residual del virus y a la dificultad de iniciar la TAR en las etapas tempranas de la enfermedad (Figura 14) [80, 81].

Por si fuera poco, el largo uso de la terapia antirretroviral está asociado con el desarrollo de toxicidad, anormalidades metabólicas y la aparición de variantes virales resistentes. Asimismo, se ha observado que algunos antirretrovirales tienen como efecto secundario algunos síntomas gastrointestinales, tales como diarrea. Estos efectos son particularmente evidentes en las TAR basadas en inhibidores de proteasa y potenciadas con Ritonavir (lopinavir/ritonavir) y no son evidentes en otros tipos de tratamiento como los basados en Efavirenz [30].

Ahora bien, a pesar de que los niveles de marcadores de activación, inflamación y translocación disminuyen bajo una TAR efectiva, permanecen elevados al compararse con controles no infectados y son dependientes de la restauración inmune y de la barrera

epitelial (Figura 14) [65, 82]. De igual manera, los estudios sobre la microbiota han observado que la disbiosis manifestada en individuos vírgenes al tratamiento persiste, en un menor grado, en individuos bajo TAR (Figura 13) [63].

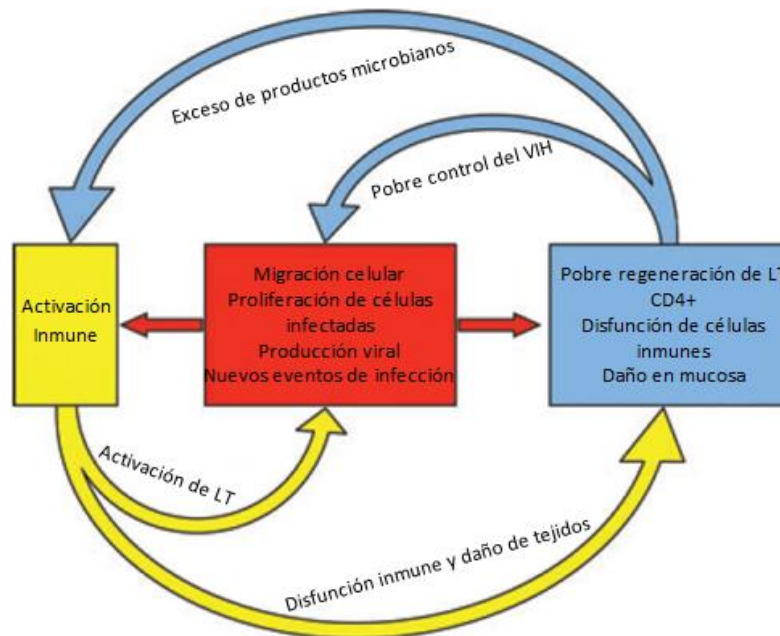


Figura 14. La activación inmune mantiene la persistencia viral durante el uso de TAR. El daño en el sistema linfóide asociado a la infección por VIH sólo es parcialmente reversible. Durante una TAR de larga duración, la disfunción inmune residual tiene como consecuencia una inmunodeficiencia, altas cantidades de patógenos y activación inmune. La activación inmune en cambio favorece la migración de LT a lugares de alta replicación viral, la generación de células activadas y susceptibles blancos y la producción viral de células que se encontraban latentes. La replicación/producción residual de virus en consecuencia contribuye en el sostenido daño al tejido y activación inmune. Modificada de [68].

El estudio más reciente sobre microbiota en individuos infectados por VIH es el realizado por Mutlu, en el cual observa que en general los individuos infectados bajo TAR presentan una disminución en la diversidad microbiana, con un correspondiente incremento de Proteobacteria, Fusobacteria y Prevotella al comparar con individuos no infectados [72]. Los estudios de Lozupone, McHardy y Vujkovic muestran que las alteraciones observadas en la diversidad y composición de la microbiota se encuentran en valores intermedios entre individuos infectados sin TAR e individuos no infectados, evidenciando una restauración incompleta [76, 77, 79]. Estos valores a veces son más parecidos hacia uno u otro extremo sin llegar a dilucidar aún el porqué de esta observación.

La infección por VIH ejemplifica claramente la importancia de los microorganismos del intestino en la patogénesis de una enfermedad infecciosa. La relación entre la composición de la microbiota intestinal y las anormalidades en el sistema inmunológico en la infección por VIH podría proveer una idea de cómo la alteración en la microbiota y todas sus consecuencias impacta en esta enfermedad [67].

Son necesarios más estudios para poder aclarar cuáles son las alteraciones en la microbiota específicamente asociadas a la infección por VIH, tomando en cuenta los posibles factores confusores, como: dieta, genética, terapia antirretroviral, etcétera.

CAPÍTULO II. ANTECEDENTES.

1. Antecedentes.

El identificar el origen de la inflamación crónica del sistema inmunológico es de gran importancia en la lucha contra la infección por VIH. Numerosos estudios han demostrado una relación directa entre la activación del sistema inmune y la translocación microbiana, pero la fuente y el tipo de factores desencadenantes siguen siendo motivo de investigación. La gran cantidad de marcadores inflamatorios asociados a la patogénesis del VIH y las interacciones moleculares y celulares entre el sistema inmunológico y la microbiota intestinal son factores de integración que podrían ofrecer un mecanismo.

La mayoría de los estudios se han centrado en el impacto de la translocación microbiana en la activación crónica del sistema inmune en la enfermedad del VIH. Nuestro estudio se centrará en investigar la composición de la microbiota intestinal como candidato para poder aclarar cómo la translocación microbiana afecta la infección por VIH y su progresión.

Un posible modelo de la patogénesis del VIH sugiere que el daño infligido a la mucosa del intestino durante la fase aguda de la infección por VIH (depleción de las células T CD4+) conduce a la translocación microbiana que a su vez contribuye con la activación crónica del sistema inmunológico y con la progresión y mortalidad de la infección por VIH [74]. Sin embargo, el papel de la composición de la microbiota en la infección por VIH aún queda indefinido. Son pocos los estudios que han tratado de identificar un vínculo específico entre la composición de la microbiota y la progresión de la infección.

Los estudios sobre el impacto de la diversidad de la microbiota en la progresión de la enfermedad por VIH cobran aun mayor relevancia al conocer la fuerte dependencia de la composición de la microbiota con hábitos alimenticios y de higiene, así como con el contexto genético de diversas poblaciones. El entendimiento del papel de la microbiota intestinal en la progresión de la enfermedad por VIH podría culminar en nuevas estrategias de tratamiento que regulen la composición del mismo, que impactarían en la

salud y calidad de vida de los pacientes que viven con el virus. Además, estos estudios aportarían información valiosa para el entendimiento no sólo de los mecanismos de inmunopatogénesis del VIH, sino también de enfermedades complejas y de componente autoinmune.

CAPÍTULO III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.

1. Hipótesis.

Dados los cambios en la inmunidad de la mucosa (depleción de las células CD4+, la translocación microbiana y la activación crónica del sistema inmune) y la pérdida de función de la barrera epitelial asociados a la infección por VIH, la composición de la microbiota intestinal estará modificada en individuos que viven con VIH en relación con individuos no infectados. De igual manera, el uso de tratamiento antirretroviral y el tipo de tratamiento utilizado impactará en la composición de la microbiota intestinal.

2. Objetivos.

2.1. Generales.

Describir la composición de la microbiota intestinal característica de un grupo de individuos mexicanos infectados por VIH en diferentes etapas de la infección en comparación con un grupo de individuos no infectados utilizando la técnica de secuenciación masiva del gen codificado por el DNA ribosómico 16S, así como posibles alteraciones en la misma debido al uso de tratamiento antirretroviral y al tipo de tratamiento utilizado.

2.2. Particulares.

- Estandarizar la técnica de secuenciación masiva para diferentes regiones hipervariables del gen 16S.
- Determinar qué región hipervariable es la más informativa sobre la diversidad de la microbiota intestinal.
- Determinar la diversidad en la microbiota intestinal de diferentes grupos de individuos VIH+ y VIH- mexicanos.
- Encontrar patrones característicos en la composición de la microbiota intestinal asociados a diversos factores (e.g., dieta, uso de tratamiento, tipo de tratamiento utilizado, infección por VIH).

CAPÍTULO IV. METODOLOGÍA.

1. SELECCIÓN DEL GRUPO DE ESTUDIO.

El presente estudio fue aprobado por el Comité de Ciencia y Bioética en Investigación del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias con el código B36-12 (Anexo A). Todos los individuos que fueron reclutados para el estudio firmaron una carta de consentimiento informado (Anexo B). El estudio fue dirigido de manera transversal y el único criterio de exclusión que se utilizó fue el uso de antibióticos dentro de las dos semanas anteriores a la toma de muestras. Se reclutaron 68 individuos con diagnóstico confirmado de enfermedad por VIH (VIH positivos); de los cuales, 25 eran vírgenes al tratamiento (naïve), 20 se encontraban bajo el esquema de Efavirenz, 17 se encontraban bajo el esquema de inhibidores de proteasa (Lopinavir o Atazanavir potenciados con Ritonavir) y 6 individuos fueron controladores (carga viral <2000 copias/mL por al menos 1 año) [83]. Además se reclutaron 9 individuos no infectados por VIH de entre los familiares de los individuos infectados. Aunados a estos individuos se obtuvieron las muestras de 7 voluntarios no infectados para realizar la estandarización de la técnica. De cada uno de los individuos se recolectaron, en una única toma, de 5 a 10 g de heces que fueron congelados a -80°C hasta su posterior procesamiento.

2. EXTRACCIÓN DE DNA.

A partir de las muestras de heces se realizó la extracción de DNA total con el estuche de reactivos QIAamp® DNA stool mini Kit (QIAGEN, Valencia, CA). Brevemente, en esta técnica se utilizó una solución llamada ASL que junto con una incubación a 95°C, permite la lisis de las células presentes, liberando el DNA presente. Después se añadieron unas tabletas que contienen una matriz capaz de adsorber las sustancias que pudieran dañar el DNA o inhibir la PCR. Posteriormente, el sobrenadante fue incubado junto con proteinasa K para eliminar todas las proteínas presentes. A continuación se centrifugó y el sobrenadante fue colocado en una columna de sílice lo cual permitió que el DNA presente se uniera a la columna. La columna fue lavada dos veces con distintas soluciones

amortiguadoras para eliminar posibles contaminantes. Finalmente, el DNA fue eluido utilizando una solución de baja fuerza iónica.

3. CUANTIFICACIÓN DEL DNA

Se determinó la concentración del DNA extraído por medio de un espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE) para poder ajustar la concentración de DNA en la reacción de amplificación (20 ng/μL). La pureza del DNA purificado fue evaluada por la relación entre ácidos nucleicos/proteínas (absorbancia 260/280), buscando valores mayores a 1.8.

4. AMPLIFICACIÓN DE LAS REGIONES HIPERVARIABLES DEL GEN 16S.

Para amplificar la muestra de DNA extraído se utilizó una Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Esta técnica permitió amplificar fragmentos hipervariables específicos del gen 16S de diferentes tamaños (V2, V3, V5, V6). Se utilizó un termociclador Veriti 96 well Thermal Cycler (Life Technologies, Carlsbad, CA). Además de las muestras se utilizó un control positivo (estándar de *Escherichia coli*) y un control negativo (Agua).

Para la amplificación se utilizaron unos *fusion primers*, los cuales son primers que además de tener la secuencia de reconocimiento de la región de interés, están unidos a 4 adaptadores distintos (Figura 15). Estos adaptadores permiten el reconocimiento de las diferentes secuencias por el equipo durante el proceso de secuenciación (A, key, P1) y la diferenciación entre muestras distintas (*barcode*).

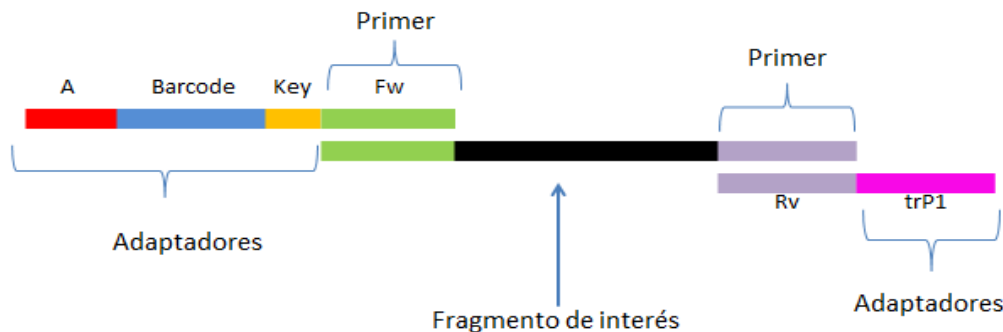


Figura 15. Representación esquemática de la técnica de *fusion primers*. Los adaptadores para la generación del amplicón que será utilizado en los templates de la plataforma Ion PGM fueron fusionados, de acuerdo con los protocolos del fabricante, a *primers* optimizados (Forward o FW y reverse o RV) para amplificar diversas regiones hipervariables del gen 16S. Se incluyeron 10 diferentes *barcodes* en el *primer forward* para poder obtener muestras múltiples.

Las secuencias de los *primers* utilizados se enlistan en la Tabla 2. Para el diseño de estos *primers* se utilizaron reportes previos observados por Nossa y colaboradores, los cuales están optimizados para identificar bacterias, incluso en una microbiota de composición compleja [84].

Tabla 2. Primers para amplificación de regiones hipervariables del gen DNAr 16s.

Región	Forward	Reverse
V2	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	TGCTGCCTCCCGTAGGAGT
V3	TACGGRAGGCAGCAG	AGGGTATCTAATCCT
V5	AACAGGATTAGATACCCTGGTAG	GGTTCTKCGCGTTGCWTC
V6	CWACGCGARGAACCTTACC	ACRACACGAGCTGACGAC

La enzima utilizada fue Platinum® Taq DNA polymerase High Fidelity (Invitrogen, Carlsbad, CA), utilizando la mezcla de reactivos mostrada en la Tabla 3.

Tabla 3. Mezcla de amplificación para regiones hipervariables.

Componente	Volumen por muestra
dH2O	13.15 µL
Buffer 10x <i>High-Fidelity</i>	2.50 µL
MgCl (50 mM)	2.00 µL
DMSO	1.25 µL
dNTP's mix (10 mM)	0.50 µL
Primer "forward" (10µM)	0.25 µL
Primer "reverse" (10µM)	0.25 µL
Platinum Taq Hi-Fi DNA polimerasa	0.10 µL
DNA (20ng/µL)	5.00 µL
Volumen Final	25.00 µL

Se aplicó el siguiente programa para el termociclador: 1 ciclo de 3 min a 94°C, seguido de 25 ciclos a de 30 s a 94°C, 45 s a 55°C y 1 min a 72°C, finalmente se aplicó un ciclo de 10 min a 72°C.

5. VISUALIZACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE AMPLIFICACIÓN.

Para comprobar que se llevó a cabo una exitosa amplificación del fragmento deseado se realizó una electroforesis en un gel de Agarosa al 2%, utilizando un marcador de peso molecular de 100pb (Invitrogen, Carlsbad, CA) y seleccionando como positivas aquellas bandas que se encontraran aproximadamente en los tamaños correspondientes para cada una de los amplicones de las regiones hipervariables (V2 = 377 pb, V3 = 255 pb, V5 = 265 pb, V6 = 178 pb).

6. PURIFICACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE AMPLIFICACIÓN.

Los productos de amplificación con un tamaño adecuado fueron purificados por medio del estuche de reactivos Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter, Pasadena, CA), el cual permite que el DNA se una a perlas magnéticas y de esta manera, al colocar una barra magnética, logrará la separación del DNA de los contaminantes presentes. Posteriormente se lavaron las perlas con etanol para eliminar cualquier contaminante remanente y se eluyó el DNA en presencia de una solución de baja fuerza iónica y pH alcalino (solución de Tris-EDTA, pH=8.0).

7. CUANTIFICACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE AMPLIFICACIÓN.

Se cuantificó el material purificado mediante el kit Qubit® dsDNA HS (Life Technologies, Carlsbad, CA), el cual permite la unión de marcadores fluorescentes al material genético que permiten su detección y cuantificación al comparar con una curva estándar. Esta cuantificación permitió realizar mezclas equimolares de los amplicones de hasta 5 individuos. Las mezclas equimolares fueron corridas en un gel E-Gel® SizeSelect (Life Technologies, Carlsbad, CA) para eliminar posibles fragmentos muy cortos o muy largos y finalmente, se volvieron a purificar mediante el kit Agencourt AMPure XP y a cuantificar mediante el kit Qubit® dsDNA HS.

8. SECUENCIACIÓN

El primer paso fue la preparación del templado y para realizarlo las mezclas equimolares fueron ajustadas a una concentración de 20 pM. Las mezclas ajustadas fueron corridas en el equipo Ion OneTouch™ 2 (Life Technologies, Carlsbad, CA), el cual mediante una PCR en emulsión permite la generación de los templados. Posteriormente, los templados obtenidos se enriquecieron con el equipo OneTouch™ ES (Life Technologies, Carlsbad, CA), según las especificaciones del fabricante. La secuenciación se realizó utilizando el equipo Ion Personal Genome Machine® (PGM™) (Life Technologies, Carlsbad, CA), con una química de secuenciación de 200 pb y chips 316 V2. Las corridas de cada chip fueron visualizadas mediante el Torrent Browser y de igual manera se descargaron las secuencias de cada chip para su posterior análisis.

9. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO

Las secuencias obtenidas para cada individuo fueron filtradas por calidad (Q20) y tamaño (dependiendo del tamaño del amplicón) y todas aquellas secuencias que pasaron este filtro fueron analizadas mediante el *software* QIIME v.1.8. Este *software* permite la formación de unidades taxonómicas operacionales u OTUs, que son grupos de secuencias con un 97% de identidad entre ellas. En este *software* se pueden elegir diferentes formas de analizar las secuencias para obtener los OTUs dependiendo del tipo de datos que se tengan. En nuestro caso se utilizó el proceso conocido como: selección de OTUs con referencia abierta u “open-reference OTU picking”. Mediante este proceso de formación de OTUs, las secuencias son comparadas contra una colección de secuencias referencia para formar los grupos, y todas aquellas secuencias que no alineen con la colección referencia son subsecuentemente alineadas y agrupadas entre ellas. Posteriormente se realiza la determinación taxonómica de las secuencias encontradas en los diferentes individuos al comparar con la base de datos de GreenGenes (Mayo, 2014).

De igual manera, al utilizar esta plataforma bioinformática se pudo obtener la alfa diversidad, que equivale a la diversidad observada dentro de una muestra o grupo de muestras. En esta plataforma la alfa diversidad se evalúa mediante 4 índices: Observed

Species (número de grupos presentes, al tener más grupos habrá mayor diversidad), Shannon (abundancia relativa de los diferentes grupos presentes, al tener una mayor abundancia de un grupo en específico habrá menor diversidad), Chao 1 (cantidad de especies raras o únicas presentes, al tener mayor número de este tipo de grupos mayor será la diversidad) y Phylogenetic Diversity (cantidad de grupos con una filogenia más alejada entre ella, al tener un mayor número de grupos con una filogenia más alejada entre ellos mayor será la diversidad).

Finalmente, también es posible obtener la beta diversidad, que equivale a la diversidad observada al comparar diferentes grupos de muestras con características particulares. La visualización de la beta diversidad se obtiene por medio de un gráfico de componentes principales, determinando de esta manera si existían diferencias entre los diferentes grupos de estudio. Los resultados utilizados en todos los casos fueron los correspondientes a los análisis mediante Weighted UniFrac, pues este toma en consideración no sólo presencia o ausencia, sino abundancia relativa. Las comparaciones estadísticas entre grupos se realizaron a nivel de phylum, familia y género, mediante pruebas no paramétricas: U de Mann-Whitney, Kruskal-Wallis (seguida de una prueba de Dunn para múltiples comparaciones) y ANOVA de 2-vías (seguida de una prueba de Bonferroni), todo mediante el programa GraphPad PRISM 5.

CAPÍTULO V. RESULTADOS.

1. Estandarización de la técnica.

El gen de DNAr 16S contiene diversas regiones hipervariables que son utilizadas, de manera individual o en conjunto, para realizar la clasificación taxonómica de comunidades microbianas. Estudios previos sobre microbiota han utilizado de manera preferencial algunas de estas zonas debido a la calidad de los resultados obtenidos. En el presente estudio se decidió analizar qué región nos permitiría obtener los resultados de mejor calidad de acuerdo a la metodología utilizada (uso de *fusion primers*, plataforma de secuenciación Ion PGM y análisis bioinformático por medio de QIIME).

Para la estandarización se analizaron las muestras de 7 voluntarios no infectados por el VIH (distintos de los utilizados para el estudio transversal), secuenciando cuatro regiones diferentes: V2, V3, V5, V6. Estas regiones varían en tamaño, siendo V2 la más grande y V6 la más pequeña (Tabla 4). Ahora bien, esta variación en los tamaños afecta en el número de secuencias perdidas al realizar el filtrado por tamaño. Esto es debido a que entre más grande sea el fragmento por secuenciar más difícil será para la plataforma lograr que todas las secuencias obtenidas alcancen el tamaño deseado. De esta forma se observó que una enorme cantidad de las secuencias obtenidas para V2 (97%) se perdían después de aplicar este filtro. Por otro lado, para las regiones V3, V5 y V6 se pierde en promedio solamente el 46% de las secuencias, permitiendo tener más de 100,000 secuencias para que los análisis posteriores sean más confiables (Tabla 4). Para las cuatro regiones la cantidad de secuencias perdidas debido al filtrado por calidad (Q20) fue <10%.

Tabla 4. Secuencias obtenidas para cada región hipervariable.

	Tamaño promedio de las secuencias (pb)	Secuencias promedio antes del filtrado	Secuencias promedio después del filtrado	Pérdida promedio de secuencias (%)
V2	200	248,918	4,460	97.0
V3	150	400,010	210,269	46.4
V5	125	472,236	200,714	52.5
V6	70	782,050	443,466	41.0

El siguiente paso fue analizar las secuencias y observar de qué manera se distribuyeron las abundancias relativas de los diferentes phyla para cada región (Figura 16). Lo primero que se observó fue que la clasificación taxonómica por medio de la región V5 muestra proporciones de los phyla más abundantes (Firmicutes y Bacteroidetes) totalmente invertidas al comparar con las otras regiones analizadas y con lo reportado previamente. Esto se podría explicar debido a que V5 es, dentro de las regiones hipervariables, la que presenta menos grado de variabilidad; lo que podría provocar errores en la clasificación de las secuencias obtenidas. Por esta razón esta región quedó descartada.

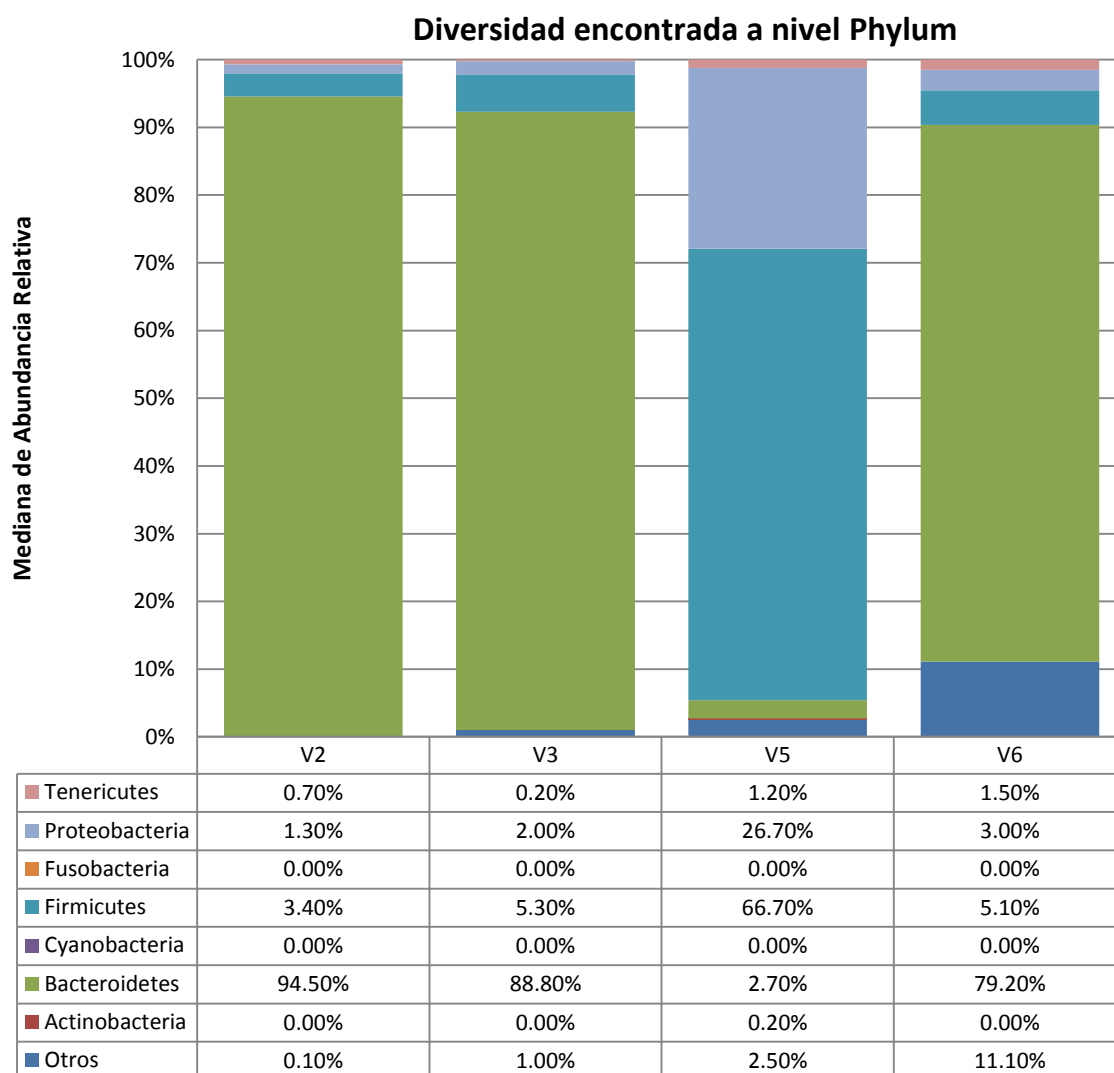


Figura 16. Diversidad encontrada a nivel Phylum para cada región hipervariable. Se observa la mediana de abundancia relativa para los 7 voluntarios no infectados en cada una de las regiones hipervariables (V2, V3, V5 y V6). El grupo “otros” corresponde a todas aquellas secuencias que no pudieron ser clasificadas.

Por otro lado, aunque la región V2 sería la ideal para los análisis por ser la de mayor tamaño, al perder tantas secuencias en el filtrado por tamaño podríamos estar perdiendo valiosa información. Esto se observa en el gráfico al tener menor diversidad y estar casi dominada esta región por el phyla Bacteroidetes. De igual manera que con V5, esta región fue descartada.

Por último tenemos a las regiones V3 y V6. Ambas regiones perdieron menos del 50% de las secuencias obtenidas después del filtrado por tamaño proporcionando suficientes lecturas para tener una clasificación taxonómica más confiable. Sin embargo, debido a que la región V6 es más corta (70 pb vs 150 pb) arrojó significativamente una mayor cantidad de secuencias no clasificadas (11.1% vs 1.0%. $p=0.0021$). Estas secuencias son información que se podría estar perdiendo para futuros análisis.

Aunado a lo anterior, al observar las curvas de rarefacción para cada una de estas regiones observamos resultados distintos. Una curva de rarefacción evidencia si se ha logrado observar toda la diversidad posible en una muestra. Cuando las curvas llegan a la zona de meseta significa que con el número de secuencias obtenidas se está mostrando toda la diversidad posible y aun cuando se aumentara el número de secuencias no se observaría más diversidad. De tal forma, se observó que para V3 las curvas de rarefacción se encuentran iniciando la zona de meseta mientras que para V6 serían necesarias más secuencias para ver toda la diversidad posible (Figura17).

Por medio de la región V3, como se observó, es posible obtener suficientes secuencias aun después del filtrado de calidad. A su vez, estas secuencias cuentan con la suficiente calidad para obtener una clasificación taxonómica confiable. Por tanto, la región V3 fue seleccionada para seguir la metodología y realizar el análisis de las muestras en el grupo de estudio.

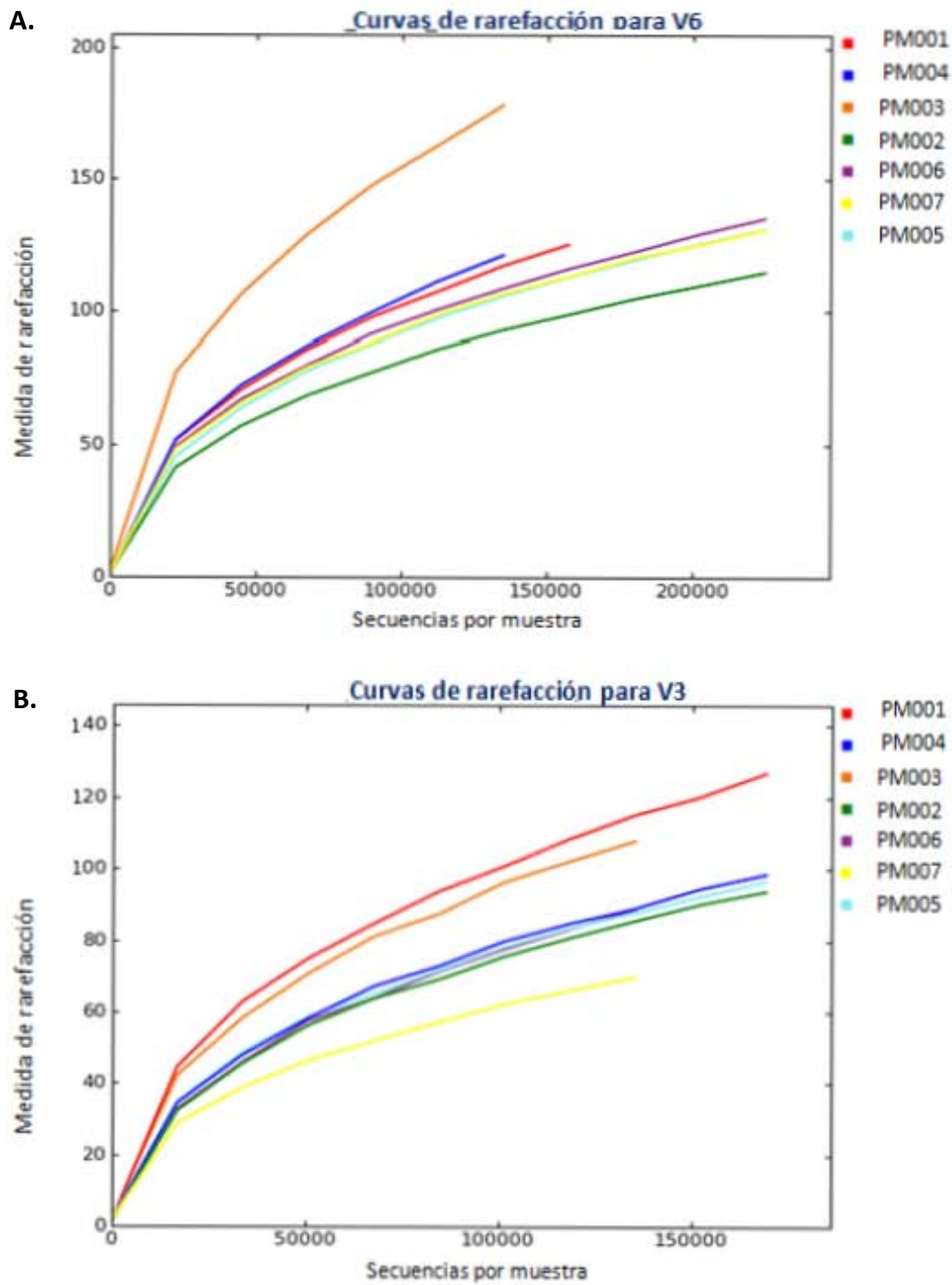


Figura 17. Curvas de rarefacción para V3 y V6. A) Curvas de rarefacción para los 7 voluntarios no infectados obtenidas con la región V6. Se observa que las curvas aún no llegan a la zona de meseta y serán necesarias más secuencias para observar toda la diversidad de las muestras. **B)** Curvas de rarefacción para los 7 voluntarios no infectados obtenidas con la región V3. Las curvas están iniciando la fase de meseta y aunque se agregaran más secuencias no se observaría más diversidad en las muestras.

2. Descripción del grupo de estudio.

Se reclutaron 77 individuos para el presente estudio. Del total de individuos: 25 eran VIH+ sin terapia antirretroviral o Naïves; 37 eran VIH+ bajo terapia antirretroviral (TAR) con un esquema basado en Tenofovir/Emtricitabina (TDF+FTC) y como tercer componente 20 tenían Efavirenz (EFV) y 17 tenían Lopinavir/ritonavir o Atazanavir/ritonavir (inhibidores de proteasa o IPs); 6 individuos controladores (individuos que mantienen cargas virales menores a 2000 copias de RNA/mL por al menos un año y sin el uso de TAR); y 9 VIH – como grupo control. Los datos descriptivos del grupo de estudio se presentan en la Tabla 5. El grupo estudiado se encuentra dominada por adultos jóvenes, principalmente varones. No se encontraron diferencias en edad, ni en el índice de masa corporal (IMC), entre los distintos grupos ($p=0.3449$ y $p=0.3021$, respectivamente). No hubo diferencias significativas entre la duración de la TAR de los grupos tratados ($p=0.5795$). Los individuos VIH+ sin TAR presentaron niveles de CD4 significativamente más bajos y carga viral significativamente más alta al compararse con individuos controladores y controles VIH- ($p<0.0001$).

Tabla 5. Datos descriptivos del grupo de estudio.

Grupo	VIH+ TAR -	VIH+ TAR+		Controladores	VIH-
N	25	Efavirenz 20	IPs 17	6	9
Edad (años)	28±6.8	42±8.8	39.5±9.2	34±15.21	38±12.43
Género (H/M)	24/1	18/2	15/2	3/3	5/4
IMC (Kg/m ²)	22.3±5.0	23.2±4.4	23.7±4.1	25.9±7.4	24.5±2.8
Duración TAR (meses)	0	67±32.5	75±35.7	0	0
CD4* (células/μL)	425±203.0 (80-821)	457±251.0 (235-1,297)	582±284.0 (240-1,177)	947±298.3 (482-1,160)	965±251.0 (617-1,468)
Carga Viral* (copias/mL)	97,441±461,513.0 (3,462-2,030,199)	40±0.0 (<40)	40±0.0 (<40)	62±158.9 (<40-447)	0

Los datos se presentan como mediana ± DE y los intervalos entre paréntesis.

H, hombre; M, mujer; IMC, índice de masa corporal.

* Valores estadísticamente significativos: $p<0.0001$ al comparar VIH+TAR- vs controles y VIH+TAR- vs VIH- .

No se encontraron diferencias significativas entre los grupos en las variables: edad, IMC y duración de TAR.

Las secuencias obtenidas para cada individuo del grupo de estudio (N=77) fueron filtradas por calidad (Q20) y tamaño (>129 pb), eliminándose de esta manera aquellas secuencias que no cumplieran con estos criterios de calidad. Después del filtrado, se obtuvo una mediana de 245,719 ± DE 167,632 secuencias que fueron utilizadas para los diversos análisis posteriores.

3. Cambios en la microbiota

3.1. Efecto de la infección por VIH

El primer grupo en el que se analizaron posibles cambios en la microbiota fue el de individuos VIH+ sin TAR al ser comparados contra el grupo control (VIH-) para evaluar el efecto que tiene la infección por VIH en la microbiota intestinal. Lo primero que se comparó fueron las variaciones en la alfa diversidad (diversidad dentro de un mismo grupo de muestras).

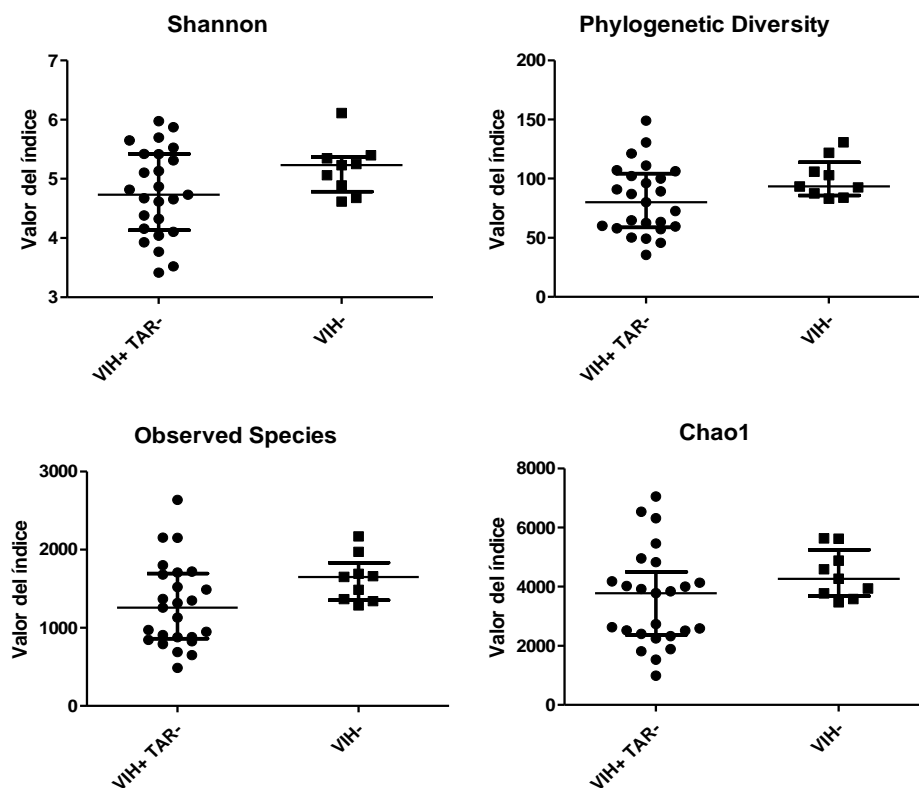


Figura 18. Alfa diversidad para individuos VIH+ TAR- e individuos VIH-. Se observan los valores de alfa diversidad para cada uno de los índices analizados en los individuos pertenecientes a cada grupo. Todos los índices fueron calculados a una profundidad de 49,208 secuencias/muestra (tomadas al azar) para asegurar que en todos los casos se tuvieran suficientes secuencias. Se observa la mediana y el rango intercuartil.

En la figura 18 se observan como varían los cuatro índices de alfa diversidad entre ambos grupos. A pesar de que hay cambio entre los niveles de diversidad de estos grupos ninguno de los cuatro índices alcanzó diferencias significativas ($p > 0.05$).

Posteriormente, la evaluación siguió al observar las variaciones al nivel taxonómico más alto: Phylum (Figura 19). Se encontraron 12 phyla diferentes, sin embargo, solamente 4 de ellos presentaron una mediana de abundancia relativa mayor al 1%: Bacteroidetes, Firmicutes, Proteobacteria y Fusobacteria.

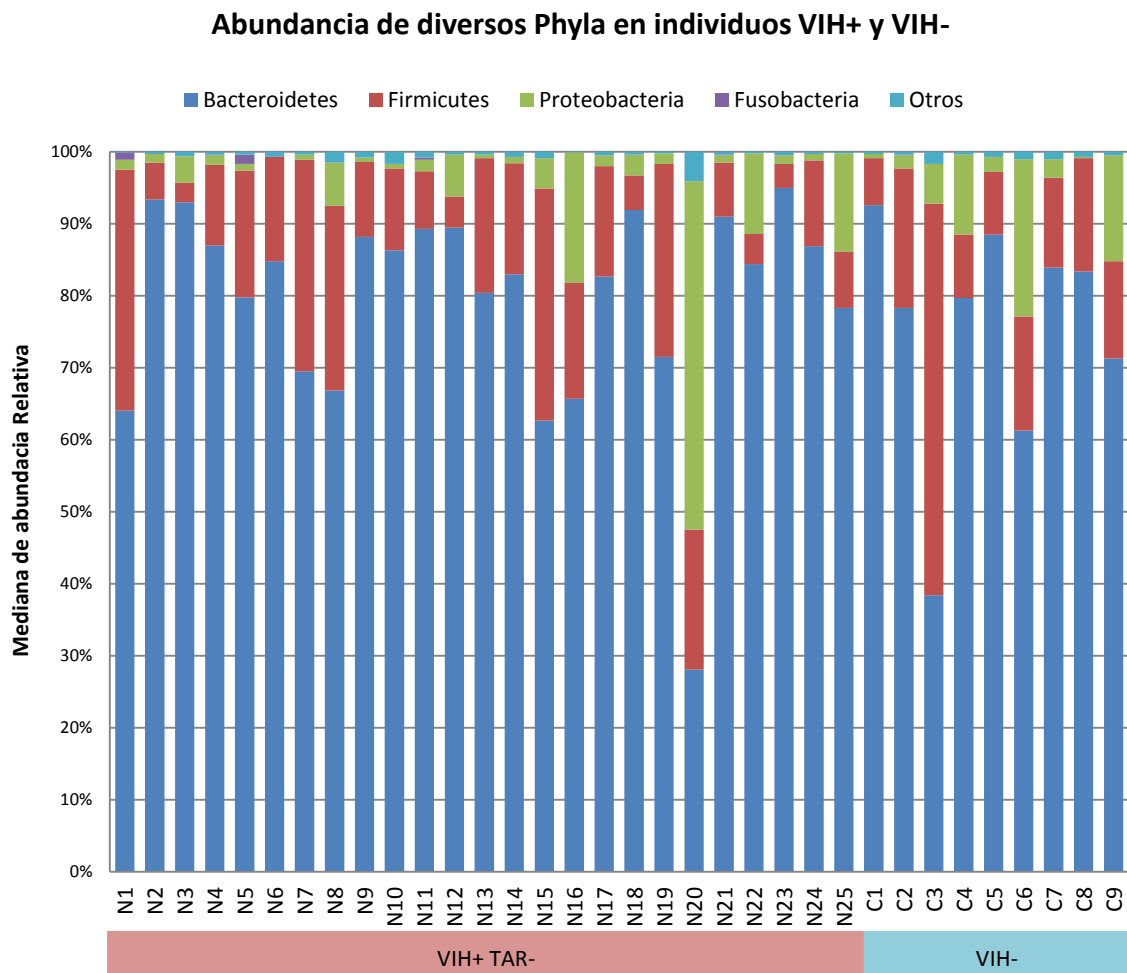


Figura 19. Abundancia de diversos phyla para individuos VIH+ TAR- e individuos VIH-. Se muestra como varía la presencia de los diversos phyla en cada uno de los individuos pertenecientes a ambos grupos. La clasificación “otros” corresponde a todos los phyla que contribuyen en menos del 1% y a aquellas secuencias no clasificadas.

A pesar de que se observaron ligeras diferencias para cada uno de los phyla al comparar entre ambos grupos, ninguna alcanzó diferencias estadísticamente significativas (Figura 20).

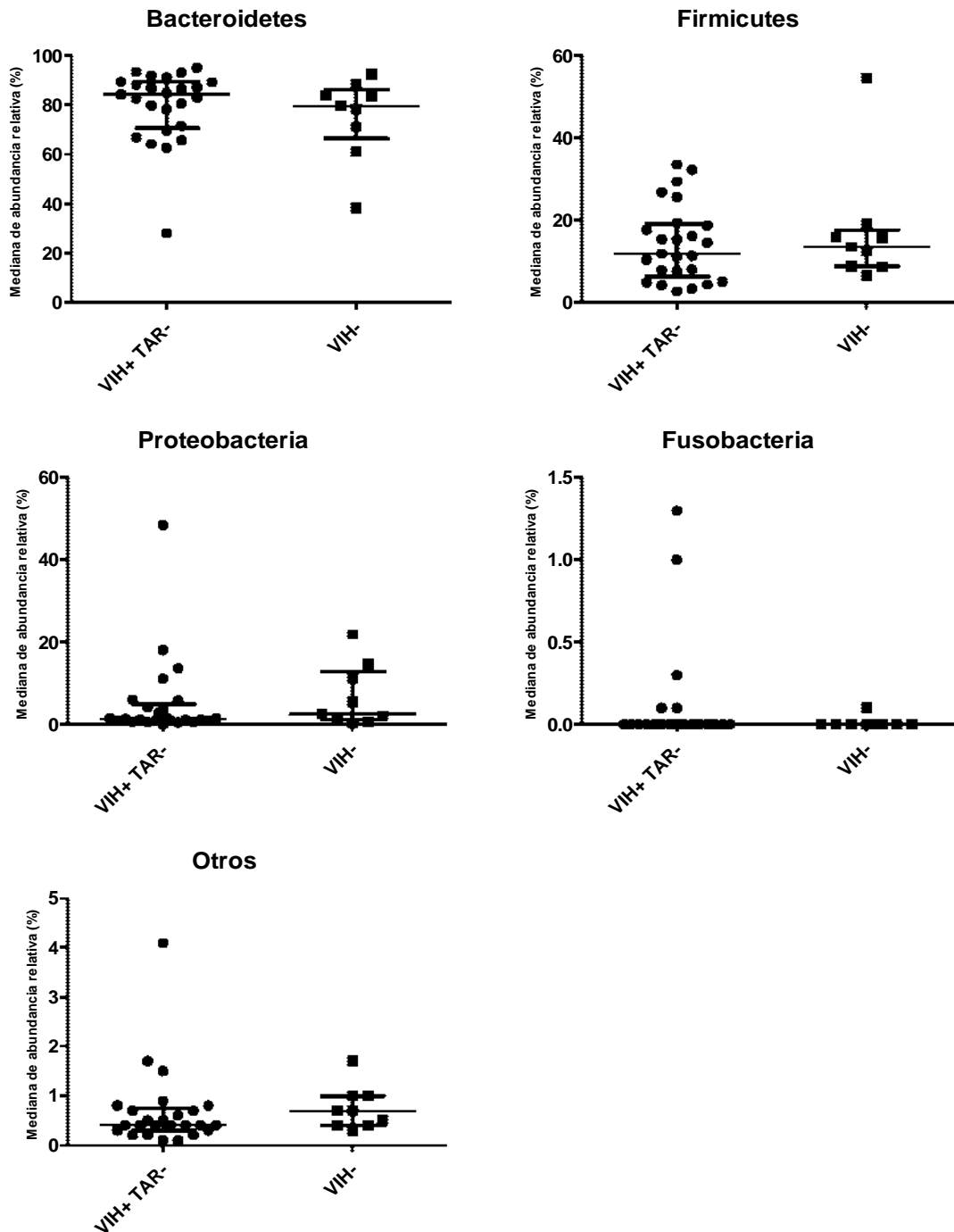


Figura 20. Comparación de abundancia de diversos phyla para individuos VIH+ TAR- e individuos VIH-. Se muestran cuáles son las variaciones en la mediana de la abundancia relativa al comparar el grupo de individuos VIH+ sin TAR y el grupo control (VIH-). No se observan diferencias significativas en ninguno de los phyla al comparar ambos grupos ($p > 0.05$). Se observa la mediana y el rango intercuartil.

Ahora bien, al profundizar en el nivel taxonómico analizado se observan algunas variaciones entre los perfiles de cada individuo (Figura 21). A nivel familia se encontraron más de 100 grupos taxonómicos diferentes; sin embargo, únicamente 11 de ellos se presentaron en más del 1% de la mediana de abundancia relativa.

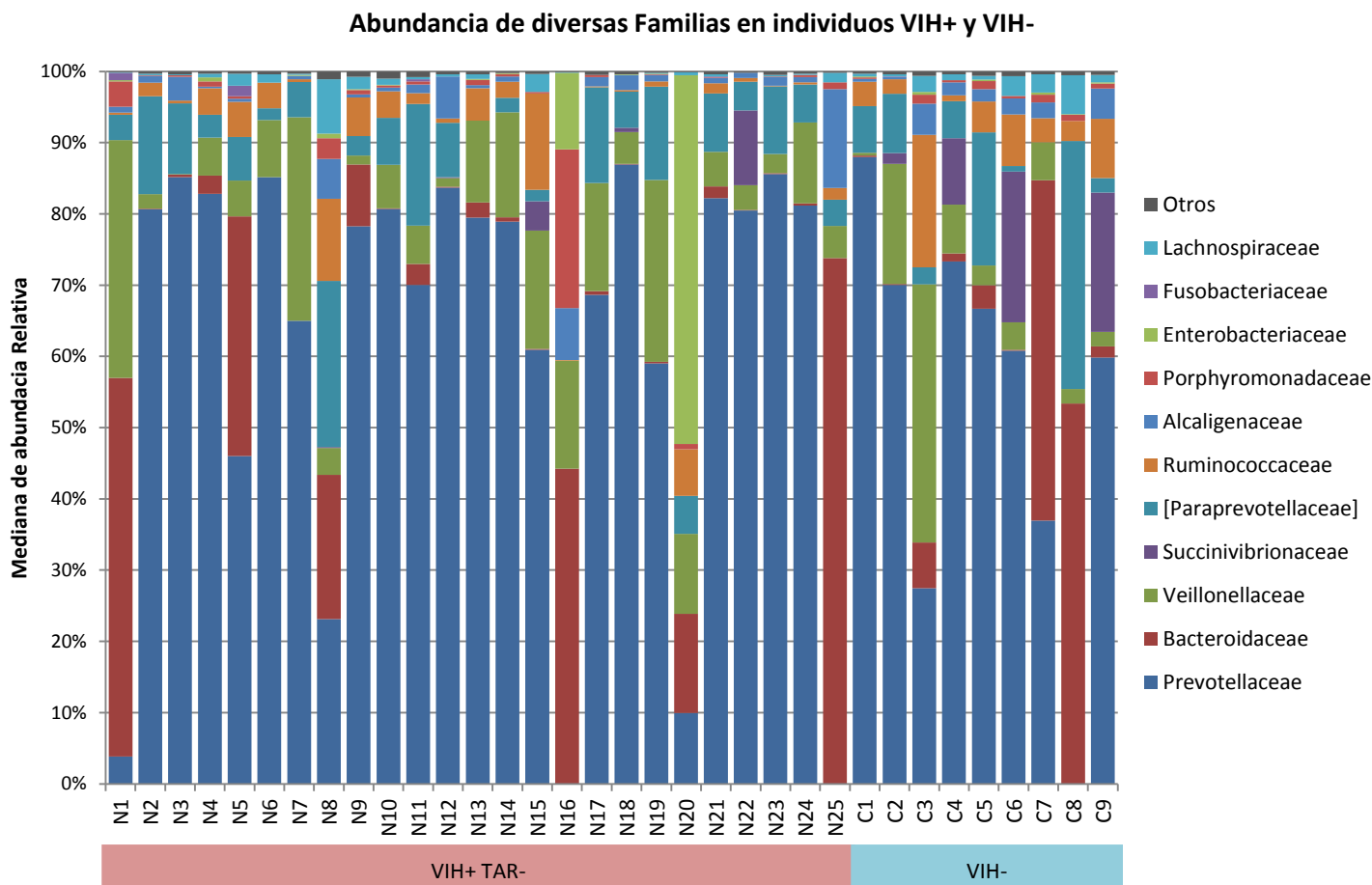


Figura 21. Abundancia de diversas familias para individuos VIH+ TAR- e individuos VIH-. Se muestra como varía la presencia de las diversas familias en cada uno de los individuos pertenecientes a ambos grupos. La clasificación “otros” corresponde a todas las familias que contribuyen en menos del 1% y a aquellas secuencias no clasificadas.

Se observaron algunas variaciones en las medianas de abundancia relativa de las diversas familias entre los grupos VIH+ y VIH-. Sin embargo, solamente la disminución de la familia Lachnospiraceae en el grupo VIH+ sin TAR presentó diferencias estadísticamente significativas ($p=0.0129$) al comparar contra los VIH-. Por otro lado, la familia Ruminococcaceae presentó una tendencia ($p=0.0508$) a presentar valores disminuidos en el grupo VIH+ sin TAR al comparar contra el grupo control (Figura 22).

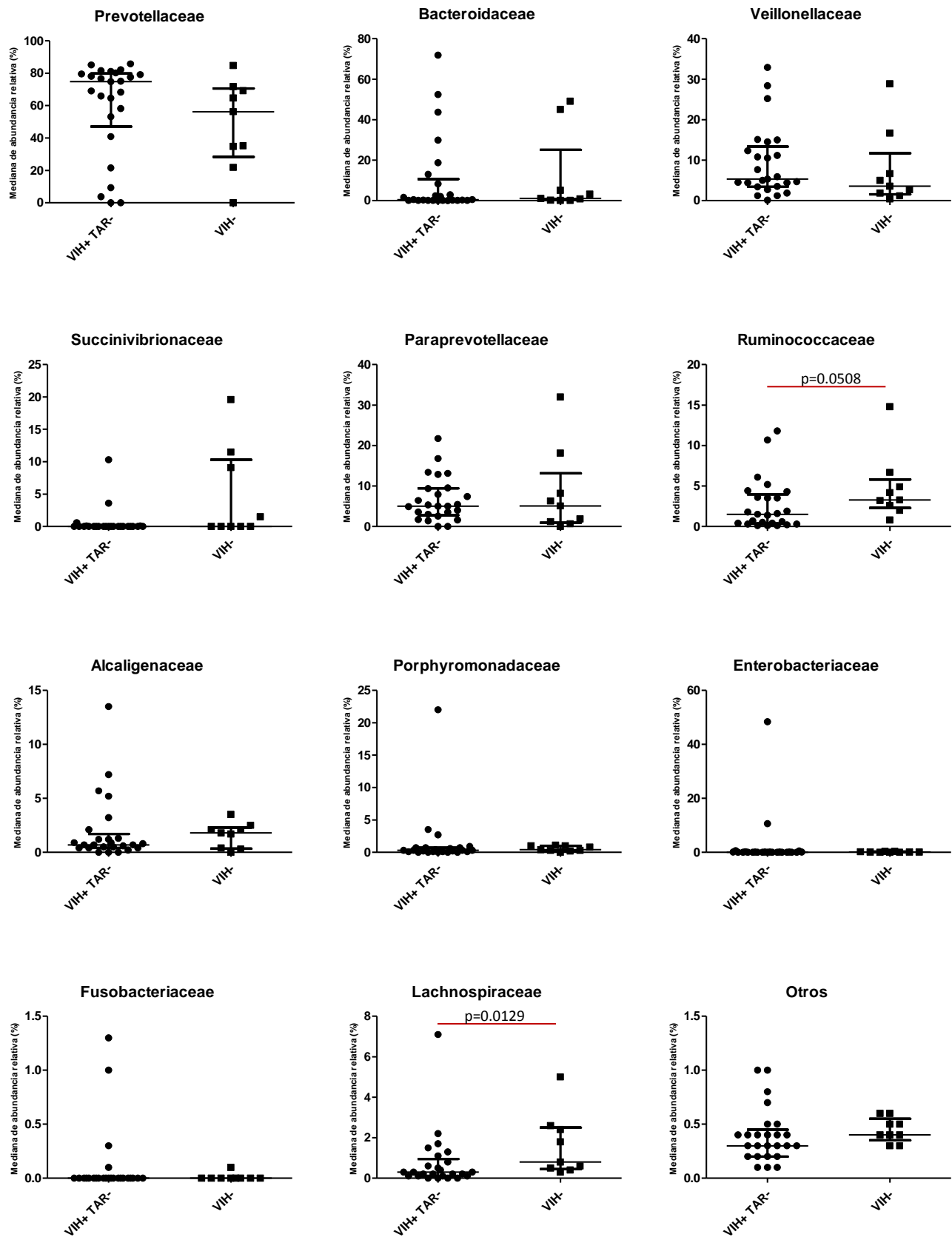


Figura 22. Comparación de abundancia de diversas familias para individuos VIH+ TAR- e individuos VIH-. Se muestran cuáles son las variaciones en la mediana de la abundancia relativa al comparar el grupo de individuos VIH+ sin TAR y el grupo control (VIH-). Se observa una diferencia significativa en la familia Lachnospiraceae al comparar ambos grupos ($p < 0.05$) y una tendencia en la familia Ruminococcaceae ($p \approx 0.05$). Se marcan la mediana y el rango intercuartil.

Finalmente, se analizó al nivel taxonómico más profundo que la metodología nos permitió: Género. Se encontraron representados en el grupo de estudio más de 200 géneros de los cuales, solamente 11 presentaron una abundancia relativa mayor al 1% en el grupo de estudio (Figura 23).

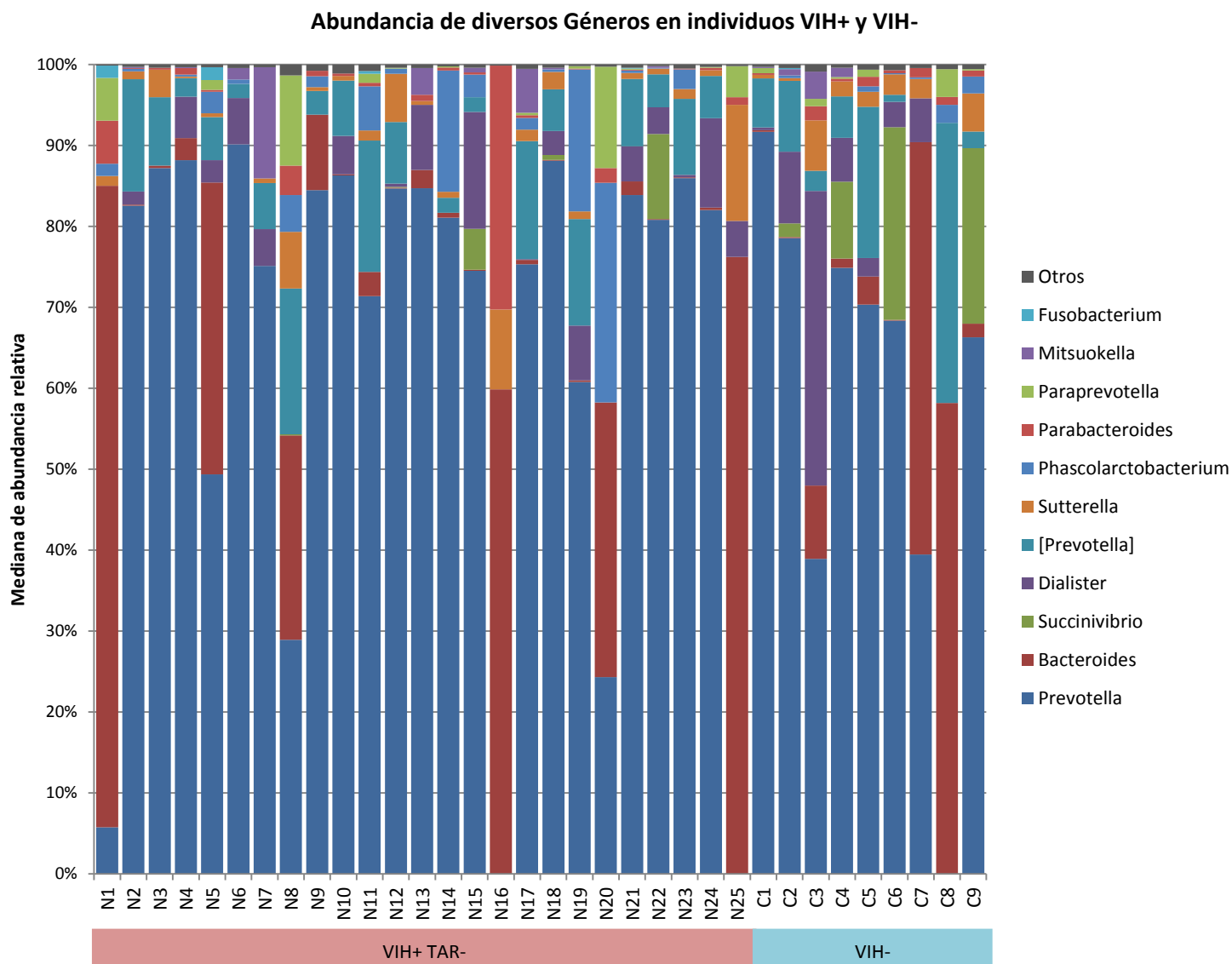


Figura 23. Abundancia de diversos géneros para individuos VIH+ TAR- e individuos VIH-. Se muestra como varía la presencia de los diversos géneros en cada uno de los individuos pertenecientes a ambos grupos. La clasificación “otros” corresponde a todos los géneros que contribuyen en menos del 1% y a aquellas secuencias no clasificadas.

Aun cuando se observaron algunas diferencias en las medianas de abundancia relativa entre los géneros encontrados para el grupo VIH+ TAR- y el grupo VIH-, estas no alcanzaron significancia estadística (Figura 24).

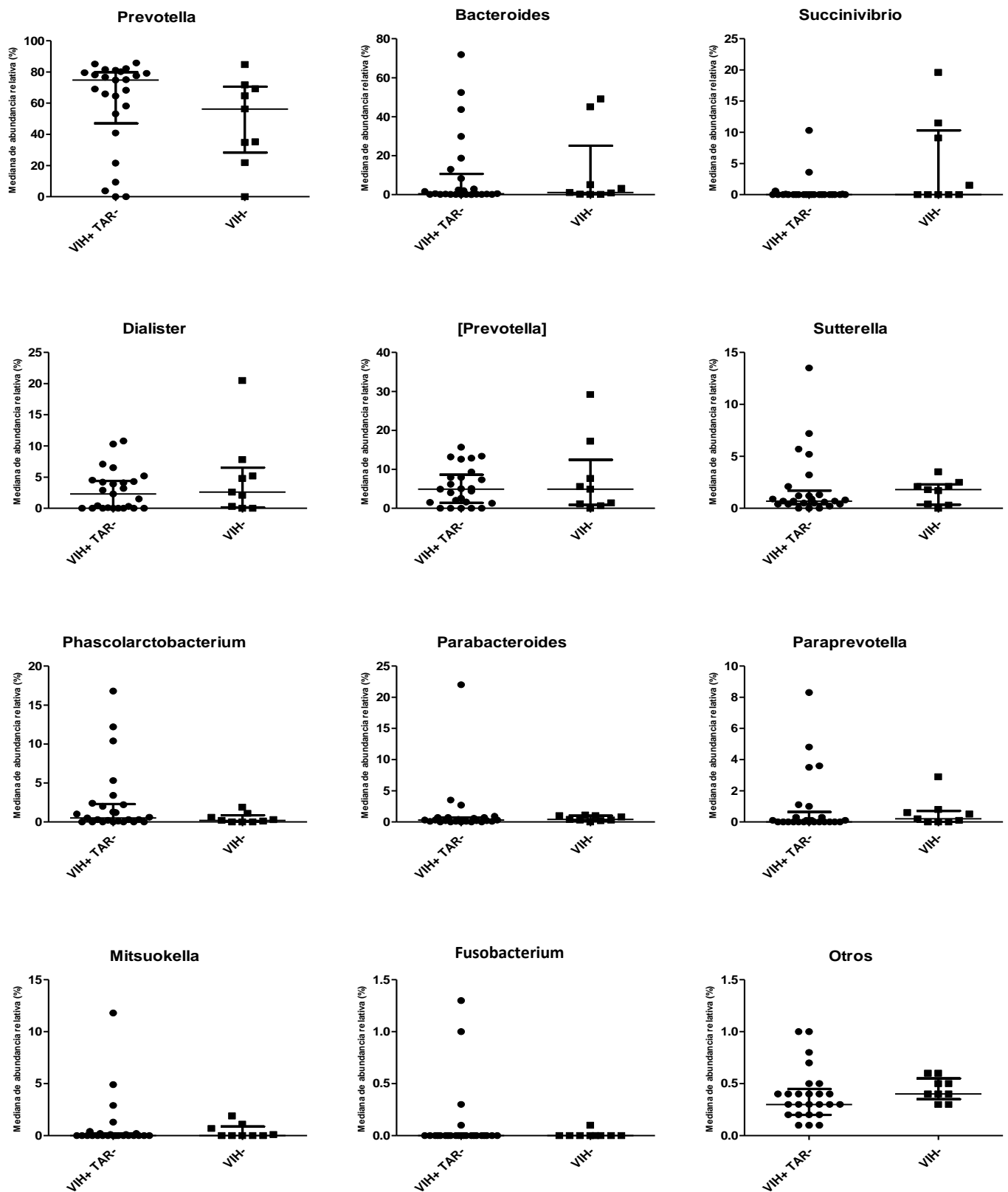


Figura 24. Comparación de abundancia de diversos géneros para individuos VIH+ TAR- e individuos VIH-. Se muestran cuáles son las variaciones en la mediana de la abundancia relativa al comparar el grupo de individuos VIH+ sin TAR y el grupo control (VIH-). No se observan diferencias significativas en ninguno de los géneros al comparar ambos grupos ($p > 0.05$). Se observa la mediana y el rango intercuartil. El grupo Prevotella pertenece a la familia Prevotellaceae y [Prevotella] a la familia Paraprevotellaceae.

Un reporte previo [76] evaluó únicamente a los individuos VIH+ TAR- que presentaban conteos de LT CD4+ mayores a 200 células/ μ L. Esto debido a que los individuos que se encuentren en fase de SIDA (LT CD4+ < 200 células/ μ L) podrían presentar características y alteraciones totalmente distintas a individuos VIH+ con conteos de LT CD4+ por arriba de este límite, debido al daño crónico en su sistema inmunológico. Al excluir del análisis a los cinco individuos (N1, N4, N7, N8, N13) VIH+ TAR- con conteos inferiores a 200 células que estaban presentes en el grupo de estudio se observaron algunos cambios en los resultados de las pruebas estadísticas.

Los cambios más importantes observados fueron la aparición de valores significativos para dos de los índices de alfa diversidad, mientras que al incluir a estos cinco individuos ningún índice de alfa diversidad difería estadísticamente (Figura 25). De esta manera se evidenció una menor diversidad en el grupo de individuos infectados al compararlos con el grupo control: Phylogenetic Diversity, $p=0.0451$ y Observed Species, $p=0.0403$.

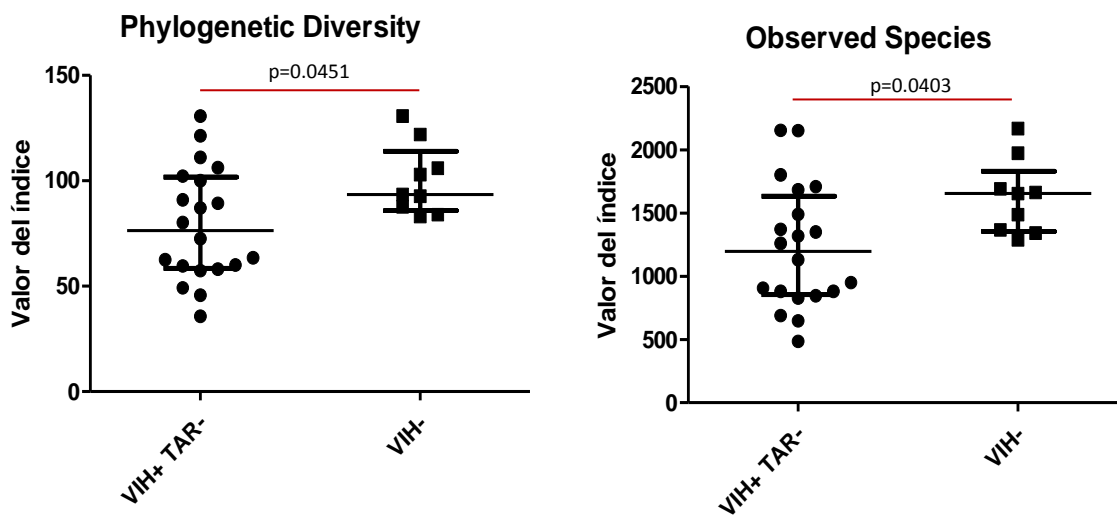


Figura 25. Alfa diversidad para individuos VIH+ TAR- con CD4 >200 células e individuos VIH-. Se observan los valores de alfa diversidad para los dos índices que presentaron diferencias estadísticas entre grupos ($p<0.05$). Todos los índices fueron calculados a una profundidad de 49,208 secuencias/muestra (tomadas al azar) para asegurar que en todos los casos se tuvieran suficientes secuencias. Se observa la mediana y el rango intercuartil.

De igual manera, se observaron un par de cambios importantes en dos de las familias encontradas en el grupo de estudio (Figura 26). Por un lado, la tendencia que se había observado de tener menor abundancia de Ruminococcaceae en los individuos infectados se volvió significativa ($p=0.0283$). Por otro lado, la disminución significativa de la familia Lachnospiraceae, que ya se había observado en los individuos infectados, obtuvo un valor estadístico más fuerte ($p=0.0081$).

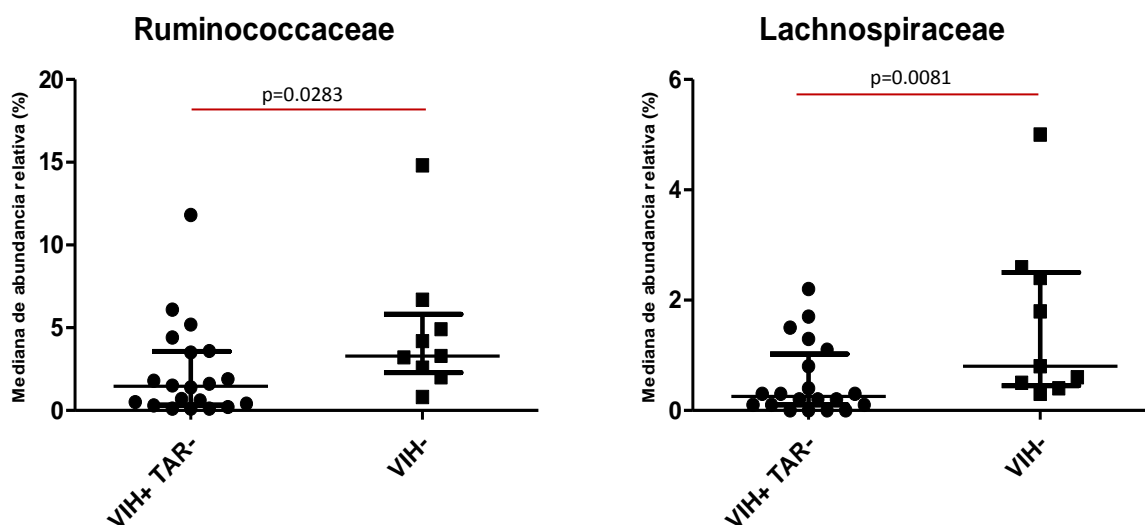


Figura 26. Comparación de la abundancia de dos familias para individuos VIH+ TAR- con CD4 >200 células e individuos VIH-. Se muestran cuáles son las variaciones en la mediana de la abundancia relativa al comparar el grupo de individuos VIH+ sin TAR, cuyos conteos de LT CD4+ son mayores a 200 células y el grupo control (VIH-). Se observan una disminución significativa en las familias Ruminococcaceae y Lachnospiraceae al comparar ambos grupos ($p<0.05$). Se observa la mediana y el rango intercuartil.

Debido a las diferencias observadas, los futuros análisis que se realizaron únicamente consideraron a los individuos con conteos de LT CD4+ mayores a 200 células por microlitro.

3.2. Efecto de la TAR.

El siguiente paso fue evaluar de qué manera la terapia antirretroviral está modificando o dirigiendo posibles cambios en la microbiota de los individuos VIH+. Para esto, dentro del grupo de estudio se incluyó a un grupo de individuos infectados por el VIH que además se encontraban bajo TAR. De este grupo 20 individuos se encontraban bajo una terapia basada en Efavirenz y 17 individuos bajo una terapia basada en Inhibidores de proteasa (IPs). Se seleccionó la terapia de Efavirenz debido a la importancia que tiene el país como tratamiento de primera línea. Por otro lado, se eligió una terapia basada en IPs debido a los efectos secundarios asociados al tracto gastrointestinal que se le han asociado (malestar estomacal, diarrea, etcétera).

Al igual que con anterioridad, el primer aspecto a analizar fue la Alfa-diversidad. En este caso se observaron varias diferencias entre los individuos bajo tratamiento y los individuos infectados sin tratamiento y el grupo control. En general se observa que los individuos bajo TAR presentan valores intermedios de diversidad, menores a los del grupo VIH- y mayores a los del grupo sin TAR. También se observa que los valores de diversidad entre los dos tipos de TAR son distintos (Figura 27). En particular, se observa que en Observed Species los individuos bajo Efavirenz presentan menores valores al compararlos contra los individuos VIH- ($p=0.0043$) y contra los individuos bajo IPs ($p=0.0317$). Con respecto a este mismo índice se observa que los individuos bajo IPs tienen significativamente mayores valores que los individuos sin TAR ($p=0.0493$). En el caso del índice de Shannon se observa una disminución en los individuos bajo Efavirenz al comparar con los VIH- ($p=0.0251$). Por otro lado, Phylogenetic Diversity evidenció una disminución en los individuos bajo IPs al comparar con el grupo VIH- ($p=0.0060$) y una tendencia a disminuir al comparar contra aquéllos bajo una terapia basada en Efavirenz ($p=0.0530$). Finalmente, en cuanto al índice Chao1, los individuos bajo una terapia basada en Efavirenz presentaron significativamente mayores valores al comparar con los individuos sin TAR ($p=0.0439$) y con una terapia basada en IPs ($p=0.0317$). A su vez, los individuos bajo IPs presentaron valores menores al comparar contra los individuos VIH- ($p=0.0097$).

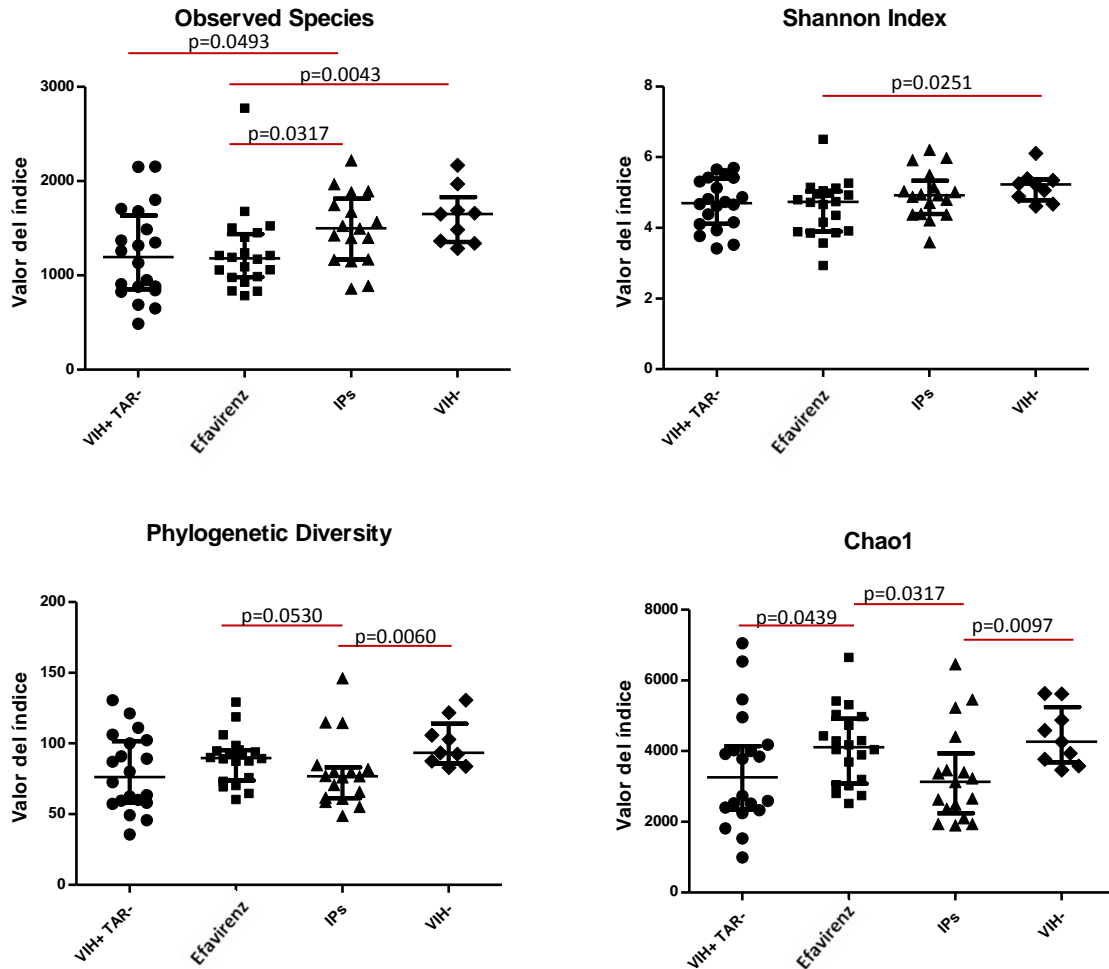


Figura 27. Alfa diversidad para individuos VIH+ sin TAR, VIH+ con TAR e individuos VIH-. Se observan los valores de alfa diversidad para cada uno de los índices analizados en los individuos pertenecientes a los siguientes grupos: VIH+ TAR-, VIH+ con terapia basada en Efavirenz, VIH+ con terapia basada en IPs e individuos control (VIH-). Todos los índices fueron calculados a una profundidad de 49,208 secuencias/muestra (tomadas al azar) para asegurar que en todos los casos se tuvieran suficientes secuencias. Todas las $p < 0.05$ son significativas, mientras que la $p=0.0530$ muestra una tendencia. Se observa la mediana y el rango intercuartil.

Al analizar qué taxones específicamente varían en los grupos bajo TAR observamos que a nivel Phylum se observan principalmente diferencias en el grupo bajo Efavirenz (Figura 28). Hay una disminución significativa de Bacteroidetes en este grupo al comparar contra individuos sin TAR ($p < 0.0001$), individuos bajo IPs ($p=0.0064$) y el grupo VIH- ($p=0.0196$). Por otro lado, en el phylum Proteobacteria existe un aumento en el grupo tratado con Efavirenz ($p=0.0143$), mientras que el grupo bajo IPs muestra una tendencia a aumentar con respecto a los TAR- ($p=0.0528$). De forma interesante, se observó que el phylum Fusobacteria se encuentra representado de una forma mayor sólo en el grupo bajo una TAR basada en Efavirenz mientras que en los grupos VIH+ TAR- ($p=0.0054$), IPs ($p=0.0002$) y VIH- ($p=0.0217$) la abundancia es prácticamente cero.

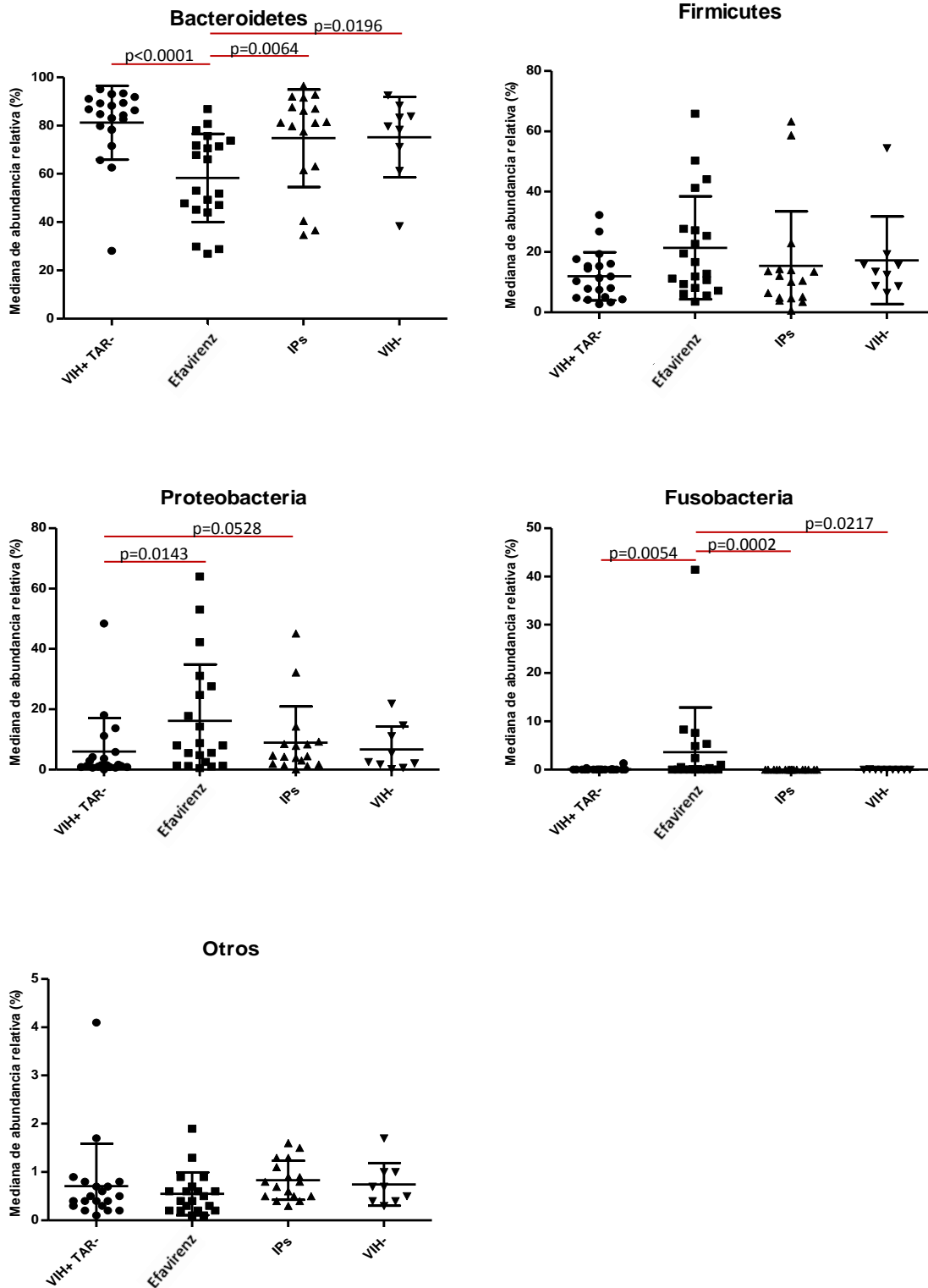


Figura 28. Abundancia de diversos phyla para individuos VIH+ sin TAR, VIH+ con TAR e individuos VIH-. Se muestran cuáles son las variaciones en la mediana de la abundancia relativa en los phyla con abundancia >1%, al comparar los tres grupos de estudio. Se muestran algunas diferencias significativas ($p<0.05$) y una tendencia ($p=0.0528$). La clasificación “otros” corresponde a todos los phyla que contribuyen en menos del 1% y a aquellas secuencias no clasificadas. Se observa la mediana y el rango intercuartil.

Si se analiza a un nivel taxonómico más profundo observamos que todos los cambios significativos observados a nivel familia están asociados al grupo con una terapia basada en Efavirenz. Se observó una disminución significativa de la abundancia en la familia Prevotellaceae al comparar contra el grupo sin TAR ($p=0.0016$) y contra el grupo con una terapia basada en IPs ($p=0.0448$), de la familia Paraprevotellaceae comparando contra el grupo sin TAR ($p=0.0132$) y una tendencia en la familia Lachnospiraceae al comparar contra los individuos VIH- ($p=0.0554$).

De forma análoga, hubo una disminución significativa de la familia Bacteroidaceae al comparar contra el grupo TAR- ($p=0.0330$) y el grupo con IPs ($p=0.0386$), de la familia Veillonellaceae al comparar contra el grupo sin TAR ($p=0.0453$) y el grupo VIH- ($p=0.0251$), y una tendencia al comparar contra el grupo con IPs ($p=0.0568$). Se observó que la familia Fusobacteriaceae, perteneciente al phylum Fusobacteria, se encuentra significativamente más representada en el grupo bajo Efavirenz (vs TAR-, $p=0.0107$; vs IPs, $p=0.0007$ y vs VIH-, $p=0.0351$) (Figura 29).

Con respecto a los cambios en la abundancia relativa a nivel género, los individuos bajo Efavirenz evidencian una disminución de Prevotella perteneciente a la familia Prevotellaceae al comparar contra individuos TAR- ($p=0.0016$) e individuos con IPs ($p=0.0448$). Esta disminución también se observa en el género [Prevotella] perteneciente a la familia Paraprevotellaceae al comparar contra los otros tres grupos de estudio (vs TAR, $p=0.0011$; vs IPs, $p=0.0471$ y vs VIH-, $p=0.0244$). De forma concomitante, se observa un aumento significativo de Bacteroides en los individuos con Efavirenz al comparar contra individuos sin TAR ($p=0.0330$) e individuos con IPs ($p=0.0386$).

Al igual que lo observado a nivel phylum y familia, a nivel género se observa que existe un grupo que se encuentra únicamente representado en los individuos bajo una TAR basada en Efavirenz. Este género es Fusobacterium y si se compara contra los otros grupos se obtienen valores estadísticamente significativos (vs TAR-, $p=0.0107$; vs IPs, $p=0.0007$ y vs VIH-, $p=0.0351$) (Figura 30).

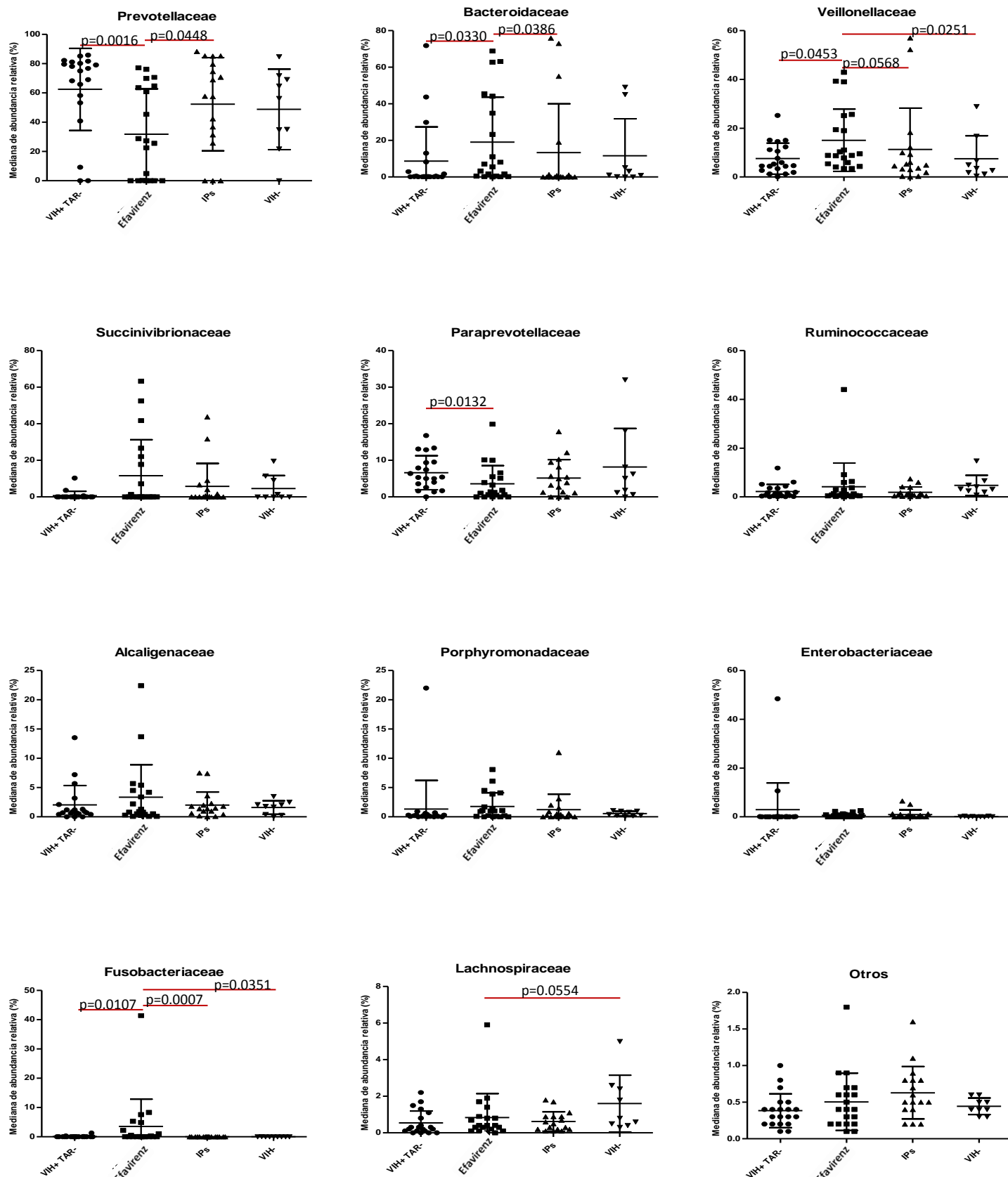


Figura 29. Comparación de abundancia de diversas familias para individuos VIH+ TAR-, TAR+ e individuos VIH-. Se muestran cuáles son las variaciones en la mediana de la abundancia relativa al comparar los tres grupos. Se muestran varias diferencias significativas en el grupo bajo Efavirenz ($p < 0.05$) y dos tendencias, una en la familia Veillonellaceae ($p = 0.0568$) y otra en la familia Lachnospiraceae ($p = 0.0554$). Se observa la mediana y el rango intercuartil.

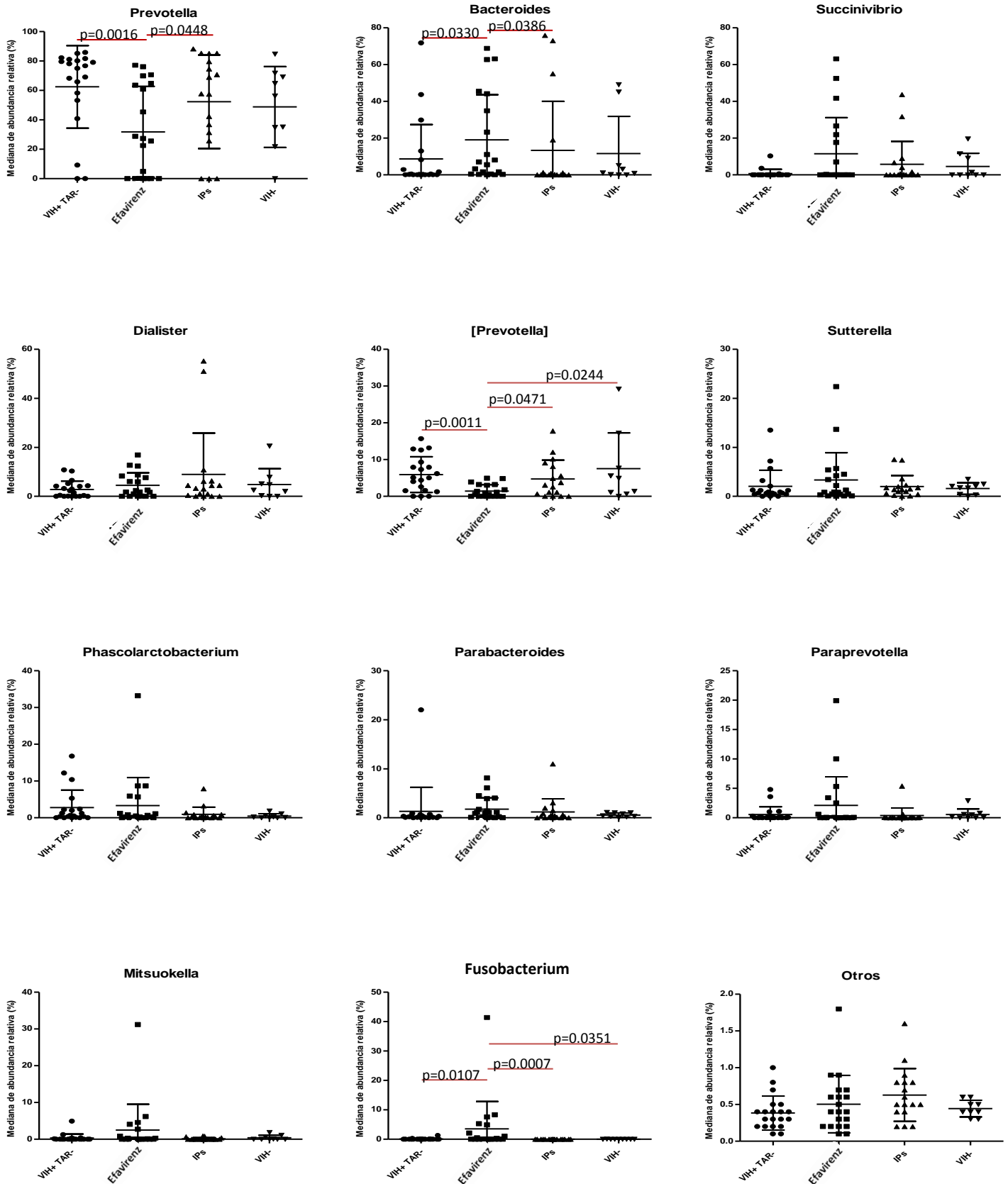


Figura 30. Comparación de abundancia de diversos generos para individuos VIH+ TAR-, TAR+ e individuos VIH-. Se muestran cuáles son las variaciones en la mediana de la abundancia relativa al comparar los tres grupos. Se muestran varias diferencias significativas en el grupo bajo Efavirenz ($p < 0.05$). Se observa la mediana y el rango intercuartil. El grupo Prevotella pertenece a la familia Prevotellaceae y [Prevotella] a la familia Paraprevotellaceae.

3.3. Efecto del control de la infección.

Una vez que se evaluó el efecto que tiene la infección por VIH y el uso de la TAR en los cambios de la microbiota, se quiso evaluar si aquellos individuos que son capaces de mantener bajas cargas virales (<2000 copias de RNA viral/mL) por largos periodos de tiempo (>1 año) sin la necesidad de usar algún tipo de TAR (controladores) presentaban alguna diferencia particular en la composición de su microbiota.

En cuanto a la alfa diversidad, no se encontraron diferencias significativas entre los individuos controladores y el resto de los grupos (Figura 31); sin embargo, se observa que el grupo de controladores, al igual que los dos grupos bajo TAR, tiene valores intermedios de diversidad entre los observados para el grupo infectado sin TAR y el grupo VIH-.

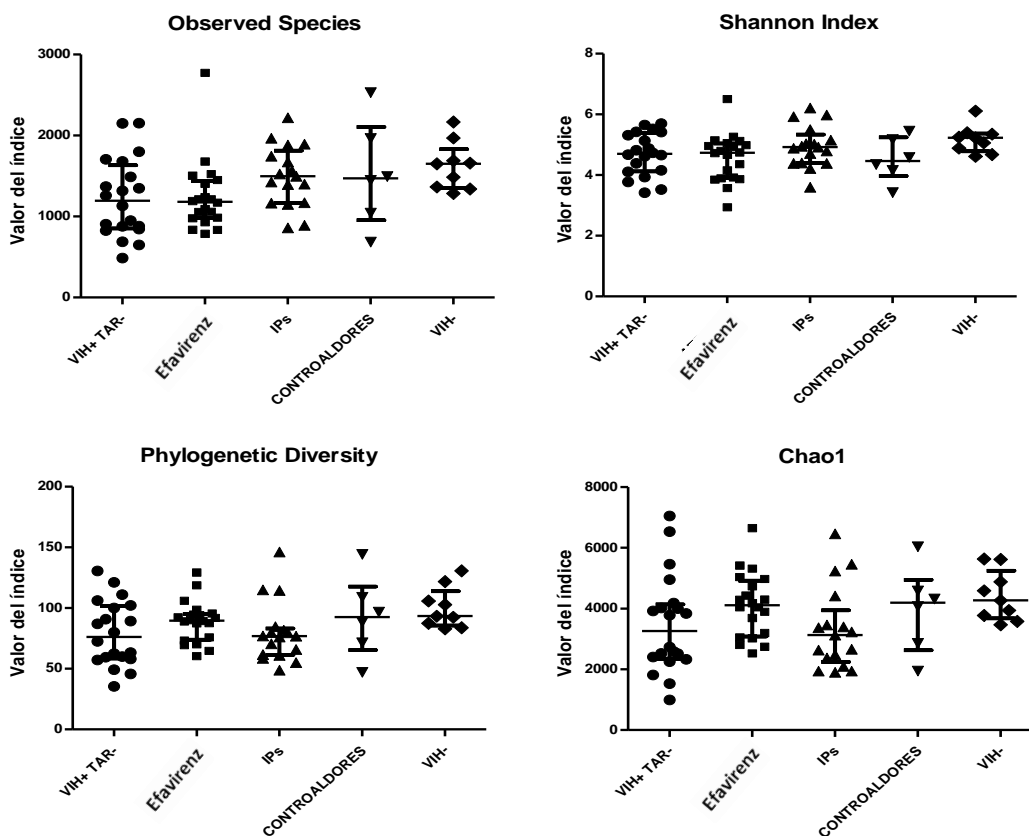


Figura 31. Alfa diversidad para individuos VIH+ sin TAR, VIH+ con TAR, controladores e individuos VIH-. Se observan los valores de alfa diversidad para cada uno de los índices analizados en los individuos pertenecientes a los cinco grupos en estudio. Todos los índices fueron calculados a una profundidad de 49,208 secuencias/muestra (tomadas al azar) para asegurar que en todos los casos se tuvieran suficientes secuencias. No se encontraron diferencias significativas al comparar los diferentes grupos contra los individuos controladores ($p < 0.05$). Se observa la mediana y el rango intercuartil.

La principal diferencia que se encontró en el grupo de controladores a nivel phylum fue en Fusobacteria (Figura 32). Al igual que lo observado en los otros grupos, los controladores presentaron valores prácticamente de cero, y al ser comparados con el grupo bajo Efavirenz presentan una diferencia significativa ($p=0.0002$).

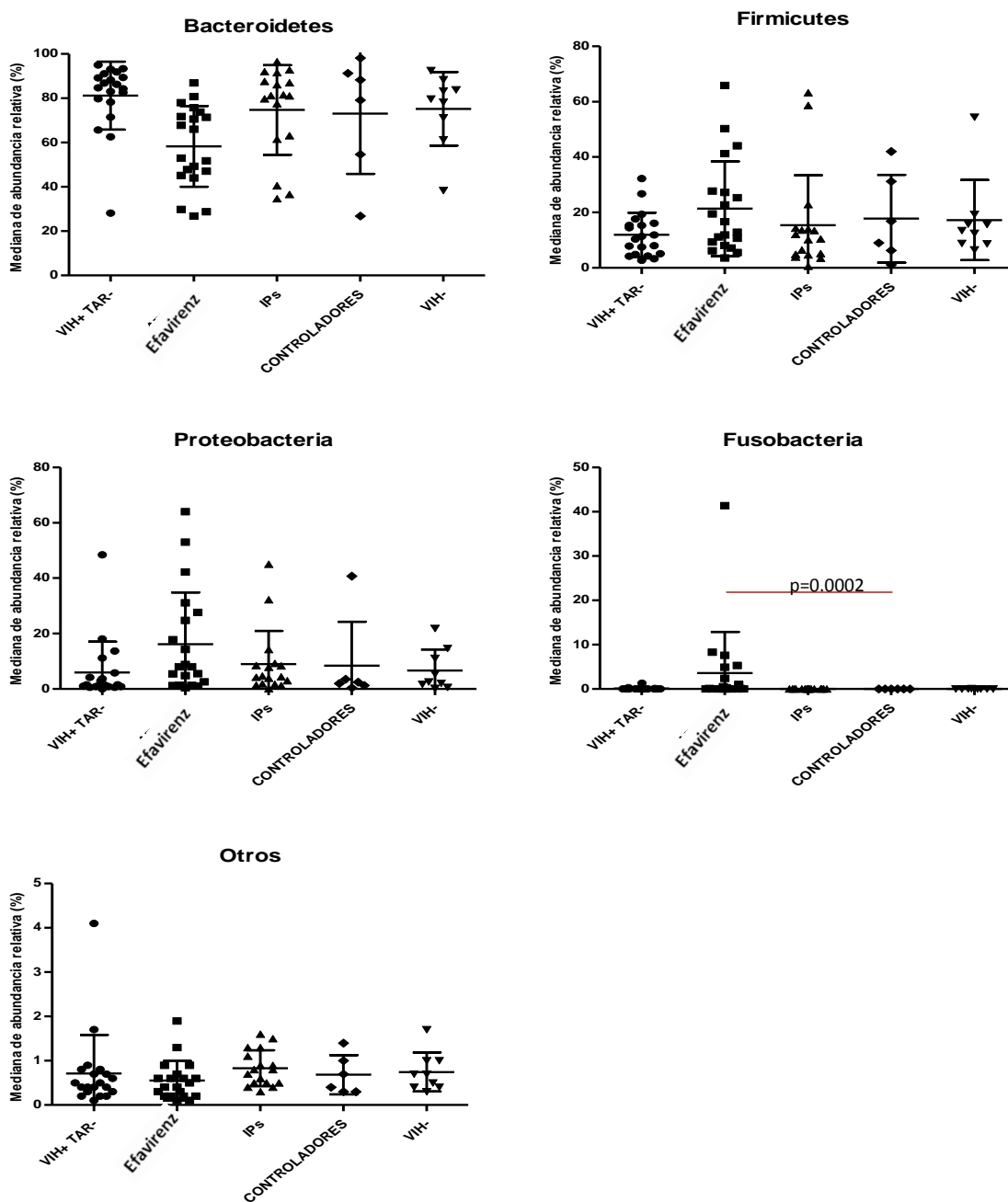


Figura 32. Abundancia de diversos phyla para individuos VIH+ sin TAR, VIH+ con TAR, controladores e individuos VIH-. Se muestran cuáles son las variaciones en la mediana de la abundancia relativa en los phyla con abundancia >1%, al comparar los grupos de estudio. Se observa una disminución significativa de Fusobacteria ($p<0.05$). La clasificación “otros” corresponde a todos los phyla que contribuyen en menos del 1% y a aquellas secuencias no clasificadas. Se observa la mediana y el rango intercuartil.

Al no observar más alteraciones en el resto de los phyla se analizaron los cambios observados en las familias. En este nivel taxonómico se observó nuevamente la diferencia en la familia Fusobacteriaceae al comparar contra los individuos bajo terapia de Efavirenz ($p=0.0007$). Aunado a esto se encontró una disminución significativa de la familia Viellonellaceae al comparar contra el grupo que se encontraba usando Efavirenz ($p=0.0224$). De forma similar la familia Paraprevotellaceae mostró una tendencia a tener valores disminuidos de abundancia al comparar contra el grupo VIH+ sin TAR ($p=0.0552$) (Figura 33).

Finalmente, a nivel género, solamente se observó la disminución en Fusobacterium que se ha venido reportando para el resto de los grupos. La nula aparición de este género en el grupo de controladores arroja un variación estadísticamente significativos al ser comparada con lo abundancia presentada por el grupo tratado con Efavirenz ($p=0.0007$) (Figura 34).

Ningún otro cambio además de los reportados se observó en el resto de phyla, familias o géneros, ni en los valores de alfa diversidad en el grupo de individuos controladores, lo cual podría deberse al reducido número de muestras de este grupo ($n=6$).

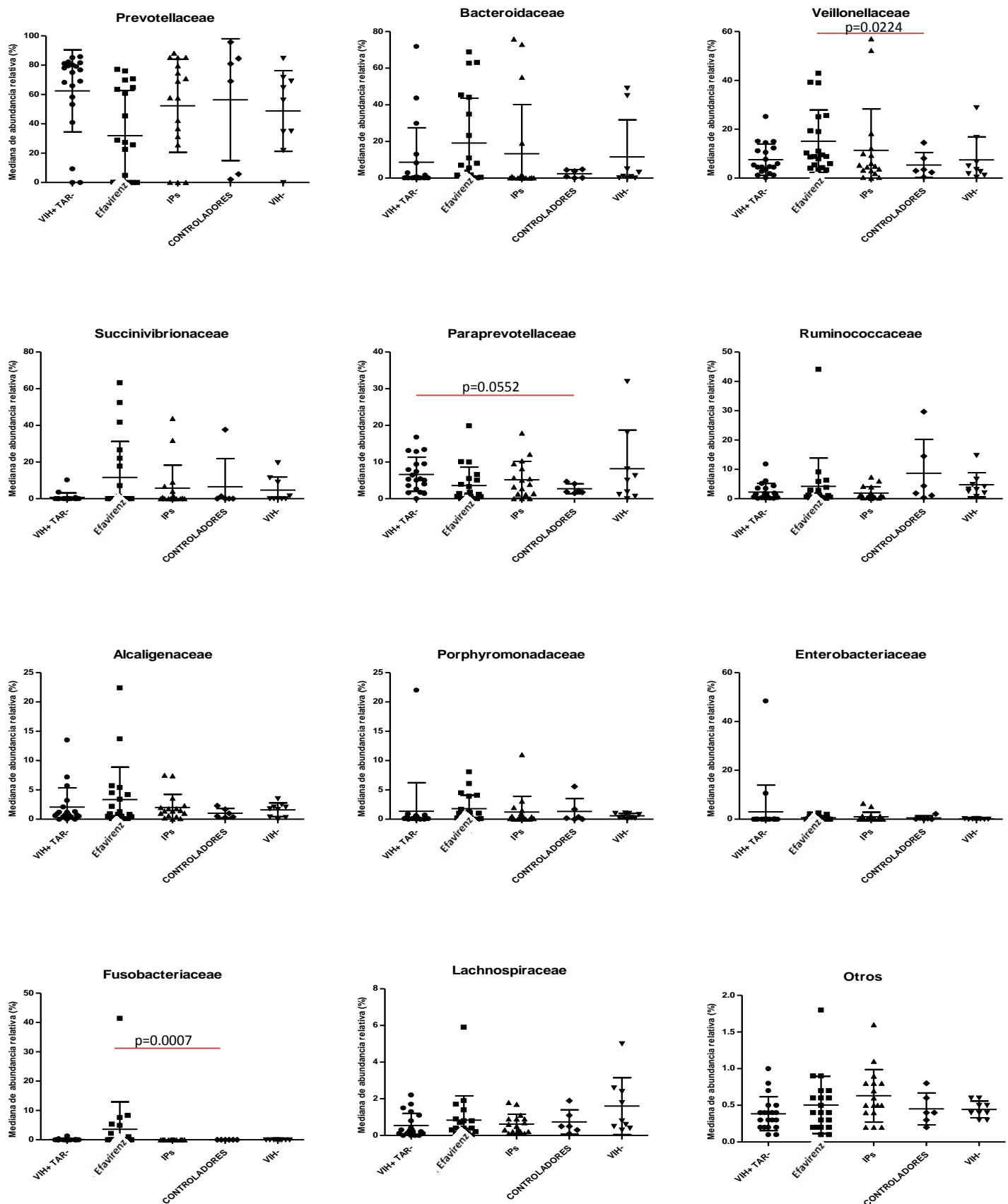


Figura 33. Comparación de abundancia de diversas familias para individuos VIH+ TAR-, TAR+, controladores e individuos VIH-. Se muestran cuáles son las variaciones en la mediana de la abundancia relativa al comparar los grupos. Se muestran disminuciones significativas en el grupo de controladores para Veillonellaceae y Fusobacteriaceae ($p < 0.05$) y una tendencia en Paraprevotellaceae ($p = 0.0552$). Se observa la mediana y el rango intercuartil.

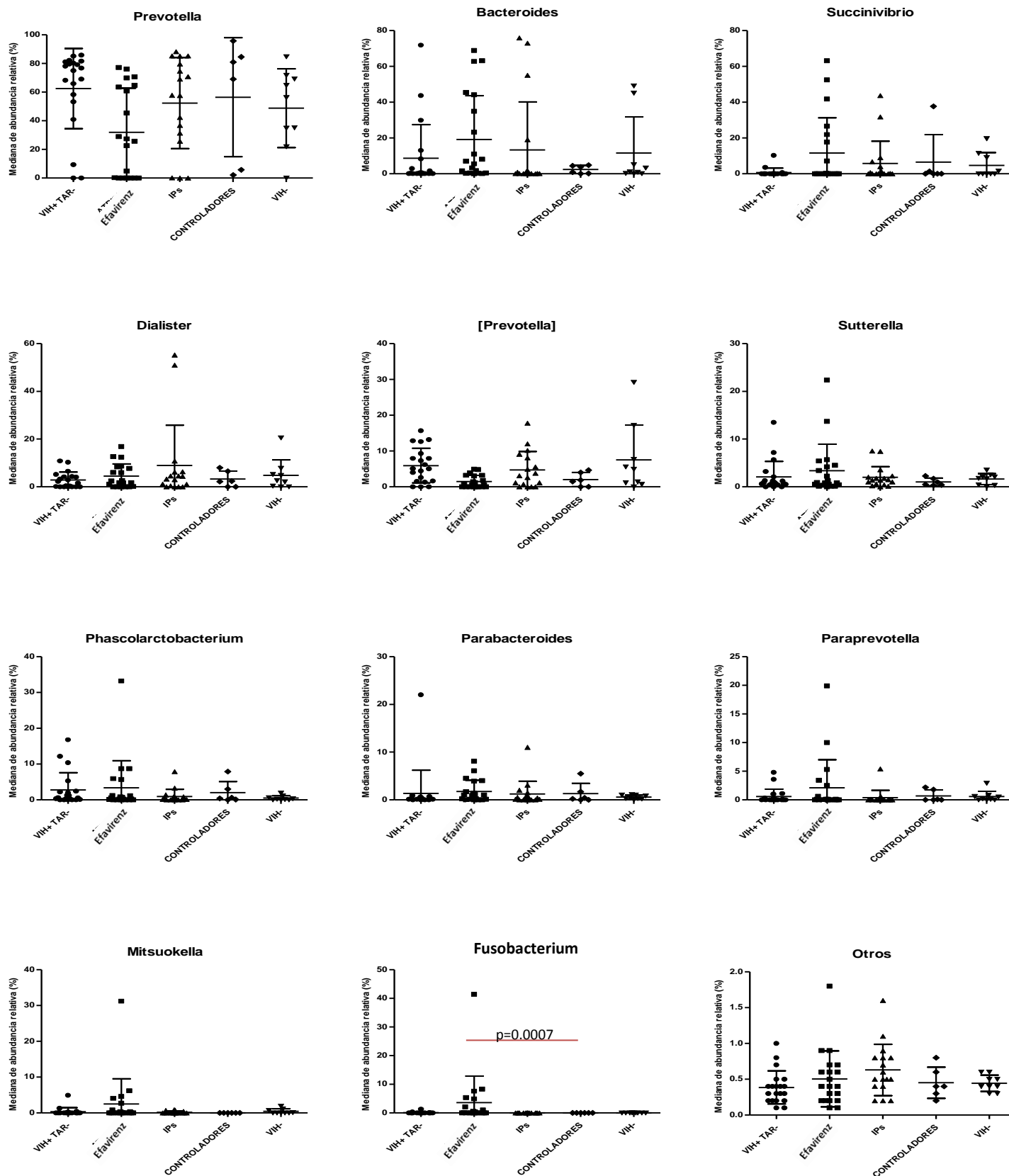


Figura 34. Comparación de abundancia de diversos géneros para individuos VIH+ TAR-, TAR+, controladores e individuos VIH-. Se muestran cuáles son las variaciones en la mediana de la abundancia relativa al comparar los grupos. Se muestran una diferencia significativa en Fusobacterium para el grupo de individuos controladores ($p<0.05$). Se observa la mediana y el rango intercuartil. El grupo Prevotella pertenece a la familia Prevotellaceae y [Prevotella] a la familia Paraprevotellaceae.

3.4. Beta-diversidad.

El último análisis que se realizó fue el de Beta-diversidad, un análisis que permite comparar grupos de muestras dentro de una población. Utilizando los géneros presentes y la abundancia de los mismos en cada uno de los individuos de los distintos grupos (Figura 35) este análisis es capaz de arrojar un gráfico de componentes principales. El gráfico nos permitió observar posibles agrupamientos entre las muestras y su ubicación en el espacio del gráfico evidenció la similitud o diferencia entre cada uno de los individuos.

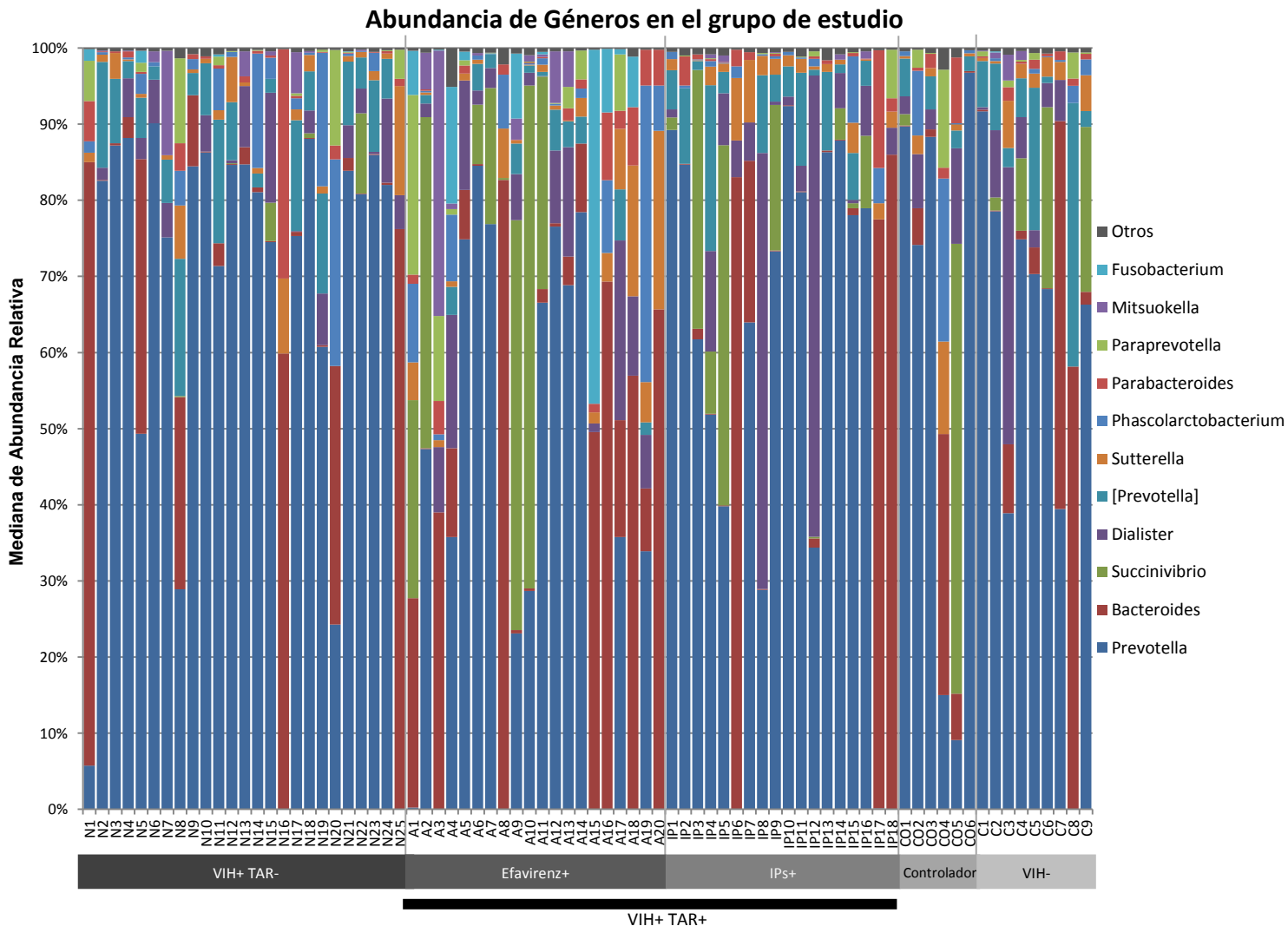


Figura 35. Abundancia de diversos géneros para los individuos del grupo de estudio. Se muestra como varía la presencia de los diversos géneros en cada uno de los individuos pertenecientes a los siguientes grupos: individuos VIH+ TAR- (n=25); individuos VIH+ TAR+, de los cuales, Efavirenz+ (n=20) e IPs+ (n=17); individuos controladores de la infección (n=6) e individuos VIH- (n=9). La clasificación “otros” corresponde a todos los géneros que contribuyen en menos del 1% y a aquellas secuencias no clasificadas.

En la Figura 35 se observa que dentro de cada grupo los individuos pueden llegar a tener cierto grado de variabilidad en la composición de su microbiota. Sin embargo, se puede distinguir que dentro de cada grupo hay algunos géneros más o menos abundantes, permitiendo observar patrones específicos. Cuando estas diferencias son colocadas en un gráfico de Componentes Principales (PC, siglas en inglés) lo que observamos es un gráfico de 3 dimensiones (PC1, PC2 y PC3) en donde cada eje equivaldrá a una serie de factores (géneros) que explican cierto porcentaje de diferencia entre los individuos.

En el gráfico obtenido para las muestras de nuestro grupo de estudio se observa una tendencia de las muestras pertenecientes al grupo de individuos VIH+ TAR- a agruparse entre sí (con respecto a PC 1 y PC2). Este evento no se observa en los restantes cuatro grupos, los cuales, tienden a tener a los individuos repartidos de una forma más difusa a lo largo del gráfico, en particular a lo largo del PC1 (Figura 36). Este gráfico ejemplifica visualmente las diferencias que se observaron entre los individuos infectados sin terapia y el resto de los grupos, en particular los individuos bajo una TAR basada en Efavirenz.

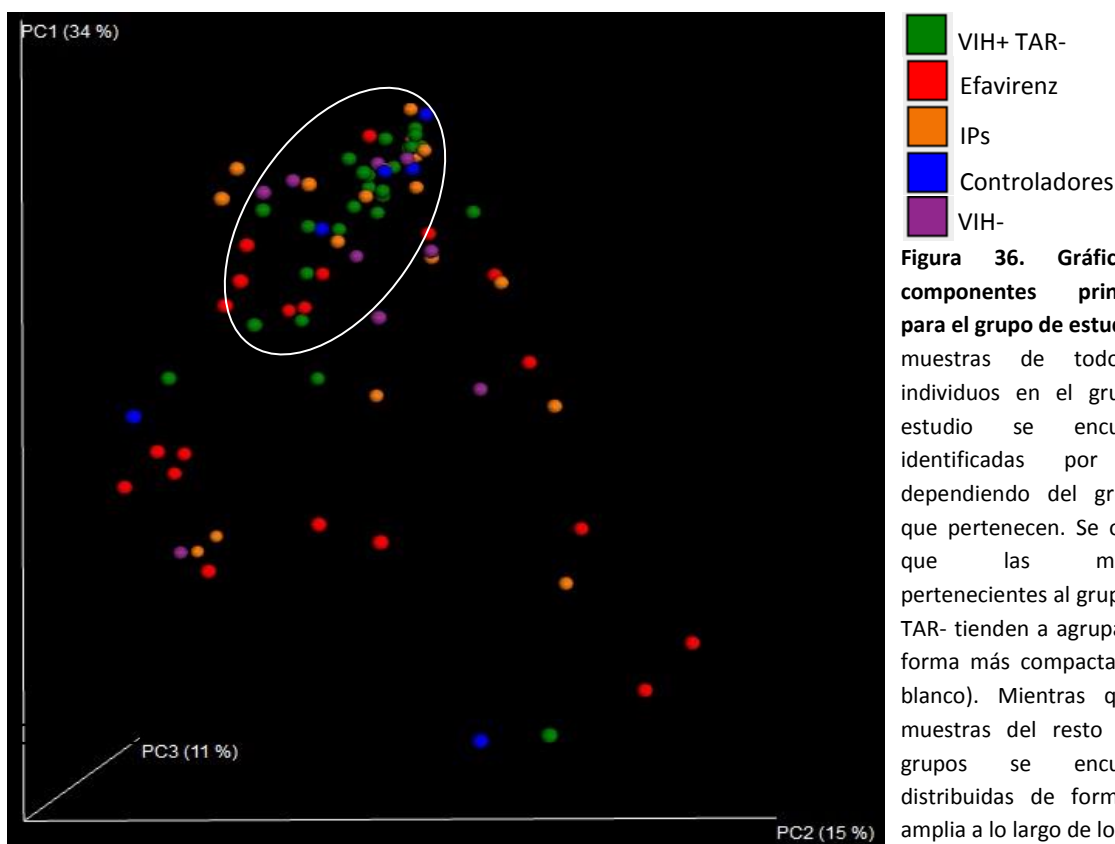
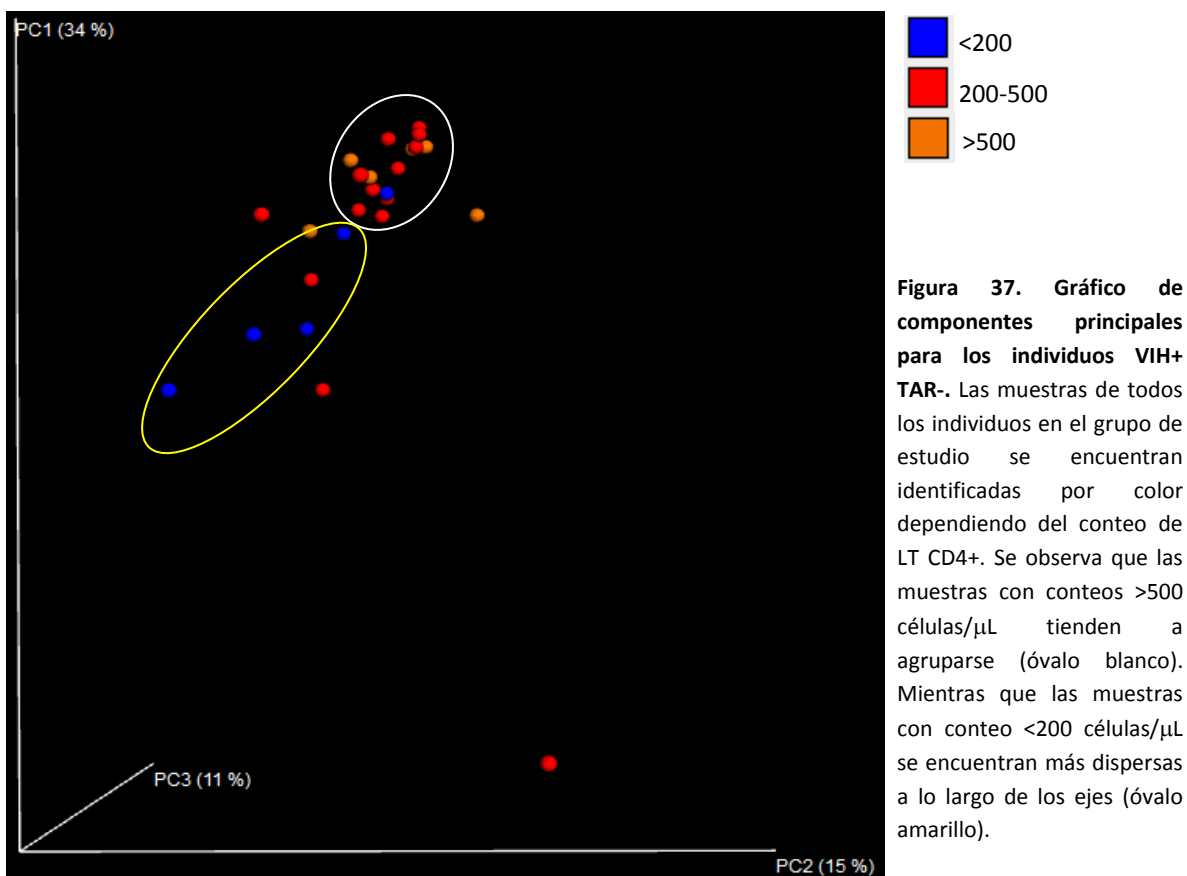


Figura 36. Gráfico de componentes principales para el grupo de estudio. Las muestras de todos los individuos en el grupo de estudio se encuentran identificadas por color dependiendo del grupo al que pertenecen. Se observa que las muestras pertenecientes al grupo VIH+ TAR- tienden a agruparse de forma más compacta (óvalo blanco). Mientras que las muestras del resto de los grupos se encuentran distribuidas de forma más amplia a lo largo de los ejes.

Por último, cuando las muestras pertenecientes a los individuos VIH+ TAR- son identificadas de forma distinta, según el conteo de LT CD4+ de los individuos, observamos que mientras los individuos con conteos por arriba de 200 células/ μ L tienden a estar más compactamente unidas, los individuos con conteos inferiores a 200 células se encuentran más dispersos sobre PC1 y PC2 (Figura 37). De tal forma que estos individuos tienden a tener una composición diferente a la de los que tienen conteos por arriba de 500 células. Esto podría explicar porque al incluir a los cinco individuos con conteos menores a 200 células se pierden algunas de las diferencias estadísticas observadas en las diferentes clasificaciones taxonómicas.



Es importante recordar que sobre todos los resultados analizados en los diferentes apartados de esta tesis se tiene la limitante del número de muestras en dos de los grupos (Controladores, n=6 y VIH-, n=9). Lo cual no nos permite tener el suficiente poder estadístico para observar posibles diferencias, las cuales podrían observarse si se aumentara el número de muestras analizadas.

CAPÍTULO VI. DISCUSIÓN.

A pesar de que existen varias regiones dentro del gen de rRNA 16S que podrían ser utilizadas para caracterizar la microbiota, es necesario estandarizar la técnica para las condiciones del proyecto del que se trate [21, 23]. Para el tipo de metodología (uso de fusion primers), plataforma de secuenciación (Ion PGM) y programa de análisis (QIIME) utilizados en este proyecto, la región V3 fue la que nos permitió obtener una suficiente cantidad de secuencias aún después del filtrado por calidad y tamaño. Esta buena cantidad de secuencias de suficiente tamaño permiten una mejor clasificación taxonómica, observándose en la baja proporción de secuencias no clasificadas (1.0%) y en la obtención de curvas de rarefacción que evidencian que se está viendo prácticamente toda la diversidad de las muestras.

En el grupo de estudio se analizaron diferentes grupos de individuos infectados por el VIH para observar de esta manera como es que la microbiota puede modificarse bajo diversas condiciones. Por primera vez se realizó un estudio analizando de forma separada a individuos que utilizan diferentes esquemas de terapia antirretroviral y a individuos que son capaces de controlar la infección sin el uso de TAR. Es importante recordar la importancia de que los individuos no tuvieran un uso activo de antibióticos pues ha sido observado que este factor altera de importante manera la composición de la microbiota pudiendo enmascarar cambios asociados a los factores estudiados en el proyecto [85]. Hay que recalcar que una de las principales limitantes de este estudio fue el bajo número de muestras de los sujetos VIH- y controladores, debido a la dificultad de reclutar individuos para estos grupos. Será importante considerar este factor dentro de los resultados obtenidos.

El grupo de estudio se encontró principalmente compuesta por varones adultos jóvenes, lo cual era de esperarse debido que en nuestro país la epidemia se encuentra dominada por este grupo [86]. De manera interesante, se observa que entre los grupos no se encontraron diferencias con respecto a la edad ni al índice de masa corporal (IMC). Se ha observado que la microbiota tiende a tener composición diferente conforme la edad cambia [87]. De igual manera, altos IMC reflejan un estado de obesidad, lo cual se ha

relacionado con cambios en la microbiota [38]. Al no observarse diferencias en estas dos variables entre los grupos de estudio se considera que éstos son similares entre sí y los cambios encontrados se pueden asociar principalmente al estatus de infección más que a diferencias entre los datos clínicos de los grupos estudiados. En cuanto a los grupos bajo TAR se observó que no existe diferencia en la duración de la terapia, permitiendo que ambos grupos sean lo más similares posibles, a excepción del tipo de esquema de TAR. De igual manera, es importante mencionar que no existió diferencia entre el tipo de alimentación de los diferentes grupos analizados (cantidad de consumo de carbohidratos, proteínas y grasas), lo cual podría haber actuado como un factor externo que se pudiera asociar a los cambios observados en la microbiota.

Fue evidente que los individuos infectados que no están bajo un esquema de TAR presentan niveles de LT CD4+ más bajos que los individuos no infectados o los controladores. Algunos de estos individuos se encuentran incluso con conteos que los clasifican en fase de SIDA (<200 células/ μ L) y más adelante se observa que pueden estar presentando una composición en la microbiota diferente.

Se esperaba que los individuos infectados que no se encuentran bajo una TAR presentaran cambios al compararlos contra los individuos no infectados. Los cambios en la diversidad y en taxones específicos han sido observados por otros grupos de investigación [67, 70, 75-77, 79]. Sin embargo, al comparar los grupos el único cambio que se observó fue la disminución de la familia Lachnospiraceae en los individuos infectados. Una de las razones por las cuales no se podrían estar observando estos cambios podría ser la presencia de individuos con menos de 200 células CD4+. La mayoría de los individuos con estos conteos han perdido la capacidad de mantener el equilibrio tan particular entre microbiota y sistema inmune, pues la comunicación entre las dos partes ha sido afectada por la masiva pérdida y casi nula presencia de linfocitos CD4+. Esta alteración en el equilibrio permitirá la proliferación de microorganismos que antes se encontraban controlados, aumentando de esta forma la diversidad y la presencia de posibles bacterias patógenas. De esta forma se decidió excluir a estos individuos del análisis.

Al excluir a estos individuos se observó que efectivamente hay una disminución de la diversidad de en la microbiota de los individuos infectados, lo que coincide con lo que ha sido reportado previamente [70, 77]. Por el contrario, Lozupone y cols. [76] reportan un aumento en la diversidad de los individuos infectados; sin embargo, esto podría explicarse debido a que los individuos dentro de nuestro grupo de estudio presentan un conteo de linfocitos CD4+ relativamente alto. De tal manera, se podría especular que antes de la infección los individuos tienen una diversidad considerable y equilibrada, la cual se mantiene en las primeras etapas de la infección pero que va decayendo conforme avanza la disminución de linfocitos CD4+. No obstante, hacia la fase final de la infección, cuando el sistema inmune es incapaz de mantener un equilibrio y la comunicación con la microbiota, existirá un aumento en la diversidad debido a la proliferación de microorganismos que antes se encontraban reprimidos.

Con respecto a alteraciones en taxones particulares, sólo se observó que a la disminución de la familia Lachnospiraceae se agrega la disminución de la familia Ruminococcaceae. La disminución de estas familias coincide con lo observado por McHardy y Dillon [70, 77]. Estas dos familias son las más abundantes del phylum Firmicutes (phylum que comprende del 50% al 80% de la microbiota intestinal humana) [88] y han sido asociadas con la promoción de la salud intestinal a través de la degradación y formación de compuestos que son utilizados como fuente de energía por las células epiteliales [89, 90]. Aunado a esto, una disminución en ambas familias se han asociado a enfermedades que presentan una desregulación del proceso inflamatorio (enfermedad de Crohn y enfermedad inflamatoria del intestino) [91, 92]. De esta manera es claro pensar que la infección por VIH, donde se tiene un gran daño a la barrera epitelial y un fuerte proceso inflamatorio, se puede asociar con el decaimiento de éstas dos familias.

Ahora bien, el resto de las alteraciones que han sido observadas y reportadas previamente por otros grupos de estudio [67, 70, 75-77, 79] y que no se están observando en nuestro grupo de estudio podrían ser explicadas por tres factores. El primero sería las características particulares del grupo de estudio que se está estudiando (e.g., contexto inmunogenético, historial de uso de antibióticos, tipo de alimentación, hábitos de

higiene), lo cual podría estar evidenciando modificaciones particulares de este grupo de individuos. [8, 9, 12, 73, 85]. El segundo podría deberse a las diferencias entre las metodologías de cada proyecto (e.g., muestras fecales o biopsias, región hipervariable amplificada, plataforma de secuenciación utilizada). Y el tercero sería la poca cantidad de muestras presentes en el grupo control (VIH-) lo cual podría disminuir el poder estadístico para encontrar diferencias y presentarse como un sesgo en este grupo.

Con respecto a estudios sobre la terapia antirretroviral, los resultados hasta ahora reportados no hacían distinción entre diferentes esquemas de tratamiento y realizaban los análisis de manera global. De esta forma, aunque se ha reportado que los individuos bajo terapia tienden a presentar valores intermedios de diversidad y de abundancia de algunos taxones entre lo que se observa para individuos sin terapia e individuos no infectados, algunos reportes los encuentran más similares a uno u otro grupo, difiriendo entre sí [72, 76, 77].

En el presente estudio, como se había reportado previamente, se observaron valores intermedios de diversidad al comparar individuos bajo tratamiento antirretroviral con individuos sin terapia e individuos no infectados. No obstante, como se analizaron de forma separada los dos tipos de tratamiento observamos características particulares para cada uno de ellos, teniendo diferencias marcadas y significativas entre sí.

Para el caso de Observed Species, que es un índice de alfa diversidad que presenta resultados sobre el número de géneros presentes (riqueza), observamos que los individuos bajo una terapia con Efavirenz presentan índices menores que los observados en individuos bajo IPs. Lo mismo se observó al revisar el índice de Shannon, el cual no sólo toma en cuenta presencia o ausencia sino también la abundancia relativa (igualdad o uniformidad) [93, 94]. Por otro lado, tenemos los índices PD y Chao1, ambos índices de diversidad para sus cálculos toman en cuenta el número de taxones únicos presentes en cada grupo [95, 96]. Lo que observamos fue que para estos dos índices el grupo bajo Efavirenz presenta mayores valores que el grupo bajo IPs, mostrando que hay un mayor número de géneros únicos o raros presentes en el primer grupo con TAR. De esta forma podríamos mencionar que el grupo bajo Efavirenz muestra una menor cantidad de

géneros (Observed Species) que además, se encuentran distribuidos de una manera no equitativa (Shannon) pues hay ciertos grupos que están altamente favorecidos en detrimento de otros. Aunado a esto podemos mencionar que este grupo también evidencia una mayor cantidad de géneros únicos o raros (Chao 1) y que presentan una mayor diferencia filogenética entre ellos (Phylogenetic Diversity).

De esta manera se puede observar que diferentes índices de diversidad evalúan distintos aspectos sobre la diversidad encontrada en las muestras (e.g., géneros raros, abundancia relativa, presencia o ausencia, riqueza). Sin embargo, lo más importante que se observó fue que distintos tipos de TAR presentarán diversas modificaciones en la microbiota que las harán, en algunos casos, más similares hacia el grupo sin tratamiento y en otros hacia el grupo sin infección. Esto puede explicar por qué en los reportes previos, en los cuales se analizaba de manera global, había equipos que encontraban sus resultados más parecidos hacia uno u otro grupo, y recalca la importancia de analizar de forma separada por tipo de TAR.

En general la microbiota de un individuo adulto sano se ha reportado como principalmente poblada por el phylum Firmicutes (50% - 80%) [88], seguida por Bacteroidetes (20%-40%) y finalmente Proteobacteria (<10%). De manera interesante en nuestro grupo de estudio no observamos esto. Todos los grupos de estudio, incluido el grupo VIH-, presentan altos valores de Bacteroidetes (50% - 80%), seguido por los Firmicutes (10% - 40%) y finalmente Proteobacteria (que en algunos casos llega a ser mayor al 20%). Esto podría explicarse debido a las características particulares de la población. Estudios previos han observado perfiles con altas cantidades de Proteobacteria y Bacteroidetes (en especial el género *Prevotella*) con poblaciones de países que se encuentran en vías de desarrollo (e.g., Ecuador, Bangladesh, países en África) y que por tanto, tienen una alimentación rica en carbohidratos y deficiente en proteína de origen animal, malos hábitos de higiene y un historial de uso no controlado de antibióticos [97-101]. Esto podría ser parte de la explicación de lo que pasa en nuestro grupo de estudio y de los cambios particulares observados y antes mencionados.

Es por esto que llama la atención que dentro de los cambios específicos en los taxones, observados en los individuos tratados, se encuentra una disminución del phylum Bacteroidetes. Dentro de este phylum, particularmente se vio una disminución de la familia Prevotellaceae y Paraprevotellaceae, y dentro de estas familias los géneros Prevotella. Es importante mencionar que este género ha sido asociado como patógeno oportunista bajo condiciones inflamatorias y como productor de compuestos que favorecen procesos como la aterosclerosis [76, 102, 103]. De esta manera, una disminución en su abundancia, asociada a una TAR, podría ser de beneficio para los individuos infectados por VIH, los cuales tienen un fuerte componente inflamatorio. Aunado a esto vemos que dentro del phylum Bacteroidetes, existe la familia Bacteroidaceae y dentro de esta el género Bacteroides; el cual, se encuentra aumentado en los individuos tratados con Efavirenz y coincide con la disminución de Prevotella. Este género juega un papel importante en la comunicación entre la microbiota y el sistema inmune del tracto GI. Existe un polisacárido (polisacárido A o PSA) en su cápsula que favorece el desarrollo de células CD4+ y la diferenciación a linfocitos T reguladores, induciendo una mayor producción de IL10 y por tanto, protección contra enfermedades inflamatorias [104-106]. Es así que el aumento de este género también sería beneficioso para los individuos infectados.

Existen otras familias que se vieron aumentadas en el grupo Efavirenz, como lo es Veillonellaceae que pertenece al phylum Firmicutes, y de los cuales no se han reportado claramente funciones o consecuencias de la alteración en su abundancia. Únicamente se sabe que pueden actuar como patógenos oportunistas. Por tanto sería interesante asociar daño en la barrera epitelial, marcadores de inflamación o alteraciones en el sistema inmunológico del huésped con metabolitos que pudieran estar generando estas familias. Dentro de este grupo también se encuentra la Familia Fusobacteriaceae, la cual pertenece al phylum Fusobacteria e incluye al género Fusobacterium. Este género, de forma muy interesante, sólo se encontró aumentado en los individuos con Efavirenz. Recientemente se ha asociado a este género como un patógeno oportunista que al aumentar su abundancia en procesos de alteración de la composición de la microbiota, favorece la

inflamación. Este género se encuentra aumentado en procesos como la colitis ulcerativa y el cáncer de colon [107, 108].

A pesar de que el grupo de IPs se ha asociado con problemas gastrointestinales en los individuos que los utilizan, las mayores y más dramáticas diferencias observadas en la microbiota fueron asociadas al grupo bajo Efavirenz. Es interesante mencionar que dentro de los 17 individuos bajo IPs solamente 8 reportaron problemas gastrointestinales previos (diarrea) y únicamente 3 reportaron tener presencia de estos problemas en la actualidad con una frecuencia de un evento al mes. De esta manera, se confirma que estos problemas GI en los individuos con IPs podrían estar más asociados al tratamiento en sí que a las alteraciones en la microbiota [109]. Y por el contrario, podría estar sucediendo que por alguna vía los individuos bajo la TAR con Efavirenz pudiera encontrarse favoreciendo a ciertos taxones de manera específica y en detrimento de otros.

Es necesario recordar que estudios como este no han sido realizados con anterioridad y por tanto, no se conocen posibles mecanismos los cuales se podrían asociar con los cambios observados. Aunado a esto, el presente estudio está diseñado de forma transversal, por lo que no se puede hablar de causalidad entre los cambios observados en la microbiota y la TAR. Sin embargo, un posible acercamiento que podría proponerse se basa en las recientes observaciones de mayores niveles de marcadores de inflamación (en particular: proteína C reactiva, IL-6 y CD14s) en los individuos bajo terapia con Efavirenz al compararlos contra otros esquemas de antirretrovirales [110-113]. Este estado de mayor inflamación podría asociarse con un mayor daño y desequilibrio inmunológico en el intestino que a su vez se asocia con una mayor probabilidad de disbiosis [66, 70, 79]. Ahora bien, esta teoría podría verse más reforzada si se hace referencia a los últimos estudios que investigan la relación entre la vía catabólica del triptófano a kinurenina y la infección por VIH. Los reportes observan un círculo vicioso entre aumento de marcadores de inflamación, aumento de la vía antes mencionada y el enriquecimiento con microorganismos que tienen enzimas que favorecen esta vía; todo esto a su vez asociado con la producción de metabolitos tóxicos para las células del hospedero que favorecen la perpetuación del ciclo. Algunos de estos metabolitos producen neurotoxicidad en los

individuos, dando un posible mecanismo biológico que explique las complicaciones neurológicas observadas en los individuos bajo una TAR con Efavirenz [114-116]. Futuros estudios sobre marcadores de inflamación, activación y translocación microbiana serían necesarios para comprobar esta hipótesis.

Por otro lado, no puede desecharse la opción de que podría ser algún producto intermediario derivado del metabolismo de la TAR con Efavirenz el que se encuentre favoreciendo los cambios en la microbiota. No obstante, estudios de metabolómica y de pruebas directas de metabolitos sobre comunidades microbianas específicas deberían ser conducidos para comprobar esta hipótesis.

La falla de la TAR para restaurar la microbiota de los individuos infectados hasta un estado semejante al de los individuos no infectados, evidenciada entre otras cosas por los aún bajos niveles de Lachnospiraceae observados, es consistente con todas las complicaciones de enfermedades gastrointestinales y cardiovasculares observadas en estos individuos [76]. Y es por esto, que será necesario continuar la investigación para lograr restaurar la microbiota al perfil observado en los individuos no infectado y mejorar la calidad de vida de los individuos infectados.

Como último grupo tenemos a los individuos controladores. Dentro de la infección por VIH, este grupo siempre ha sido de gran interés pues descubrir los mecanismos que permiten el control de la infección sería de suma importancia para optimizar estrategias de tratamiento. Se han descrito mecanismos virológicos, genéticos e inmunológicos asociados con el control; sin embargo, estos factores no siempre explican el control, existiendo seguramente otros factores no descritos que influyen en evitar el avance de la infección [117]. Un posible factor adicional que podría estar asociado al control viral podría ser la microbiota. Una microbiota no alterada en estos individuos podría permitir el correcto estímulo de las diferentes células inmunológicas permitiendo su correcta función y abundancia. De igual forma, al tener en suficiente abundancia a las bacterias que estimulan a las células de la barrera epitelial para mantener su estructura permitirá una menor cantidad de translocación y daño, y un menor estímulo que favorece la activación e inflamación crónica. Aunado a esto, la presencia de estas bacterias benéficas permitirá

que aquellas bacterias asociadas a inflamación y daño no proliferen, disminuyendo el proceso inflamatorio y de activación crónica, que finalmente conduce a un estado exhausto del sistema inmunológico.

Interesantemente, los índices de diversidad en individuos controladores mostraron tener valores muy similares a lo observado en los individuos no infectados. Esto podría estar mostrando que la diversidad de la microbiota no se altera significativamente en este grupo de individuos, como sucede con los individuos que progresan normalmente en la enfermedad por VIH. Al observar cambios específicos en los taxones (nivel phylum, familia y género) no se encuentran diferencias al comparar contra el grupo VIH- o contra el grupo infectado sin TAR. Las únicas diferencias significativas que se encuentran son las previamente observadas en Fusobacteria, Fusobacteriaceae y Fusobacterium (taxones que sólo estuvieron presentes en el grupo con Efavirenz). De forma interesante, se observó también una reducción de Veillonellaceae al comparar contra el grupo con Efavirenz. Esto podría estar mostrando que a pesar de que los individuos controladores se encuentran infectados, los cambios en la composición de su microbiota no son tan drásticos como lo observado en individuos infectados no controladores (con o sin TAR). Sin embargo, es de importancia considerar que este grupo incluye a un número pequeño de muestras (n=6), lo cual podría disminuir el poder estadístico para encontrar diferencias entre grupos. De tal forma, que es necesario tomar estos resultados con precaución y continuar el análisis con más muestras y con un seguimiento por más tiempo, para descubrir si efectivamente la microbiota podría ser otro factor contribuyendo en el control de la infección.

Finalmente, al enfocarnos en la Beta- diversidad, observamos que a pesar de que dentro de cada grupo hay cierta variabilidad entre los individuos, existen ciertos patrones que se observan a lo largo de un grupo en específico. Esto fue más evidente para los individuos infectados sin terapia, en donde se ve un agrupamiento de las muestras evidenciando que son más similares entre sí que con el resto de las muestras de los otros grupo. Esto sugiere que la infección crónica temprana por VIH se asocia con un cambio consistente en la microbiota, que tiende a disminuir significativamente la diversidad. Existen algunas excepciones en donde algunos miembros de otros grupos pueden llegar a ser similares a

los VIH+ TAR- y encontrarse cerca del *cluster* de estos últimos. Sin embargo, ningún otro grupo formó un agrupamiento fuerte. Incluso si se estratifican los participantes por conteo de linfocitos T CD4+, observamos que los individuos con conteos por arriba de 500 células tenderán a estar aún más unidos que los que tienen conteos inferiores a 200. Esto confirma lo mencionado con anterioridad donde se observa que el conteo de linfocitos T CD4 podría estar asociado con diferentes cambios en la microbiota.

Aunque es necesario aumentar el número de muestras para confirmar algunos de nuestros hallazgos, el presente estudio apoya la observación de una importante asociación de la infección crónica temprana por el VIH con pérdida de la diversidad de la microbiota y sugiere que el uso de diferentes esquemas de TAR pueden tener distintos efectos en la composición de la microbiota en individuos mexicanos. La identificación de cambios en la abundancia de ciertos grupos taxonómicos, previamente reportados en poblaciones distintas, apoya la idea de que la infección por el VIH se encuentra asociada con modificaciones en la microbiota. Sin embargo, también se observa que podrían existir cambios específicos que puedan estar asociados a ciertas características particulares, como podrían ser el tipo de alimentación o el uso de una TAR específica. Este estudio abre nuevas puertas en torno a la investigación sobre cambios en la microbiota bajo diversas condiciones y recalca la importancia de hacer este tipo de investigación en diferentes grupos de estudio.

La posibilidad de caracterizar las alteraciones observadas en la microbiota podría permitir el desarrollo de terapias complementarias que permitieran mejorar la calidad de vida de los individuos infectados. Algunas posibles aplicaciones de las observaciones de este y los trabajos previos podrían permitir el desarrollo de tratamientos complementarios a la terapia antirretroviral. El uso de probióticos y prebióticos que permitieran favorecer a aquellos taxones que estimulan la regeneración de la barrera epitelial y de células del sistema inmunológico podría ser beneficiosos para disminuir el estado activado e inflamado de los individuos infectados.

De igual manera podrían explorarse otros acercamientos como el trasplante fecal. Este proceso permite cambiar la microbiota alterada por una no alterada al pasarla de un

individuo sano a uno con alteraciones y ha presentado resultados alentadores en la infección por *C. difficile*. Un trasplante fecal podría permitir, en los individuos infectados por VIH, que los taxones que generalmente se encuentran en baja proporción y que ahora se encuentran aumentados, regresen a abundancias bajas y no tengan los efectos dañinos presentan al verse desregulados. Por otro lado, podría pensarse también en una terapia con fagos que permita la eliminación directa de aquellos taxones que favorecen el estado de inflamación crónica.

En general, una búsqueda del aumento de la diversidad y la uniformidad de abundancia, permitiría que la propia competición entre los diversos taxones controlara a aquellos grupos que favorecen el daño y el estado inflamatorio, que finalmente causa el círculo vicioso con el daño, la activación crónica y el agotamiento del sistema inmunológico.

CAPÍTULO VII. CONCLUSIÓN Y PERSPECTIVAS.

1. Conclusión.

En el presente trabajo se logró la estandarización de una técnica de secuenciación masiva, que de manera confiable y accesible permite obtener la composición de la microbiota bacteriana de muestras fecales. Esto permitió a su vez observar que la infección por VIH está relacionada con una disminución de la diversidad microbiana encontrada en las muestras y con cambios (aumento o disminución) en la abundancia relativa de algunos taxones específicos. De igual manera, se encontró que las alteraciones en la microbiota no solamente están asociadas con el status de infección por VIH, sino también, con el uso de la terapia antirretroviral, observándose que diferentes regímenes de tratamiento afectan de forma diferente la composición y diversidad de la microbiota (evento que no había sido reportado previamente). Particularmente, en este estudio se observó que una terapia basada en el uso de Efavirenz está asociada con cambios más dramáticos en la microbiota. Aunado a esto, se observó que la microbiota de individuos que son capaces de controlar la infección sin el uso de terapia antirretroviral por largos periodos de tiempo, un grupo que no se había estudiado con anterioridad presenta características similares a la de individuos no infectados por VIH, lo cual es consistente con un estado inflamatorio menos evidente y alteraciones intestinales más benignas.

El presente estudio es el primero que se realiza en un grupo de pacientes mexicanos, permitiendo comparar lo observado con estudios en otras poblaciones. Se observó que aunque algunos cambios coinciden con reportado previamente, existen cambios específicos que se presentan en el grupo de estudio y que podrían estar relacionadas con el contexto inmunogenético y socio-cultural de la población en sí misma.

Finalmente, al conjuntar los resultados obtenidos se logró obtener una imagen más clara de las variaciones en la microbiota con respecto a la infección por VIH, uso de distintos tipos de TAR y control de la infección en una población con características particulares, observándose que hay cambios tan dramáticos que se mantienen a lo largo de diversas poblaciones y otros que podrían ser particulares de cada población. Las alteraciones

observadas en este estudio podrían estimular el interés en la búsqueda de terapias complementarias a la TAR que pudieran mejorar la calidad de vida de los individuos infectados.

2. Perspectivas.

Existen dos puntos importantes a considerar sobre las perspectivas de este estudio. El primero es el número de muestras y el segundo sería los cambios de la microbiota a lo largo del tiempo.

Como se ha mencionado con anterioridad, en este proyecto nos encontramos con la limitante del número de muestras debido a la dificultad de encontrar individuos en el tiempo estipulado. De esta manera sería importante aumentar el número de muestras, principalmente en los grupos VIH- y controladores. De ser posible sería interesante aumentar en general el número de muestras en todos los grupos analizados y de esta manera ver posibles cambios que se encuentran enmascarados o eliminar posibles resultados espurios.

Por otro lado, es importante recordar que el estudio aquí presentado es un análisis de cambios en la microbiota de forma transversal. Por tanto, sólo se tiene una pequeña parte de la historia global, la cual, sólo nos permite hablar sobre una asociación entre la microbiota y la infección o el uso de TAR pero no nos permitiría hablar sobre causalidad de los eventos. Sería interesante poder realizar un estudio longitudinal de los individuos desde una infección temprana o antes del uso de la terapia antirretroviral, continuar el seguimiento al inicio de la terapia y seguirlo varios años después. De esta forma podríamos hacer asociaciones de qué evento es el que está teniendo un efecto de modificación sobre el otro y de qué forma específica. De igual manera, se podría observar cómo van evolucionando los cambios en la microbiota, como algunos taxones van disminuyendo incluso hasta desaparecer y como otros se van enriqueciendo hasta dominar en la comunidad.

Como un punto extra, sería interesante realizar estudios celulares, de marcadores de inflamación y activación y de transcriptómica. De esta forma sería posible conocer no solamente qué microorganismos se están modificando, sino también, qué efectos específicos podría tener esto cambios en el hospedero. Podría explicarse cómo estos cambios modifican patrones metabólicos y cómo esto a su vez modifica a las poblaciones microbianas. Explicando de una forma más específica y certera la comunicación que hay entre hospedero y huésped.

Finalmente, la realización de este tipo de estudios en otras poblaciones de microorganismos sería importante, debido a los recientes estudios que han observado la comunicación entre estas. Observar cambios en la composición de virus, hongos y parásitos podría ayudarnos a explicar el favorecimiento de ciertas bacterias o su decremento. E incluso, cómo podría existir sinergia o potenciación de alguno de estos procesos en la microbiota bacteriana.

CAPÍTULO VIII. LITERATURA CITADA

1. Pflughoeft, K.J. and J. Versalovic, *Human microbiome in health and disease*. Annu Rev Pathol, 2012. **7**: p. 99-122.
2. Hooper, L.V., D.R. Littman, and A.J. Macpherson, *Interactions between the microbiota and the immune system*. Science, 2012. **336**(6086): p. 1268-73.
3. Zoetendal, E.G. and W.M. de Vos, *Effect of diet on the intestinal microbiota and its activity*. Curr Opin Gastroenterol, 2014. **30**(2): p. 189-95.
4. Joyce, S.A. and C.G. Gahan, *The gut microbiota and the metabolic health of the host*. Curr Opin Gastroenterol, 2014. **30**(2): p. 120-7.
5. Spor, A., O. Koren, and R. Ley, *Unravelling the effects of the environment and host genotype on the gut microbiome*. Nat Rev Microbiol, 2011. **9**(4): p. 279-90.
6. Surana, N.K. and D.L. Kasper, *Deciphering the tete-a-tete between the microbiota and the immune system*. J Clin Invest, 2014. **124**(10): p. 4197-203.
7. Wardwell, L.H., C. Huttenhower, and W.S. Garrett, *Current concepts of the intestinal microbiota and the pathogenesis of infection*. Curr Infect Dis Rep, 2011. **13**(1): p. 28-34.
8. David, L.A., et al., *Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome*. Nature, 2014. **505**(7484): p. 559-63.
9. Lozupone, C.A., et al., *Meta-analyses of studies of the human microbiota*. Genome Res, 2013. **23**(10): p. 1704-14.
10. Willing, B.P., N. Gill, and B.B. Finlay, *The role of the immune system in regulating the microbiota*. Gut Microbes, 2010. **1**(4): p. 213-223.
11. Round, J.L. and S.K. Mazmanian, *The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease*. Nat Rev Immunol, 2009. **9**(5): p. 313-23.
12. Reid, G., et al., *Harnessing microbiome and probiotic research in sub-Saharan Africa: recommendations from an African workshop*. Microbiome, 2014. **2**: p. 12.
13. Fujimura, K.E., et al., *Role of the gut microbiota in defining human health*. Expert Rev Anti Infect Ther, 2010. **8**(4): p. 435-54.
14. Huse, S.M., et al., *A core human microbiome as viewed through 16S rRNA sequence clusters*. PLoS One, 2012. **7**(6): p. e34242.
15. Knights, D., et al., *Human-associated microbial signatures: examining their predictive value*. Cell Host Microbe, 2011. **10**(4): p. 292-6.

16. Bengmark, S., *Gut microbiota, immune development and function*. Pharmacol Res, 2013. **69**(1): p. 87-113.
17. Weinstock, G.M., *Genomic approaches to studying the human microbiota*. Nature, 2012. **489**(7415): p. 250-6.
18. Brocchieri, L., *Phylogenetic inferences from molecular sequences: review and critique*. Theor Popul Biol, 2001. **59**(1): p. 27-40.
19. Eckburg, P.B., et al., *Diversity of the human intestinal microbial flora*. Science, 2005. **308**(5728): p. 1635-8.
20. Baker, G.C., J.J. Smith, and D.A. Cowan, *Review and re-analysis of domain-specific 16S primers*. J Microbiol Methods, 2003. **55**(3): p. 541-55.
21. Wang, Y. and P.Y. Qian, *Conservative fragments in bacterial 16S rRNA genes and primer design for 16S ribosomal DNA amplicons in metagenomic studies*. PLoS One, 2009. **4**(10): p. e7401.
22. Reigstad, C.S. and P.C. Kashyap, *Beyond phylotyping: understanding the impact of gut microbiota on host biology*. Neurogastroenterol Motil, 2013. **25**(5): p. 358-72.
23. Chakravorty, S., et al., *A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria*. J Microbiol Methods, 2007. **69**(2): p. 330-9.
24. Junemann, S., et al., *Bacterial community shift in treated periodontitis patients revealed by ion torrent 16S rRNA gene amplicon sequencing*. PLoS One, 2012. **7**(8): p. e41606.
25. Gibello, A., Blanco, M.M., Domínguez, L., Fernández-Garayzábal, J.F., *Utilización de la PCR para el diagnóstico en Ictiopatología*, in *AquaTIC2001*:
26. Fraher, M.H., P.W. O'Toole, and E.M. Quigley, *Techniques used to characterize the gut microbiota: a guide for the clinician*. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2012. **9**(6): p. 312-22.
27. Rodríguez-Santiago, B., Armengol, L., *Tecnologías de secuenciación de nueva generación en diagnóstico pre- y posnatal*. Diagn Prenat, 2012. **47**: p. 11.
28. Cole, J.R., et al., *The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis*. Nucleic Acids Res, 2009. **37**(Database issue): p. D141-5.
29. Gill, S.R., et al., *Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome*. Science, 2006. **312**(5778): p. 1355-9.
30. Hill, D.A. and D. Artis, *Intestinal bacteria and the regulation of immune cell homeostasis*. Annu Rev Immunol, 2010. **28**: p. 623-67.

31. Lozupone, C.A., et al., *Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota*. Nature, 2012. **489**(7415): p. 220-30.
32. Wen, L., et al., *Innate immunity and intestinal microbiota in the development of Type 1 diabetes*. Nature, 2008. **455**(7216): p. 1109-13.
33. Scher, J.U. and S.B. Abramson, *The microbiome and rheumatoid arthritis*. Nat Rev Rheumatol, 2011. **7**(10): p. 569-78.
34. Peterson, D.A., et al., *Metagenomic approaches for defining the pathogenesis of inflammatory bowel diseases*. Cell Host Microbe, 2008. **3**(6): p. 417-27.
35. Manichanh, C., et al., *Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach*. Gut, 2006. **55**(2): p. 205-11.
36. Hildebrandt, M.A., et al., *High-fat diet determines the composition of the murine gut microbiome independently of obesity*. Gastroenterology, 2009. **137**(5): p. 1716-24 e1-2.
37. Tremaroli, V. and F. Backhed, *Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism*. Nature, 2012. **489**(7415): p. 242-9.
38. Harris, K., et al., *Is the gut microbiota a new factor contributing to obesity and its metabolic disorders?* J Obes, 2012. **2012**: p. 879151.
39. Hevia, A., et al., *Intestinal dysbiosis associated with systemic lupus erythematosus*. MBio, 2014. **5**(5): p. e01548-14.
40. Gori, A., et al., *Specific prebiotics modulate gut microbiota and immune activation in HAART-naive HIV-infected adults: results of the "COPA" pilot randomized trial*. Mucosal Immunol, 2011. **4**(5): p. 554-63.
41. Cammarota, G., et al., *Gut microbiota modulation: probiotics, antibiotics or fecal microbiota transplantation?* Intern Emerg Med, 2014. **9**(4): p. 365-73.
42. Petrof, E.O., et al., *Stool substitute transplant therapy for the eradication of Clostridium difficile infection: 'RePOOPulating' the gut*. Microbiome, 2013. **1**(1): p. 3.
43. Collini, P.J., E. Kuijper, and D.H. Dockrell, *Clostridium difficile infection in patients with HIV/AIDS*. Curr HIV/AIDS Rep, 2013. **10**(3): p. 273-82.
44. Kinross, J.M., A.W. Darzi, and J.K. Nicholson, *Gut microbiome-host interactions in health and disease*. Genome Med, 2011. **3**(3): p. 14.
45. Reyes-Terán, G., et al., *Treinta años del VIH-SIDA: perspectivas desde México*. 2011: Centro de Investigación en Enfermedades Infecciosas. 1-146.

46. Freed, E.O., and Martin, M.A., *HIVs and their replication*, in *Fields Virology* 2007: Philadelphia. p. 2108-2183.
47. AVERT *History of AIDS up to 1986*. 2011.
48. CENSIDA, *EL VIH/SIDA en México 2011: Numeralia Epidemiológica.* , 2011: México.
49. InfoMed *Resumen mundial de la epidemia de VIH/SIDA 2014*. 2011.
50. Kaiser *The HIV/AIDS epidemic in Mexico*. 2008.
51. CENSIDA, *Vigilancia epidemiológica de casos de VIH/SIDA en México*, 2011: México.
52. WHO *Antiretroviral therapy*. 2012.
53. Gómez-Carrillo, M., Salomon, H., Pand, M.A., Kijak, G., Avila, M.M., *Distribución de subtipos y recombinantes del HIV situación en la Argentina*, in *Medicina* 2001: Argentina. p. 881-889.
54. Córdoba-Villalobos, J.A., P.d.L.R.S., Valdespino, J.L., *25 años de SIDA en México. Logros, desaciertos y retos*. 2nd ed 2009, México: Instituto Nacional de Salud Pública.
55. Freed, E.O., *HIV-1 Gag proteins: Diverse functions in the virus life cycle*, in *Virology* 1998. p. 1-15.
56. Fauci, A.S., Kasper, D.L., Braunvald, E., Hauser, S.L., Longo, D.L., Jameson, J.L., Loscalzo, J., *Harrison principios de medicina interna*. 17th ed 2006.
57. Kuritzkes, D.R., Walker, B.d., *HIV-1 pathogenesis, clinical manifestations and treatment*. Vol. II. 2007, Philadelphia: Knipe DM.
58. Abbas, A.K., Lichtman, A.H., Pillai, S., *Cellular and molecular immunology*. Vol. 6. 2011: Elsevier.
59. Overbaugh, J. and L. Morris, *The Antibody Response against HIV-1*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2012. **2**(1): p. a007039.
60. Kinnebrew, M.A. and E.G. Pamer, *Innate immune signaling in defense against intestinal microbes*. Immunol Rev, 2012. **245**(1): p. 113-31.
61. Cecchinato, V., et al., *Altered balance between Th17 and Th1 cells at mucosal sites predicts AIDS progression in simian immunodeficiency virus-infected macaques*. Mucosal Immunol, 2008. **1**(4): p. 279-88.
62. Ancuta, P., et al., *Microbial translocation is associated with increased monocyte activation and dementia in AIDS patients*. PLoS One, 2008. **3**(6): p. e2516.
63. George, M.D., *A Potential Role for Host-Microbe Dysbiosis in Enteropathy Associated with HIV Infection*. J Immunodeficient Disor, 2012. **1**(2).

64. Douek, D., *HIV disease progression: immune activation, microbes, and a leaky gut*. *Top HIV Med*, 2007. **15**(4): p. 114-7.
65. Jiang, W., et al., *Plasma levels of bacterial DNA correlate with immune activation and the magnitude of immune restoration in persons with antiretroviral-treated HIV infection*. *J Infect Dis*, 2009. **199**(8): p. 1177-85.
66. Klatt, N.R., N.T. Funderburg, and J.M. Brechley, *Microbial translocation, immune activation, and HIV disease*. *Trends Microbiol*, 2013. **21**(1): p. 6-13.
67. Ellis, C.L., et al., *Molecular characterization of stool microbiota in HIV-infected subjects by panbacterial and order-level 16S ribosomal DNA (rDNA) quantification and correlations with immune activation*. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 2011. **57**(5): p. 363-70.
68. Klatt, N.R., et al., *Immune activation and HIV persistence: implications for curative approaches to HIV infection*. *Immunol Rev*, 2013. **254**(1): p. 326-42.
69. Ferri, E., et al., *Plasma levels of bacterial DNA in HIV infection: the limits of quantitative polymerase chain reaction*. *J Infect Dis*, 2010. **202**(1): p. 176-7; author reply 178.
70. Dillon, S.M., et al., *An altered intestinal mucosal microbiome in HIV-1 infection is associated with mucosal and systemic immune activation and endotoxemia*. *Mucosal Immunol*, 2014. **7**(4): p. 983-94.
71. Perez-Santiago, J., et al., *Gut Lactobacillales are associated with higher CD4 and less microbial translocation during HIV infection*. *AIDS*, 2013. **27**(12): p. 1921-31.
72. Mutlu, E.A., et al., *A compositional look at the human gastrointestinal microbiome and immune activation parameters in HIV infected subjects*. *PLoS Pathog*, 2014. **10**(2): p. e1003829.
73. Abdurahman, S., et al., *Pattern of microbial translocation in patients living with HIV-1 from Vietnam, Ethiopia and Sweden*. *J Int AIDS Soc*, 2014. **17**: p. 18841.
74. Sandler, N.G., et al., *Plasma levels of soluble CD14 independently predict mortality in HIV infection*. *J Infect Dis*, 2011. **203**(6): p. 780-90.
75. Gori, A., et al., *Early impairment of gut function and gut flora supporting a role for alteration of gastrointestinal mucosa in human immunodeficiency virus pathogenesis*. *J Clin Microbiol*, 2008. **46**(2): p. 757-8.
76. Lozupone, C.A., et al., *Alterations in the gut microbiota associated with HIV-1 infection*. *Cell Host Microbe*, 2013. **14**(3): p. 329-39.

77. McHardy, I.H., et al., *HIV Infection is associated with compositional and functional shifts in the rectal mucosal microbiota*. *Microbiome*, 2013. **1**(1): p. 26.
78. Imai, K., Ochiai, K., *Effect of microbial coinfection with HIV-1 and butyric acid-producing anaerobic bacteria on AIDS progression*. *J Oral Biosc*, 2013. **55**: p. 55-60.
79. Vujkovic-Cvijin, I., et al., *Dysbiosis of the gut microbiota is associated with HIV disease progression and tryptophan catabolism*. *Sci Transl Med*, 2013. **5**(193): p. 193ra91.
80. Dandekar, S., *Pathogenesis of HIV in the gastrointestinal tract*. *Curr HIV/AIDS Rep*, 2007. **4**(1): p. 10-5.
81. Lackner, A.A., M. Mohan, and R.S. Veazey, *The gastrointestinal tract and AIDS pathogenesis*. *Gastroenterology*, 2009. **136**(6): p. 1965-78.
82. Torres, B., et al., *Protease inhibitor monotherapy is associated with a higher level of monocyte activation, bacterial translocation and inflammation*. *J Int AIDS Soc*, 2014. **17**: p. 19246.
83. Deeks, S.G. and B.D. Walker, *Human immunodeficiency virus controllers: mechanisms of durable virus control in the absence of antiretroviral therapy*. *Immunity*, 2007. **27**(3): p. 406-16.
84. Nossa, C.W., et al., *Design of 16S rRNA gene primers for 454 pyrosequencing of the human foregut microbiome*. *World J Gastroenterol*, 2010. **16**(33): p. 4135-44.
85. Panda, S., et al., *Short-term effect of antibiotics on human gut microbiota*. *PLoS One*, 2014. **9**(4): p. e95476.
86. CENSIDA. *El VIH/SIDA en México 2011 Numeralia epidemiológica*. 2011; Available from: http://www.censida.salud.gob.mx/descargas/2011/NUMERALIA_SIDA_2011.pdf.
87. Hopkins, M.J., R. Sharp, and G.T. Macfarlane, *Variation in human intestinal microbiota with age*. *Dig Liver Dis*, 2002. **34 Suppl 2**: p. S12-8.
88. Jalanka-Tuovinen, J., et al., *Intestinal microbiota in healthy adults: temporal analysis reveals individual and common core and relation to intestinal symptoms*. *PLoS One*, 2011. **6**(7): p. e23035.
89. Biddle, A.S., L.; Blanchard, J.; Leschine, S., *Untangling the genetic basis of fibrolytic specialization by Lachnospiraceae and Ruminococcaceae in diverse gut communities*. *Diversity*, 2013. **5**(3): p. 627-640.

90. Meehan, C.J. and R.G. Beiko, *A phylogenomic view of ecological specialization in the Lachnospiraceae, a family of digestive tract-associated bacteria*. *Genome Biol Evol*, 2014. **6**(3): p. 703-13.
91. Frank, D.N., et al., *Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. **104**(34): p. 13780-5.
92. Fujimoto, T., et al., *Decreased abundance of Faecalibacterium prausnitzii in the gut microbiota of Crohn's disease*. *J Gastroenterol Hepatol*, 2013. **28**(4): p. 613-9.
93. Gotelli, N.J.C., R. K., *Quantifying biodiversity: procedures and pitfalls in the measurement and comparison of species richness*. *Ecology letters*, 2001. **4**(4): p. 379-391.
94. Gotelli, N.J., *A primer of ecology*2008, Sunderland, Massachusetts, USA.: Sinauer Associates, Inc. 290.
95. Faith, D.P., *Conservation evaluation and phylogenetic diversity*. *Biological Conservation*, 1992. **61**(1): p. 1-10.
96. Chao, A., *Nonparametric estimation of the number of classes in a population*. *Scandinavian Journal of statistics*, 1984. **11**(4): p. 265-270.
97. De Filippo, C., et al., *Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. **107**(33): p. 14691-6.
98. Cooper, P., et al., *Patent human infections with the whipworm, Trichuris trichiura, are not associated with alterations in the faecal microbiota*. *PLoS One*, 2013. **8**(10): p. e76573.
99. Lin, A., et al., *Distinct distal gut microbiome diversity and composition in healthy children from Bangladesh and the United States*. *PLoS One*, 2013. **8**(1): p. e53838.
100. Wu, G.D., et al., *Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes*. *Science*, 2011. **334**(6052): p. 105-8.
101. Ellis, R.J., et al., *Comparison of the distal gut microbiota from people and animals in Africa*. *PLoS One*, 2013. **8**(1): p. e54783.
102. Tanaka, S., et al., *The relationship of Prevotella intermedia, Prevotella nigrescens and Prevotella melaninogenica in the supragingival plaque of children, caries and oral malodor*. *J Clin Pediatr Dent*, 2008. **32**(3): p. 195-200.
103. Scher, J.U., et al., *Expansion of intestinal Prevotella copri correlates with enhanced susceptibility to arthritis*. *Elife*, 2013. **2**: p. e01202.

104. Mazmanian, S.K., et al., *An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system*. Cell, 2005. **122**(1): p. 107-18.
105. Round, J.L. and S.K. Mazmanian, *Inducible Foxp3+ regulatory T-cell development by a commensal bacterium of the intestinal microbiota*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(27): p. 12204-9.
106. Mazmanian, S.K., J.L. Round, and D.L. Kasper, *A microbial symbiosis factor prevents intestinal inflammatory disease*. Nature, 2008. **453**(7195): p. 620-5.
107. Aliyu, S.H., et al., *Real-time PCR investigation into the importance of Fusobacterium necrophorum as a cause of acute pharyngitis in general practice*. J Med Microbiol, 2004. **53**(Pt 10): p. 1029-35.
108. Park, A. *A Surprising Link Between Bacteria and Colon Cancer*. 2011; Available from: <http://healthland.time.com/2011/10/18/a-surprising-link-between-bacteria-and-colon-cancer/?iid=pf-main-mostpop1>.
109. Hill, A. and A. Balkin, *Risk factors for gastrointestinal adverse events in HIV treated and untreated patients*. AIDS Rev, 2009. **11**(1): p. 30-8.
110. McComsey, G.A., et al., *Inflammation markers after randomization to abacavir/lamivudine or tenofovir/emtricitabine with efavirenz or atazanavir/ritonavir*. AIDS, 2012. **26**(11): p. 1371-85.
111. Gupta, S.K., et al., *Worsening endothelial function with efavirenz compared to protease inhibitors: a 12-month prospective study*. PLoS One, 2012. **7**(9): p. e45716.
112. Shikuma, C.M., et al., *Change in high-sensitivity c-reactive protein levels following initiation of efavirenz-based antiretroviral regimens in HIV-infected individuals*. AIDS Res Hum Retroviruses, 2011. **27**(5): p. 461-8.
113. Gallego-Escuredo, J.M., et al., *Differential effects of efavirenz and lopinavir/ritonavir on human adipocyte differentiation, gene expression and release of adipokines and pro-inflammatory cytokines*. Curr HIV Res, 2010. **8**(7): p. 545-53.
114. Martinez, P., et al., *Reversal of the Kynurenine pathway of tryptophan catabolism may improve depression in ART-treated HIV-infected Ugandans*. J Acquir Immune Defic Syndr, 2014. **65**(4): p. 456-62.
115. Byakwaga, H., et al., *The kynurenine pathway of tryptophan catabolism, CD4+ T-cell recovery, and mortality among HIV-infected Ugandans initiating antiretroviral therapy*. J Infect Dis, 2014. **210**(3): p. 383-91.

116. Favre, D., et al., *Tryptophan catabolism by indoleamine 2,3-dioxygenase 1 alters the balance of TH17 to regulatory T cells in HIV disease*. *Sci Transl Med*, 2010. **2**(32): p. 32ra36.
117. Saag, M. and S.G. Deeks, *How do HIV elite controllers do what they do?* *Clin Infect Dis*, 2010. **51**(2): p. 239-41.

Anexo A



INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS
ISMAEL COSIO VILLEGAS



COMITÉ DE CIENCIA Y BIOÉTICA EN INVESTIGACIÓN DEL INER

DI/CCB/341/12

Dr. Gustavo Reyes Terán
Investigador Principal

Asunto: DICTAMEN DEL COMITÉ DE CIENCIA Y BIOÉTICA EN INVESTIGACIÓN.
APROBACIÓN.

Título del Proyecto: ESTUDIO GENÓMICO Y FUNCIONAL DEL MICROBIOMA INTESTINAL DE INDIVIDUOS MEXICANOS INFECTADOS POR EL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA (VIH) EN DIFERENTES ETAPAS DE LA INFECCIÓN CON O SIN TRATAMIENTO ANTIRRETROVIRAL COMPARADO CON INDIVIDUOS NO INFECTADOS.

Código asignado por el Comité: **B36-12**

Le informamos que su proyecto de referencia ha sido evaluado por el Comité y las opiniones acerca de los documentos presentados se encuentran a continuación:

	Nº y/o Fecha Versión	Decisión
Protocolo	Versión 1, Octubre 2012	APROBADO
Consentimiento Informado Grupo Control	Versión 1, Octubre 2012	APROBADO
Consentimiento Informado Estudio Transversal	Versión 1, Octubre 2012	APROBADO
Consentimiento Informado Estudio Longitudinal	Versión 1, Octubre 2012	APROBADO
Cuestionario de historia clínica para el protocolo	Versión 1, Octubre 2012	APROBADO
Instrucciones para la toma de muestra de heces	Versión 1, Octubre 2012	APROBADO
Formato Recordatorio de 24 horas	Versión 1, Octubre 2012	APROBADO

Este protocolo tiene vigencia de noviembre de 2012 a noviembre 2017.

En caso de requerir una ampliación, le rogamos tenga en cuenta que deberá enviar al Comité un reporte de progreso al menos 30 días antes de la fecha de término de su vigencia. El Comité dispone en su página electrónica de un formato estándar que podrá usarse al efecto. Lo anterior forma parte de las obligaciones del Investigador las cuales vienen descritas al reverso de esta hoja.

Atentamente

Dra. Rocio Chapela Mendoza
Presidente del Comité

27 de Noviembre de 2012

Anexo B

Versión 1



**INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ISMAEL COSIO VILLEGAS
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS**

**FORMA DE CONSENTIMIENTO ESCRITO PARA PARTICIPAR EN EL PROYECTO DE
INVESTIGACIÓN DEL INER TITULADO:**

"ESTUDIO GENÓMICO Y FUNCIONAL DEL MICROBIOMA INTESTINAL DE INDIVIDUOS MEXICANOS INFECTADOS POR EL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA (VIH) EN DIFERENTES ETAPAS DE LA INFECCIÓN CON O SIN TRATAMIENTO ANTIRRETROVIRAL COMPARADO CON INDIVIDUOS NO INFECTADOS-ESTUDIO TRANSVERSAL"

PATROCINADOR

Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas (INER)

SITIO DE INVESTIGACIÓN

Centro de Investigación en Enfermedades Infecciosas (CIENI), del Servicio de Infectología para el Paciente Inmunocomprometido (SIPI), del INER.

INVESTIGADORES RESPONSABLES

Dr. Gustavo Reyes Terán, CIENI, INER
Dr. Santiago Avila Ríos, CIENI, INER
Dra. Sandra Pinto Cardoso, CIENI, INER

DIRECCIÓN

Calzada de Tlalpan 4502
Colonia Sección XVI
CP 14080
México, D. F.
Tels: 5666 7985, 5171 7335, 5171 4735, 5171 4697, 5171 4718

CORREO ELECTRÓNICO

santiago.avila@cieni.org.mx
sandra.pinto@cieni.org.mx

Estimado(a) paciente:

Ésta es una invitación para participar en un proyecto de investigación en el que se estudiará a un grupo de personas con la infección por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), causante del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). Su participación es completamente voluntaria y su decisión de participar o no participar no afectará en absoluto la atención que recibirá en el CIENI del INER.





Este estudio se realiza con el apoyo del INER, institución de renombrado prestigio científico en nuestro país. Ninguna empresa farmacéutica ni ninguna otra compañía privada tiene o tendrá participación alguna en esta investigación.

IMPORTANCIA DEL ESTUDIO

El intestino humano alberga una comunidad bacteriana muy diversa y compleja. Las comunidades bacterianas del intestino tienen un papel muy importante en el balance entre la salud y enfermedad. Se ha comprobado que el cambio de la composición de las comunidades bacterianas del intestino está asociado con enfermedades tal como la obesidad, síndrome del intestino inflamado y diabetes tipo 1, entre otros. De hecho, el intestino es importante para la replicación del VIH y para la persistencia del virus sobre todo en individuos infectados que se encuentran bajo tratamiento antirretroviral. La infección por VIH está asociada a la presencia de productos bacterianos en la sangre periférica, que contribuyen a la activación del sistema inmune y a la progresión a la enfermedad o SIDA. El origen de la activación crónica del sistema inmunológico es de gran importancia en la lucha contra la infección por VIH. Por lo tanto, estudiar la composición de las comunidades bacterianas intestinales es relevante para definir nuevos blancos terapéuticos en conjunto con otros tratamientos ya establecidos.

OBJETIVO

El presente proyecto tiene como objetivo de analizar el papel de las comunidades bacterianas en la infección por VIH. Particularmente, se propone describir de la composición y la diversidad de las comunidades bacterianas de individuos infectados por VIH.

PROCEDIMIENTOS

Usted ha sido invitado a participar en este estudio porque:

1. Es una persona que vive con VIH, que previamente no ha tomado fármacos antirretrovirales y con un conteo de linfocitos T CD4 inferior a 200 células/ μ l
2. Es una persona que vive con VIH, que previamente no ha tomado fármacos antirretrovirales y con un conteo de linfocitos T CD4 superior a 500 células/ μ l
3. Es una persona que vive con VIH, que previamente no ha tomado fármacos antirretrovirales y su carga viral está en niveles indetectables.
4. Es una persona que vive con VIH, que toma fármacos antirretrovirales por lo menos por 1 año completo.

En todos los casos, la decisión sobre el inicio del tratamiento antirretroviral es totalmente independiente de su participación en este estudio y será tomada exclusivamente entre usted y su médico. Su participación en este estudio no influye en la efectividad del tratamiento.

Se invitará a participar en la presente investigación a 30 personas que cumplan los requisitos del punto 1, 30 personas que cumplan los requisitos del punto 2, 30 personas que cumplan los requisitos del punto 3 y 30 personas que cumplan los requisitos del punto 4.

Microbioma intestinal de pacientes infectados por VIH

2/6





Se obtendrán 50 mililitros (8 tubos) de sangre de una vena del brazo en la sesión de toma de muestra y se realizarán las mismas pruebas que a los individuos que viven con VIH y que incluirán una revisión de infectología, nutriología y estudio de densimetría ósea sin cargo alguno, en las mismas instalaciones del CIENI. Además se incluirán estudios de laboratorio clínico sin cargo alguno en las instalaciones del INER. Estos estudios incluyen una biometría hemática, química sanguínea, perfil de lípidos y perfil hepático, sin cargo alguno para usted. Además, se estudiarán las características de las células CD4+ y se cuantificaron los productos microbianos presentes en su sangre como parte de la investigación.

Además, se le pedirá una muestra de heces y se le proporcionará un contenedor de plástico, una bolsa plástica e instrucciones para la toma de muestra de heces. Se le pedirá además llenar un cuestionario de frecuencia de consumo alimenticio, un recordatorio alimenticio de 24hrs (se realizarán tres por participante) y un cuestionario de su historia clínica en presencia de médicos del CIENI, INER. Estos cuestionarios son muy importantes para el estudio ya que la dieta y los antibióticos influyen de manera significativa en la composición de las comunidades microbianas. Parte de la muestra de sangre y de la muestra de heces serán guardadas durante un tiempo indefinido y podrá ser estudiada nuevamente en el futuro en el marco de otros proyectos de investigación sobre la infección por VIH. Si los investigadores responsables de este estudio lo consideran necesario, se le podría citar para una toma de muestra adicional, la cual será completamente voluntaria. Se tomará esta cantidad de sangre debido a que se requiere un número considerable de células para los estudios considerados.

RIESGOS

El procedimiento para la obtención de una muestra de su sangre será realizado por personal calificado, siguiendo todas las precauciones y medidas de higiene necesarias. La extracción de sangre produce dolor y molestias pasajeras en el sitio de punción. En raras ocasiones puede haber infección en el sitio de la punción, la cual sería manejada por el personal médico del CIENI. La cantidad de sangre extraída no representa riesgos para su salud. Si hubiera algún problema relacionado con los procedimientos de este estudio, se dispondrá por cuenta del INER del tratamiento para resolverlo (antibióticos, analgésicos, antiinflamatorios). El INER no proporcionará compensación por eventos no relacionados con los procedimientos de este estudio. El procedimiento para la obtención de una muestra de heces será realizado por el paciente, siguiendo las instrucciones proporcionadas por el CIENI.

BENEFICIOS

Usted no obtendrá beneficios económicos por parte del INER al participar en el presente estudio. Sin embargo, la investigación contempla la realización de algunas pruebas de laboratorio que son útiles para su seguimiento clínico, las cuales se realizarán sin costo alguno para usted. Estas pruebas incluyen los estudios de carga viral, conteo de linfocitos T CD4+, química sanguínea, biometría hemática, perfil de lípidos, perfil hepático. Además usted tendrá derecho a un seguimiento regular de la infección por VIH mediante análisis de laboratorio, incluyendo los que se realizan en el presente proyecto de investigación, y consultas médicas periódicas será de gran beneficio para el





manejo de la infección y su bienestar. Así mismo, participando en este estudio, usted contribuirá en la obtención de información importante que podría definir nuevas estrategias de tratamiento que podrían mejorar la efectividad del tratamiento ya establecido para el control de la enfermedad por VIH.

OPTATIVIDAD Y LIBERTAD DE RETIRARSE

Su participación en este estudio es **totalmente voluntaria**. Esto implica que usted puede decidir no participar, sin que esto afecte su seguimiento clínico y/o tratamiento en absoluto. Si decide participar, puede retirarse de este estudio en cualquier momento. Cualquiera de estas decisiones será respetada y los beneficios (atención clínica, de laboratorio, etcétera) que usted obtiene como paciente del INER no cambiarán. Su tratamiento y sus relaciones con los médicos y organizadores que participan en esta investigación no se afectarán en ningún momento.

CONFIDENCIALIDAD

Todas las muestras de heces y de sangre donadas para el presente estudio se manejarán con claves, sin incluir en ningún momento su nombre o datos personales. Los registros médicos donde usted puede ser identificado y el consentimiento informado, autorizado por usted con su firma, podrían ser requeridos y copiados para una inspección de los datos o resultados de los estudios que podría ser realizada por las siguientes instituciones nacionales o extranjeras:

- o Comité de Ciencia y Bioética en Investigación del INER (México)
- o Secretaría de Salud (México)
- o Agencias gubernamentales y comités de ética y derechos humanos de otros países

Estas instituciones podrían conocer su identidad, pero **siempre respetarán su privacidad**. Usted no será identificado(a) en ningún caso si los resultados de este estudio de investigación se presentan en reuniones científicas o en publicaciones. Su identidad no formará parte de los resultados de este estudio, a ser publicados en el medio científico y académico especializado.

DUDAS Y COMENTARIOS

Si usted tiene dudas o comentarios sobre su participación en este estudio o sobre el estudio mismo, puede consultar en todo momento a los responsables de este proyecto: Dr. Gustavo Reyes Terán, jefe del CIENI, Dr. Santiago Avila, investigador del CIENI ó Dra. Sandra Pinto Cardoso, investigadora del CIENI en la dirección y teléfonos indicados en la primera página de este documento. Del mismo modo, usted puede optar por dirigirse a la Dra. Rocío Chapela Mendoza, presidenta del Comité de Ciencia y Bioética en Investigación del INER, órgano encargado de vigilar la investigación del Instituto, que se encuentra en la Unidad de Investigación del INER, Calzada de Tlalpan 4502, Colonia Sección XVI, Delegación Tlalpan, CP 14080, México D. F. al teléfono 5487 1700 ext 5110 y 5254, o al correo electrónico: ccybiner@yahoo.com.mx





CONSENTIMIENTO

Me han proporcionado la Forma de Consentimiento Informado para participar en el presente proyecto de investigación. Me han explicado los métodos y procedimientos que me realizarán en este estudio. He hablado directamente con _____, quien ha respondido a mi satisfacción todas mis preguntas respecto a este estudio. Acepto donar 50 mL de mi sangre para que se estudien las células y el virus en ella. Estoy informado de que parte de la muestra de sangre será guardada durante un tiempo indefinido y que podrá ser estudiada nuevamente en el futuro en el marco de otros proyectos de investigación.

Doy mi consentimiento de participación en esta investigación y sé bien que puedo retirarme del estudio en cualquier momento si yo lo deseo. Sé que esto no tendría repercusiones en mi atención como paciente del INER. Al firmar este consentimiento, no renuncio a ninguno de mis derechos legales como paciente en un estudio de investigación.

Nombre y firma del paciente: _____

Fecha: _____

Nombre y firma del testigo 1: _____

Fecha: _____ Relación: _____

Dirección: _____

Nombre y firma del testigo 1: _____

Fecha: _____ Relación: _____

Dirección: _____

Nombre y firma del investigador: Dra. Sandra Pinto Cardoso

Fecha: _____ *Cardoso*





DECLARACIÓN DE LOS DERECHOS DE LAS PERSONAS EN EXPERIMENTACIÓN

Los derechos que enseguida se describen son los de todas las personas a quienes se les solicita participar en un estudio de investigación:

1. Que me expliquen de qué se trata el estudio y qué están tratando de encontrar. Tengo derecho a saber con todos los detalles los objetivos de investigación.
2. Que me digan exactamente qué me sucederá si participo en un estudio de investigación.
3. Que me expliquen si alguno de los procedimientos, medicamentos o dispositivos que se emplearán en la investigación son diferentes de los que se usan en la práctica médica rutinaria. Si son diferentes, debo saber con exactitud en qué consisten las diferencias.
4. Que me describan con precisión y de manera que yo lo entienda bien, la frecuencia y la importancia de los riesgos a los que seré sometido, así como de los efectos adversos o molestias que puedo tener, relacionados con mi participación en la investigación.
5. Que me digan si yo puedo esperar algún beneficio de mi participación y, si así fuera, cuál sería el beneficio.
6. Que me expliquen otras opciones que yo tengo y cómo esas opciones pueden ser mejores, iguales o peores que las de este estudio.
7. Que me permitan hacer cualquier pregunta que se me ocurra respecto al estudio, antes de dar mi consentimiento para participar y durante el curso del estudio (si decido participar).
8. Que me digan qué tipos de tratamientos están disponibles para mí, en caso de presentarse alguna complicación.
9. Puedo negarme a participar totalmente o, si decido participar, puedo cambiar mi decisión acerca de mi participación después de que haya comenzado el estudio. Esta decisión no afectará mis derechos para recibir la atención médica que yo recibiría si no estuviera en el estudio.
10. Debo recibir una copia del documento o de la forma escrita de mi consentimiento para participar en esta investigación.
11. Nadie puede ni debe presionarme cuando yo esté considerando tomar la decisión de participar o no en el estudio.

Si tengo cualquier pregunta, puedo solicitar al Dr. Gustavo Reyes Terán (Tel. 5666 7985), investigador principal y Jefe del Centro de Investigación en Enfermedades Infecciosas (CIENI) del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER), o a los co-investigadores del estudio, para que me la resuelvan. Además puedo establecer comunicación con el Comité de Ciencia y Bioética del INER, que se preocupa por la protección de los voluntarios de los proyectos de investigación, con su presidente, Dra. Rocío Chapela Mendoza, que se encuentra en la Unidad de Investigación del INER, Calzada de Tlalpan 4502, Colonia Sección XVI, Delegación Tlalpan, CP 14080, México D. F. al teléfono 5487 1700 ext 5110 y 5254, o al correo electrónico: ccybiner@yahoo.com.mx

Recibí: _____

Fecha: _____

