



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias
Médicas, Odontológicas, y de la Salud.

“Cambios en la microbiota intestinal antes y
después del inicio de la terapia antirretroviral en
pacientes con infección por VIH”

Graduación por tesis para optar por el grado de
Maestro en Ciencias Médicas

Presenta:
DORA EDITH CORZO LEON

Tutor Principal:
DRA. SANDRA MARIA PINTO CARDOSO
INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES
RESPIRATORIAS

México, D.F; Enero 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

“Microbioma fecal antes y después del inicio de la terapia antirretroviral en pacientes con infección por VIH”.

Índice de contenido	Página
1.MARCO TEÓRICO	3
1.1 Microbiota intestinal: definiciones y características.	
1.2 El estudio de la microbiota mediante el gen 16S	
1.3 La microbiota del tracto gastrointestinal: compleja y dinámica	
1.4 Daños al tejido linfoideo asociado al intestino (GALT) y enteropatía en individuos con infección por el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH)	
2.ANTECEDENTES MICROBIOTA Y VIH	25
3.PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	30
4.DEFINICION DEL PROBLEMA	30
5.JUSTIFICACION	31
6.OBJETIVOS	31
7.HIPOTESIS	32
8. METODOLOGÍA	32
8.1 Diseño del estudio	
8.2 Cohorte de estudio	
1. Grupos de estudio	
2. Criterios de inclusión, exclusión y eliminación	
3. Variables	
4. Calculo del tamaño de muestra	
8.3 Materiales y procedimientos	
a. <u>Materiales y consumibles</u>	
b. <u>Procedimientos</u>	
- Recolección de información y muestras clínicas.	
- Extracción de DNA	
- Cuantificación de DNA extraído de muestras de heces.	
- Amplificación, secuenciación y análisis del DNA obtenido de las muestras de heces.	
c. <u>Análisis estadístico</u>	
9. RESULTADOS	56

1. Características demográficas, clínicas, biométricas y bioquímicas de los grupos de estudio
2. Características generales de la microbiota fecal
3. El microbioma fecal y su relación con los grupos de estudio
4. Características demográficas, clínicas, biométricas y bioquímicas de los individuos del grupo longitudinal (individuos con VIH antes {T0} y 6 meses después de iniciar TAR {T6})
5. Características del microbioma fecal de los individuos del grupo longitudinal, (individuos con VIH antes {T0} y 6 meses después de iniciar TAR {T6}).

10. DISCUSION **88**

11. CONCLUSIONES **94**

12. ANEXOS **95**

ANEXO 1. Formato de recolección de datos clínicos.

ANEXO 2 Formato de recolección de datos de nutriología

ANEXO 3 Aprobación del comité de ética

ANEXO 4 Hoja de consentimiento informado

ANEXO 5 Hoja de instructivo de toma y entrega de muestra de heces

13. BIBLIOGRAFIA **105**

1. MARCO TEÓRICO

1.1 Microbiota intestinal: definiciones y características.

El cuerpo humano está colonizado con microbios simbióticos, de los cuales pueden formar parte las bacterias, archaeas, hongos, virus y protozoarios. Los microbios que existen en el cuerpo humano son colectivamente conocidos como microbiota (1) (2). Estas comunidades contribuyen de manera significativa a la arquitectura y función de los tejidos corporales, lo que los convierte en piezas fundamentales en el mantenimiento del balance entre la salud y la enfermedad (3).

El tracto gastrointestinal de los mamíferos contiene la mayor densidad de estos microorganismos comensales, entre los cuales predominan las bacterias. Esta colonización microbiana inicia desde el nacimiento y es modificada con la dieta, la higiene y los medicamentos, en particular antibióticos, utilizados a lo largo de la vida. Sin embargo, a pesar de que la composición de la microbiota varía durante la vida se considera parcialmente estable después del 3º año de vida, se estabiliza entre los 3-60 años, y nuevamente cambia gradualmente con el envejecimiento (4).

Los ácidos biliares y secreciones pancreáticas disminuyen la colonización bacteriana del estómago e intestino delgado. Por lo anterior, la mayor parte de las bacterias intestinales son encontradas en el colon donde se cuentan en más de 100 trillones de células microbianas, es decir, aproximadamente 10^{12-14} organismos/gr de contenido intestinal, ver Figura 1. En general, en el colon pueden encontrarse más de 1000 especies bacterianas; de las cuales hay al menos 160 especies por persona (5), (6), (7)

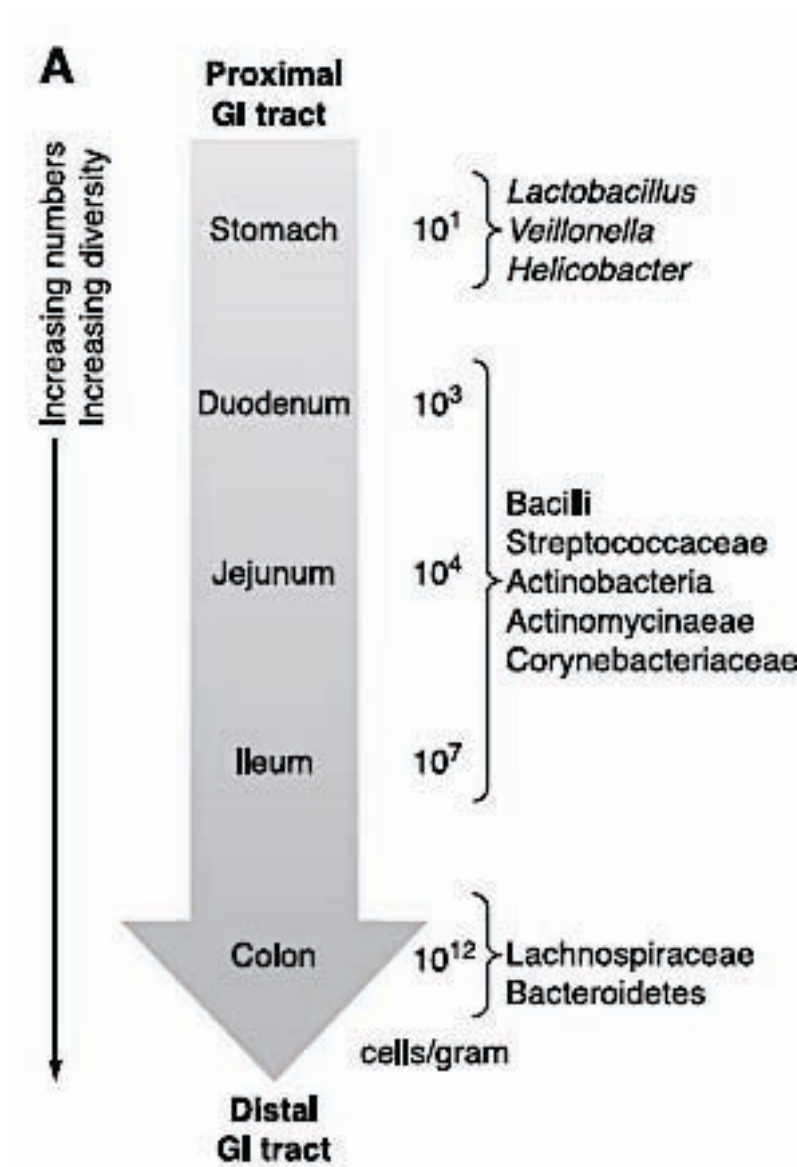


FIGURA 1: Variaciones de la composición microbiana en el tracto gastrointestinal. Tomado de Sekirov I. Microbiota in Health and Disease. Physiol Rev 2010, (8).

Aproximadamente 90% de todos los filotipos bacterianos en el íleon y colon de un adulto están conformados por Bacteroidetes y Firmicutes, de las cuales más del 90% de estos están constituidos por anaerobios obligados como: *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Bifidobacterium*, *Fusobacterium*, *Peptostreptococcus*, *Lactobacillus*, etc (4) (9) (7).

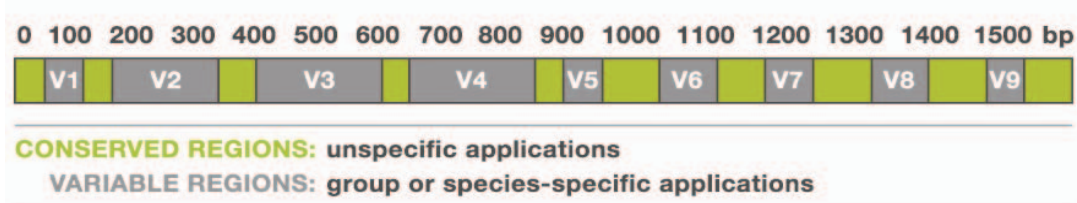
Mientras que la microbiota intestinal se refiere a los taxones microbianos asociados en el intestino de los humanos, el catálogo de estos microbios y sus genes, o secuenciación del genoma microbiano intestinal es llamado

microbioma. Así mismo, el término metagenómica se refiere a la caracterización del DNA total, sin embargo, actualmente los estudios para caracterizar bacterias y archaeas se enfocan al estudio de un marcador filogenético común a todas las bacterias, del gen 16S ribosomal RNA (rRNA), mientras que en el caso de los hongos, se han utilizado el gen 18S rRNA y el 28S rRNA (10) (1). En el caso del estudio del viroma, éste se complica por la ausencia de marcador común a todos los virus (11). Mucho del entendimiento previo del microbioma bacteriano se basaba en la identificación por 16sRNA de los elementos cultivables. Sin embargo 20-60% de los componentes microbianos de la microbiota no son cultivables (5) (7).

1.2 El estudio de la microbiota mediante el gen 16S

Mediante el análisis del gen 16s rRNA se puede documentar la historia y evolución taxonómica bacteriana (12). El gen 16S rRNA difiere en cada especie bacteriana, tiene una longitud de 1.5 kilobases y 9 regiones cortas hipervariables de 50-100 bases en longitud (Figura 2). Estas regiones hipervariables permiten distinguir el taxón bacteriano, y la secuencia de estas regiones son las que ayudan en la identificación universal de las bacterias. Las unidades operacionales taxonómicas u OTUs (en inglés: Operational Taxonomic Units,) son agrupaciones de microorganismos definidas por el nivel de la similitud de su secuencia (porcentaje de identidad) del gen 16S rRNA con secuencias reportadas en bases de datos (Greengenes, SILVA, Ribosomal Database Project). Una especie o género bacteriano es difícil de definir pero es regularmente analizada, identificada y categorizada si la secuencia de su gen 16S rRNA tiene 97% de identidad (7) (13) (1).

Figura 2. Estructura del gen 16S



Actualmente el estudio de la microbioma intestinal por medio del análisis del gen 16S rRNA ha permitido definir que el microbioma del humano contiene más de 150 veces el número de genes que el genoma humano. Tan solo el estudio MetaHIT reportó un catálogo de 3.3 millones de genes en el microbioma intestinal comparado con 22, 000 genes en el genoma humano completo (10) (1) (7).

De las diferentes estrategias, no-dependientes de cultivo, para el conocimiento de la microbiota, la más frecuentemente usada es la amplificación y secuenciación dirigida del DNA. Las técnicas de reacción en cadena de polimerasa (PCR) en tiempo real y secuenciación de porciones específicas del gen 16s rRNA son ampliamente usadas (12). Previamente la secuenciación por técnica de Sanger permitía el conocimiento de la microbiota, sin embargo, esta técnica requiere un alto costo, tiempo y existe alto riesgo de sesgo de hibridación (12).

Actualmente la tecnología de secuenciación de nueva generación (NGS, Next Generation Sequencing, siglas en inglés) ha permitido un análisis más extenso dirigido a la secuenciación del gen 16S rRNA en el caso de poblaciones bacterianas y archaeas, mientras que en el caso de los hongos, han utilizado el gen 18S rRNA y el 28S rRNA. Estos análisis pueden realizarse por diferentes plataformas y métodos, como los que se manejan en plataformas como Illumina y las 454-roche (Tabla 1), (1) (14).

Tabla 1. Características de las plataformas y métodos de secuenciación usadas para los estudios de metagenómica

Plataforma	Método	Características	16S rRNA	Comentario
Método Sanger	Terminador dideoxi- y fluorescencia	Lectura de 900 bases de alta exactitud	Longitud total	El método más costoso, bajo rendimiento
Roche 454	Emisión de luz por pirosecuenciación	Lectura de 600 bases.	Más de 3 regiones variables por lectura	Alta cobertura. Costo alto,
Illumina	Secuenciación escalonada, fluorescencia	Lecturas de hasta 600 bases.	2 regiones hipervariables	Menor costo que 454. Alta cobertura. Lecturas de alta calidad (>Q30)
Ion Torrent	Detección de protones.	Lecturas de más de 200 bases.	Una región hipervariable	Alta cobertura. Alta tasa de errores de secuenciación.
PacBio	Secuenciación de una molécula, fluorescencia	Lectura de más 10 kilobases		Baja exactitud, bueno para lecturas largas

Tomado de Weinstock GM. Genomic approaches to studying the human microbiota. Nature 2012, (1).

Una vez que se ha secuenciado la o las regiones hipervariables de interés, la clasificación de las secuencias bacterianas de 16sRNA obtenidas se hace mediante la definición de OTUs y con clasificadores Bayesianos (15).

El análisis de las secuencias se realiza mediante el uso de herramientas computacionales especializadas como MOTHUR, y QIIME (por sus siglas en inglés: Quantitative Insights Into Microbial Ecology). El uso de la herramienta QIIME en particular permite el análisis de datos de secuenciaciones de alto rendimiento a partir de datos de secuenciación crudos, así como hacer mediciones de la diversidad, y permite la caracterización de patrones de comunidades microbianas (10) (16) (14).

El estudio de la diversidad de la microbiota se ha basado en el análisis de las especies como unidad fundamental del análisis. La diversidad dentro de una comunidad (alfa diversidad) es usualmente caracterizada usando el número total de especies (riqueza). La diversidad entre comunidades (beta diversidad) es usualmente caracterizado usando el número de especies compartidas entre dos comunidades (17). Sin embargo, existen varias métricas para la medición de la alfa y beta diversidad. Las métricas más utilizadas para medir alfa diversidad son: 1. Las que miden diversidad cualitativa basadas en especies por ejemplo Chao 1; y 2. Las que miden diversidad cuantitativa basada en especies como el índice de Shannon. Las métricas utilizadas para medir beta diversidad también pueden ser cualitativas (basadas en divergencia como UniFrac), o cuantitativas (como DPCoA, del inglés: double principal coordinate analysis) (17).

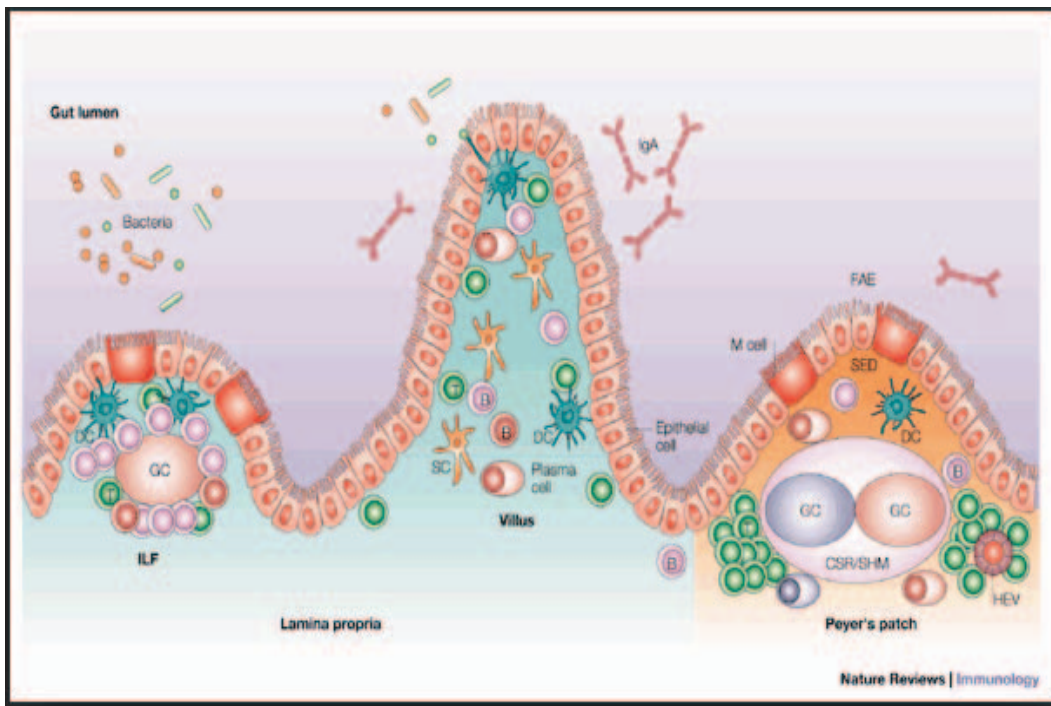
El estudio de las comunidades microbianas a través de sus genes o microbioma tiene como objetivo fundamental medir la estructura y dinámica de las comunidades microbianas, las relaciones entre sus miembros, la producción de metabolitos y su interacción con el huésped y con el proceso salud enfermedad (1). Múltiples ejemplos en humanos, modelos animales y estudios *in vitro* han reportado el papel de la microbiota intestinal y la enfermedad, por ejemplo, en la patogénesis de algunas neoplasias, enfermedades intestinales, obesidad y dislipidemia (2).

Desde hace varios años los Institutos Nacionales de Salud de Estados Unidos de América (NIH) llevan a cabo el proyecto microbioma humano o Human Microbiome Project (HMP, por su siglas en inglés), (5). El HMP consistió, en una primera fase, en secuenciar las regiones V3 a V5 del gen 16S rRNA de 12 mil muestras de sujetos sanos. Estas 12 mil muestras comprendían 18 zonas corporales de 300 personas. El objetivo del HMP es conocer la relación del microbioma con el proceso salud-enfermedad. Gracias al HMP se creó una base de datos que nos informa sobre cuál es la microbiota de un sujeto sano en diversos sitios anatómicos y nos permite usar esos hallazgos para comparar la microbiota en sujetos con una determinada enfermedad (5).

1.3 La microbiota del tracto gastrointestinal: compleja y dinámica

La superficie mucosa del tracto gastrointestinal es un nicho anatómico y fisiológico único, el cual sirve como barrera estructural e inmunológica contra microorganismos externos. Además, los enterocitos del epitelio mucoso absorben agua y nutrientes necesarios para la vida. El tracto gastrointestinal, específicamente intestinos, albergan el 60-80% de los linfocitos corporales en el tejido linfoide asociado al intestino (GALT) (figura 2), (18).

FIGURA 3: Estructura del tejido linfoide asociado al intestino (GALT)



La microbiota tiene funciones muy importantes, entre las cuales regular funciones metabólicas e inflamatorias. Se le ha asociado con la capacidad de absorción de energía, la fermentación de polisacáridos no digeribles por el humano, con la absorción de monosacáridos y ácidos grasos de cadena corta y su conversión a lípidos complejos en el hígado, además de participar de la regulación de los genes del huésped que promueven la deposición de los

lípidos y adipocitos. Otro ejemplo es la activación de TLR 5 (por elementos flagelares bacterianos), en las células mieloides y epiteliales, afecta la composición de la microbiota intestinal y como resultado la regulación del apetito, la ganancia de peso y la resistencia a la insulina (13) (20).

La dieta, los antibióticos y la inflamación intestinal alteran la microbiota intestinal y por lo tanto su papel funcional en el cuerpo humano (21) (10). Los cambios en la dieta pueden rápidamente causar un cambio sustancial en la composición de la microbiota intestinal, un ejemplo es que se sabe que los enterotipos se agrupan basados en la abundancia de proteína animal vs carbohidratos en la dieta y la fibra. Los enterotipos parecen tener una influencia o función específica y diferente en el intestino. El microbioma intestinal humano se puede clasificar en 3 enterotipos (*Bacteroides*, *Prevotella*, y *Ruminococcus*) caracterizados por la predominancia de un género sobre otros (2,9). Otro ejemplo, se ha observado en estudios en ratones, que los cambios en su dieta producen alteraciones en el metabolismo bacteriano tan solo una semana después del cambio en la dieta. Además de estos cambios en el metabolismo, las dos divisiones mayores microbianas intestinales (Bacteroidetes y Firmicutes) muestran cambios en su proporción, ejemplo de esto es que en estudios donde se usaron ratones obesos hay disminución de Bacteroidetes y aumento de Firmicutes muy diferente a lo observado en sus contrapartes delgadas. Parece ser que, esta diferencia fenotípica se asocia con mayor absorción de energía por parte de los ratones obesos (10).

Los antibióticos ejercen una presión selectiva al eliminar la colonización de bacterias susceptibles nativas del intestino, esto favorece que las bacterias más resistentes sobrevivan (22); sin embargo, el impacto de los antibióticos sobre la microbiota varía dependiendo del espectro de actividad, la dosis, la cantidad que es usualmente secretada en el intestino, (23).

Las alteraciones de la microbiota intestinal por antibióticos persisten aun después de concluido el antibiótico (23,24)

Tabla 2. Antibióticos y sus efectos

Antibiótico	Efecto en la microbiota	Efecto en la inmunidad
Amoxicilina	Depleción de <i>Lactobacillus</i> , enterobacterias y bacterias anaeróbicas en colon.	Disminución de MHC I y II en intestino delgado delgado y grueso. Disminución de péptidos antimicrobianos en intestino delgado.
Metronidazol, neomicina, vancomicina	Disminución del número de bacterias en intestino delgado y grueso. Disminución de Bacteroidetes y aumento de Enterobacteriaceae	Disminución de la expresión de Reg3 gamma en Intestino delgado.
Metronidazol	Depleción de Bacteroidales y <i>Clostridium coccoides</i> Aumento de Lactobacilli.	Aumento de Reg3 gamma e IL25. Aumento del número de macrófagos y células NK en colon
Colistina	Disminución de bacterias Gram negativas susceptibles.	Disminución del número de folículos linfoides.
Ampicilina, neomicina, metronidazol, vancomicina	Depleción de microbiota. Disminución de los niveles de peptidoglucano en suero	Disminución de la actividad bactericida mediada por neutrófilos. Disminución de Reg3 gamma y pro-IL1beta, IL18
Amox/clavulanato	No determinado	Disminución de los niveles de IgG
Ampicilina, gentamicina, metronidazol, vancomicina,	Disminución de las bacterias en int grueso. Disminución de Firmicutes, Disminución de <i>Lactobacillus</i>	Disminución de IFN gamma, e IL17 por los CD4+ Aumento de niveles séricos de IgG

Vancomicina	Disminución de bacterias Gram positivas, incluyendo <i>Clostridium</i> Aparición de bacterias Gram positivas resistentes como <i>Enterococcus</i> Aumento de Enterobacteriaceae	Disminución de células Treg en colon. Disminución de Th17 en intestino delgado Disminución de folículos linfoides.
Quinolonas	De 3a y 4a generación tienen efecto antianaerobio Aumento de Enterococo resistente a vancomicina en intestino Ciprofloxacino disminuye las enterobacterias pero favorece permanencia de resistentes	
Cefalosporinas	Disminuye las enterobacterias pero favorece permanencia de resistentes Aumento de <i>Clostridium</i>	
Clindamicina	Incremento de <i>Clostridium</i> Favorece resistencia en individuos tratados con quinolonas	

MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad.

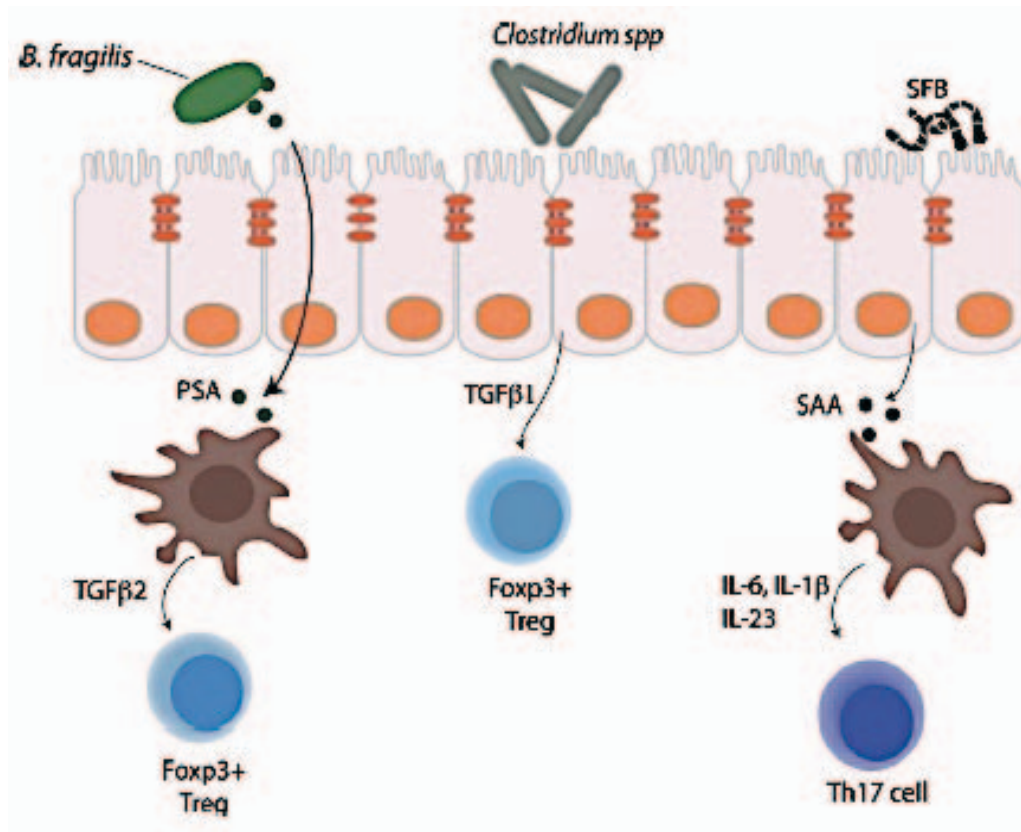
Se sospecha que la microbiota colónica está involucrada en la patogénesis de cánceres colorectales. En estudios clínicos se ha demostrado la presencia y predominancia de especies de *Fusobacterium* en pacientes con cáncer de colon. Los posibles efectos favorecedores de cáncer de la microbiota son: la síntesis de ácidos grasos de cadenas cortas y otros metabolitos pro-cáncer, los cuales inducen apoptosis, detención en el ciclo celular, y la diferenciación. La microbiota colónica, además, parece tener un efecto genotóxico a las células epiteliales colónicas como se ha demostrado en el caso de la inducción de aneuploidia y tetraploidia por *Enterococcus faecalis* (2).

Otra función importante de la microbiota intestinal en el proceso de salud-enfermedad es la inmunomodulación. La microbiota favorece la expresión de los receptores intestinales de tipo Toll o TLRs (por sus siglas en inglés: Toll Like Receptors), además del complejo mayor de histocompatibilidad tipo II. Los TLRs son los principales reguladores de la inmunidad intestinal, principalmente TLR-9. TLR-9 parece estar asociada con la diferenciación de células Th-17 (30). Además, la microbiota regula la cantidad de linfocitos T CD4+, favorece la presencia de folículos linfoides, células dendríticas y agregados de células B. La regulación de los linfocitos CD4+ no sólo es a nivel intestinal, sino esplénico. Una de las funciones específicas de la microbiota intestinal es inducir un tipo específico de células reguladoras (Treg) llamadas Foxp3+, las cuales se asocian con la producción de IL-10 y previenen la autoinmunidad y las enfermedades linfoproliferativas; *Bifidobacteria infantis*, *Faecalibacterium prausnitzii*, y *Bacteroides fragilis* se han asociado con inducción y regulación de estas células, ver figura 5 (21,31).

El desarrollo de células Th17 en el intestino ha demostrado que estas son específicamente afectadas por bacterias comensales. La pérdida de la microbiota intestinal disminuye la producción de IL-17 en las células del intestino delgado, esplénicas y en cordones espinales. La respuesta Th17 es crítica en el control de las infecciones de mucosas por patógenos extracelulares, ya que reclutan neutrófilos y su aumento se asocia con

autoinmunidad. También existen bacterias intestinales que se asocian con reducción de la producción de células Th17 (21).

Figura 5: Bacterias que educan el sistema inmune de la mucosa intestinal



Tomado de Smith PM. The gut microbiota and mucosal T cells. *Frontiers in Microbiology* 2011

La influencia de la microbiota sobre los aspectos de desarrollo de la inmunidad adaptativa son mejor ejemplificados en los modelos animales libres de gérmenes. En estos modelos se ha encontrado falta de maduración del tejido linfóide asociado al intestino (GALT) y exhibe defectos extensos en las respuestas humorales de los anticuerpos (32).

Algunas bacterias filamentosas segmentadas son estimuladores potentes de las células TH17 en el intestino delgado. Se ha demostrado que en modelos libres de gérmenes existe escasez de células TH17 y un incremento de las mismas cuando se coloniza a estos modelos con bacterias filamentosas segmentadas (32). En los modelos de ratones libres de gérmenes estimulados con *Bacteroides fragilis*, la producción de polisacárido A (PSA)

por parte de esta bacteria, protege contra el desarrollo de colitis por medio de la inducción de PSA sobre las células Foxp3+ productoras de IL-10 por medio de TLR2 (32).

1.4 Daños al tejido linfoideo asociado al intestino (GALT) y enteropatía en individuos con infección por el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH)

El tejido linfoideo asociado al intestino (GALT) alberga más del 50% de las células inmunes del cuerpo. Estas células están organizadas en dos tipos de estructuras, los sitios inductores (como las placas de Peyer donde se encuentran células presentadoras de antígenos) y los sitios efectores (linfocitos de la lámina propia e intraepiteliales-CD4s, CD8s) (33) y constituyen el tejido linfoide gastrointestinal (en inglés Gut-Associated Lymphoid Tissue, abreviado GALT). En el GALT residen más del 60% de los linfocitos T del cuerpo (18,33–35). Estas funciones hacen que una alteración en la estructura mucosa del GALT tenga secuelas múltiples.

En la infección por VIH el sistema inmune se ve comprometido debido a la depleción de células T CD4+, macrófagos, y células dendríticas, lo cual favorece las infecciones oportunistas. La rápida destrucción de estas células CD4+ primariamente ocurre en las mucosas en las dos primeras semanas de la infección, principalmente en las células que constituyen el GALT (36) y se ha descrito que la depleción de células T CD4+ en GALT es incluso mayor que la que ocurre en sangre, en donde sólo se encuentra del 0.1-2% de las células CD4+ (18,33–35,37).

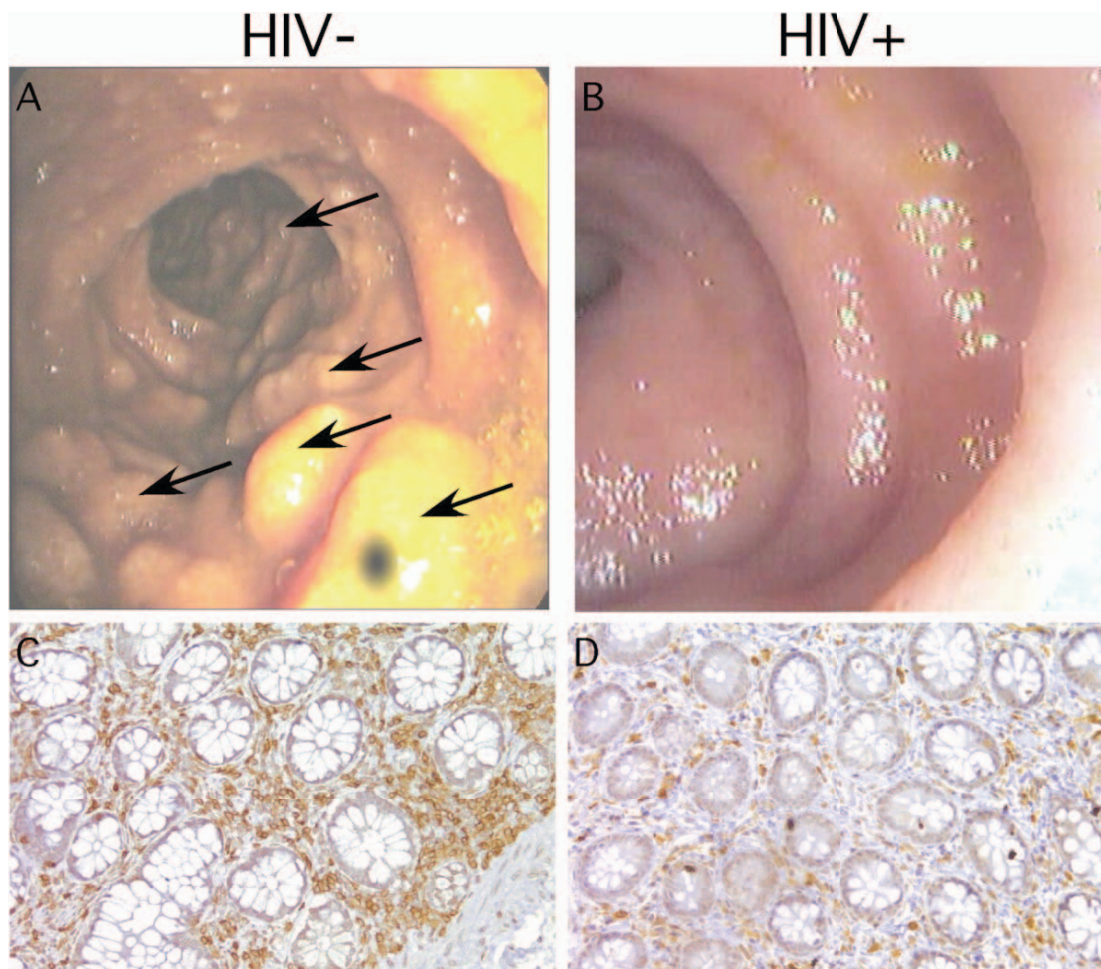
Los daños al GALT durante la infección aguda por VIH se caracterizan por una disminución de vellosidades intestinales, un aumento de la permeabilidad intestinal (hasta 5 veces más que en individuos sin VIH), una hiperplasia criptica debido a hiperproliferación por compensación de la apoptosis de células intestinales (38), un daño a la barrera de los enterocitos y una depleción de las células que constituyen el GALT, preferencialmente de células T CD4+. La mucosa gastrointestinal contiene una gran abundancia

El VIH, por efectos virotóxicos directos de algunas proteínas virales como *tat* y *gp120*, deteriora la barrera GI y podría afectar la composición de la microbiota intestinal. Los pacientes con VIH presentan una condición llamada enteropatía por VIH caracterizada por lesión en la lámina propia de mucosa intestinal, malabsorción de vitamina B12 y ácidos biliares, inflamación y aumento de la permeabilidad intestinal y depleción de linfocitos intestinales (18,33).

La enteropatía ocurre en pacientes con primo infección y con enfermedad crónica avanzada, sin asociación de afección bacteriana, y se caracteriza por la disminución sustancial de CD4+ intestinales, preferentemente CCR5+ en todas las etapas de la infección por VIH (41), ver figura 7, el resumen del impacto del VIH sobre la mucosa intestinal se encuentra en la tabla 3.

Dentro de los daños encontrados en el GALT asociados a VIH se ha observado también que las vellosidades intestinales disminuyen y aumentan las profundidades cripticas debido a infiltración de CD8+, lo que lleva a disminución de la diferenciación de los enterocitos y su apoptosis. Lo anterior causa falla en el mantenimiento del balance iónico y aumento de IFN gamma y TNF alfa. El aumento del TNF alfa conlleva destrucción de las uniones intestinales. En intestino las células T CD4+ son destruidas, incluyendo a las TH17 lo que favorece el sobrecrecimiento bacteriana. Todo lo anterior contribuye al aumento de translocación bacteriana (40).

Figura 7. Cambios endoscópicos e histológicos en el tracto gastrointestinal durante la infección por VIH:



Tomado de Brenchley JM. CD4+ T cells depletion during all stages of HIV disease. *The Journal of Experimental Medicine*. 2004.

Flechas: Son placas de Peyer

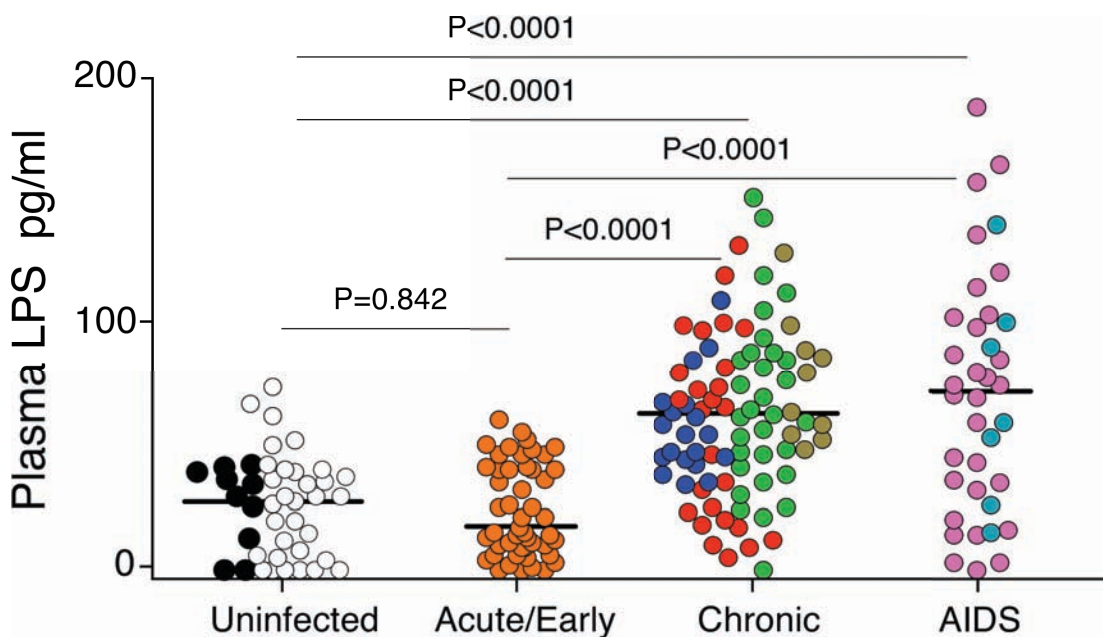
Debido a la ruptura sustancial de la barrera anatomía-funcional GI en pacientes con VIH y a la falla progresiva de la inmunidad en la mucosa intestinal se observa una translocación de productos bacterianos, como lipopolisacárido (LPS), flagelina y fragmentos de ADN bacterianos (16S), hacia la circulación sistémica (translocación de productos bacterianos), ver figura 8, (40).

En la infección por VIH, el LPS, sCD14 y los fragmentos 16s rDNA se correlacionan con activación sistémica inmune y progresión de la enfermedad. Los individuos con mayores niveles de estos marcadores tienen la mayor proporción de activación inmune y mayor riesgo de muerte,

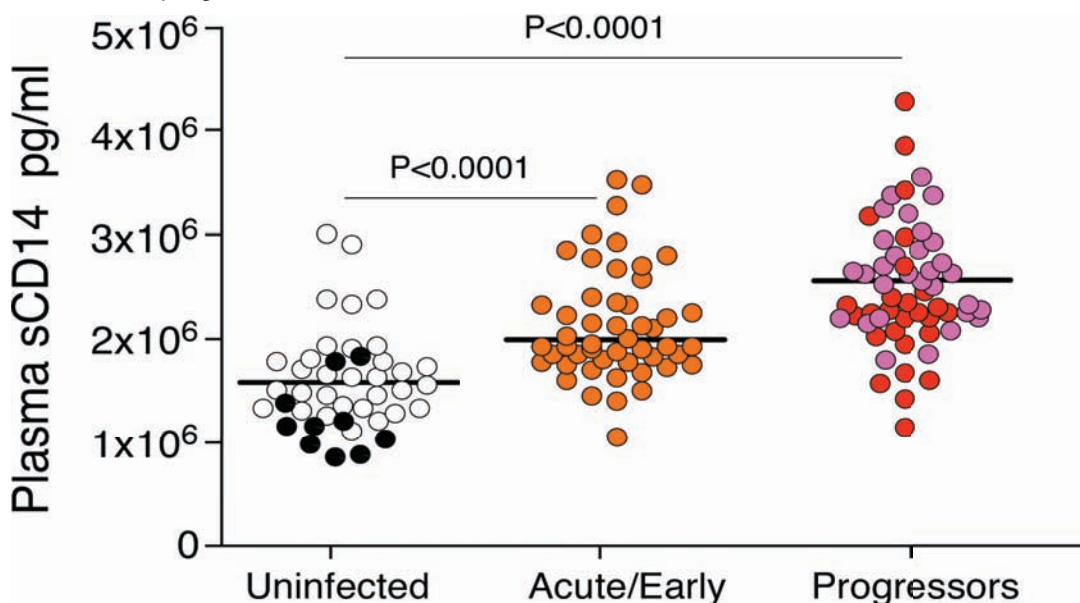
principalmente debido a enfermedad cardiovascular, enfermedad renal, hepática y neoplasias; independientemente de si el individuo tiene supresión viral por terapia antiretroviral (42,43). Un ejemplo de estos marcadores, su translocación y asociación con progresión se puede apreciar en la figura 8.

Figura 8. Evidencia de translocación en individuos infectados por VIH.

8a Aumento de LPS en individuos con VIH como indicador de translocación



8a Aumento de sCD14 en plasma indica estimulación crónica por LPS y aumenta en enfermedad progresiva



Tomado de Brechley JM. Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nature Medicine*. 2006.

La translocación de estos elementos puede mantener de manera crónica la activación inmune como resultado de la activación crónica de TLR y la renovación de células T por el reconocimiento de productos bacterianos en la circulación. Los mecanismos implicados que llevan a la activación inmune parecen incluir la apoptosis de enterocitos, la pérdida masiva de células CD4+ intestinales, la pérdida preferencial de células Th17 intestinales posiblemente por efectos virotóxicos. Además la presencia de elementos microbianos en múltiples sitios anatómicos se asocian con la expresión incrementada de IFN-alfa e IL-18 e inducción de activación inmune; lo anterior se favorece y parece perpetuarse por macrófagos disfuncionales incapaces de fagocitar los productos microbianos (44).

Los individuos que inician terapia antirretroviral (TAR) en etapas tempranas, antes de que la enteropatía sea avanzada, parece tener mejor restauración del sistema inmune en la mucosa (39). La recuperación de células CD4+ en el GALT es más lenta y retrasada en individuos que inician TAR en fases más avanzadas de la infección por VIH comparados con aquellos que inician temprano. La posible explicación de este retraso es un incremento de la expresión de genes asociados con activación inmune y disminución de la expresión de genes asociados con funciones digestivas y metabólicas intestinales (39,45). Debido a lo anterior, se ha concluido que la TAR actual mejora parcialmente el daño anatómico-funcional, la homeostasis de la microbiota y disminuye, pero no evita, la translocación de estos productos lo que puede afectar o retrasar la restauración inmune, ver Figura 3, (35,46).

Tabla 3. Resumen del impacto de la infección por VIH sobre la mucosa intestinal a diferentes etapas de la infección.

Fases	Característica
Fase temprana	<p>Disrupción de la composición de la microbiota intestinal, los individuos con VIH tienen más proporción de bacterias patógenas que los individuos sin VIH (47) y la disminución de células Th17 permite el sobre crecimiento bacteriano (40). Pérdida de las células T CCR5+ CD4+ intestinales incluyendo TH17 (18). Proteína accesoria <i>Tat</i> inhibe la captación de glucosa y gp120 incrementa las concentraciones de calcio en los enterocitos asociándose con alteración en el balance iónico (33). Aumento de la producción de citocinas pro inflamatorias y alteración de la expresión de genes relacionados con la reparación de mucosa (33).</p>
Fase crónica	<p>Capacidad monofuncional de las células T CD8 específicas para VIH (falta de capacidad de producción de IFN-γ y TNF-α (18). Los productos bacterianos pueden sobrepasar la barrera intestinal y entrar a la circulación sistémica (translocación de productos bacterianos), (33,40). Activación inmune crónica asociada con inflamación y destrucción crónica de los tejidos mucosos intestinales con translocación intestinal crónica (presencia de LPS séricos), (35).</p>
Después de tratamiento con TAR	<p>Macrófagos incapaces de fagocitar productos microbianos (44). Productos bacterianos permanecen elevados en sangre periférica (LPS, CD14, 16s rRNA) a pesar del manejo supresor con TAR, lo que afecta la restauración inmune (48). El daño enteropático parece incrementar debido a infecciones intestinales oportunistas (38).</p>

2. ANTECEDENTES MICROBIOTA Y VIH

Durante la fase crónica de la infección por VIH, el predictor de progresión de la enfermedad más importante es el nivel de activación inmune. La activación inmune en personas que viven con VIH está caracterizada por un alto recambio de células T, apoptosis de células T, y activación de células T y B además de un incremento de los niveles de citosinas pro inflamatorias y mediadores profibróticos (33,49). La infección masiva de células T CD4+ en GALT se asocia directamente con la inflamación y destrucción de las barreras mucosas intestinales (33,49). El daño a las barreras mucosas se asocian con aumento de la permeabilidad de la barrera intestinal en individuos con VIH (secundaria a la enteropatía por VIH), (36) lo que permite la translocación bacteriana (paso de los productos microbianos del lumen intestinal a la circulación sistémica en ausencia de bacteriemia evidente). Dicha translocación bacteriana está asociada con activación inmune sistémica (33,49).

Se ha sugerido que la translocación microbiana, puede tener un papel regulatorio en la activación inmune persistente en individuos con infección crónica. Los productos bacterianos que translocan son el lipopolisacárido (LPS), peptidoglucanos, ácido lipoteicoico, flagelina, DNA 16S ribosomal, y flagelina, y DNA bacteriano no metilado de contenido CpG. Estos productos disparan potentes respuestas inflamatorias innatas y adquiridas (40).

El manejo con terapia antirretroviral o TAR parcialmente restaura el daño a la mucosa y la disfunción intestinal pero no es completa. Se ha observado que aunque la reconstitución de CD4+ en la circulación periférica sea adecuada con TAR, la depleción se mantiene típicamente en los tejidos mucosos (50).

La activación inmune persiste aún en individuos con supresión virológica con TAR (VIH+ TAR+) y puede afectar la reconstitución de las células CD4+. Esto se ha asociado con la evidencia de que la translocación bacteriana, si bien disminuye con TAR, sigue estando presente en individuos con supresión viral por TAR como se demuestra en estudios donde los niveles de LPS permanecen 2 veces más elevados en este grupo de individuos que en aquellos sin VIH (33,40,49). Muchas de las alteraciones en la activación e inflamación en sujetos con VIH no tratados

(VIH+ TAR-) se atribuyen directamente a la replicación activa del VIH (43). Sin embargo, a pesar del control de la replicación con TAR de larga duración, la infección crónica por VIH se caracteriza por una expansión persistente de células T CD8 y una tasa de mortalidad mayor que aquellos sin VIH. Aún con la optimización de TAR y la supresión viral crónica, las personas con VIH siguen teniendo una tasa de mortalidad mayor (42) que la población general debido a enfermedades cardiovasculares, cánceres, osteoporosis, etc; especialmente en aquellos que inician TAR en el curso avanzado de la enfermedad e independientemente de la supresión viral y el conteo de células CD4+ (50).

Se han realizado estudios en individuos sin (VIH-) y con VIH (con y sin TAR) sobre la composición de productos bacterianos encontrados en plasma, la composición del microbioma en tejido intestinal (biopsias e hisopados) y en heces para determinar si las diferencias de composición entre ellos se asocian con diferentes respuestas inmunes (36).

En algunos estudios se ha podido correlacionar la composición del microbioma fecal con la de los productos biológicos bacterianos identificados en plasma. En estos estudios se ha concluido que la proporción de microbioma plasmático en individuos VIH+ es mayor que en individuos sin VIH (VIH-) y que el tipo de especies encontradas en el microbioma fecal y plasmático de individuos con VIH está dominado por el grupo Pseudomonadales, así también se ha reportado mayor inflamación intestinal en los individuos con VIH, Tabla 4, (34,51).

Tanto en muestras de biopsias intestinales como fecales, se ha podido describir que la diversidad microbiana es menor en los individuos con VIH que aquellos VIH-, incluso haciendo el análisis controlando por historia de consumo de antibióticos. Sin embargo, el microbioma intestinal de los individuos con VIH parece caracterizarse por tener mayor proporción de bacterias consideradas patógenas como aquellas en el grupo de *Enterobacteriaceae*, *Prevotella* y *Ralstonia*, Tabla 4, (47).

Por otro lado, la composición de los productos biológicos bacterianos encontrados en plasma y en heces difieren entre los individuos VIH+ TAR+, esta diferencia parece relacionarse con la translocación bacteriana y el tipo de respuesta inmune.

En individuos VIH+ se ha encontrado mayor proporción de bacterias, como las *Erysipelotrichaceae* (*E. bifforme*), las cuales se han asociado con mayor cantidad de TNF α periférico, lo que parece indicar que esta familia de bacterias podría tener un efecto proinflamatorio (52).

En individuos con una buena respuesta inmune o good responders (CD4s >250 después de inicio de TAR) parece existir mayor proporción de organismos del orden *Lactobacillales* en comparación con aquellos sin respuesta inmune a pesar de TAR. Los *Lactobacillales* se han vinculado con funciones antiinflamatorias, e inmunoreguladoras de células T. Estos hallazgos aportan evidencia sobre que la composición de la flora fecal parece tener un papel en la dinámica inmunológica en la infección por VIH, Cuadro 5, (46,53).

Los estudios de Pérez-Santiago et al. (53) y Lozupone CA et al. (52) concluyeron que el inicio y duración de TAR no predice la restauración o el cambio de las características de la microbiota fecal hacia un fenotipo similar al del individuo VIH-. Esto podría aportar datos a favor del porqué de la activación inmune crónica a pesar de TAR. Además, en la actualización de la cohorte de Lozupone CA en 2014 se ha concluido que la recuperación diferencial y variable de varios taxones con el inicio de TAR puede reflejar la recuperación de varios componentes del sistema inmune de GALT y existen muchos factores que controlan la prevalencia y el grado de esta recuperación (54).

Tabla 4. Resumen de estudios sobre microbiota en la infección por VIH

Autor/ año	Intervención	Tipo de muestra y metodología	Hallazgos principales
Gori et al. 2008 (34)	57 sujetos con HIV naive a ART y nivel de CD4+ >500 Análisis de la microbioma y medición de calprotectina	FISH, PCR cuantitativa en tiempo real. ELISA. Tipo de muestra: Heces	<i>P. aeruginosa</i> presente en 92% de los individuos. Altos niveles de calprotectina en >50% de los individuos estudiados. (Calprotectina: Proteína secretada por los neutrófilos y marcador indirecto de inflamación intestinal)
Li et al. 2012 (51)	Medición de microbioma plasmático en 10 individuos en cada grupo. -(VIH+ TAR-) y CD4s <200 -HIV -	DNA plasmático y secuenciación de genoma completo con Illumina Genome Analyzer	Mayor proporción de microbioma plasmático en VIH (7% de las secuencias) que en VIH- (0.0084%). En VIH se encontró predominio de Pseudomonadales (72%), Lactobacillus (4.92%), y en no-VIH Clostridiales (42.9%), y Verrucomicrobiales (23.6%).
Merlini et al. 2011 (46)	Estudio longitudinal (N=44) con un grupo con VIH y CD4s < 200 células/mL. Después de 12 meses de TAR se dividieron en dos grupos: 1. con respuesta inmune parcial -PIR- (CV<60 y CD4>250) y 2. no respondedores inmunes-NRI- (CV<60, CD4<200).	Midieron LPS plasmáticos por ELISA, DNA bacteriano plasmático con PCR y secuenciación del gen 16S rRNA con el analizador genético ABI PRISM de Applied Biosystems.	El grupo NRI tuvo mayores niveles plasmáticos de 16s rDNA. La composición bacteriana del DNA encontrado, tanto al inicio del estudio como 12 meses después de TAR, fue similar tanto en PIR como en NRI. La única diferencia fue la proporción de los <i>Pseudomonadales</i> y <i>Lactobacillales</i> (mayores en pacientes PIR.)
Ellis et al. 2011 (55)	Se incluyeron 10 pacientes con VIH+ TAR-, 6 con TAR y 5 controles sanos VIH-.	Se realizó citometría, toma de biopsia duodenal y heces previo a TAR y control a 9 meses. Se realizó con inmunohistoquímica. En heces, cuantificación del gen 16S rRNA por PCR cuantitativa	El grupo VIH+ TAR- tuvo más CD8 circulantes con fenotipo activado. En heces se encontró una tenencia a mayor proporción de <i>Enterobacteriales</i> en pacientes con VIH+ TAR-. Los <i>Bacteroidales</i> se asociaron con mayor proporción de CD8 periféricos, y los <i>Enterobacterias</i> se correlacionaron con una baja proporción de células CD8 duodenales.
Perez-Santiago et al. 2013 (53)	Estudio longitudinal de 11 individuos con VIH+ TAR+ Con seguimiento por un año.	Se realizaron hisopados anales y cuantificación de LPS en suero. Se usó región V6 del 16s rRNA y pirosecuenciación de DNA de heces con la plataforma Roche 454 FLX Titanium.	Los individuos con menos CD4+ antes de TAR tuvieron menor proporción de <i>Lactobacillales</i> , <i>Enterobacteriales</i> y <i>Pseudomonadales</i> , y mayor proporción de <i>Bacteroidales</i> y <i>Clostridiales</i> . A la semana 48 de TAR se documentó una tendencia positiva en la proporción de <i>Lactobacillales</i> con recuperación de CD4s+ y menor tasa de translocación bacteriana

Autor/ año	Metodología/ e intervención	Tipo de muestra y metodología	Hallazgos principales
Lozupone CA et al. 2013 (52)	Estudiaron 4 cohortes, una con infección reciente por VIH+ y TAR- (n=3), otra con infección crónica VIH+ TAR- (n=11), el 3er grupo con VIH+ TAR+ > 12 meses (n=8) y un grupo control VIH- (n=13)	Se colectaron muestras de heces y se usó PCR con la región V4 del gen 16S rRNA. Secuenciación con MiSeq personal sequencer de Illumina. Las secuencias se analizaron con el QIIME 1.5.0. Se asignaron OTUs a 97% de identificación.	Los individuos con VIH+ TAR+ por al menos 8 meses tuvieron una diversidad bacteriana mayor. En el grupo con VIH+ TAR- tuvieron una mayor abundancia de <i>Prevotellaceae</i> , <i>Erysipelotrichaceae</i> , <i>Veillonellaceae</i> , <i>Clostridium</i> cluster XIII y mientras que los controles sin VIH mayor proporción de <i>Bacteroidaceae</i> , y <i>Porphyromonadaceae</i> .
Mutlu et al. 2014 (47)	Se obtuvieron 121 muestras de 21 sujetos con VIH y 22 sujetos controles VIH-.	Se obtuvieron de un banco de tejidos muestras de biopsias de íleon y colon y muestras de heces. Se realizó pirosecuenciación del gen 16s rRNA en una plataforma 454 GS FLX y análisis con QIIME	El número de OTUs observados en el grupo con VIH fue menor que en el grupo control, incluso al controlar por consumo de antibióticos. El grupo con VIH tuvo mayor proporción de bacterias consideradas patógenas (<i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Prevotella</i> y <i>Ralstonia</i>) Las muestras tomadas de biopsias mostraron mejor las diferencias que las de heces.
Dillon SM et al. 2014 (56)	Dos grupos pareados por sexo y edad: uno con VIH (N=18) y otro control VIH- (N=14), reclutados VIH+ TAR- y seguidos por 6 meses.	Muestras de heces, biopsias de colon, y suero y plasma. Se realizó citometría de flujo y citosinas con ELISA. Secuenciación del gen 16s rRNA con la región V4. Se usó plataforma MiSeq Illumina.	En biopsias de colon, la abundancia relativa de familia <i>Prevotellaceae</i> fue mayor y la de <i>Lachnospiraceae</i> y <i>Bacteroidaceae</i> menor en individuos con VIH. Estos hallazgos correlacionan en muestras lumbales y de heces, pero no aplica para todos los grupos bacterianos. <i>Prevotella</i> parece asociarse con estados proinflamatorios.
Lozupone C. 2014 (54)	Estudiaron 4 cohortes, una con infección crónica VIH+ TAR- (n=12), otra con infección crónica VIH+ TAR+ <12 meses (n=11), el 3er grupo con VIH crónico TAR+ > 12 meses (n=17) y un grupo control VIH - (n=15)	Se colectaron muestras de heces y se usó PCR con región V4 del gen 16S rRNA. Secuenciación con MiSeq de Illumina. Las secuencias se analizaron con QIIME 1.8. Se asignaron OTUs a 97% de identificación.	Los Bacteroides disminuyen en individuos con VIH y permanecen disminuidos a pesar de inicio de TAR. El género <i>Prevotella</i> se ha encontrado aumentado en individuos con VIH y su proporción disminuye con TAR pero no a niveles de individuos sin VIH.
Nowvak P, et al. 2015 (57)	Cohorte con 3 grupos. Uno de pacientes virémicos (n=28), otro con elite-controllers (n=3), y el grupo control VIH- (n=9)	Extracción de DNA de heces. Uso de las regiones v3-v4 del 16s rRNA y secuenciación en la plataforma MiSeq de Illumina. El análisis con QIIME y las OTUs se clasificaron a 97% de identidad.	Se encontró menor número de especies y alfa diversidad, medido con el índice de Shannon, entre los individuos con VIH comparado con aquellos sin VIH. EL número de especies y la menor diversidad se asoció con menores niveles de CD4s en individuos virémicos.

TAR: Terapia antiretroviral. CV: Carga viral LPS: Lipopolisacárido TNF: factor de necrosis tumoral. LTA: Acido lipoteicoic

3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿CÓMO CAMBIA LA COMPOSICION Y DIVERSIDAD DEL MICROBIOMA FECAL DE LOS PACIENTES CON VIH ANTES Y DESPUÉS DE TERAPIA ANTIRRETROVIRAL (TAR)?

4. DEFINICION DEL PROBLEMA

La microbiota intestinal es pieza fundamental en el mantenimiento del balance entre la salud y la enfermedad. Múltiples ejemplos en humanos, modelos animales y estudios *in vitro* han reportado el papel de la microbiota intestinal en este balance, por ejemplo, en el desarrollo de la inmunidad adaptativa, la maduración del GALT, en el control metabólico, en la patogénesis de algunas neoplasias, enfermedades intestinales, obesidad y en las dislipidemias (2). La dieta, los antibióticos y la inflamación intestinal alteran la microbiota intestinal y por lo tanto su papel funcional en el cuerpo humano (10,21).

Los individuos infectados con VIH presentan una condición llamada enteropatía por VIH caracterizada por lesión en la lámina propia de mucosa intestinal, malabsorción, inflamación, aumento de la permeabilidad intestinal y depleción de linfocitos intestinales. Dicha enteropatía ocurre en pacientes con primoinfección y con enfermedad crónica avanzada, sin asociación de afección bacteriana (18).

Debido a la ruptura sustancial de la barrera anatomo-funcional GI en pacientes con VIH y a la falla progresiva de la inmunidad en la mucosa intestinal ocurre la translocación de productos bacterianos hacia la circulación sistémica. Ésta translocación participa de manera activa en la activación del sistema inmune. La TAR actual mejora parcialmente el daño anatomo-funcional, la homeostasis de la microbiota y disminuye, pero no evita, la translocación de estos productos, lo que puede afectar o retrasar la restauración inmune (40). Aún con la optimización de la TAR y la supresión viral crónica, las personas con VIH siguen teniendo una tasa de mortalidad mayor que la población general debido a enfermedad cardiovascular, cáncer, osteoporosis, etc; especialmente en aquellos que inician TAR en el curso

avanzado de la enfermedad e independientemente de la supresión viral y el conteo de células CD4+ (50).

5. JUSTIFICACION

Identificar el origen de la inflamación crónica del sistema inmunológico es de gran importancia en la lucha contra la infección por VIH. Parece existir 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.

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 conduce a la translocación microbiana que a su vez contribuye a la activación crónica y sistémica del sistema inmunológico y a la progresión a la enfermedad y mortalidad. El inicio de TAR parece disminuir la translocación bacteriana pero no la evita por completo, lo que podría explicar parcialmente la persistencia de los fenómenos antes descritos.

Con este estudio pretendemos contribuir al conocimiento de los cambios en la microbiota asociados con TAR al describir las características del microbioma fecal, en individuos mexicanos atendidos en el CIENI, antes y después de su inicio.

6. OBJETIVOS

1. OBJETIVO GENERAL

- a. Describir la composición y diversidad del microbioma fecal de los pacientes con VIH antes y después de iniciar TAR

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a. Estudiar la relación de las características antropométricas con el microbioma fecal de los individuos con VIH antes y después de TAR
- b. Estudiar la relación de las características de la dieta con el microbioma fecal de los individuos con VIH antes y después de TAR
- c. Estudiar la relación de las características clínicas y bioquímicas con el microbioma fecal de los individuos con VIH antes y después de TAR

7. HIPOTESIS

La composición del microbioma intestinal estará modificada en individuos con VIH en relación con individuos no infectados. Se encontrará predominio de bacterias consideradas patógenas en los individuos con VIH sin tratamiento (VIH+,TAR-). La diversidad de la microbiota fecal de los individuos con VIH será menor que en los individuos sin VIH. La composición y diversidad del microbioma fecal será diferente después de iniciado el TAR.

8. METODOLOGÍA

8.1 Diseño del estudio

Se trata de un sub-estudio derivado del proyecto intitulado **“Estudio genómico y funcional del microbioma intestinal de individuos mexicanos infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) a diferentes etapas de la infección con o sin tratamiento antirretroviral comparado con individuos no infectados”** con número de protocolo B-36-12, aprobado por el comité de ética del INER para su realización por 5 años, ver anexos.

El presente sub-estudio es observacional, longitudinal y prospectivo en el que se estudiaron las características de la composición y diversidad de la microbiota fecal por medio de técnicas de nueva generación de secuenciación masiva de la porción v3-v4 del gen 16S rRNA bacteriano con la plataforma MiSeq de Illumina (Illumina, San Diego, EEUA).

La valoración de las características de la microbiota intestinal se acompañó de una evaluación clínica por medio de un formato estandarizado, y evaluación con pruebas bioquímicas (conteo de células T CD4, CD8, química sanguínea, pruebas de función hepática, biometría hemática, perfil de lípidos etc), ver anexos.

8.2 Cohorte de estudio

Los pacientes se seleccionaron de la población que atiende sus problemas de salud en el INER/CIENI durante 2013-2014. Todos firmaron el consentimiento informado, ver anexos.

5. GRUPOS DE ESTUDIO

Un total de 37 pacientes fueron seleccionados y agrupados de la siguiente manera:

- a. Grupo de individuos con VIH sin TAR previo (VIH+, TAR-) al inicio del estudio y posterior seguimiento longitudinal cada 6 meses a partir del inicio de TAR (N=9, se reportó aquellos con seguimiento a 6 meses de inicio de TAR).
- b. Grupo con VIH en tratamiento con TAR por más de 2 años, (VIH+, TAR+), (N=19).
- c. Grupo de controles sin VIH (N=9).

Criterios de inclusión, exclusión y eliminación

Criterios de inclusión

- En todos los casos los individuos deben tener 18 o más años sin límite superior de edad y que acepten participar y firmen el consentimiento informado.

Criterios de exclusión

- Toma de antibióticos en las últimas 2 semanas.
- Suspensión o cambio de régimen de TAR en el grupo longitudinal.

Criterios de eliminación

- El paciente que después de dar su consentimiento para el estudio, decidió retirarse del seguimiento, pero no se excluyó del análisis.

Variables

Variables principales

- Diversidad de la microbiota fecal
- Composición taxonómica de la microbiota fecal

Co-variables

- Características de la dieta, por medio de cuestionarios estandarizados realizados por el equipo de nutriología de CIENI, ver anexos.
- Carga viral y conteo de CD4+
- Frecuencia de ejercicio y tipo
- Historia de infecciones oportunistas previas no activas
- Historia o consumo actual de tabaco y/o alcohol
- Peso, Índice de masa corporal (IMC)
- Perdida o ganancia de peso

Calculo del tamaño de muestra

No fue realizado ya que es un estudio exploratorio.

8.3 Materiales y procedimientos

1. Materiales y consumibles

En la tabla 5 se enumeran los consumibles y equipos que se requirieron durante el estudio para el procesamiento de las muestras de heces recolectadas.

Tabla 5. Consumibles y equipos

Consumibles	Proveedor
Tubos de microcentrífuga 1.5, 2.0 ml	Laboratorio CIENI
Puntas de pipeta 10 ul, 20 ul, 200 ul , 1000 ul	Laboratorio CIENI
Pipetas de 10 ul, 20 ul, 200 ul, 1000 ul.	Laboratorio CIENI
QIAamp DNA stool mini kit	QIAGEN
Etanol 96-100% y al 80%	Laboratorio CIENI
Hielo	Laboratorio CIENI
Qubit dsDNA HS Assay kit	Thermo FisherScientific
Tubos invitrogen	Thermo FisherScientific
10x HF buffer	Invitrogen
10 mM dNTPs	Invitrogen
50 mM MgSO4	Invitrogen
1 mM F Primer V3-V4	

1 mM R Primer V3-V4	
DMSO	Invitrogen
Taq POL (Platinum Taq DNA polymerase High Fidelity kit)	Invitrogen
H2O libre de nucleasas	Laboratorio CIENI
10 mM Tris pH 8.5	Invitrogen
AMPure XP beads y magneto	Illumina
Placas de 96 pozos para PCR	Life Technologies
Nextera XT index 1 primer y kit	Illumina
Nextera XT index 2 primer y kit	Illumina
HT1 (buffer de hibridación)	Illumina
0.2 N NaOH	Sigma-Aldrich
PhiX Control kit v3 (FC-110-3001)	Illumina
Agarosa	Sigma-Alrich
Marcador buffer de 100 pares de bases y gel red	Invitrogen
Equipos	Proveedor
Centrífuga con rotor para tubos de 2 ml	Laboratorio CIENI
Ultracongelador	Laboratorio CIENI
Baño María	Laboratorio CIENI
Vortexer	Laboratorio CIENI
Fluorometro Qubit 2.0 de Invitrogen™	Thermo FisherScientific.
Aparato electroforético con fuente de energía	CIENI
Termociclador Veriti ®	Thermo FisherScientific
MiSeq	Illumina

2. Procedimientos

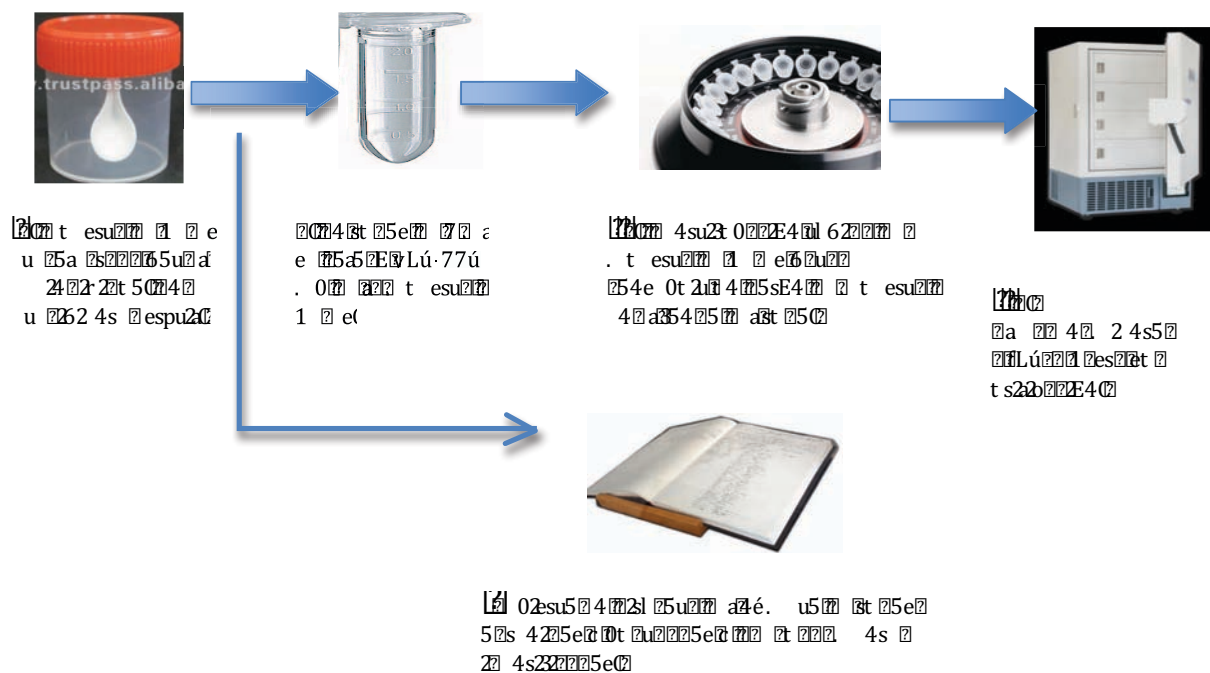
Recolección de información y muestras clínicas.

1. Antes de ingresar al laboratorio para procesar las muestras, fue necesario tomar un curso de bioseguridad y los procedimientos se realizaron siempre bajo la supervisión del tutor.
2. Previa explicación del protocolo y firma de consentimiento informado, se realizó un cuestionario predeterminado de antecedentes clínicos, nutricionales (realizado por el servicio de nutriología), y se realizaron:

densitometría ósea, y estudios clínicos en el momento del ingreso al protocolo y cada 6 meses a partir del inicio de TAR (en el caso del grupo de seguimiento longitudinal) por el laboratorio de diagnóstico clínico del CIENI y laboratorios clínicos del INER . Además, se solicitó a los individuos otorgar una muestra de heces que tomaron ellos mismos, siguiendo las indicaciones de los investigadores, ver anexos.

3. Las muestras de sangre fueron procesadas por el LDV de CIENI para conteo de células CD45+, CD3+, CD4+, CD8+ y para la determinación de la carga viral; además se envió muestra al laboratorio central del INER para realización de estudios bioquímicos (biometría hemática, química sanguínea, perfil de lípidos, y perfil hepático)
4. Se solicitó a los participantes del estudio que la muestra de heces debía ser obtenida en el momento de su cita de protocolo o la noche previa a la cita y estar contenida en un recipiente de plástico sellado estéril. Figura 4.
5. Una vez entregada la muestra de heces se procedía a colocar aproximadamente entre 180-220 mg de heces en tubos eppendorf lo-bind de 2 ml y se les colocó a -80 grados en un ultracongelador hasta que se requiriera procesar la muestra. Figura 9.

Figura 9. Recolección y almacenamiento de muestra de heces.

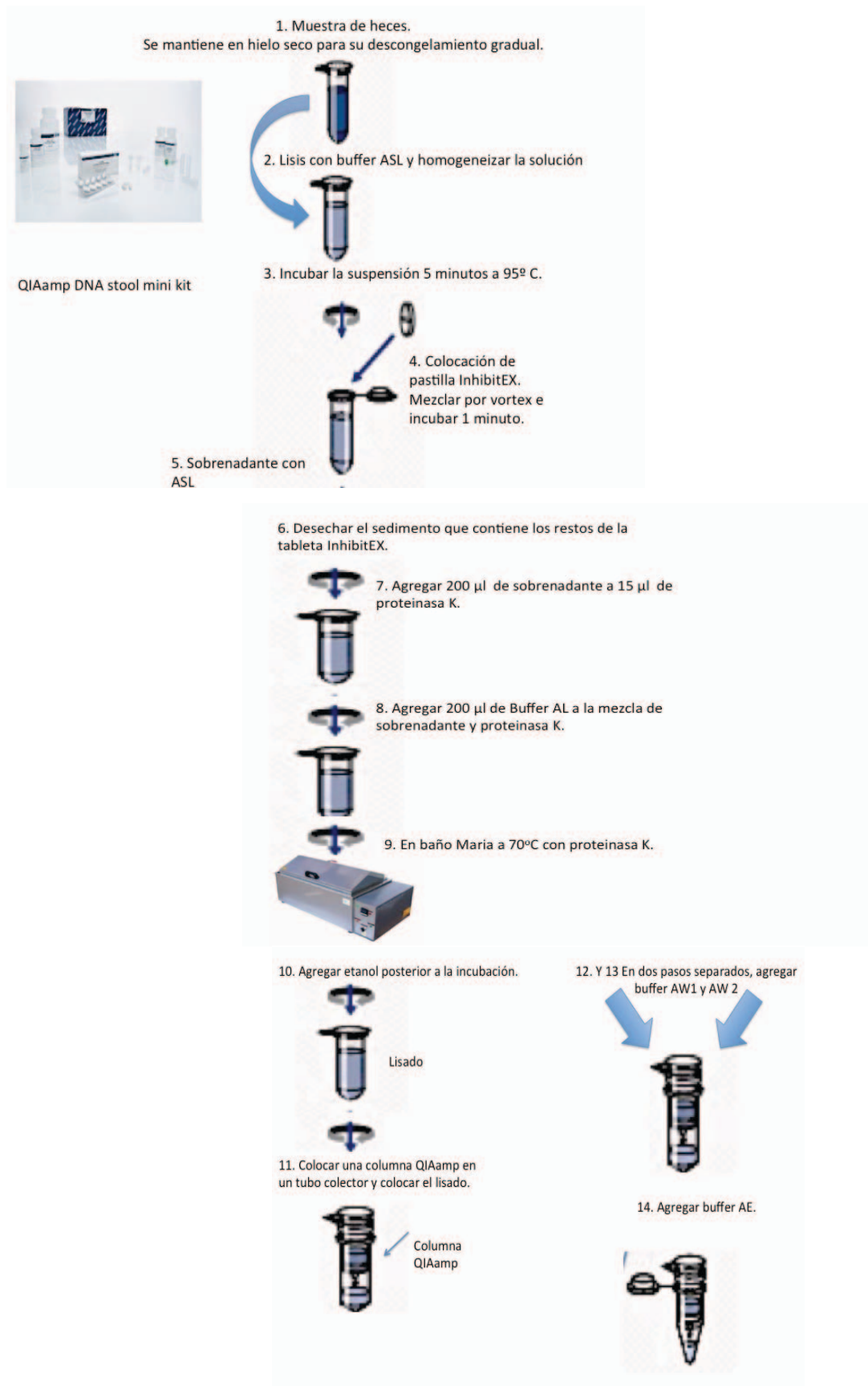


Extracción de DNA

1. Se realizó la extracción de DNA de las muestras de heces recolectada con el QIAamp DNA Stool mini kit y siguiendo las instrucciones del proveedor.
2. Se incluyó un control negativo del procedimiento de la extracción de DNA, usando el buffer de elución (buffer AE) en vez de muestra de heces para determinar la posible contaminación de DNA bacteriano durante los procedimientos realizados provenientes del kit.
3. Se realizó lisis celular alcalina con el buffer ASL para solubilizar la pared celular y permitir el proceso de desnaturalización del DNA.
4. Se calentó la suspensión por 5 minutos a 95° C. A diferencia de las células humanas que se lisan a 15-20° C, las bacterias, sobre todo las Gram positivas son difíciles de lisar por lo que debe hacerse a 95 grados.
5. Se mezcló usando Vortexer por 15 segundos y centrifugó 1 minuto a velocidad completa.
6. Tomamos 1.2 ml del sobrenadante que obtuvimos y se colocó en un nuevo tubo de microcentrífuga de 2 ml y desechamos el sedimento.
7. Se colocó una tableta InhibitEX a cada muestra y mezcló con vortexer hasta homogeneizar. Incubamos 1 minuto para permitir que los inhibidores absorban hacia la matriz de la tableta. La tableta absorbe las sustancias que dañan el DNA, y también absorbe inhibidores potenciales de la PCR.
8. Centrifugamos la muestra a velocidad máxima por 3 minutos para sedimentar los inhibidores unidos a la matriz de la tableta InhibitEX.
9. Tomamos el sobrenadante y colocamos en un nuevo tubo de microcentrífuga de 1.5 ml y tirando el sedimento. Centrifugamos a velocidad completa 3 minutos.
10. Colocamos 15 µl de proteínasa K (proteasa endolítica que sirve para digerir DNAsa y RNAsas además de otros residuos hidrofobicos, aromáticos etc) en un tubo nuevo de 1.5 ml con 200 µl del sobrenadante del paso 9 al tubo de 1.5 ml que contiene la proteínasa K.

11. A la mezcla de sobrenadante y proteínasa K agregamos 200 μ l de Buffer AL y mezclar con vortexer por 15 segundos.
12. La mezcla del punto 11 se incubó a 70°C por 10 minutos (en la digestión de proteínas a temperatura de desnaturalización de DNA, la proteínasa K tendrá un efecto de su actividad a esta temperatura).
13. Agregamos 200 μ l de Etanol al 96-100% al lisado y mezclamos con vortexer. Después centrifugamos brevemente. El etanol favorece la precipitación del DNA al favorecer su hidrofobicidad.
14. Se usó una columna nueva QIAamp colocada en un tubo de recolección de 2 ml (ver Figura 10).
15. Cuidadosamente colocamos el lisado del paso 14 a la columna QIAamp sin humedecer la rueda de goma. Centrifugar a velocidad completa por un minuto. El DNA se une a la membrana del QIAamp.
16. Se volvió a colocar la columna QIAamp en un nuevo tubo de recolección y descartar el previo.
17. Se agregó a la columna QIAamp 500 μ l Buffer AW1 y centrifugamos a velocidad completa por un minuto. Para remover concentraciones de sales, proteínas e impurezas que inhiban las reacciones de PCR posteriores.
18. Repetimos el paso 16 y agregamos 500 μ l Buffer AW2, y centrifugamos por 3 minutos a velocidad completa. Para remover concentraciones de sales, proteínas e impurezas que inhiban las reacciones de PCR.
19. Se transfirió la columna QIAamp a un nuevo y etiquetado tubo de microcentrífuga de 1.5 ml.
20. Agregamos al tubo del paso previo, 200 μ l Buffer AE, incubamos 1 minuto y centrifugamos 1 minuto a velocidad total para eluir el DNA.

Figura 10. Extracción de DNA



Cuantificación de DNA extraído de muestras de heces.

1. Se realizó cuantificación por fluorimetría del DNA extraído de las muestras usando el Qubit dsDNA HS Assay kit y fluorómetro Qubit 2.0 (Thermo Fisher Scientific). Se usó este kit debido a que es altamente sensible para DNA de doble cadena sobre RNA y está diseñado para hacer cuantificaciones exactas desde 10 pg/ μ l a 100 ng/ μ l.
2. Todas las muestras fueron diluidas 1:10 para su cuantificación y tomado en cuenta para el cálculo posterior de la concentración. Además de las muestras, se incluyeron los estándares descritos por el proveedor (los cuales sirven de control de calidad y calibración para la generación de datos) y un control negativo con agua, el control negativo del Kit de extracción de DNA y un control de DNA humano procedente de células PBMCs (periferal blood mononuclear cells).
3. Preparación de la solución de trabajo (mastermix)
 - a. Diluir el reactivo Qubit HS con el buffer Qubit HS en una relación 1:200
 - b. Calcular la cantidad de cada reacción tomando en cuenta que el volumen total de cada reacción debe ser 200 μ l, de los cuales 198 μ l fueron de mastermix para cada muestra de estudio y 190 μ l para la preparación de los estándares de calibración y calidad. Figura 11.
4. Preparación de estándares para la calibración previa a la cuantificación de las muestras:
 - a. Después de identificar los tubos, agregamos 190 μ l de la solución de trabajo a cada uno de los 10 μ l de los dos estándares (ST1, ST2). Figura 6a
5. Al usar el fluorómetro, escoger DNA en la pantalla para especificar el tipo de muestra por analizar, posteriormente escoger el tipo de ensayo: dsDNA High Sensitivity
6. Presionar "YES" para calibrar con los estándares. Leer primero el ST1 y luego el 2.
7. El ST1 contiene 0 ng/ μ l por lo que su lectura debe ser 0 (<0.5 ng/ μ l)
8. El ST2 contiene 10 ng/ μ l por lo que la lectura debe ser alrededor de 100 ng/ μ l
9. La lectura de los estándares permite que se forme una línea que permite determinar la concentración de las muestras de estudio.

10. Posteriormente se hace lectura del control negativo (agua) y después cada una de las muestras.

11. Cálculo de la concentración de DNA

- El fluorómetro da una cuantificación en ng/mL
- Este valor corresponde a la concentración después de que la muestra fue diluida hacia el tubo de ensayo.
- Para calcular la concentración de la muestra se usa la siguiente fórmula

Concentración de la muestra en ng/mL: $\text{valor QF} \times 200/X$

- QF es el valor de lectura del fluorómetro
- X es el número de micro litros de la muestra
- En el caso de dilución previa de la muestra (1:10) se multiplicó además por 10

Figura 11. Cuantificación de DNA por fluorometría

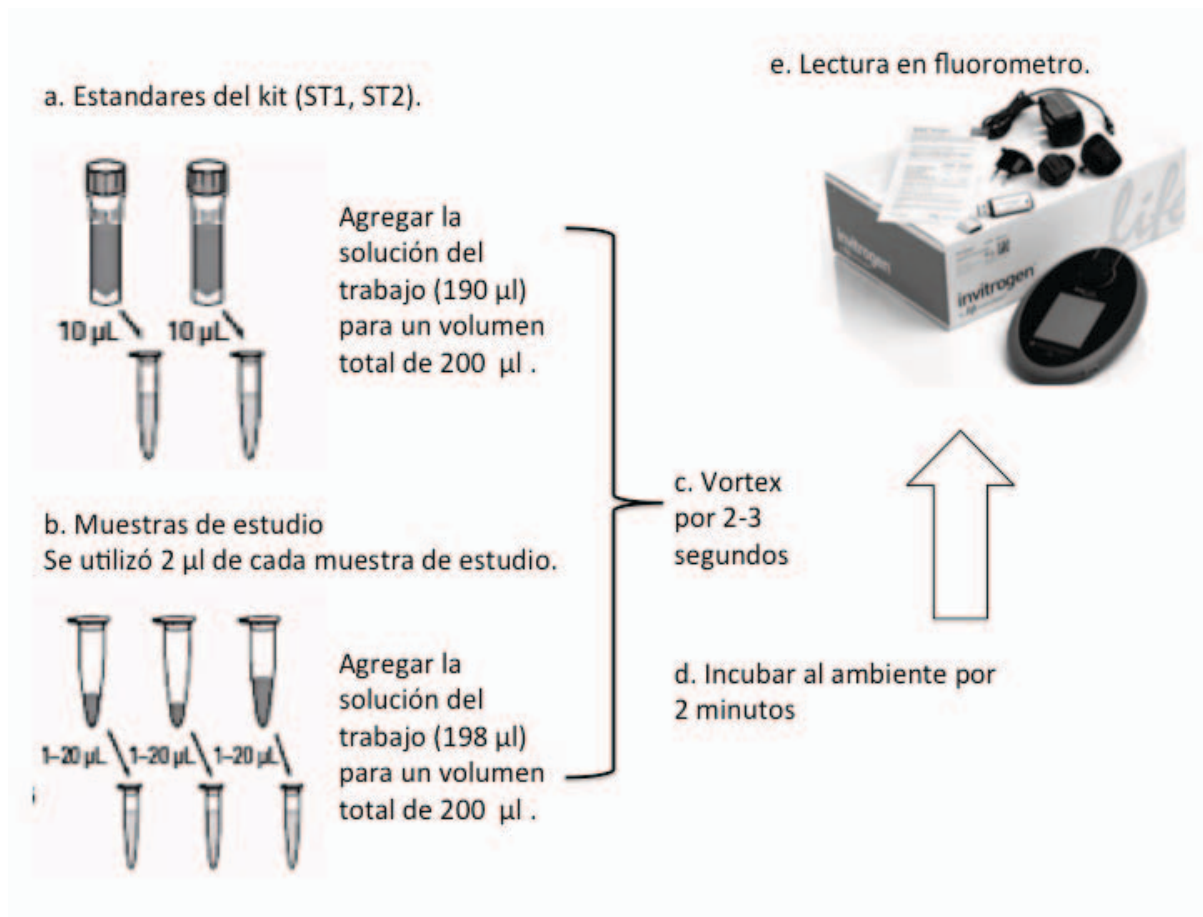


Tabla 6. Concentración en ng/ μ l de DNA extraído medida con fluorómetro Qubit 2.0:

Muestra	ng/ul	Muestra	ng/ul	Muestra	ng/ul	Muestra	ng/ul
001	48	015	26.6	039	3.2	060	36
003	35	018	26.6	043	21	064	3.1
004	68.5	019	5.6	044	7.9	071	9.7
005	20	020	11	045	17		
006	55	023	8.5	047	4.7	076	20
011	32.5	033	10.3	048	23	078	16
013	7.4	034	9.8	025	19	079	5.4
014	14.6	037	32	058	24.5	080	5.3
083	9.5	093	57	042	33.1	091	68
084	8.2	094	4.2	052	26.2	098	32
088	17.5	095	24	021	116		
089	3.9	096	16	Human DNA	<0.5	NTC Kit (buffer AE)	<0.5

Amplificación, secuenciación y análisis del DNA obtenido de las muestras de heces.

1. Resumen del flujo de trabajo para la amplificación, secuenciación y análisis del DNA extraído:

- A. El protocolo de amplificación requirió un par de primers de secuencia para la región V3 y V4 que crean un solo amplicon de aproximadamente 460 pb (pares de bases).
- B. El protocolo también incluyó un par de secuencias adaptadoras en los extremos que deben anexarse al par de primers de secuencia para la permitir la compatibilidad entre los índices Illumina y los adaptadores de secuencia.
- C. Se siguió el protocolo 16S Metagenomic Sequencing Library preparation de Illumina para amplificar las regiones V3 y V4. Se usó PCR, adaptadores de secuencia Illumina e índices duales codificados para el amplicon. Usando el complemento de los índices Nextera XT, se crearon las bibliotecas requeridas, pudiendo ser hasta 96 (ver figura 12).

Figura 12. Para la preparación de las bibliotecas se siguió el protocolo 16s metagenomic sequencing library preparation de Illumina.

Dicho protocolo tiene el siguiente flujo de acciones:



- D. Para la secuenciación se utilizó el equipo/plataforma MiSeq de Illumina. La plataforma MiSeq realiza lecturas de 300 pb pareadas, y los extremos de cada lectura se sobrepone para generar lecturas de longitud completa y de alta calidad de las regiones V3 y V4 en una sola corrida de 65 hrs. La corrida de la plataforma de MiSeq es de más de 20 millones de lecturas y asumiendo 96 muestras indexadas, puede generar >100,000 lecturas por muestra, lo cual es suficiente para los estudios de metagenómica.
- E. El análisis 16S es una opción de análisis secundario construido en el software del sistema MiSeq (MiSeq Reporter) o disponible en el software en la nube de BaseSpace de Illumina. El flujo de trabajo lleva a cabo una clasificación taxonómica usando la base de datos Greengenes mostrando la clasificación a nivel de género o especie en un formato de gráfica.

2. Primers del amplicon

- A. Las secuencias específicas de gen utilizadas en este protocolo se dirigen a la región V3 y V4 del gen 16S. Los adaptadores Illumina de secuencia en los extremos se anejan en las extremidades 5'. El tamaño de los primers de secuencia, usando la nomenclatura de nucleótidos IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry), para usar en este protocolo son:
- 16S Amplicon PCR Forward Primer = 5'
TCGTCCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG
 - 16S Amplicon PCR Reverse Primer = 5'
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC
- B. Los adaptadores de secuencia en los extremos deben ser anejados al locus específico del primer. Los adaptadores de secuencia en los extremos Illumina que deben anejarse al locus de secuencia específica son:
- Forward overhang: 5'
TCGTCCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG [locus-specific sequence]
 - Reverse overhang: 5'
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG - [locus-specific sequence]

3. PCR del amplicon (primera PCR)

Se amplificaron los DNA extraídos de las muestras de heces y los controles negativos usando los primers específicos de la región de interés con los adaptadores externos de interés en triplicado.

Para cada muestra se preparó la siguiente mezcla,

Tabla 7: Preparación y composición de la solución de trabajo para PCR

REACTIVO	VOL POR REACCIÓN/muestra
10x HF buffer	2.5 ul
10 mM DNTPs	0.5 ul
50 mM MgSO ₄	2.0 ul
1 mM F Primer	5 ul
1 mM R Primer	5 ul
DMSO	1.25 ul
Taq POL	0.25 ul
H ₂ O libre de nucleasas	6 ul
DNA	2.5 ul
Volumen total por reacción	25 ul

Se realizó PCR con el siguiente protocolo, usando un termociclador de Thermo FisherScientific, Tabla 8.

Tabla 8. Protocolo de amplificación programado en termociclador

Etapa	Ciclos	Temperatura	Tiempo
1	1	95°	3 minutos
2	25	95°	30 segundos
		55°	30 segundos
		72°	30 segundos
3	1	72°	5 minutos
4	1	4°	hold

La amplificación exitosa del DNA por PCR fue determinada por electroforesis en un gel de agarosa de 2%, ver figura 13a-c.

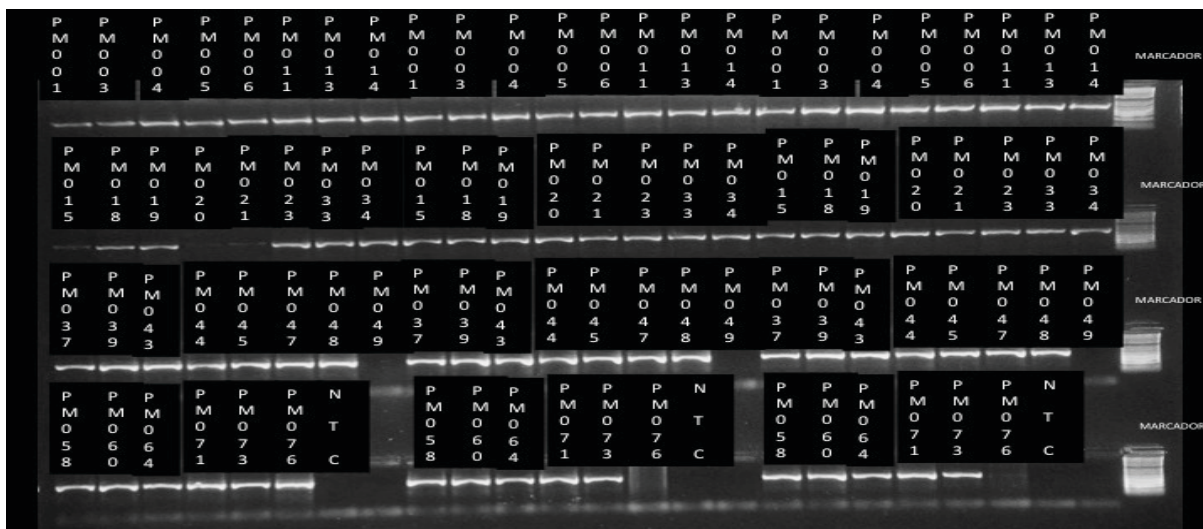


Figura 13a: Electroforesis de las muestras en triplicado. Gel de agarosa al 2%.



Figura 13b: Electroforesis de proteínas en gels al 2% de las muestras en triplicado

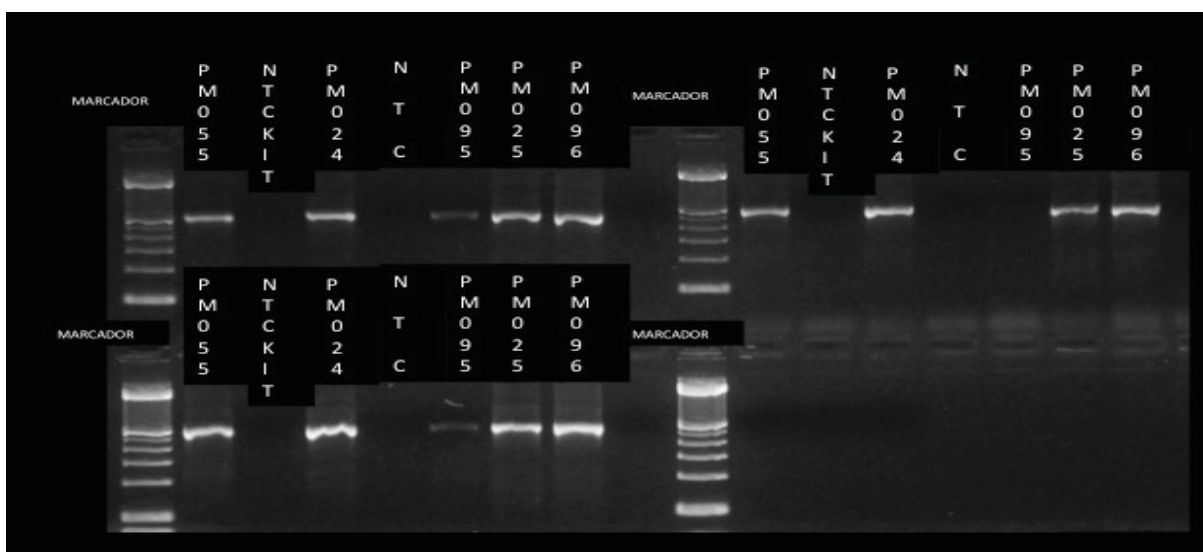


Figura 13c: Electroforesis de las muestras en triplicado y los controles negativos (NTC, NTCKIT)

4. Purificación de DNA (Limpieza de la primera PCR)

PURIFICACIÓN DE LA PRIMERA PCR

- A. Después de la amplificación por triplicado cada muestra, se juntaron todas las muestras correspondientes para la purificación de cada amplificado.
- B. Todas las muestras que amplificaron se purificaron para retirar dímeros de primer y primers libres. La purificación se realizó con perlas de AMPURE XP y dos lavados con etanol al 80% (ver figura 14).

Figura 14. Uso de perlas de AMPURE y cama magnética: Al unirse las perlas de AMPure al DNA amplificado, el etanol y el uso de una cama magnética facilita la separación de los dímeros y primers libres

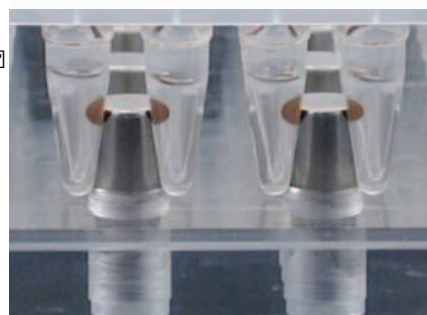


707e577 6 ua2e772 22227727M @ 14 4775e77 6a22225e77
24222 20 477 7uu22275uu e6542 7ay 170

7775a522u25e77 25e77M 7754s2 4 477e77 ua2e77542
a5e77 6a2254 e77 477 47777 77 204ps22277
25uu e6542 775e77é. u5e97777 2230t u777 2
2uu222C



9777r 225e775477 2LúÓ 77277 42e 22e77 ua2e2477 42
25sE40u2222e7777777 22 204ps22277 6 u 2 42
a5e22r 225e772477 u2 u25e77 6a22225e77



5. PCR de índices (segunda PCR)

- i. Previo a realizar la segunda PCR y colocar los índices, se generó una hoja de planeación para saber cómo colocar los índices con respecto de las muestras. En la tabla 9 se coloca muestra cómo se planearon las bibliotecas.

Tabla 9: Hoja de planeación de bibliotecas (colocación de amplicon con índices de secuencia correspondientes)

		PRIMERS DE ÍNDICES 1							
		N701	N702	N703	N704	N705	N706	N707	N708
P R I M E R S D E Í N D Í C E S 2	S501	001	015	039	060	081	092	100	040
		N701	N702	N703	N704	N705	N706	N707	N708
		S501	S501	S501	S501	S501	S501	S501	S501
	S502	003	018	043	064	083	093	101	042
		N701	N702	N703	N704	N705	N706	N707	N708
		S502	S502	S502	S502	S502	S502	S502	S502
	S503	004	019	044	071	084	094	102	052
		N701	N702	N703	N704	N705	N706	N707	N708
S503		S503	S503	S503	S503	S503	S503	S503	
S504	005	020	045	073	085	095	103	055	
	N701	N702	N703	N704	N705	N706	N707	N708	
	S504	S504	S504	S504	S504	S504	S504	S504	
S505	006	023	047	076	088	096	104	NTCKIT	
	N701	N702	N703	N704	N705	N706	N707	N708	
	S505	S505	S505	S505	S505	S505	S505	S505	
S506	011	033	048	078	089	097	012	024	
	N701	N702	N703	N704	N705	N706	N707	N708	
	S506	S506	S506	S506	S506	S506	S506	S506	
S507	013	034	025	079	090	098	Human	NTC	
	N701	N702	N703	N704	N705	N706	N707	N708	
	S507	S507	S507	S507	S507	S507	S507	S507	
2508	014	037	058	080	091	099	028	021	
	N701	N702	N703	N704	N705	N706	N707	N708	
	S508	S508	S508	S508	S508	S508	S508	S508	

- ii. Los índices son duales, cada uno contiene 8 bases. A cada muestra se le adiciona un índice 1 (i7) y un índice 2 (i5). Los índices están contenidos en el 96 sample Nextera XT Index kit y tiene 12 adaptadores diferentes de índice 1 (i7, N701-N712) y 8 adaptadores diferentes de índice 2 (i5, S501-S508), ver tabla 10.

Tabla 10. Secuencia de los índices

Índice 1 (i7)	Secuencia	Índice 2 (i5)	Secuencia
N701	TAAGGCGA	S501	TAGATCGC
N702	CGTACTAG	S502	CTCTCTAT
N703	AGGCAGAA	S503	TATCCTCT
N704	TCCTGAGC	S504	ACAGTAGA
N705	GGACTCCT	S505	GTAAGGAG
N706	TAGGCATG	S506	ACTGCATA
N707	CTCTCTAC	S507	AAGGAGTA
N708	CAGAGAGG	S508	CTAAGCCT
N709	GCTACGCT		
N710	CGAGGCTG		
N711	AAGAGGCA		
N712	GTAGAGGA		

- iii. Después de tener la hoja de diseño de las muestras (ver arriba) con sus índices se realizó una PCR con el siguiente protocolo:

Tabla 11: MAstermix para PCR de los amplicones con los índices.

Reactivos	1 reacción	72 reacciones
10x HF buffer	5 ul	360 ul
10 mM DNTPs	1 ul	72 ul
50 mM MgSO ₄	4.0 ul	288 ul
DMSO	2.5 ul	180 ul
Platinum Taq DNA polymerase High Fidelity	0.5 ul	36 ul
H ₂ O libre de nucleasas	12 ul	864 ul
TOTAL	25 ul	1800 ul

Tabla 12 : Preparación de los componentes reactivos para la 2ª PCR de los índices

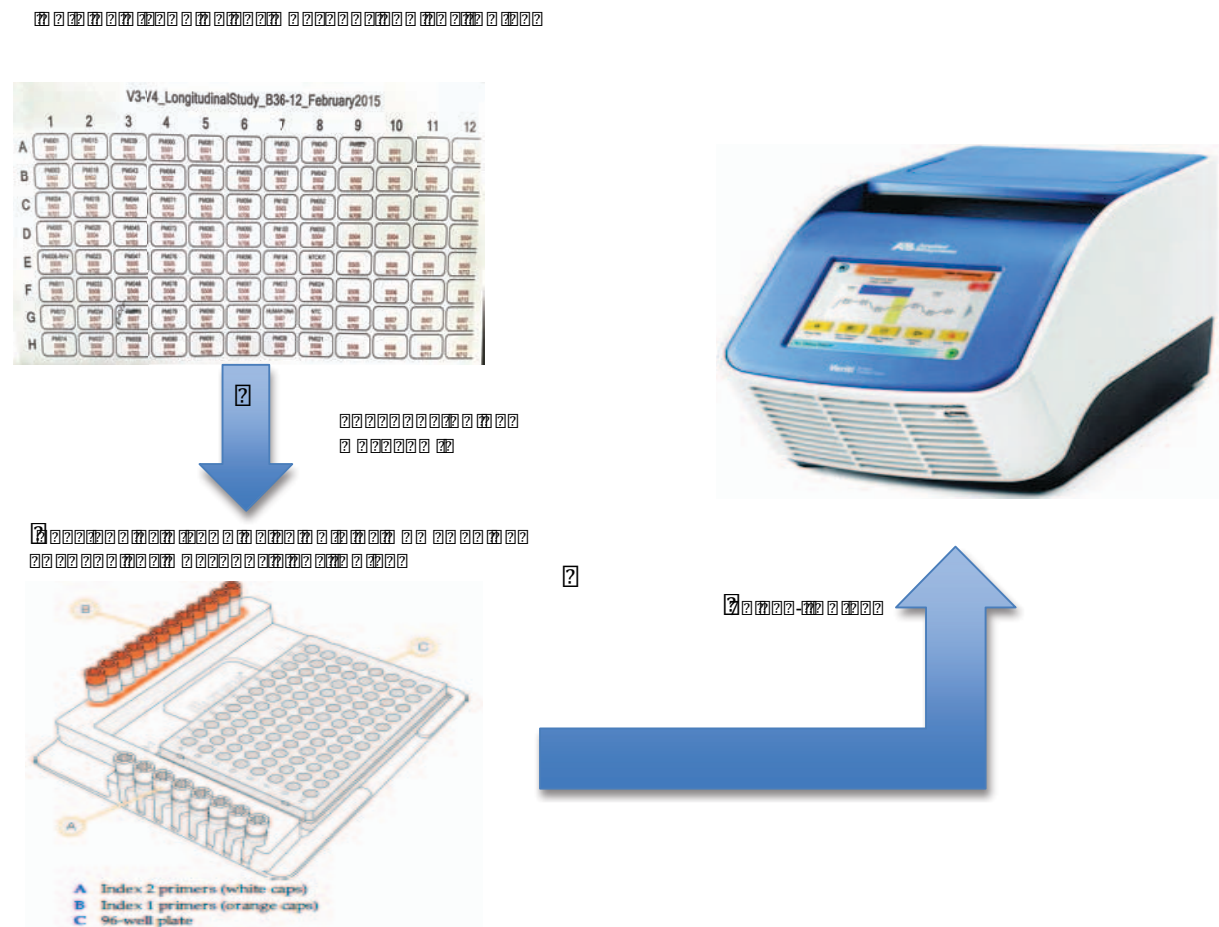
PREPARACIÓN PARA PCR	Cantidad p/ 1 reacción
Master Mix para PCR de índices*	25 ul
Nextera XT Index Primer 1	5 ul
Nextera XT Index Primer 2	5 ul
Amplicon de PCR purificado	5 ul
Agua FN	10 ul
TOTAL DE CADA REACCIÓN	50 ul

* compuesta con los reactivos del cuadro anterior.

Tabla 13: Protocolo de la 2ª PCR de índices, usando un termociclador Veriti ®, by Life Technologies/ThermoFisherScientific

Etapa	Ciclos	Temperatura	Tiempo
1	1	95°	3 minutos
2	8	95°	30 segundos
		55°	30 segundos
		72°	30 segundos
3	1	72°	5 minutos
4	1	4°	hold

FIGURA 15. Flujo de la PCR de índices



6. 2ª purificación de DNA con fluorómetro Qubit 2.0

- A. Se realizó nuevamente purificación con perlas de AMPure XP y etanol recién preparado al 80%, usando una cama magnética para 96 muestras.
- B. Posterior a la purificación se realizó nuevamente cuantificación por fluorometría usando el Qubit dsDNA HS Assay kit y el fluorómetro Qubit 2.0 de Invitrogen™ by Life Technologies Thermo FisherScientific.

7. Cuantificación de biblioteca, Normalización y Agrupación

CUANTIFICACIÓN Y NORMALIZACIÓN DE LIBRERIAS

- A. Después de cuantificar por fluorometría los amplicones de PCR indexados, se procedió a un control de calidad de las librerías usando el bioanalizador Agilent 2100 y el Agilent DNA ds DNA kit. El tamaño

esperado de cada biblioteca (amplicon con los índices) es aproximadamente de 630 pb, ver figura 16.

- a. Se escogieron 10 muestras al azar y un control negativo para conocer el promedio del tamaño de las bibliotecas.
 - i. Muestras escogidas al azar (019, 044, 071, 085, 095, 103, 033, 048, 078, 090 Y HUMAN DNA)
- b. El tamaño promedio calculado de las librerías con el uso de agilent fue 632 bp

Tabla 14. Tamaño medido de las muestras seleccionadas al azar

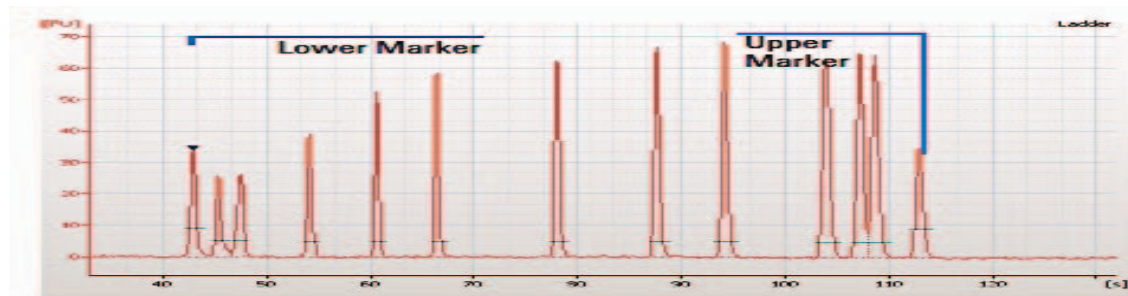
Muestra tomada al azar	Tamaño en bp
019	638
044	612
071	646
085	639
095	619
103	627
033	623
048	628
078	640
090	652
Human DNA	No identificado
TOTAL	632
PROMEDIO	

FIGURA 16: Bioanalizador Agilent 2100

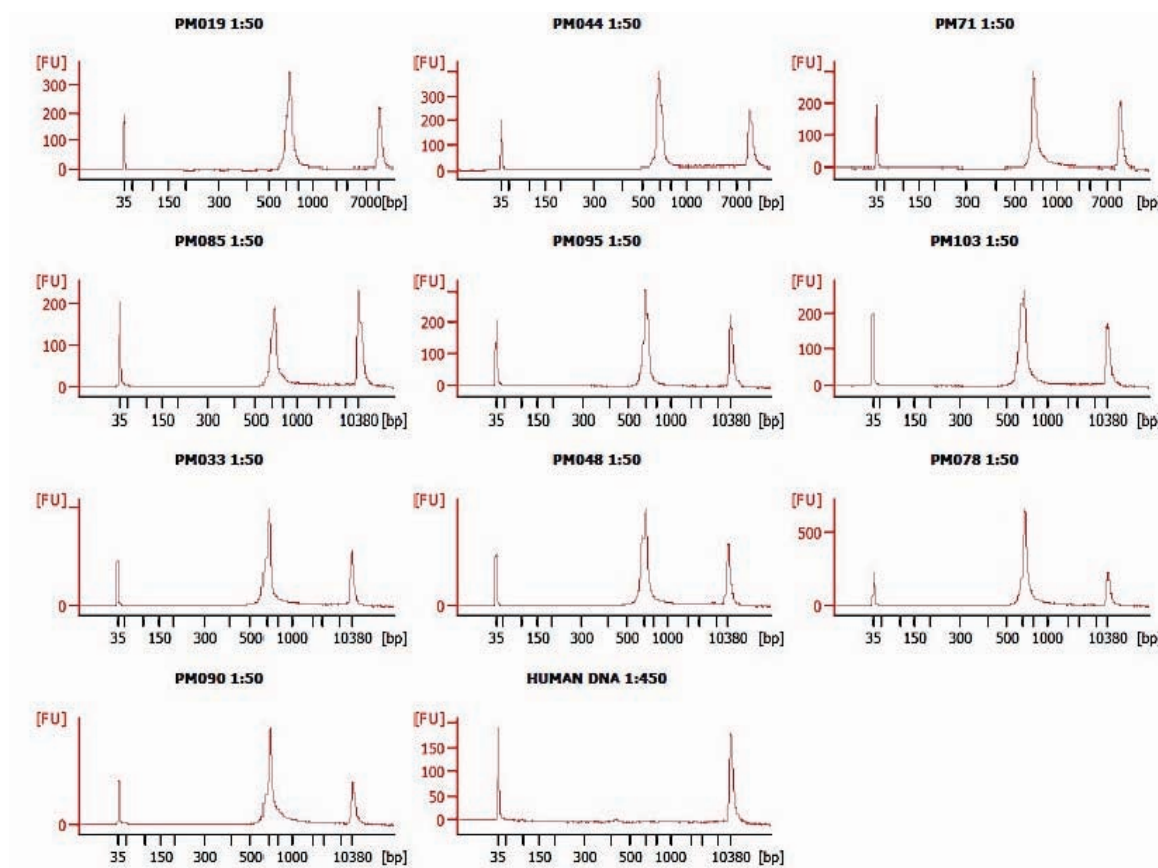
El tamaño de los fragmentos de ADN se mide en base pares (bp). En este caso, el tamaño promedio de los fragmentos de ADN es de 632 bp. Este tamaño es el resultado de la suma de los tamaños de los fragmentos de ADN de las 10 muestras seleccionadas al azar, dividido por el número de muestras (10). El tamaño promedio de los fragmentos de ADN es un indicador importante de la calidad de las bibliotecas de ADN.



2020年12月25日 星期五 15:40:25



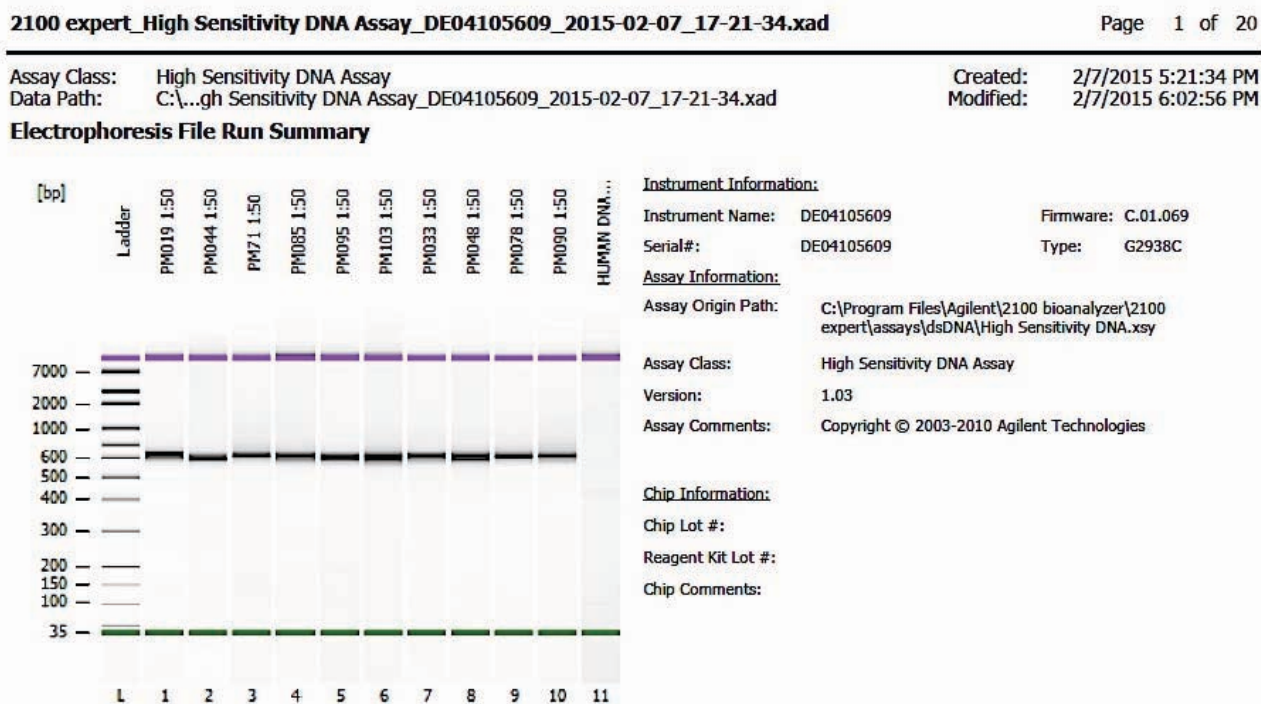
2020年12月25日 星期五 15:40:25



2020年12月25日 星期五 15:40:25

Figura 16c. Gel digital

Los electroferogramas se acompañan de un “gel digital” para cada muestra y se prefiere al gel tradicional en agarosa debido a que es más rápido de realizar, y es reproducible.



- B. Una vez calculado el tamaño promedio de las librerías con el equipo Agilent 2100, se realizó la cuantificación en nM de las librerías con la siguiente fórmula:

$$\frac{\{(Concentración \text{ en } ng/ul) \times 10^6 = \text{concentración en nM}\}}{(660 \text{ g/mol} \times \text{promedio del tamaño de las librerías})}$$

Por ejemplo la muestra 0019: $\{(35.1 \text{ ng/ul}) / (660 \text{ g/mol} \times 632)\} \times 10^6 = 84 \text{ nM}$

- C. Después de calcular el tamaño de las librerías se realizó normalización a 4 nM con buffer de re-suspensión.

8. Desnaturalización de biblioteca y carga de la muestra en MiSeq

DESNATURALIZACIÓN DE LIBRERIAS

Para preparar la generación de clústers y la secuenciación, las librerías deben juntarse (hacer un pool) y ser desnaturalizadas con NaOH al 0.2 N y buffer de hibridación con un control de secuenciación (Phix).

- Se preparó un pool de librerías al juntar cada librería en un solo tubo
- Se preparó NaOH 0.2 N
- Se combinó 5 mcl del pool de librería de DNA con 5 mcl de NaOH 0.2
- Se incubó a temperatura ambiente 5 mins

- Esta combinación de 10 mcl se diluyó en buffer de hibridación (n=990 mcl)
 - a. Esto resulta en 20 pM de librería desnaturalizada en 1 mM de NaOH
- Posteriormente se preparó Phix al 5% con buffer de re-suspensión y re-diluido en buffer de hibridación (n=990 mcl).

PREPARACIÓN DE LA LIBRERÍA FINAL

Se agregó como control interno de la secuenciación en espiga Phix >30%- La concentración final de la librería fue de 8pM.

CARGA DE POOL DE LIBRERÍA A LA PLATAFORMA MISEQ DE ILLUMINA ®

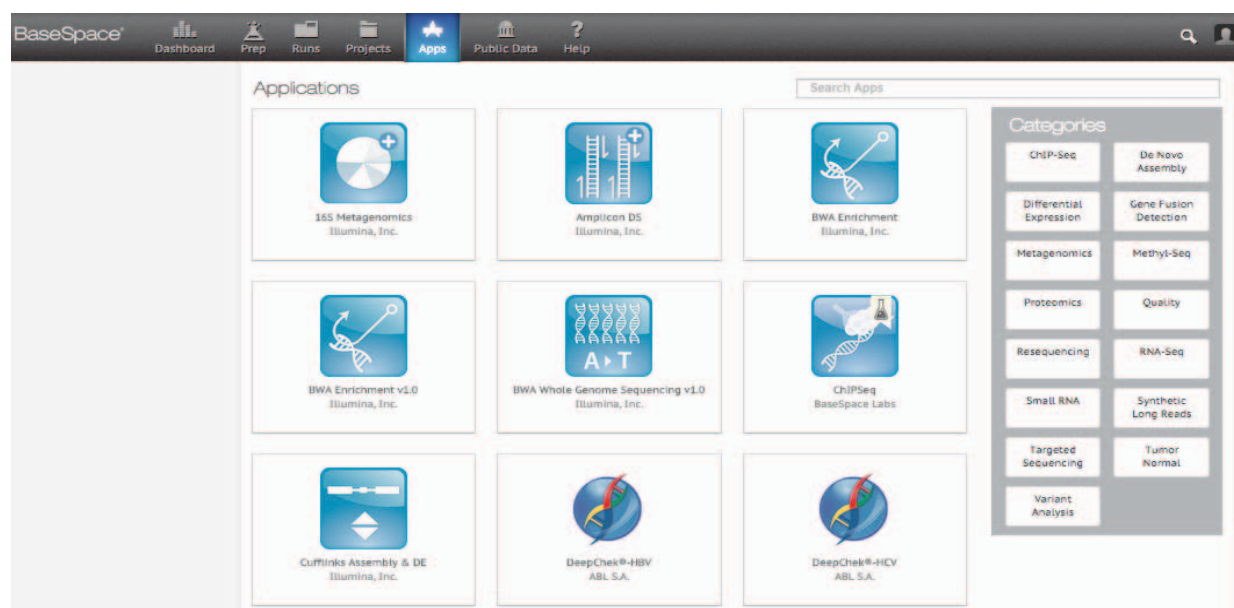
Se cargó la librería final en el cartucho de secuenciación de MiSeq Illumina. La corrida se tardó 65 hrs.

3. Análisis estadístico

- Análisis de las secuencias generadas

Para el análisis de las secuencias obtenidas, se ocuparon dos software. El primero 16S metagenomics App fue desarrollada por Illumina, y está disponible en BaseSpace (www.basespace.illumina.com). Esa App es gratuita y permite el análisis (clasificación taxonómica y diversidad microbiana con el cálculo de especies observadas y el índice de Shannon) de las secuencias obtenidas, ver figura 17.

Figura 17. Interface de la plataforma Miseq donde se observan las opciones de software para análisis de secuencias



El 16 metagenomics permite la clasificación taxonómica usando la versión para Illumina de la base de datos de Greengenes. Así también, permite la visualización interactiva y la clasificación cruda por cada muestra. LA clasificación es posible debido al uso del flujo de trabajo de Illumina 16S metagenomics, que también está disponible en el software de reporte de MiSeq (ver figura 17).

La segunda herramienta que se uso fue el software QIIME (16). Se utilizó QIIME para calcular la beta-diversidad mediante el uso de unweighted y Weighted UNIFRAC (58–60). Los resultados obtenidos son visualizados en análisis de componentes principales (PCoA).

- Características clínicas de los grupos de estudio

Para el análisis y reporte de las características clínicas, bioquímicas, antropométricas y características de la microbiota de los pacientes se utilizó medianas y rango mínimo y máximo. Para la comparación entre los grupos no relacionados, es decir el grupo longitudinal con VIH sin TAR, el grupo con VIH con TAR y el grupo sin VIH, se utilizó prueba de X^2 ajustada a los grados de libertad correspondientes en el caso de variables categóricas y la prueba de Kruskal-Wallis en el caso de variables cuantitativas. Así mismo se utilizó la prueba de correlación de Spearman para valorar correlaciones entre datos clínicos y/o bioquímicos con variables derivadas del estudio del microbioma. El valor de $P \leq 0.05$ fue considerado como diferencia con significancia estadística. Se utilizó la paquetería SPSS 20 para MAC y Excel para MAC.

- Análisis de las características antes y después del inicio de TAR

Para el análisis y reporte de las características clínicas, bioquímicas, antropométricas y características de la microbiota de los pacientes se utilizó medianas y rango mínimo y máximo. Para la comparación entre los grupos relacionados, es decir el grupo longitudinal con VIH antes del inicio de TAR y 6 meses después del inicio de TAR, se utilizó X^2 Mc Nemar en el caso de las variables categóricas y Wilcoxon matched-pair signed Rank (Wilcoxon de rangos señalados) para las variables cuantitativas. El valor de $P \leq 0.05$ fue considerado como diferencia con significancia estadística. Se utilizó la paquetería SPSS 20 para MAC y Excel para MAC.

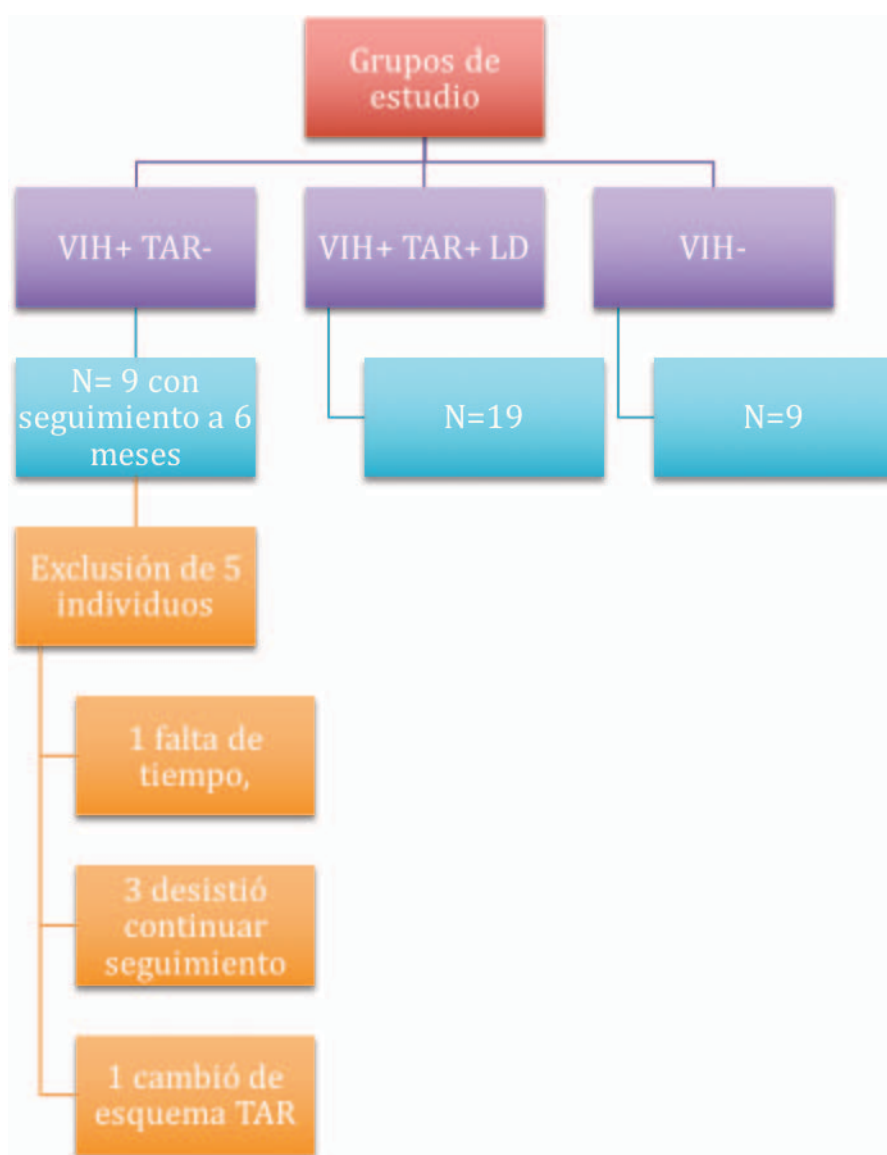
9. RESULTADOS

Características demográficas, clínicas, biométricas y bioquímicas de los grupos de estudio

CARACTERÍSTICAS DEMOGRAFICAS Y CLÍNICAS

Se incluyeron al estudio 37 individuos, 9 en el grupo sin VIH (VIH-), 19 en el grupo con VIH y TAR de larga duración (VIH+ TAR+ LD) y 9 en el grupo longitudinal (que en un principio no tenía TAR, {VIH+ TAR-}), ver Figura 18. Todos los individuos en el grupo VIH+ TAR+ tenían el mismo esquema TAR (emtricitabina, tenofovir, efavirenz) y los individuos en el grupo VIH+ TAR- comenzarían TAR con el mismo esquema y se mantuvieron en el mismo esquema por lo menos 6 meses para incluirlo en el estudio.

Figura 18: Distribución de los grupos de estudio



En nuestra cohorte, se observó que 32 (86%) eran hombres, 29 (78%) solteros y 26 (70%) residentes de la Ciudad de México. La mediana de edad de la cohorte fue de 37 años (rango 20-66). Se observó una diferencia significativa (KW $p=0.03$) entre la mediana de edad del grupo VIH+ TAR- (32 años, rango 22-47), al compararse con el grupo VIH- (38 años, rango 20-66) y VIH+ TAR+ (41 años, rango 24-59).

De manera interesante, el 55% (N=21/37) de los individuos reportaron historia de problemas gastrointestinales, sin diferencia de proporción entre los grupos. Además, tampoco encontramos diferencia entre grupos en cuanto a proporción de consumo de tabaco (33% vs 21% vs 44%, $p=0.43$) o al consumo de alcohol (78% vs 42% vs 67%, $p=0.16$). Sin embargo el grupo VIH+TAR+ reportaron hacer menos ejercicio que los otros dos grupos (33% vs 67 y 79%, $p=0.006$, respectivamente), ver tabla 15.

Tabla 15: Características clínicas de los grupos de estudio

Característica	Grupo VIH- N=9(%)	Grupo con VIH+TAR+ N=19 (%)	Grupo VIH+ TAR- N=9 (%)	TOTAL N=37 (%)	P
Género (Hombre)	5 (56)	17 (89)	9 (100)	32 (86)	0.1
Estado civil					
Soltero	5 (56)	15 (79)	9 (100)	29 (78)	0.1
Casado	4 (44)	3 (16)	0	7 (19)	
Residencia actual					
DF	7 (78)	11 (58)	8 (89)	26 (70)	0.05
EDO MEX	0	7 (37)	0	7 (19)	
OTROS *	2 (22)	1 (5)	1 (11)	4 (11)	
Escolaridad					
< Media superior	4 (44)	6 (32)	2 (22)	12 (32)	0.59
≥ Media superior	5 (56)	13 (68)	7 (78)	25 (68)	
Año de Dx de HIV					
2000-2006		12 (63)	0	12 (43)	0.03
2007-2013		7 (37)	9 (100)	16 (57)	
Otras comorbilidades	3 (33)	8 (42)	5 (56)	16 (43)	0.62
Hx de problemas gastrointestinales	7 (78)	9 (47)	5 (56)	21 (57)	0.31
Toma del último antibiótico					
≤ 1 mes	0	1 (5)	0	1 (2)	0.48
Entre 1-3 m	5 (56)	5 (26)	1 (11)	11 (30)	
> 3 meses	1 (11)	3 (16)	3 (33)	7 (19)	
> 6 meses	1 (11)	3 (16)	3 (33)	7 (19)	
≥ 1 año	2 (22)	7 (37)	2 (22)	11 (30)	

Antibióticos					
Betalactámicos	3 (33)	7 (39)	2 (22)	12 (33)	0.60
Quinolonas	1 (11)	1 (6)	1 (11)	3 (8)	
TMP/SMX	2 (22)	2 (11)	1 (11)	5 (14)	
Tetraciclinas	0	1 (6)	0	1 (3)	
Peni/tetras	0	0	1 (11)	1 (3)	
No recuerda	1 (11)	6 (33)	4 (44)	11 (30)	
Hx Qx abdominal/intestinal	2 (22)	4 (21)	1 (11)	7 (19)	0.78
Consumo de tabaco	3 (33)	4 (21)	4 (44)	11 (30)	0.43
Consumo de alcohol	7 (78)	8 (42)	6 (67)	21 (57)	0.16
Tipo de bebida alcohólica					0.29
Cerveza	3 (33)	5 (26)	5 (56)	13 (35)	
Licor/destilados	2 (22)	2 (10)	0	4 (11)	
Vino	2 (22)	1 (5)	1 (11)	4 (11)	
Ejercicio	6 (67)	15 (79)	3 (33)	24 (65)	0.06
Tipo de ejercicio (isotónico)	6 (67)	10 (53)	2 (22)	18 (49)	0.08

* OTROS: Acapulco, Tlaxcala, Morelos, Hidalgo

X² fue utilizada y ajustada según los grados de libertad

BIOMETRICAS

El peso mediano de la población fue de 67 kg (rango 38-101), el porcentaje de grasa corporal 26% (rango 11-43), la mediana de la masa magra 47kg (rango 29-67), índice de masa corporal (IMC) fue 24 (rango 17-34), y la tasa de sobrepeso (n=5), y obesidad (n=5) fue 15% respectivamente. Además encontramos osteoporosis en 5 individuos (13.5%), ver tabla 16.

De los datos recopilados por el equipo de nutriología del CIENI-INER, encontramos que el promedio de ingesta calórica fue de 2416 calorías (rango 1304-5990). La contribución al promedio de ingesta calórica fue el siguiente: grasa, con una mediana de proporción en 29% (10-57%), proteínas con una mediana de 112 gr al día (rango 39-232), carbohidratos con una mediana de 291 gramos/día (141-901) e ingesta de grasa saturada con una mediana de 78 gr/d (31-169). No se identificaron diferencias en el patrón de consumo entre los 3 grupos. Tampoco, encontramos diferencias en peso, kilogramos de grasa ni masa magra, ni tampoco en el IMC ni en la proporción de sobrepeso ni obesidad entre grupos, ver Tabla 16.

Tabla 16: Características biométricas de los grupos de estudio

Característica	Grupo VIH- N=9(%)	Grupo con VIH+TAR+ N=19 (%)	Grupo VIH+ TAR- N=9 (%)	TOTAL N=37 (%)	P
Edad (años)	38 (20-66)	41 (24-59)	32 (22-47)	37 (20-66)	0.03
Tiempo en TAR (años)		6 (2-12)			
Peso (Kg)	67 (57-87)	68 (38-86)	64 (50-101)	67 (38-101)	0.57
Grasa (%)	35 (15-39)	26 (11-43)	21 (11-32)	26 (11-43)	0.08
Grasa (Kg)	22 (8-30)	16 (7-36)	12 (5-31)	17 (5-36)	0.28
Masa Magra (kg)	42 (33-54)	47 (29-61)	48 (38-67)	47 (29-67)	0.42
IMC	25 (21-30)	24 (17-34)	22 (17-33)	24 (17-34)	0.78
(IMC)					
Normal ≤ 24.9	4 (57)	13 (72)	7 (78)	24 (70)	0.55
Sobrepeso 25-29.9	2 (29)	3 (17)	0	5 (15)	
Obesidad ≥30	1 (3)	2 (6)	2 (6)	5 (15)	
T score L1-3	-0.7 (-1a1)	-0.85(-2a2)	-1.1 (-3a1)	-0.8 (-3a2)	0.22
Z score L1-L3	-0.4 (-2a2)	-0.35 (-2a2)	-1.2 (-3a1)	-0.4 (-3a2)	0.08
T score C-T	-0.5(-1a1)	-1.1(-3a1)	-1.2(-3a1)	-0.9(-3a1)	0.18
Z score C-T	-0.5 (1a3)	-0.4 (-2a1)	-0.5 (-2a1)	-0.5 (-2a3)	0.22
Osteoporosis (T Score L1-L3 <- 2.5)	2 (22)	1 (5.3)	2 (22)	5 (13.5)	0.32

Consumo calórico diario	2389 (1785-3311)	2416 (1334-4232)	2565 (1304-5990)	2416 (1304-5990)	0.75
Calorias de grasa	811 (403-1384)	784 (379-1280)	598 (262-1512)	757 (262-1512)	0.83
Proporción de grasa (calorias)	0.29 (0.22-0.57)	0.29 (0.22-0.53)	0.27 (0.10-0.44)	0.29 (0.1-0.57)	0.38
Calorias grasa saturada	201 (85-470)	207 (66-394)	109 (78-418)	198 (66-470)	0.46
Consumo Proteínas (gr)	110 (85-157)	112 (41-187)	112 (39-232)	112 (39-232)	0.80
Consumo de CH (gr)	298 (180-364)	288 (141-577)	256 (193-901)	291 (141-901)	0.48
Consumo grasa (gr)	78 (45-153)	87 (43-142)	67 (31-169)	78 (31-169)	0.90

*Mediana y rango

- La prueba de Kruskal-Wallis fue utilizada

- χ^2 fue utilizada y ajustada según los grados de libertad

CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS

Las medianas de los estudios realizados para toda la población se encuentran en la tabla 17. Dentro de los hallazgos más importantes se destaca la mediana de hemoglobina en 15.8 gr/dL (rango 13.1-18.6), plaquetas 209 mm³ (rango 40-297), leucocitos 6.1 mm³ (rango 2.9-11.2), sin diferencia significativa entre los grupos de estudio. La mediana de glucosa en 92 mg/dL (rango 62-111 mg/dL), con diferencia entre grupos significativa por $p < 0.05$ pero ninguno con niveles de glucosa > 111 o menor de 60 mg/dL.

Diferencias entre grupos se encontraron en los niveles de ácido úrico ($p = 0.01$), sin embargo el significado clínico es incierto, los individuos sin VIH tuvieron una mediana en 5.7 mg/dL (rango 4.3-6.4), los individuos con VIH y TAR 4.9 mg/dL (rango 3-7.2), y los individuos con VIH sin inicio de TAR 5.5 mg/dL (rango 4.8-8.7). Por otro lado, la mediana de proteínas en toda la población fue 7.3 gr/dL (rango 6.1-8.48) y el grupo con mayor nivel fue el de los individuos con VIH sin TAR (mediana 7.9 gr/dL, rango 7.45-8.48) comparado con aquellos sin VIH (mediana 7, rango 6.6-7.4) y con VIH y TAR (mediana 7.2 gr/dL, rango 6.1-7.98), $p = 0.001$. Además en los niveles de colesterol total (CT), lipoproteínas de baja densidad (LDL) y lipoproteínas de alta densidad (HDL) los individuos con VIH sin TAR tuvieron los niveles más bajos a comparación de los otros 2 grupos con diferencias significativas ($p = 0.04$, 0.04 y 0.02 respectivamente), ver tabla 17.

En los hallazgos de la biometría hemática encontramos que el porcentaje de linfocitos era diferente entre grupos, lo que se esperaba. Al analizar las diferentes subpoblaciones linfocitarias, encontramos que la mediana de linfocitos T CD4+ en el grupo VIH+ TAR- fue la más baja (421 mm³, rango 115-538) a comparación de los individuos con VIH+ TAR+ (486 mm³, rango 235-1297) y sin VIH (965 mm³, rango 617-1468), $p < 0.001$; lo mismo encontramos en sentido inverso con la subpoblación de linfocitos CD8+ (VIH- mediana 548, rango 460-1404; VIH+TAR+ mediana 645, rango 219-916; VIH+TAR- mediana 1344, rango 748-2224; $p < 0.001$) y la CV (carga viral) en los individuos con VIH+TAR- tuvo una mediana de 94,083 copias (rango 900-135,758), mientras que tanto el grupo VIH- como VIH+TAR+ tuvieron $CV < 40$ copias, como se esperaba, ver tabla 17.

Tabla 17: Características bioquímicas entre los grupos analizados

Característica	Grupo VIH- N=9(%)	Grupo con VIH+TAR+ N=19 (%)	Grupo VIH+ TAR- N=9 (%)	TOTAL N=37 (%)	P
Hemoglobina (gr/dL)	15.4 (13.9-17.6)	15.9 (13.1-18.6)	15.7 (14.7-17.4)	15.8 (13.1-18.6)	0.57
Hematocrito (%)	45.9 (40.9-53.9)	47.3 (38.3-56)	47.2 (43.6-51.3)	47.1 (38.3-56)	0.64
VCM	91.3 (85.1-95)	96.2 (88.7-104.2)	89.3 (84.4-93.2)	92.8 (84.4-104.2)	<0.0001
PLT (mm ³)	225 (142-293)	205 (112-297)	194 (48-271)	209 (48-297)	0.20
Lcc (mm ³)	6.4 (5.3-7.9)	5.3 (3.8-11.2)	5.2 (2.9-7.3)	6.1 (2.9-11.2)	0.32
N%	59.8 (52-70.3)	61.5 (48.6-71.9)	44.4 (37.3-53.5)	55.2 (37.3-71.9)	0.001
Lc%	29.6 (22.6-39)	28.1 (16.9-40.2)	39.6 (31-53)	33 (16.9-53)	0.006
Mon%	6.6 (4.9-8.6)	8.1 (4.3-13.3)	9.2 (3-11.3)	8.1 (3-13.3)	0.15
Eo%	1.9 (0.8-4.9)	1.5 (0.4-3.1)	2.5 (1-3.9)	1.9 (0.4-4.9)	0.063
Gluc (mg/dL)	91 (83-100)	94 (62-111)	87 (70-96)	92 (62-111)	0.05
Urea (mg/dL)	25 (19-36.4)	24.5 (16-63)	24 (12.8-35)	24 (12.8-63)	0.74
AU (mg/dL)	5.7 (4.3-6.4)	4.9 (3.0-7.2)	5.5 (4.8-8.7)	5.4 (3.0-8.7)	0.01
Cr (mg/dL)	0.8 (0.6-0.9)	0.79 (0.42-1.2)	0.83 (0.67-1.0)	0.79 (0.42-1.2)	0.34
Prot (gr/dL)	7.0 (6.6-7.4)	7.2 (6.1-7.98)	7.9 (7.45-8.48)	7.3 (6.11-8.48)	0.001
Albumina (gr/dL)	4.1 (3.7-4.3)	4.2 (3.4-4.7)	4.2 (3.2-4.6)	4.2 (3.2-4.7)	0.8
BT (mg/dL)	0.62 (0.5-0.97)	0.52 (0.15-0.79)	0.55 (0.35-1.19)	0.5 (0.15-1.19)	0.04
BI (mg/dL)	0.56 (0.41-0.83)	0.42 (0.1-0.63)	0.48 (0.24-0.77)	0.47 (0.1-0.83)	0.02
AST	23 (16-25)	24 (15-31)	25 (20-43)	24 (16-43)	0.14
ALT	24 (15-31)	28 (11-57)	24 (17-42)	24 (11-57)	0.24
DHL	145 (106-186)	139 (117-255)	169 (126-227)	146 (106-255)	0.19
TGC (mg/dL)	149 (86-483)	166 (69-305)	132 (69-288)	149 (69-483)	0.66
CT (mg/dL)	199 (158-337)	164 (106-235)	143 (123-235)	173 (106-337)	0.04

HDL (mg/dL)	40 (34-59)	36 (25-58)	29 (19-49)	36 (19-59)	0.02
LDL (mg/dL)	124 (85-241)	100 (46-159)	83 (45-153)	189 (180-240)	0.04
Fosfolípidos	249 (220-271)	238 (186-289)	189 (180-240)	231 (180-289)	0.03
APOB	92 (78.6-149)	91 (4.6-122)	84 (61-139)	90 (4.6-149)	0.21
APOA	136 (106-186)	121.5 (10-154)	100 (74-131)	121 (10-186)	0.04
CD45 (mm ³)	2299 (1627-3143)	1708 (808-3778)	2300 (1361-3154)	1921 (808-3778)	0.05
CD3 (mm ³)	1548 (1073-2406)	1059 (506-2274)	1688 (937-2672)	1347 (506-2672)	0.001
CD4 (mm ³)	965 (617-1468)	486 (235-1297)	421 (115-538)	509 (115-1468)	<0.001
CD4%		29 (17-37)	15 (8-24)		<0.001
CD8 (mm ³)	548 (460-1404)	645 (219-916)	1344 (748-2224)	711 (219-2224)	<0.001
CD8%		35.5 (21-45)	59 (46-79)	41 (21-79)	<0.001
CD4/CD8	1.69 (0.69-2.55)	0.82 (0.42-1.42)	0.22 (0.1-.45)	0.73 (0.1-2.55)	<0.001
CV	<40	<40	94, 083 (900-135,758)		<0.001
Nadir CD4 (mm ³)		300 (11-571)	435 (81-1075)	357 (11-1075)	0.04
Nadir CD4%		15 (1.9-37)	26 (7-33)	18 (1.9-37)	0.12
Nadir CD8 (mm ³)		697 (107-1630)	910 (340-1791)	734 (107-1791)	0.06
CD8% nadir		38 (12-76)	51 (39-80)	44 (12-80)	0.13
CD4/CD8N		0.37 (0.03-2.61)	0.56 (0.32-0.8)	0.46 (0.03-2.6)	0.87

*Mediana y rango

- La prueba de Kruskal-Wallis fue utilizada

Características de la microbiota fecal

CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL MICROBIOMA FECAL

La mediana total de lecturas filtradas fue de 278,749 (3722-2,292,947). No se observaron diferencias entre el número de lecturas entre grupos. Así mismo la proporción de lecturas con clasificación hasta el nivel taxonómico género que pasaron el filtro de calidad fue 87%, sin diferencias entre los 3 grupos. Se midieron dos índices de alfa diversidad: riqueza (número de especies) y el índice de Shannon. Ver tabla 18 y 19.

Tabla 18: Características generales del microbioma de los grupos de con y sin VIH

Característica	Grupo Sin VIH N=9(%)	Grupo HIV (con y sin tx) N=28 (%)	P*
Número de lecturas PF**	306,387 (155,202-409,757)	275,486 (3722-2,292,947)	0.25
Proporción de lecturas clasificadas a género PF (%)	84.8 (77.7-88.09)	88.2 (63.5-93.5)	0.01
Riqueza (#especies)	460 (349-575)	423 (160-684)	0.25
Índice de Shannon	2.26 (2.02-2.41)	2.23 (1.62-2.85)	0.95

Datos presentados en medianas e intervalo mínimo y máximo. *U Mann-Whitney

PF (passing filter)

El número de lecturas PF son los datos o secuencias que pasaron el control de calidad, aquellas que no fueron removidas al ser evaluadas por el filtro de castidad. El filtro de castidad es una propiedad de un software llamado "Base caller" y se asegura que la base que está colocada en la secuencia sea la adecuada. Las lecturas que pasaron el filtro tienen una probabilidad de error de la colocación o secuencia de la base <0.1% (Q>30).

Tabla 19: Características generales de la microbiota de los grupos de estudio

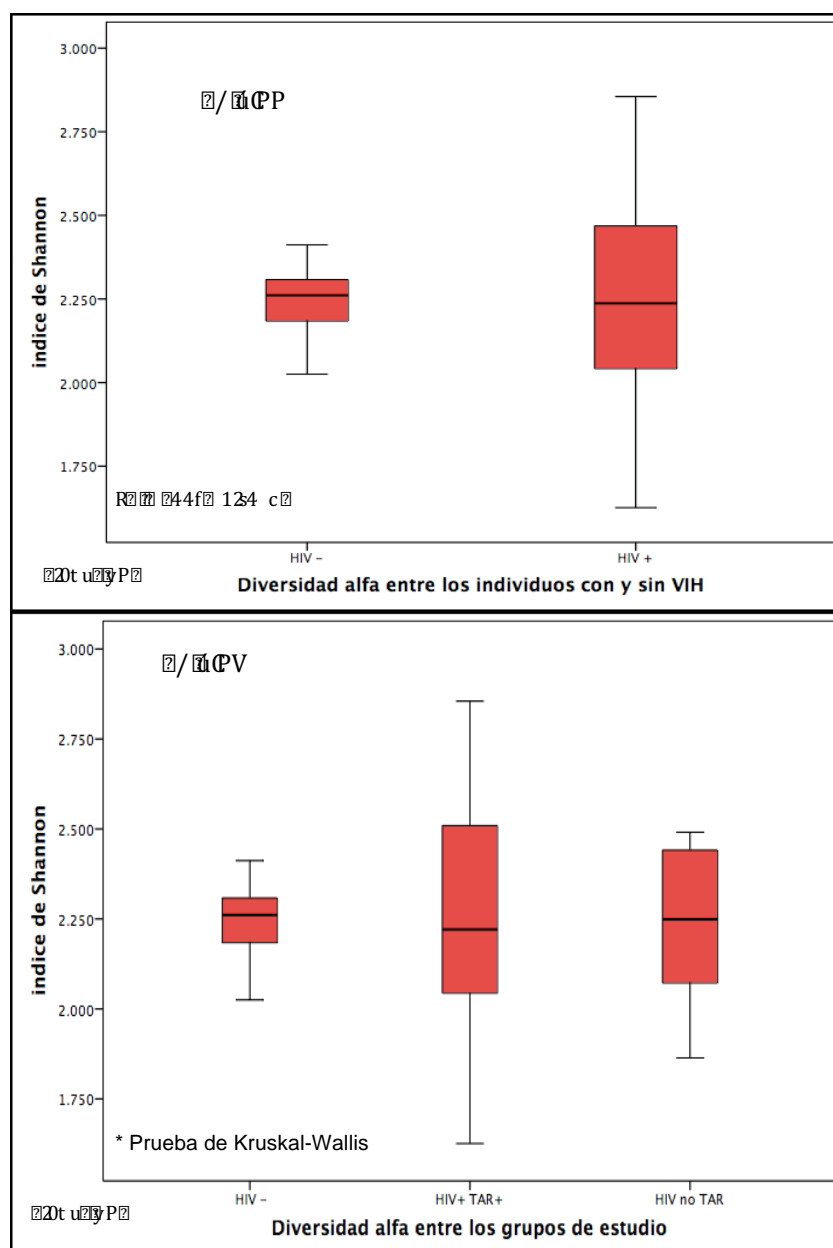
Característica	Grupo Sin VIH N=9(%)	Grupo con TAR crónico N=19 (%)	Grupo sin TAR previo N=9 (%)	TOTAL N=37 (%)	P*
Número de lecturas PF	306,387 (155,202-409,757)	270,271 (3722-2,292,947)	279,902 (198,155-1,681,838)	278,749 (3722-2,292,947)	0.81
Proporción de lecturas clasificadas a género PF (%)	84.8 (77.7-88)	88.2 (63.6-92.6)	88 (80-93)	87.3 (63.5-93.5)	0.28
Riqueza (#especies)	460 (349-575)	423 (160-617)	420 (364-684)	424 (160-684)	0.36
Índice de Shannon	2.26 (2.02-2.41)	2.22 (1.62-2.85)	2.25 (1.86-2.5)	2.25 (1.62-2.85)	0.9

PF (passing filter)

*Prueba de Kruskal-Wallis

Para los dos índices, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos, sin embargo, al observar las gráficas de cajas y bigotes que comparan el índice de Shannon, podemos observar que existe mayor variabilidad del índice en los individuos con VIH (mediana 2.23, rango 1.62-2.85) en comparación con aquellos sin VIH (mediana 2.26, rango 2.02 a 2.41), ver figura 19a, principalmente dependiente del grupo con VIH y TAR (mediana 2.22, rango 1.62-2.85) ver figura 19b.

Figura 19: INDICE DE SHANNON ENTRE LA COHORTE DE ESTUDIO



DIVERSIDAD ALFA DEL MICROBIOMA y SU RELACIÓN CON CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y BIOQUÍMICAS

Se decidió analizar nuestra cohorte con base en la mediana del índice de Shannon, de esta forma decidimos que un índice <2 sería definido como baja diversidad y un índice ≥ 2 como alta diversidad

Correlacionamos los individuos con alta o baja diversidad contra las variables clínicas y biológicas. En el análisis univariado se identificó que todos (N=18) los individuos que hicieron ejercicio isotónico tenían un índice de diversidad > 2 ($p=0.01$), así mismo los individuos con menor consumo de carbohidratos tuvieron un índice mayor (mediana 407, rango 141-901 vs mediana 279, rango 177-577, $p=0.04$).

Estas diferencias importantes también se identificaron relacionadas con los niveles de subpoblaciones linfocitarias (ver tabla 21 y figura 20).

Tabla 21: Análisis univariado del índice de Shannon.

Característica	Índice de Shannon <2 N=6 (%)	Índice de Shannon ≥ 2 N=31 (%)	P*
Grupo de estudio VIH- VIH +	0 6 (100)	9 (29) 22 (71)	0.30
Género Hombre Mujer	6 (100) 0	25 (81) 6 (19)	0.56
Ejercicio (Si)	3 (50)	21 (68)	0.64
Tipo de ejercicio Ninguno Isotónico Isométrico	3 (50) 0 3 (50)	10 (32) 18 (58) 3 (9.7)	0.01
Edad	39 (31-52)	35 (20-66)	0.58
Consumo de tabaco	3 (50)	18 (58)	1
Consumo de	1 (17)	10 (32)	0.6

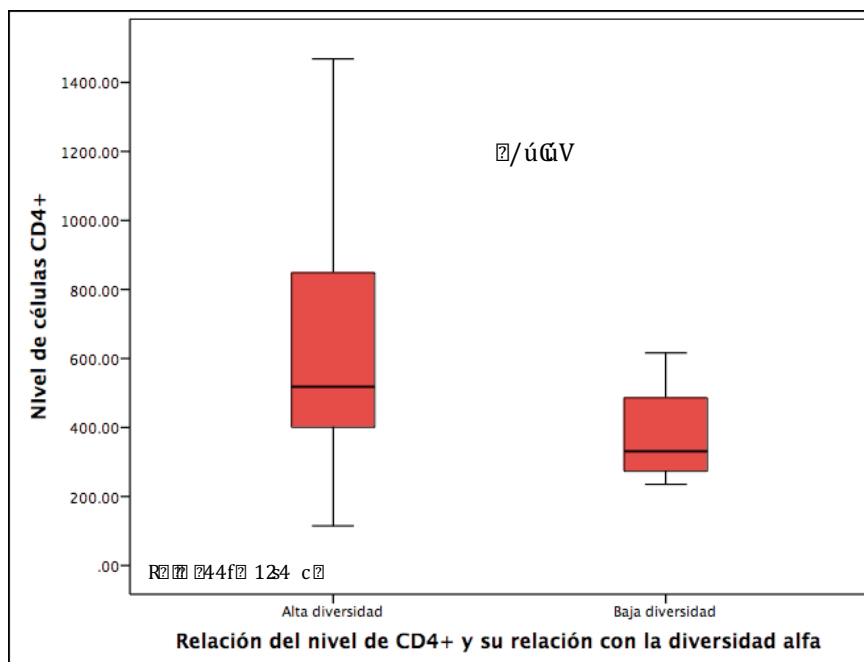
alcohol			
Grasa (%)	22.5 (18-34)	26.3 (11-43)	0.45
Consumo calórico	2802 (1538-5990)	2361 (1304-4232)	0.1
Consumo de Carbohidratos (gr)	407 (141-901)	279 (177-577)	0.04
Consumo diario <300 gr de CH	1 (16.7)	19 (65.5)	0.06
≥300 gr de CH	5 (83)	10 (34.5)	
Glucosa	91 (62-111)	92 (70-107)	0.98
Proteínas	7.34 (6.85-7.97)	7.32 (6.1-8.48)	0.98
Albúmina	4.3 (3.4-4.47)	4.1 (3.2-4.7)	0.27
CT	145.5 (113-235)	177 (106-337)	0.12
HDL	37 (29-57)	36 (19-59)	1
LDL	81 (56-153)	105 (45-241)	0.23
FOSFOLÍPIDOS	213 (186-231)	240 (180-289)	0.17
APO A	121 (100-137)	119 (10-186)	0.78
CD3	1091 (608-1468)	1360 (506-2672)	0.08
CD45	1508 (808-2060)	2023 (942-3778)	0.02
CD4	331 (235-616)	518 (115-1468)	0.06
CD8	696 (334-960)	711 (219-2224)	0.56
CD4/CD8	0.58 (0.4-0.8)	0.86 (0.1-2.55)	0.30
CARGA VIRAL	39 (39-900)	39 (39-135,758)	0.61
IMC	21 (17.8-24.3)	24 (16.7-33.5)	0.08

Datos presentados en Medianas e intervalo mínimo máximo, además de proporciones.

*U Mann-Whitney y χ^2

El Consumo de CH y el IMC afecta indistintamente a HIV y NO HIV

FIGURA 20: Relación del nivel de CD4s y la diversidad alfa



Al realizar el análisis multivariado se encontró que a mayor consumo de carbohidratos menor índice de Shannon, y esto a pesar de controlar por género, edad, y nivel de CD4s (ver modelo en tabla 22). La disminución del índice de Shannon en quienes consumen más de 300 gr/d de carbohidratos (CH) parece estar asociada con disminución del phylum de Firmicutes (mediana 0.42, rango 0.003-0.75 vs mediana 0.29, rango 0.06-0.64; $p=0.023$) y aumento del phylum de Bacteroidetes (mediana 0.39, rango 0.17-0.64 vs mediana 0.56, rango 0.21-0.86; $p=0.025$). El aumento del phylum Bacteroidetes parece estar asociado con aumento del género Prevotella, aunque sin ser significativo (consumo de CH < 300 gr/d = 0.11 rango 0-0.43 vs consumo de CH \geq 300 gr/d = 0.31 rango 0-0.47, $p=0.1$)

Tabla 22. Análisis multivariado de regresión logística ajustado para la edad, género y CD4s

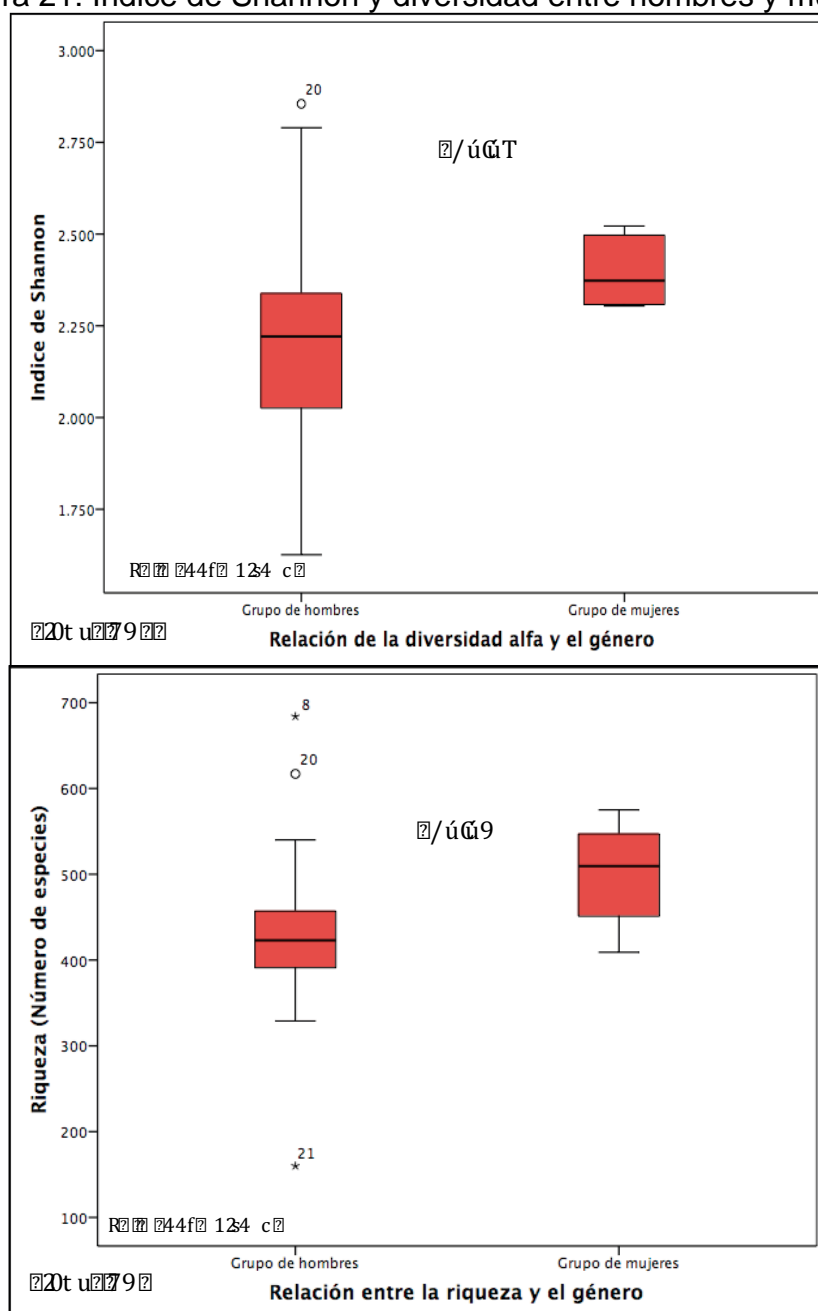
Variable	Razón de momios (IC 95%)	Valor de p
Edad	1.01 (0.91-1.13)	0.74
Género (mujer)	0	0.99
CD4	0.99 (0.98-1)	0.99
Consumo CH \geq 300 gr/d	15.41 (1.21-195.98)	0.035

$X^2=10.6$, GL=4, $p=0.03$

A pesar de que no encontramos diferencias entre mujeres y hombres en cuanto a baja o alta diversidad; es necesario reportar que todas las mujeres tuvieron un índice de Shannon >2 , y que la mediana de este índice en mujeres fue 2.33, rango 2.3-2.52 vs 2.2, rango 1.63-2.85 en hombres, $p=0.04$. La mediana de la riqueza en mujeres fue 504, rango 409-575 y fue mayor comparado con los hombres (riqueza 423, rango 160-684, $p=0.03$), figura 21a y 21b.

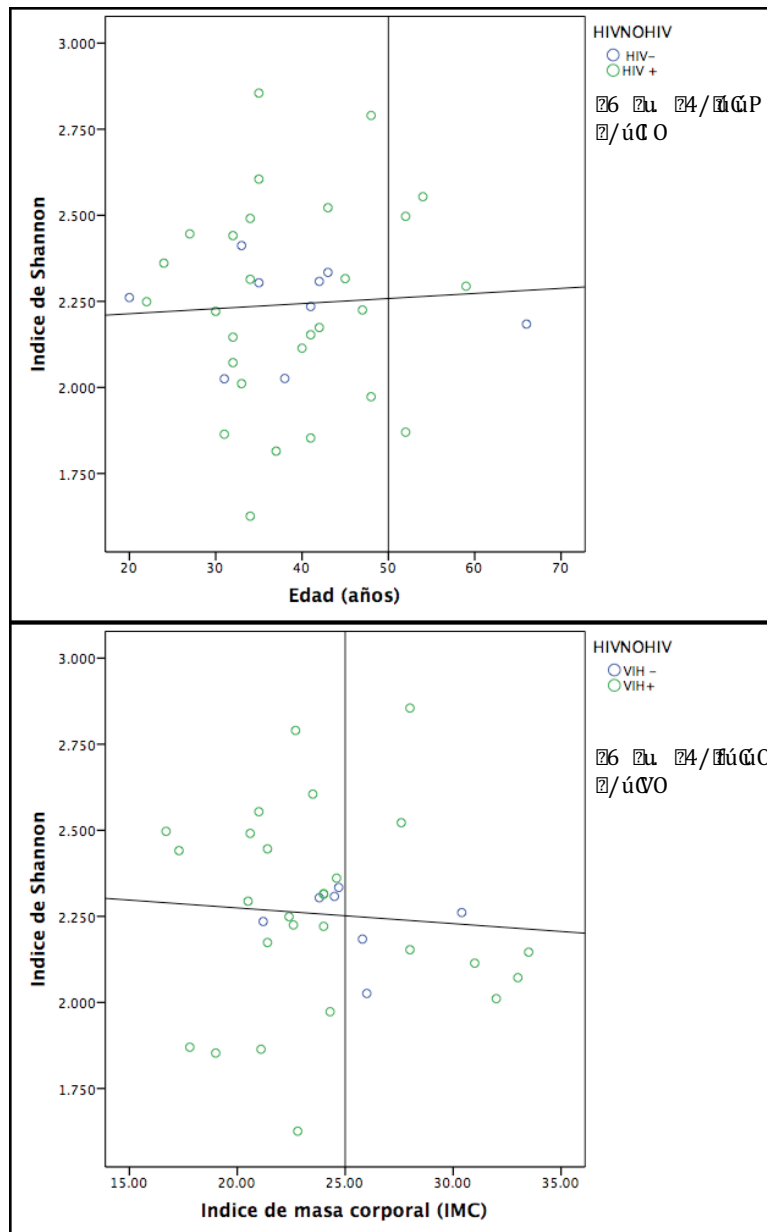
Se realizó el análisis clínico, bioquímico y del microbioma fecal solamente de hombres y no encontramos diferencias con respecto al análisis donde se toma en cuenta hombres y mujeres. Sin embargo, una tendencia a que en mujeres existiera menos proporción de Bacteroidetes ($p=0.09$) y más de Firmicutes ($p=0.1$)

Figura 21: Índice de Shannon y diversidad entre hombres y mujeres



No encontramos diferencias significativas ni correlación entre la edad, el IMC y la alfa diversidad entre los grupos ver figura 22.

Figura 22: Correlación entre Índice de Shannon y edad:



RELACION ENTRE LA ALFA DIVERSIDAD Y LA TOMA DE ANTIBIÓTICOS

En seguida, se buscó correlacionar la alfa diversidad en relación con el tiempo de la última toma de antibiótico entre los grupos de estudio. Como fue mencionado previamente, ningún individuo sin VIH tuvo un índice de Shannon <2 a pesar de que los 9 individuos reportaron haber consumido antibióticos en el último año antes de reclutamiento (ver tabla 22), incluso 5 de los 9 individuos VIH- consumieron antibióticos 3 meses previo a su reclutamiento. No encontraron correlaciones entre el índice de Shannon y el uso de antibióticos, ni el tipo de antibiótico.

Los hallazgos de la diversidad alfa y la toma de antibióticos se encuentran a detalle en las tablas 23.

Tabla 23: Tiempo de última toma de antibióticos e Índice de Shannon entre los individuos con y sin VIH

Grupo	Tiempo desde el último Abx	Índice de Shannon		Total	Valor de P
		≥ 2 N=31 (%)	< 2 N=6 (%)		
Sin VIH				N=37 (%)	0.57
	<1 mes	0	0	5 (55)	
	1-3 meses	5 (56)	0	0	
	3-6 meses	1 (11)	0	1 (11)	
	>6 meses	1 (11)	0	1 (11)	
	>1 año	2 (22)	0	2 (22)	
	Total	9 (29)	0	9 (24)	
Con VIH					
	<1 mes	1 (4.5)	0	1 (3.5)	
	1-3 meses	4 (18)	2 (33)	6 (7.9)	
	3-6 meses	4 (18)	2 (33)	6 (7.9)	
	>6 meses	6 (27)	0	6 (7.9)	
	>1 año	7 (32)	2 (33)	9 (32)	
	Total	22 (71)	6 (100)	28 (76)	

χ^2 fue utilizada y ajustada según los grados de libertad
Ningún individuo sin VIH tuvo índice <2

La mayoría de los sujetos recibió algún betalactámico, principalmente penicilina, seguido de algún antibiótico de la familia de las quinolonas; sin embargo no se encontraron similitudes entre los géneros bacterianos jerárquicos encontrados en aquellos que recibieron el mismo tipo de antibiótico ni relación con el tiempo de consumo de los mismos, ver figura 23-24 y tabla 24.

Figura 23: RELACIÓN ENTRE LA ÚLTIMA TOMA DE ANTIBIÓTICOS, EL TIPO DE ANTIBIÓTICO Y LOS GRUPOS CON Y SIN VIH

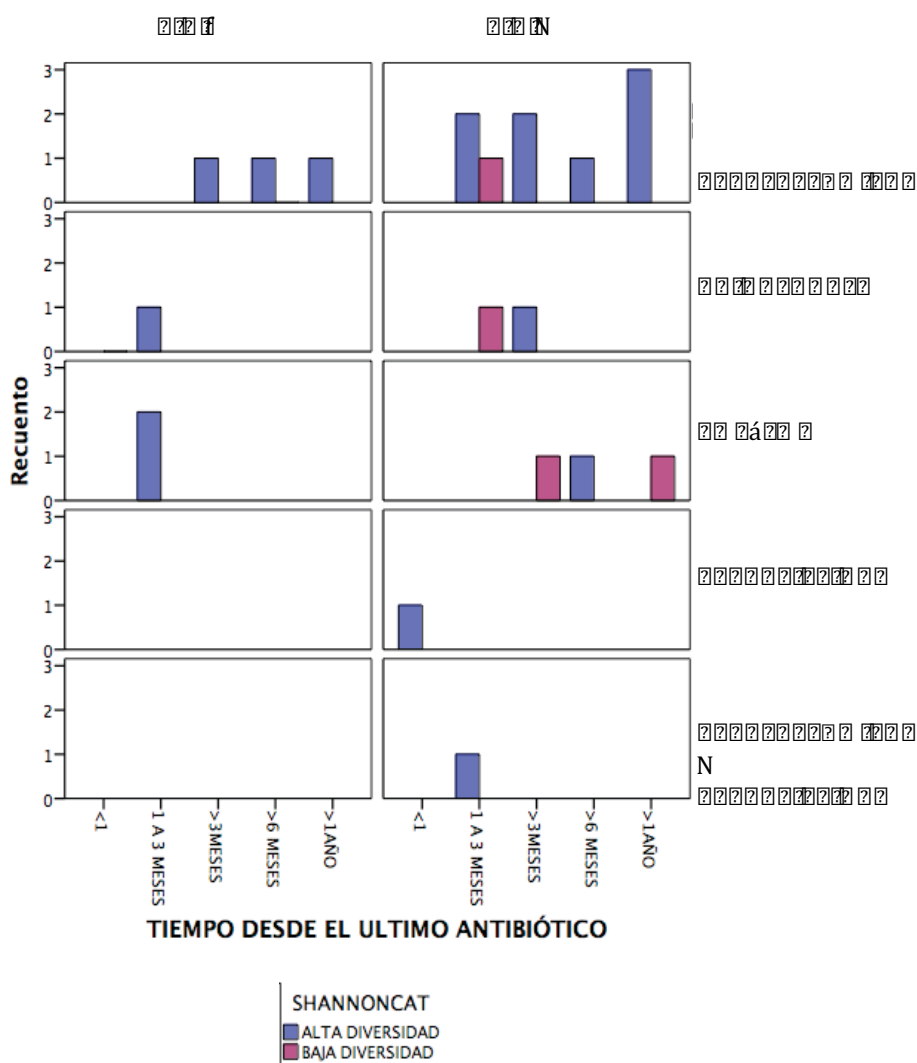
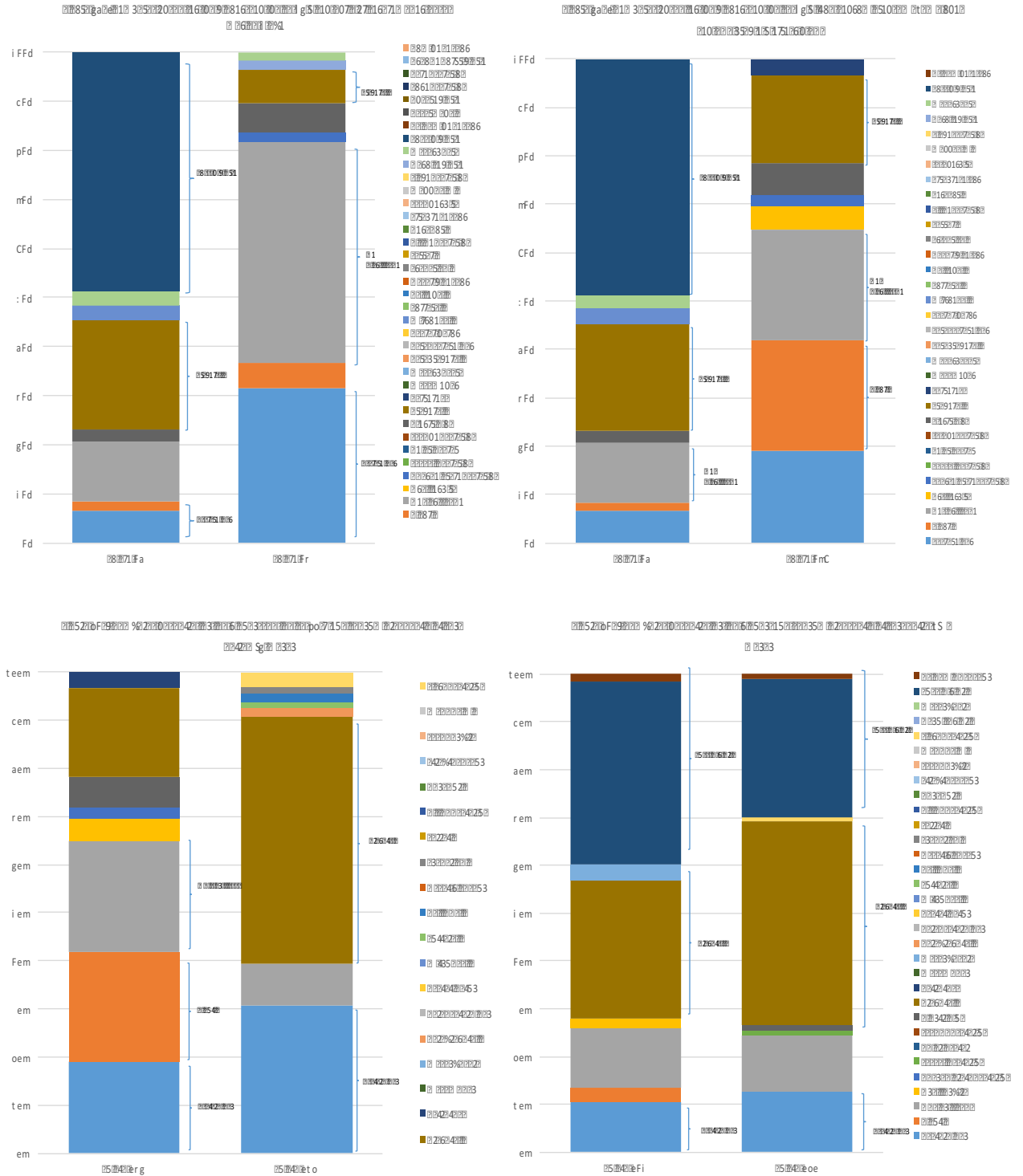


Tabla 24: Características de los individuos con índice de shannon <2, VIH y consumo de antibióticos

GRUPO	Sujeto	Tiempo del ultimo Abx	Clase de Abx	Antibiótico	Género jerárquico
HIV CON TAR	004	> 1 año	TMP/SMX	TMP/SMX	Succinivibrio
HIV CON TAR	003	>1 año			Bacteroides
HIV CON TAR	012	3-6 meses			Prevotella
HIV SIN TAR	076	3-6 meses	TMP/SMX	TMP/SMX	Blautia
HIV CON TAR	020	1-3 meses	Betalactámico	Penicilina	Prevotella
HIV CON TAR	045	1-3 meses	Quinolona	Ciprofloxacino	Succinivibrio

Figura 24: Composición taxonómica entre los individuos con índice de shannon <2, VIH y consumo de antibióticos



DIVERSIDAD BETA DEL MICROBIOMA ENTRE LOS GRUPOS DE ESTUDIO

La diversidad beta se analizó por medio de la métrica de fracción única (UniFrac) solo para filogenia/cualitativo (unweighted) y se representó con graficas de análisis de coordenadas principales (PCoA) tridimensionales. No encontramos ninguna agrupación particular entre las muestras, ver figuras 25 y 26; sin embargo, notamos una tendencia en la agrupación alrededor de la familia Prevotellaceae en quienes el consumo de carbohidratos fue alto, ver figura 26d.

Figura 25. PCoA tridimensional del microbioma de los grupos de estudio en función de la diversidad beta (UniFrac) para filogenia/cualitativo (unweighted). El eje PC1 explica el 36.52% de la varianza, PC2 el 18.51% y PC3 el 11.16%. Las familias bacterianas más abundantes son Veillonellaceae, Bacteroidaceae y Prevotellaceae.

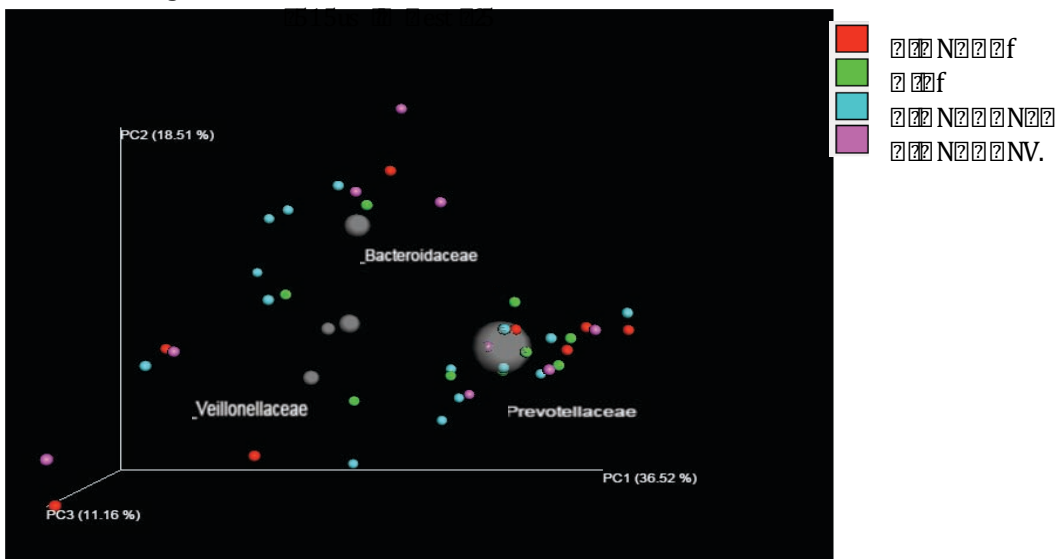


Figura 26. PCoA tridimensional del microbioma de los grupos de estudio en función de la diversidad beta (UniFrac) para filogenia/cualitativo (unweighted). El eje PC1 explica el 36.52% de la varianza, PC2 el 18.51% y PC3 el 11.16%. Las familias bacterianas más abundantes son Veillonellaceae, Bacteroidaceae y Prevotellaceae.

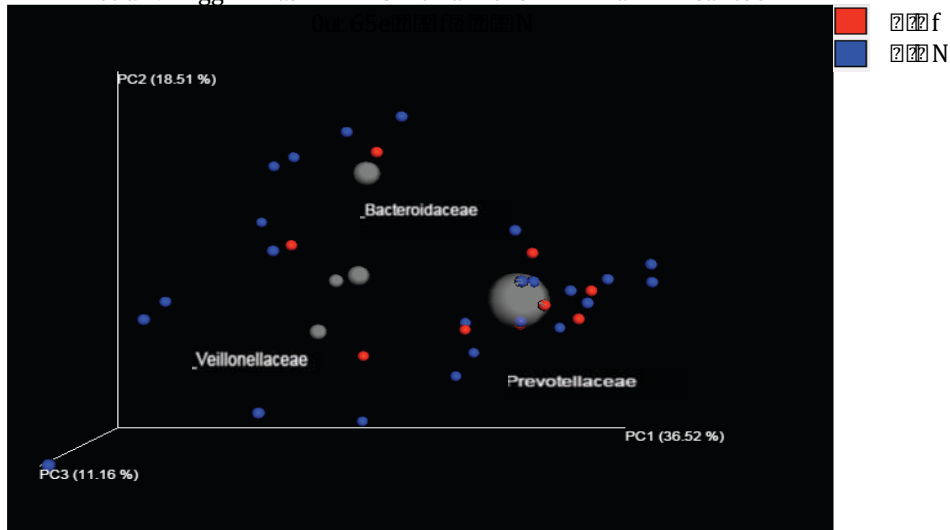


Figura 27. PCoA tridimensional del microbioma de los grupos de estudio en función de la diversidad beta (UniFrac) para filogenia/cualitativo (unweighted). El eje PC1 explica el 36.52% de la varianza, PC2 el 18.51% y PC3 el 11.16%. Las familias bacterianas más abundantes son Veillonellaceae, Bacteroidaceae y Prevotellaceae.

CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL MICROBIOMA Y SU RELACIÓN CON LOS GRUPOS DE ESTUDIO

A nivel de phylum

Se compararon las abundancias relativas de los tres phylum predominantes en nuestra cohorte: Firmicutes, Bacteroidetes y Proteobacterias en nuestros grupos de estudio. No se encontraron diferencias significativas. Bacteroidetes fue el phylum más predominante, con una abundancia relativa de 0.54 (0.21-0.71) en los individuos VIH-, 0.41 (0.17-0.86) en los individuos VIH+TAR+ y 0.61 (0.18-0.79) en los individuos VIH+TAR-, ver tabla 25. A pesar de no encontrar diferencias entre las abundancias relativa a nivel de phylum y nuestro grupos de estudio, en el grupo de los individuos VIH+TAR+ se observó la mayor proporción y variabilidad del phylum Proteobacteria (0.15, rango 0.04-0.52) sin ser estadísticamente significativo entre 3 los grupos (KW $p=0.1$), sin embargo al comparar solo al grupo VIH+ TAR- con VIH+ TAR + si existe diferencia significativa (UMW $p=0.048$) en la proporción de este Phylum. ver figura 27 y 28

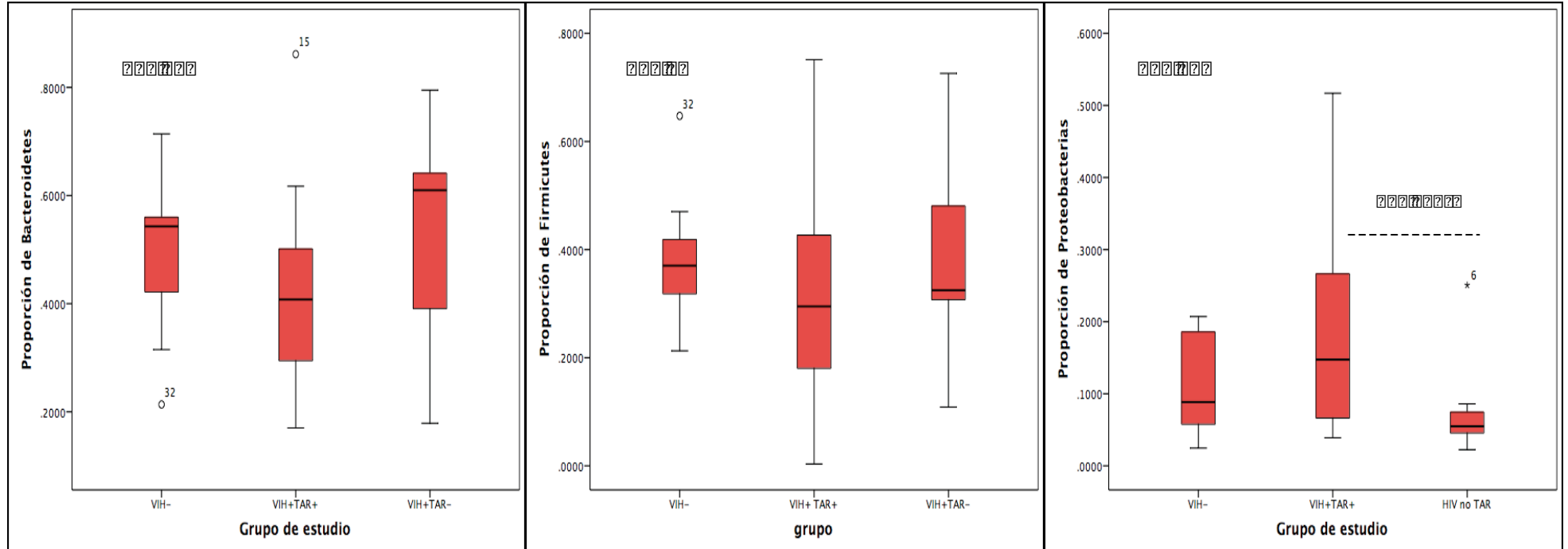
Tabla 25: Características generales de los filotipos/Phyla entre los grupos de estudio

Característica	VIH-	VIH+TAR+	VIH+ TAR-	P*
Phylum (Proporción de Firmicutes)	0.37 (0.21-0.65)	0.29 (0.003-0.75)	0.32 (0.11-0.72)	0.60
Phylum (Proporción de Bacteroidetes)	0.54 (0.21-0.71)	0.41 (0.17-0.86)	0.61 (0.18-0.79)	0.28
Phylum (Proporción de Proteobacterias)	0.08 (0.03-0.2)	0.15 (0.04-0.52)	0.05 (0.02-0.25)	0.11
Índice Firmicutes/ Bacteroides	0.68 (0.3-3)	0.7 (0.014-4.4)	0.53 (0.14-3.68)	0.93

PF (passing filter)

* Kruskal-Wallis fue utilizada

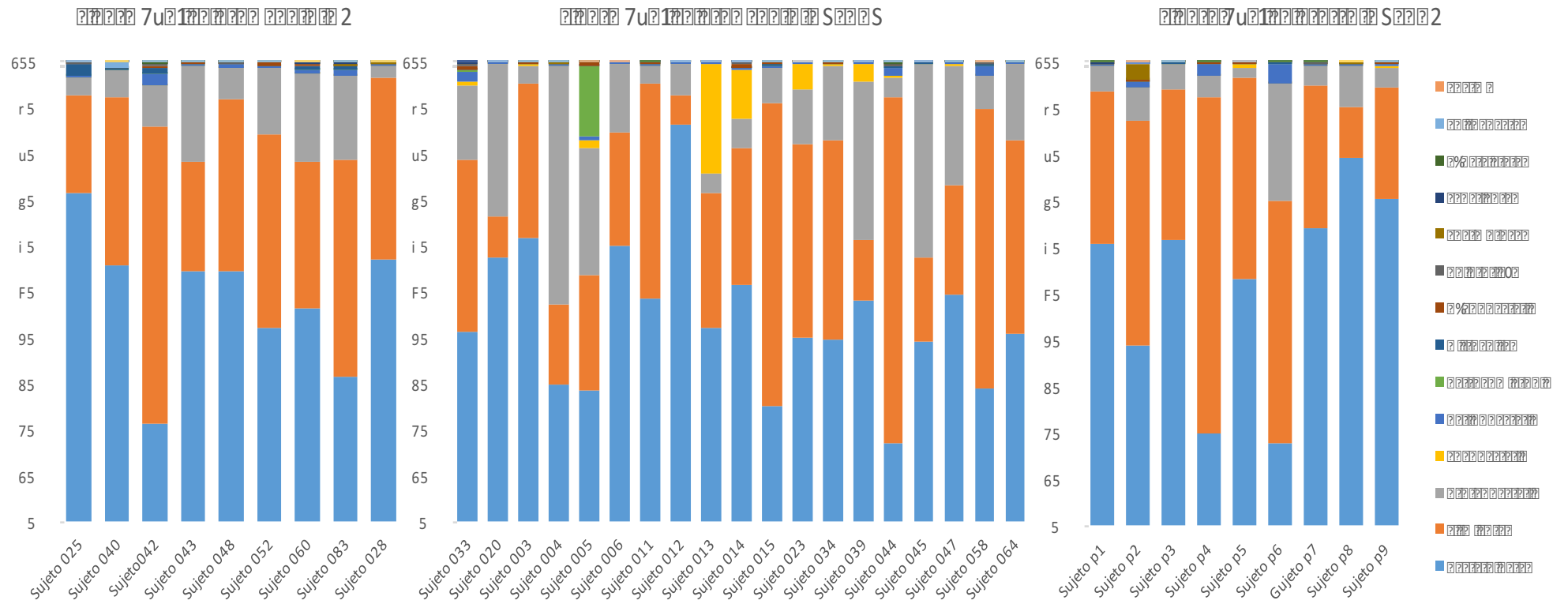
Figura 27: Proporción de Phyla entre los grupos de estudio.



* Prueba de Kruskal-Wallis para todos los grupos

** U Mann-Whitney

Figura 28. Proporciones de Phylum entre los grupos de estudio



A nivel de género

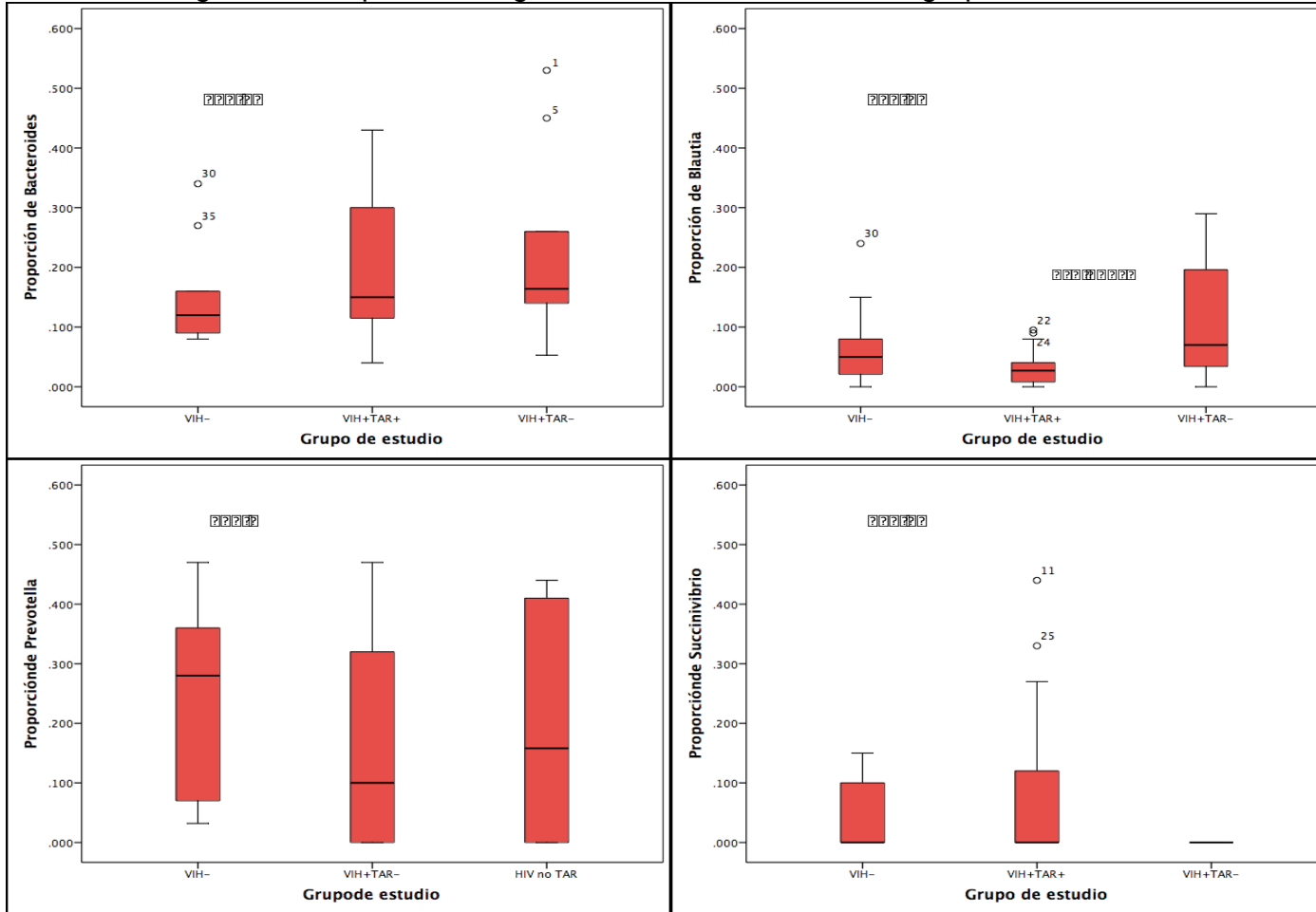
Encontramos 4 géneros predominantes en nuestra cohorte: *Bacteroides* (del phylum *Bacteroidetes*), *Blautia* (del phylum *Firmicutes*), *Prevotella* (del phylum *Bacteroidetes*), *Succinivibrio* (del phylum *Firmicutes*). *Bacteroides* fue el género (enterotipo) más abundante en los 3 grupos, sin encontrar diferencias entre ellos. Solo la proporción de *Succinivibrio* fue más frecuente en los individuos con VIH+TAR+ ($p=0.09$), y la proporción de *Blautia* tendió a ser más frecuente en individuos VIH+TAR- (mediana 0.07, rango 0-0.29, $p=0.11$). Cuando se comparó la proporción de *Blautia* entre el grupo con VIH+ TAR- con VIH+ TAR+ la diferencia fue significativa entre los dos grupos ($p=0.048$) ver tabla 26 y figura 29.

Tabla 26. Distribución de géneros bacterianos entre los grupos de estudio

Característica	VIH-	VIH+TAR+	VIH+TAR-	P*
Proporción del género <i>Bacteroides</i>	0.12 (0.08-0.34)	0.15 (0.04-0.43)	0.16 (0.05-0.53)	0.45
Proporción del género <i>Blautia</i>	0.05 (0-0.24)	0.027 (0-0.09)	0.07 (0-0.29)	0.11
Proporción del género <i>Prevotella</i>	0.28 (0.032-0.47)	0.1 (0-0.47)	0.16 (0-0.44)	0.6
Proporción del género <i>Succinivibrio</i>	0 (0-0.15)	0 (0-0.44)	0	0.09

* Kruskal-Wallis

Figura 29: Proporción de géneros bacterianos entre los grupos de estudio.



□□□□□ □□ □□□□
□□□□□ □□□□ □□□□□

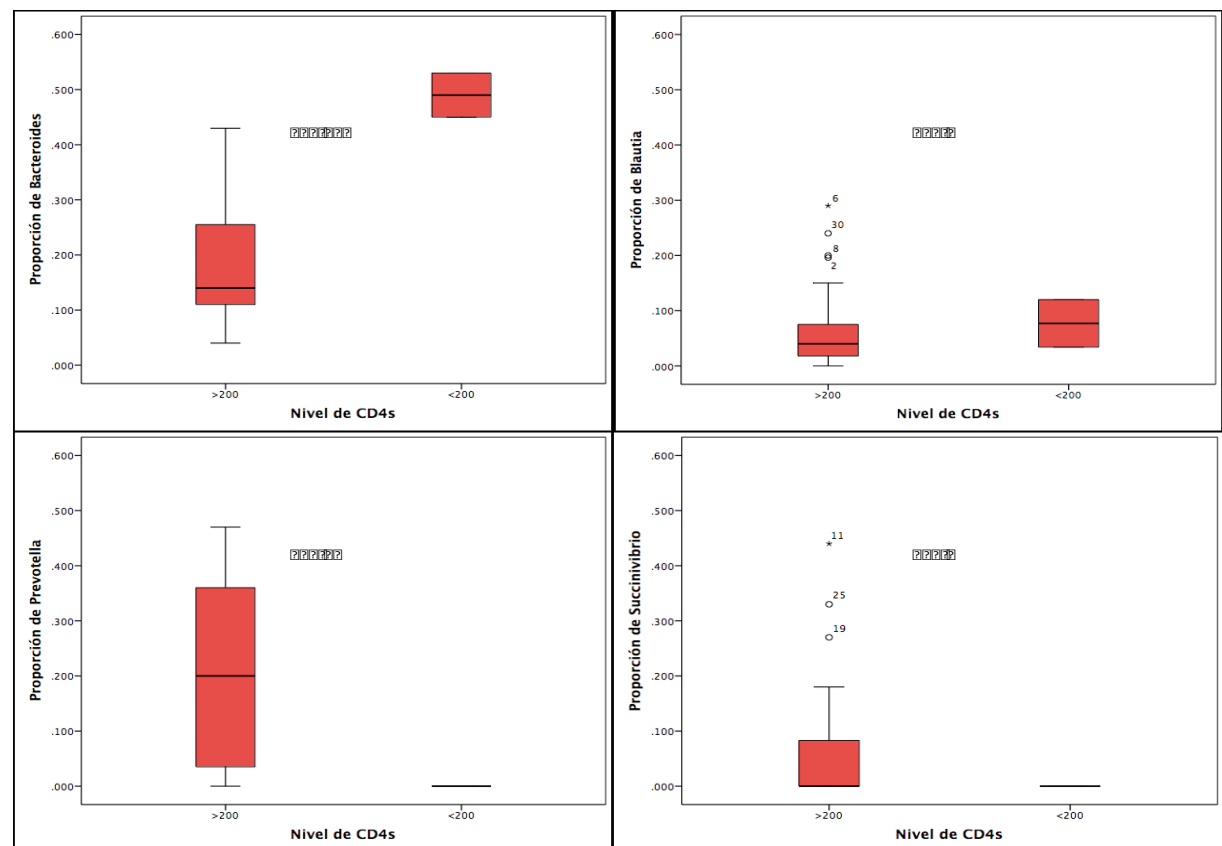
La proporción de *Bacteroides* fue mayor en los dos individuos con CD4s <200 (0.45 y 0.53) a comparación de aquellos con CD4s >200 (mediana 0.14, rango 0.04-0.43), ver tabla 27 y figura 30.

Tabla 27: Distribución de géneros bacterianos entre los grupos con conteo de CD4s <200

Característica	Conteo ≥ 200 CD4s (N=35)	Conteo <200 CD4s (N=2)	P*
Proporción del genero <i>Bacteroides</i>	0.14 (0.04-0.43)	0.49 (0.45-53)	0.003
Proporción del género <i>Blautia</i>	0.04 (0-0.29)	0.07 (0.34- 0.12)	0.5
Proporción del genero <i>Prevotella</i>	0.2 (0-0.47)	0	0.06
Proporción del género <i>Succinivibrio</i>	0 (0-0.44)	0	0.5

U Mann-Whitney

Figura 30: Diferencia de proporción de *Bacteroides* entre los individuos según su conteo de CD4s



Características demográficas, clínicas, biométricas y bioquímicas de los individuos del grupo longitudinal (individuos con VIH antes {T0} y 6 meses después de iniciar TAR {T6})

Al comparar las características clínicas y biométricas de los individuos con VIH antes y 6 meses después no encontramos diferencias significativas importantes en cuanto a toma de antibióticos, problemas gastrointestinales, consumo de tabaco, alcohol o ejercicio. Tampoco encontramos diferencias en peso, IMC, o consumo calórico diario, ver tabla 28 y 29.

Tabla 28: CARACTERISTICAS DE LOS PACIENTES DEL GRUPO LONGITUDINAL ENTRE T0 Y T6

Característica	Grupo Sin VIH (T0) N=9 (%)	Grupo con TAR 6 meses (T6) N=9 (%)	Valor de P*
Hx de problemas gastrointestinales	5 (56)	5 (56)	1
Toma del ultimo antibiótico			
≤ 1 mes	0	1 (12.5)	
Entre 1-3 m	1 (11)	5 (62.5)	
> 3 meses	3 (33)	0	
> 6 meses	3 (33)	1 (12.5)	
≥ 1 año	2 (22)	1 (12.5)	
Antibióticos			
Betalactámicos	2 (22)	5 (56)	
Quinolonas	1 (11)	0	
TMP/SMX	1 (11)	0	
Betalactámico/tetras	1 (11)	0	
No recuerda	4 (44)	4 (44)	
Consumo de tabaco	4 (44)	4 (44)	1
Consumo de alcohol	6 (67)	3 (33)	1
Ejercicio	3 (33)	3 (33)	0.5

* χ^2 de Mc Nemar

Tabla 29: Características biométricas de los grupos de estudio

Característica	Grupo Sin VIH (T0)	Grupo con TAR 6 meses (T6)	P
Peso (Kg)	64 (50-101)	64.5 (49-83.6)	0.67
Grasa (%)	21.5 (11-32)	19.9 (16-34.4)	0.77
Grasa (Kg)	11.7 (5-31)	10.6 (9-28)	0.77
Masa Magra (kg)	48 (38-67)	49 (37-54)	0.46
IMC	22 (17-33)	20.8 (18.5-33)	1
T score L1-3	-1.1 (-3.1a0.7)	-1.5 (-3.3a0.3)	0.12
Z score L1-L3	-1.2 (-2.8a0.5)	-1 (-2.9a0)	0.15
T score C-T	-1.2 (-2.5a1.3)	-1.15(-2.5a-.2)	1
Z score C-T	-0.5 (-2.4a0.8)	-0.55 (-2.4a-0.2)	0.91
Consumo calórico diario	2565 (1304-5990)	2437 (1746-3629)	0.48
Calorías de grasa	598 (262-1512)	636 (319-1159)	0.40
Proporción de grasa (calorías)	0.27 (0.1-0.4)	0.26 (0.15-0.33)	0.32
Calorías grasa saturada	109 (78-418)	178 (77-416)	0.77
Consumo Proteínas (gr)	112 (39-232)	101 (73-166)	0.88
Consumo de CH (gr)	256 (193-901)	359 (226-540)	0.67
Consumo grasa (gr)	67 (31-169)	71 (35-129)	0.32

Mediana y rango

*Wilcoxon matched-pair signed rank (Prueba de Wilcoxon rangos señalados) fue utilizada

Los principales hallazgos fueron a nivel de características bioquímicas: el aumento de la mediana de plaquetas (T0=194, rango 48-271 vs T6=232, rango 135-299; p=0.01), albúmina (T0= 4.2, rango 3.2-4.6 vs T6=4.4, rango 3.8-4.9; p=0.05), HDL (T0=29, rango 19-49 vs T6=36, rango 32-54; p=0.008), % de CD4, % de CD8 además de índice CD4/CD8 y la CV, ver en tabla 30.

Tabla 30: Características bioquímicas entre los grupos analizados

Característica	Grupo Sin VIH (T0)	Grupo con TAR 6 meses (T6)	P
Hemoglobina (gr/dL)	15.7 (14.7-17.4)	15.8 (13.4-17)	0.83
Hematocrito (%)	47.2 (43.6-51.3)	47.3 (40-51)	0.86
VCM	89 (84.4-93.2)	93.3 (88.6-97.4)	0.01
PLT	194 (48-271)	232 (135-299)	0.01
Lcc	5.2 (2.9-7.3)	5.3 (4.3-71.4)	0.73
N%	44.4 (37-53.5)	57 (7.8-74.7)	0.32
Lc%	39.6 (31-53)	31.6 (17-44)	0.12
Mon%	9.2 (3-11)	6.8 (4.3-9.1)	0.20
Eo%	2.5 (1-4)	1.6 (0-5.9)	0.62
Gluc	87 (70-96)	93 (78-106)	0.13
Urea	24 (13-35)	21.4 (11-30)	0.09
AU	5.5 (4.8-8.7)	6.2 (3.9-7.08)	0.04
Cr	0.8 (0.7-1.04)	0.86 (0.7-1.08)	0.81
Prot	7.9 (7.5-8.4)	7.5 (6.9-8.5)	0.05
Albumina	4.2 (3.2-4.6)	4.4 (3.8-4.9)	0.03
BT	0.55 (0.35-1.2)	0.46 (0.27-0.64)	0.09
BI	0.48 (0.24-0.77)	0.39 (0.21-0.5)	0.11
AST	25 (20-43)	30 (25-52)	0.26
ALT	24 (17-42)	36 (18-64)	0.06
DHL	169 (126-227)	159 (119-185)	0.07
TGC	132 (69-288)	136 (65-419)	0.31
CT	143 (123-235)	171 (141-202)	0.21
HDL	29 (19-49)	36 (32-54)	0.008
LDL	83 (45-153)	108 (76-132)	0.31
Fosfolipidos	189 (180-240)	207 (186-227)	0.52
APOB	84 (61-139)	95 (64-119)	0.86
APOA	100 (74-131)	127 (92-141)	0.03
CD45	2300 (1361-3154)	1741 (862-3285)	0.11
CD3	1688 (937-2672)	1337 (516-2907)	0.11
CD4	421 (115-538)	435 (173-1075)	0.10
CD4%	15 (8-24)	26 (17-33)	0.008
CD8	1344 (748-2224)	849 (340-1791)	0.11
CD8%	59 (46-79)	51 (39-63)	0.008
CD4/CD8	0.22 (0.1-0.45)	0.51 (0.29-0.62)	0.008
CV	94,083 (900-135,758)	<40	<0000.1

*Mediana y rango

Wilcoxon matched-pair signed rank (Prueba de Wilcoxon rangos señalados) fue utilizada

Características del microbioma fecal de los individuos del grupo longitudinal, (individuos con VIH antes {T0} y 6 meses después de iniciar TAR {T6}).

No se encontraron diferencias entre el número de lecturas que pasaron el filtro y que fueron clasificadas a género antes y después de 6 meses de TAR. Tampoco diferencias en la diversidad alfa; pero sí una disminución en el número de especies a los 6 meses de tratamiento (T0=420, rango 364-684 vs T6=413, rango 318-457; p=0.06) aunque no fue significativa ver tabla 31. Observamos una disminución significativa en la abundancia relativa de Bacteroidetes 6 meses después de iniciar el TAR (T0= 0.61, rango 0.18-0.79 vs T6=0.42, rango 0.02-0.75; p=0.04), ver tabla 31, y figuras 31.

Tabla 31: CARACTERISTICAS GENERALES DE LA MICROBIOTA EN EL GRUPO LONGITUDINAL (T0, T6)

Característica	VIH + TAR- (T0)	VIH+ TAR + 6m (T6)	P*
Proporción de lecturas clasificadas a género PF (%)	88.1 (80.3-93.5)	87.4 (65.5-90.4)	0.37
Numero de lecturas PF	279,902 (198155-1,681,838)	253,042 (195,847-385,303)	0.51
Riqueza (#especies)	420 (364-684)	413 (318-457)	0.06
Índice de Shannon	2.25 (1.86-2.50)	2.19 (1.55-2.48)	0.95
Reino (Proporción de bacterias)	0.999	0.999	1
Phylum (Proporción de Firmicutes)	0.32 (0.11-0.73)	0.49 (0.03-0.93)	0.51
Phylum (Proporción de Bacteroidetes)	0.61 (0.18-0.79)	0.42 (0.02-0.75)	0.04
Phylum (Proporción de Proteobacteria)	0.54 (0.2-0.25)	0.06 (0.02-0.33)	0.67
Índice Firmicutes/Bacteroides	0.53 (0.14-3.67)	1.02 (0.09-45)	0.51

PF (passing filter)

*Wilcoxon matched-pair signed rank (Prueba de Wilcoxon rangos señalados) fue utilizada

La disminución del Phylum de Bacteroidetes parece estar determinada principalmente por la disminución del género Bacteroides, la cual disminuyó en proporción después del inicio del TAR (T0= 0.16, rango 0.05-0.53 vs T6=0.13, rango 0-0.38; p=0.06), ver tabla 32 y figura 32.

Tabla 32: Distribución de géneros bacterianos antes y 6 meses después de TAR

Característica	VIH + TAR- (T0)	VIH+ TAR + 6m (T6)	P*
Proporción del genero <i>Bacteroides</i>	0.16 (0.05-0.53)	0.13 (0-0.38)	0.06
Proporción del género <i>Blautia</i>	0.07 (0-0.29)	0.04 (0.001-0.16)	0.21
Proporción del genero <i>Prevotella</i>	0.16 (0-0.44)	0.075 (0-0.45)	0.57
Proporción del género <i>Succinivibrio</i>	0	0 (0-0.25)	0.3
Proporción del género <i>Clostridium</i>	0 (0-0.05)	0.015 (0-0.18)	0.2
Proporción del género <i>Faecalibacterium</i>	0 (0-0.04)	0 (0-0.16)	0.78
Proporción de género <i>Phascolarctobacterium</i>	0.018 (0-0.22)	0 (0-0.13)	0.75

PF (passing filter)

*Wilcoxon matched-pair signed rank (Prueba de Wilcoxon rangos señalados) fue utilizada

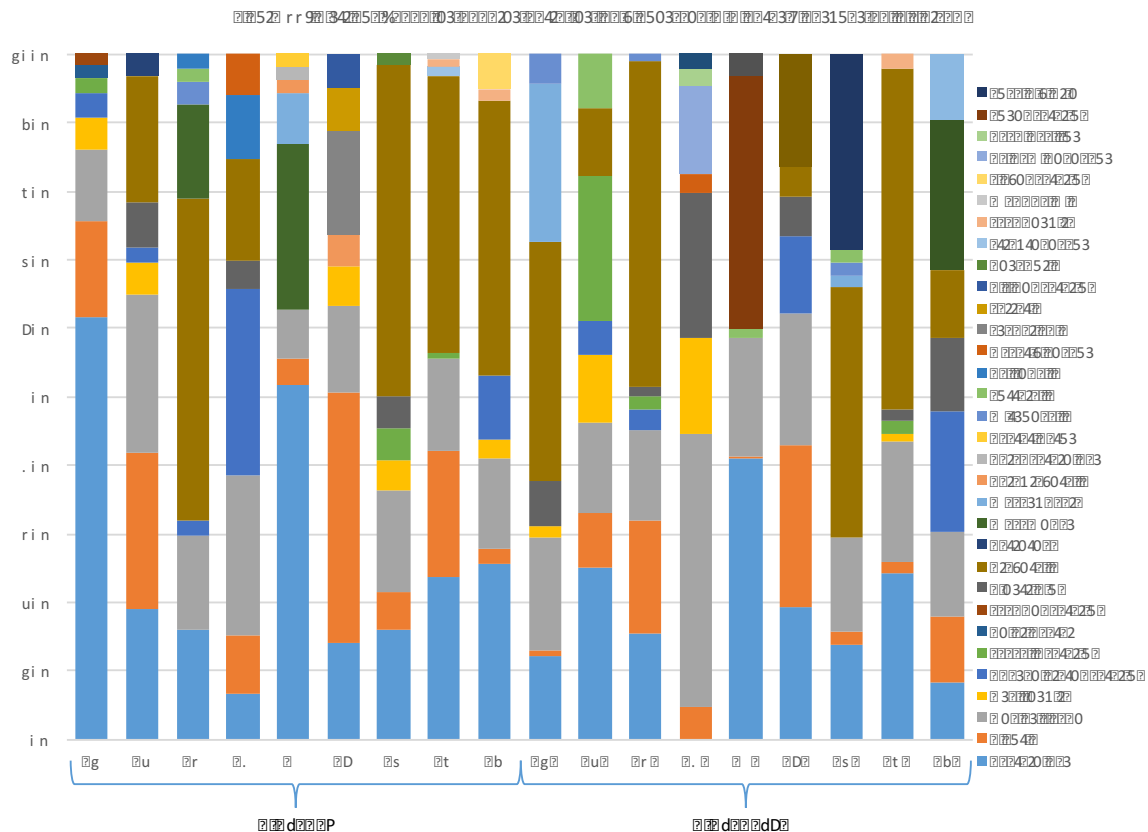
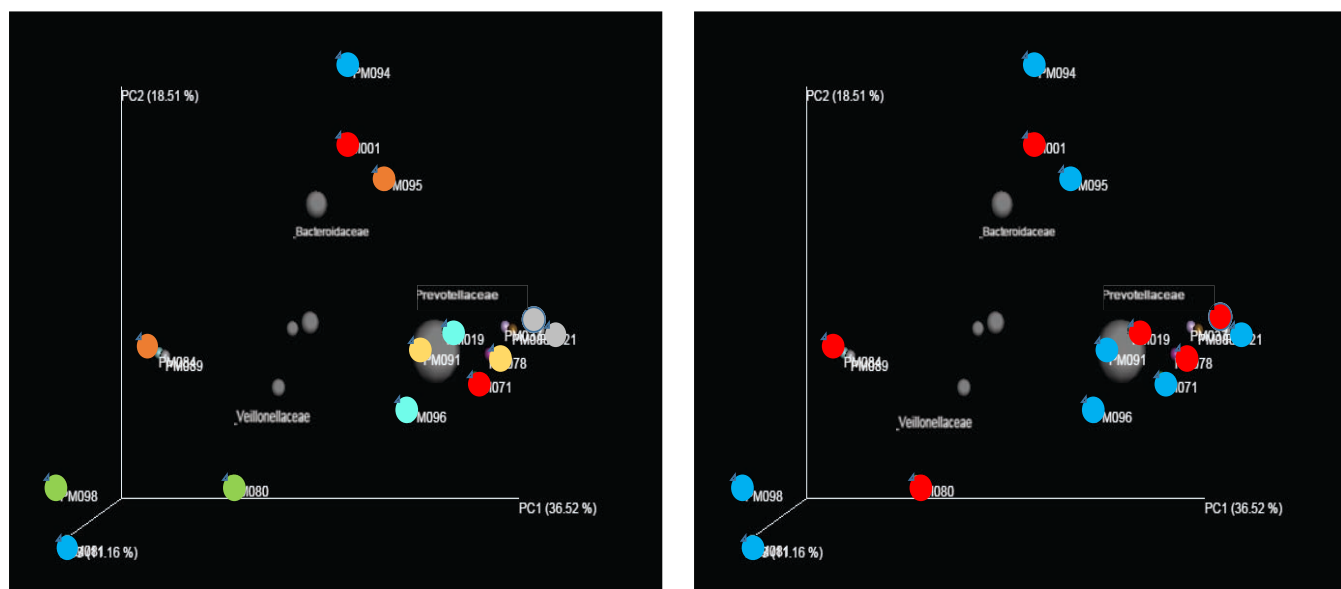


FIGURA 33. DIVERSIDAD BETA DEL MICROBIOMA EN EL GRUPO VIH+TAR- ANTES Y 6 MESES DESPUÉS DE INICIAR TAR.



Análisis de coordenadas principales (PCoA) en 3D.

10. DISCUSION

El estudio de la microbiota y su relación con los estados de salud enfermedad actualmente son un tema de estudio en varias áreas de la medicina. En nuestro estudio analizamos las características de clínicas de los individuos con VIH con y sin TAR comparados con aquellos sin VIH y su relación con las características de la microbiota fecal. Todos los individuos con VIH tenían manejo con el mismo esquema TAR, no hubo diferencia en la prevalencia de alteraciones gastrointestinales reportadas (diarrea, constipación etc), ni en las proporciones de consumo de tabaco y alcohol.

Se ha reportado que el consumo de alcohol incrementa la permeabilidad intestinal y facilita la translocación bacteriana de productos microbianos como el LPS además de que incrementa el crecimiento intestinal de Enterobacterias (61). Por otro lado, el tabaco se ha asociado con menor diversidad y favorece el incremento de Proteobacterias y disminución de Firmicutes y Actinobacterias (62). En nuestro estudio no encontramos diferencias en cuanto a diversidad, riqueza o proporción de

Phylum y genero entre quienes consumían alcohol y/o tabaco o no; por lo que podemos suponer que no fueron factores que afectaran el análisis del microbioma entre los grupos en este estudio.

Es interesante comentar que los niveles de CT, LDL y HDL fueron diferentes entre grupos, principalmente los niveles de CT fueron mayores en individuos VIH- y los niveles de HDL menores en el grupo VIH+TAR-.

Estas diferencias pueden explicarse debido a la diferencia en el estado inflamatorio y las características genética de cada individuo más que a la diferencia de la dieta pues entre grupos no hubo diferencias en la dieta.

La mediana de diversidad alfa medida con el índice de Shannon encontrada en la población total de este estudio fue baja a comparación de reportes previos en otras poblaciones como la asiática (63), la de América del Norte, (64), la francesa en donde la mediana del índice de Shannon reportada es mayor a 4 e incluso en población de Arabia Saudita donde se ha reportado baja diversidad alfa (índices menores a 4) (65). En nuestra población de estudio la mediana del índice de Shannon fue menor de 2.5, el valor mínimo fue 1.62 y el valor máximo no llego a un índice de 3, incluyendo al grupo VIH-. Incluso, entre cohortes con las mismas características que nuestra población con VIH+ se han reportado medianas mayores a 4 (52,57), lo que nos hace pensar que la mediana de diversidad baja puede ser una característica propia de la población mexicana.

La diversidad baja se ha asociado con enfermedades como la enfermedad inflamatoria intestinal (66), obesidad (6), enfermedad injerto contra huésped en trasplante de células hematopoyéticas (67), uso de antibióticos de amplio espectro (68) y las complicaciones de su uso como la colitis por *Clostridium difficile* donde se han encontrado índices asociados a esta patología hasta de 1.7 (69).

Al igual que Mutlu y colaboradores (47), nosotros observamos los índices de diversidad más bajos pero también más variables en los grupos con VIH. La variabilidad del índice de Shannon fue mayor entre los individuos con VIH+, principalmente en TAR; de hecho los índices más altos y bajos se encontraron en esta población. Sin embargo, en la población de individuos del grupo VIH+TAR- se presentó un cambio importante en la riqueza 6 meses después de iniciar TAR y aunque no presentaron diferencias en el índice de Shannon, sí se encontraron índices menores de 1.6 (aun menores que el grupo VIH+TAR+LD).

El consumo de ≥ 300 gr al día de carbohidratos se asoció con menor diversidad alfa, mientras que el ejercicio isotónico se asoció con mayor diversidad. En el análisis multivariado, el consumo de carbohidratos se asoció independientemente de la edad, el género y los CD4s con menor diversidad.

Los individuos con alto consumo diario de carbohidratos tuvieron más Bacteroidetes aparentemente a expensas de *Prevotella*, aunque sin ser significativo, y menor proporción de Firmicutes. En estudios donde se ha evaluado el papel de la dieta alta en carbohidratos se ha encontrado asociación con mayor producción de ácidos grasos de cadena corta incluyendo butirato por parte de la microbiota fecal, mayor proporción de bacterias anaerobias (principalmente Bacteroides del Phylum de los Bacteroidetes y Bifidobacterias del Phylum Actinobacteria) y esto se ha asociado con menor probabilidad de cáncer colorectal y menor grado de inflamación sistémica; sin embargo, en estos estudios el tipo de carbohidrato es principalmente fibra insoluble (70,71). En nuestro estudio no encontramos aumento de anaerobios del tipo Actinobacteria y el tipo de Bacteroidetes que incrementó fue *Prevotella* no *Bacteroides* por lo que podemos suponer que el tipo de CH consumido no fue fibra principalmente; desgraciadamente en este estudio no se analizó el tipo de carbohidrato consumido y por lo tanto no podemos saber a ciencia cierta que esa sea la razón de no observar el mismo cambio o predominancia observado en otros estudios.

En el análisis de la diversidad beta podemos observar que existe una distancia que existe entre aquellos con alto consumo de carbohidratos de los que consumen menos. Los individuos con alto consumo de CH se agruparon prácticamente alrededor de *Prevotella*.

La importancia del predominio de *Prevotella* en los individuos con alto consumo de carbohidratos es que, en individuos con VIH, esta predominancia se ha asociado con un estado de inflamatorio importante caracterizado por activación de células T (específicamente CD4, CD8) y dendríticas así como aumento de IFN (56).

En nuestra cohorte los Phyla más frecuentes fueron Bacteroidetes, Firmicutes y Proteobacteria, lo cual difiere a lo encontrado en otras poblaciones donde Actinobacteria es la 3ª población en frecuencia (63,72,73). Los enterotipos están fuertemente asociados con el tipo de dieta, cuando la dieta es principalmente

basada en proteína y grasa animal los *Bacteroides* son más frecuentes, y un alto consumo de carbohidratos se ha asociado con mayor proporción de *Prevotella* (74). El aumento de las proporciones de Proteobacteria se ha asociado con la dieta occidental, de ciudades grandes, lo cual, dada las características de nuestra población podría explicar este hallazgo (63,72,73,75). Los enterotipos más frecuentemente encontrados en nuestra cohorte fueron *Bacteroides* y *Prevotella*, sin embargo, el tercer grupo en frecuencia no fue *Ruminococcus* sino *Blautia*. Este hallazgo es muy interesante debido a que *Blautia* fue el 3er enterotipo identificado en el artículo original de Arumugam et al, y en el que se explica que la diferencia del 3er enterotipo identificado como más frecuente se debe a la base de datos de Illumina (la cual es la utilizada en este estudio basada en Greengenes), (9).

Al hacer el análisis multivariado observamos que el ejercicio afectaba el efecto del consumo de carbohidratos sobre la diversidad, lo que también ya se ha reportado con anterioridad (76,77). El ejercicio se ha asociado con disminución de Firmicutes y Proteobacterias y aumento de Bacteroidetes, así mismo en atletas de mayor rendimiento se ha observado mayor diversidad, aunque en aquellos que inician un esquema de ejercicio pueden tener disminución transitoria de la misma (76,77). La diversidad en mujeres fue mayor que en hombres y la tendencia, aunque no significativa, fue a que los hombres tuvieran mayor proporción de Bacteroidetes y las mujeres de Firmicutes. Es bien sabido en medicina que la proporción de tejido adiposo en mujeres es mayor, y la tendencia a menor proporción de Bacteroidetes y mayor de Firmicutes podría explicar las diferencias antropomórficas entre ambos géneros (71,78), aunque la influencia de las hormonas sexuales podrían ser los que dispares esta diferencia en la microbiota al igual que regulan la respuesta inmunológica (79).

Encontramos que en individuos VIH- no existía diversidad baja (definido para nuestro estudio como un índice de Shannon <2) a pesar de uso de antibióticos. Este hallazgo nos hace pensar si el efecto de los antibióticos en la microbiota de los grupos con VIH es más duradero en ellos y no solo se asocia con el tipo, duración y dosis de los antibióticos (28,29).

El phylum de Proteobacterias tendió a ser mayor en individuos VIH+TAR+ y encontramos mayor proporción de Fusobacterias

También encontramos que en el caso de los individuos VIH+TAR- que la proporción de *Blautia* fue mayor en este grupo.

Los Bacteroides predominaron en aquellos con CD4s <200 mientras que en individuos con CD4s >200 el género *Prevotella* fue más frecuente. Y la diversidad más alta en aquellos con CD4s >200, lo cual se ha reportado en estudios previos en poblaciones con VIH; sin embargo la asociación es afectada por otros factores como el consumo alto de carbohidratos previamente comentado (57).

Cuando se analizó al grupo VIH+TAR- 6 meses después de inicio de TAR no se encontraron diferencias en los datos demográficos, clínicos, biométricos y bioquímicos. Por otro lado, se observó un aumento de HDL a los 6 meses de TAR y como se esperaba aumento de CD4s, y CV <40 copias.

De manera interesante se observó una disminución de la riqueza a los 6 meses de iniciado TAR con disminución principalmente del Phylum de los Bacteroidetes que a su vez dependió de la disminución de *Bacteroides*. Los cambios en la riqueza se han asociado con la profundidad de los cambios de las poblaciones de la microbiota; por ejemplo cuando existe una intervención en la dieta, como el aumento en el consumo de fibra, o incluso al inicio de un nuevo régimen de ejercicio, la estabilidad y los cambios de la microbiota dependerán de la estabilidad o inestabilidad de la riqueza (73,77,80). La disminución de la riqueza se ha reportado en la enfermedad inflamatoria intestinal, en individuos en edad avanzada, manejo prologado con antibióticos, poblaciones urbanas y en aquellos con obesidad (73). La disminución de *Bacteroides* en VIH y el aumento de *Prevotella* ya se ha reportado por Mutlu et al (47) y Lozupone et al sin embargo este último grupo de investigadores asoció el hallazgo con dieta pobre en proteínas animales y alta de carbohidratos (como lo hemos hecho nosotros en los párrafos anteriores) pero no al efecto de TAR; de hecho Lozupone y colaboradores no encontraron cambios antes de 7-8 meses de TAR en la composición de la microbiota (52,54). En este punto, nosotros podemos comentar que sí encontramos cambios en los primeros 6 meses de TAR caracterizados por disminución significativa de la riqueza y tendencia al aumento de *Clostridium* sin aumento de *Prevotella*.

Esta disminución de diversidad y del género *Bacteroides* se ha observado entre la población con aumento de peso y obesidad (6), sin embargo los individuos que iniciaron TAR no tuvieron diferencia en el peso 6 meses después del inicio de TAR. A pesar de esto, el fenómeno de aumento de Firmicutes y disminución de

Bacteroidetes/Bacteroides se ha asociado con aumento de genes involucrados en la extracción de alimento/energía en aquellos con mayor peso (71,81,82), y esto podría explicar esta diferencia en los individuos que iniciaron TAR; que se encuentran en un estado de recuperación inmune; aunque su disminución haría suponer una disminución de la diferenciación de células Treg vía TGF- β 2. De manera también interesante, el aumento de los Firmicutes se debió principalmente, aunque no de manera única, al aumento del género *Clostridium*; lo anterior es interesante debido a que *Clostridium sp* se ha asociado con diferenciación de células Treg via el derivado epitelial TGF- β 1 y al parecer de una manera más eficiente que *Bacteroides* (31). Lo anterior podría llevarnos a concluir, aunque de manera simplista y aventurada a decir que mientras se favorece la absorción de energía con la disminución de Bacteroides no se descuida la diferenciación de las células Treg.

Las limitaciones del estudio son varias, la primera es la necesidad de tener mayor número de muestra, principalmente en los grupos VIH- y VIH + TAR-. Otra limitante del estudio fue que tuvimos más de 30% de pérdida de pacientes VIH+TAR- durante el seguimiento longitudinal, por lo que será necesario trabajar en técnicas para evitar la pérdida de seguimiento para futuros estudios longitudinales.

El estudio presentado solo contiene el seguimiento de 9 pacientes a 6 meses de TAR, será ideal continuar con el seguimiento a 12, 18 y 24 meses por lo menos de la misma población para tener más información del impacto de TAR en la composición del microbioma fecal.

Por otro lado, los individuos del grupo VIH+TAR- no tenían enfermedades oportunistas al momento de la toma de muestra de heces por lo que tener un grupo con individuos con infección por VIH avanzado suena a deseable para tener un panorama mejor de la dinámica de la microbiota.

Por otro lado, sobre nuestras observaciones relacionadas con el consumo alto de carbohidratos se requerirá un análisis más profundo del tipo de carbohidratos, y la proporción de fibra y el tipo de la misma en la dieta de los individuos del estudio para tener conclusiones y un reporte más detallado de las posibles asociaciones y el papel de la dieta en la microbiota.

Otra limitante de nuestra discusión y conclusiones son el tipo de muestra usada ya que se ha reportado con anterioridad que los aislados de heces varían con los

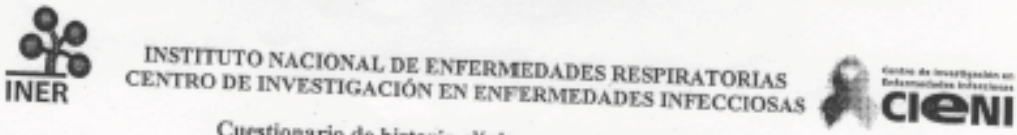
aislados de biopsias de colon, además de que el análisis que se realiza con NGS no es necesariamente de bacterias metabólicamente activas, por lo anterior se han realizado otro tipo de análisis como la metabolómica y la proteómica para entender mejor el papel de la microbiota. Por ultimo pero no menos importante, el análisis del microbioma solo incluye dominio de las bacterias pero en las heces también se encuentran hongos y virus que se ha demostrado tienen un papel en la regulación de la salud y enfermedad.

11. CONCLUSIONES

Los individuos con VIH y sin VIH no parecen tener diferencias en el índice de Shannon, sin embargo, en el grupo con VIH y TAR (a los 6 meses y de larga duración) se encontraron los índices de Shannon más bajos y el inicio de TAR a los 6 meses se asoció con disminución de la riqueza. El cambio principal asociado con el inicio de TAR fue la disminución de *Bacteroides* con aumento no significativo de *Clostridium*. Estos patrones se han asociado en estados de aumento de absorción de energía, disbiosis, y regulación inmune. Por lo anterior, el inicio de TAR parece ejercer un cambio en la microbiota intestinal a través de cambios en la diversidad, y la riqueza de especies; el impacto de TAR no puede ser analizado como un hecho aislado, sino como un factor más como la dieta, el ser hombre o mujer, la edad, el ejercicio etc que tienen un impacto en las características de la microbiota. La función e impacto de los cambios de las características de la microbiota después de TAR es un tema que aún requiere mayor estudio.

12. ANEXOS

ANEXO 1. Formato de recolección de datos clínicos.



INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS

Cuestionario de historia clínica para el protocolo:
"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"

Estimado (a) participante/paciente:

Por favor llene este cuestionario de manera completa y con la mayor precisión. Toda la información proporcionada es **CONFIDENTIAL**.

Fecha de la entrevista: _____
 Dr. _____
 Nombre y Firma

I. Datos Generales.

- Nombre: _____
- Sexo: M () F () Edad: _____ Estado Civil: _____
- País: _____ Ciudad: _____
- Centro de Salud: _____

II. Datos Socio demográficos.

1. Lugar de Nacimiento: _____ Fecha de nacimiento: _____
2. Lugar de Residencia Actual: _____
3. Escolaridad:

Primaria <input type="checkbox"/>	Preparatoria <input type="checkbox"/>
Secundaria <input type="checkbox"/>	Licenciatura <input type="checkbox"/>
Técnico <input type="checkbox"/>	Posgrado <input type="checkbox"/>
Otro: _____	
4. Situación laboral:

Estudiante <input type="checkbox"/>	Pensionado/jubilado <input type="checkbox"/>
Empleado <input type="checkbox"/>	Otro: _____
Desempleado <input type="checkbox"/>	
5. En caso de ser mujer, número de embarazos previos: _____

I.N.E.R.
INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS
APROBADO
NOV. 27 2012
COMITE DE CIENCIA Y BIOTICA

Página 1 de 5 Microbioma intestinal de pacientes infectados por VIH



INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS



III. Historia clínica.

1. Enfermedades actuales

Por favor indique la(s) enfermedades de las cuales padezca en este momento:

¿Sufre Usted o ha sufrido de problemas gastrointestinales? Si () No ()

En caso de Si, especifique cual(es): _____

¿Está Usted sufriendo de problemas gastrointestinales en este momento? Si () No ()

¿Con que frecuencia sufre usted de problemas gastrointestinales? _____

2. Medicación actual.

Si usted está tomando alguno(s) medicamento(s) actualmente, por favor anótelo(s) (incluyendo insulina, contraceptivos orales, vitaminas, medicamentos sin prescripción, suplementos dietéticos, antiácidos, laxantes etc.)

Medicamento	Razón de tomarlo	Dosis por día	Día empezado



3. Antibióticos

¿Está Usted tomando antibióticos actualmente? Sí () No ()

En caso de Sí, especifique cual(es):

Antibiótico	Razón de tomarlo	Dosis por día	Día empezado

Si No, ¿Cuándo fue la última vez que usted ha tomado antibióticos? Por favor anote el antibiótico, la razón por tomarlo y la dosis:

4. Inmunización:

¿Ha Usted sido vacunado para la influenza este año? Sí () No ()

¿Ha Usted hecho la prueba cutánea de la tuberculosis (PPD)? Sí () No ()

¿La prueba PPD fue negativa? Sí () No ()

Fecha de la prueba ___/___/_____

5. Cirugías previas

Por favor anote las cirugías que ha tenido:

Cirugía	Fecha	Comentarios



INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS



6. Enfermedades previas

Por favor anote la(s) enfermedad(es) que ha tenido en los últimos 10 años:

Enfermedad	Año	Comentarios

7. Estilo de vida.

¿Fuma Usted? Sí () No ()

En caso de responder Sí, ¿Cuántos cigarrillos fuma al día? _____

¿Consumo Usted alcohol? Sí () No ()

En caso de responder Sí, ¿Cuántas veces por semana?

Cerveza: _____

Vino: _____

Licor: _____

¿Ha Usted intentado bajar de peso este último año? Sí () No ()

En caso de responder Sí, ¿de cuántos kilos ha bajado? _____

¿Ha Usted subido de peso este último año? Sí () No ()

En caso de responder Sí, ¿de cuántos kilos ha subido? _____

¿Ha Usted estado a la dieta en este último año? Sí () No ()

En caso de responder Sí, ¿Cuáles fueron los cambios alimenticios que hizo?



INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS



¿Ha Usted consultado con un nutriólogo para bajar/subir de peso? Si () No ()

8. Ejercicio físico.

¿Hace Usted Ejercicio físico? Si () No ()

¿Con que frecuencia hace Usted ejercicio físico?

1 vez por semana () 2 a 3 veces por semana () 4 a 5 veces por semana ()

Todos los días () Otro: _____

¿Qué tipo de ejercicio físico hace Usted?

Gracias por llenar este cuestionario.

1. Institución:

2. Nombre del paciente (último, primer y medio nombre):

3. Fecha de nacimiento:

4. Fecha de ingreso al hospital:

5. Fecha de alta:

6. Fecha de inicio de síntomas:

7. Fecha de inicio de tratamiento:

8. Fecha de inicio de estudio:

9. Fecha de finalización de estudio:

10. Fecha de inicio de seguimiento:

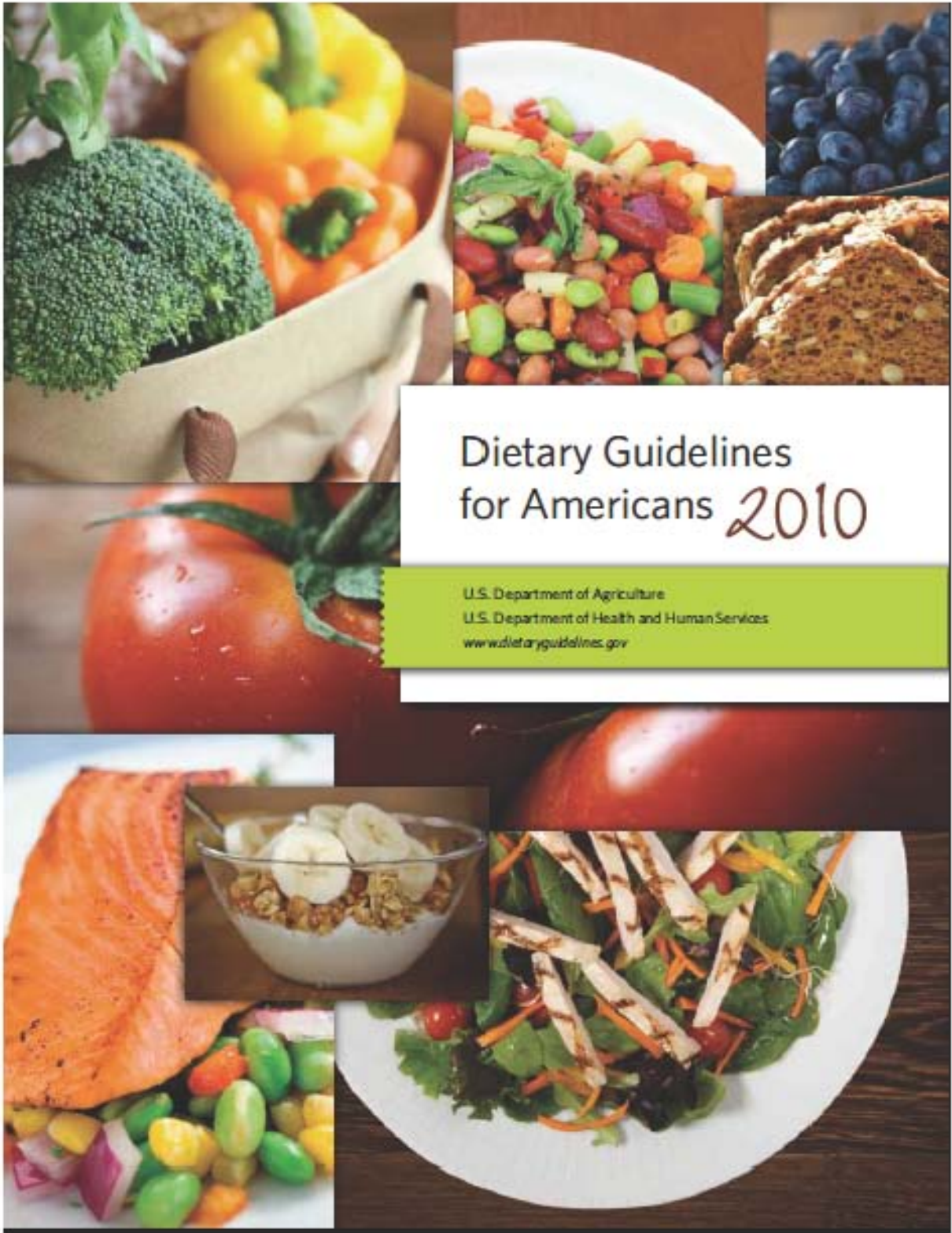
11. Fecha de finalización de seguimiento:

12. Fecha de inicio de diagnóstico:

13. Fecha de finalización de diagnóstico:



ANEXO 2 Datos de nutriología



ANEXO 3 Aprobación del comité de ética



INER

INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS
ISMAEL COSIO VILLEGAS

COMITÉ DE CIENCIA Y BIOÉTICA EN INVESTIGACIÓN DEL INER



SALUD

SECRETARÍA DE SALUD

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: 836-12

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.

Aterramente



27 de Noviembre de 2012

Dra. Raquel Chapela Mendoza
Presidente del Comité

CALZ. DE TLALPAN 4802, C. P. 14080, MEXICO, D. F. 5487-1700, APDO. POSTAL 22-0672

ANEXO 4 Hoja de consentimiento informado



INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS
"ISMAEL COSÍO VILLEGAS"
COMITÉ DE CIENCIA Y BIOTECNOLÓGICA

Consentimiento Bajo Información. Documento de 1 hoja, 2 páginas.
Comité de Evaluación del Expediente Clínico. Marzo 2012

INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS
"ISMAEL COSÍO VILLEGAS"

CONSENTIMIENTO BAJO INFORMACIÓN DE INVESTIGACIÓN
(Autorización para acceder a estudios clínicos, de investigación o ensayos clínicos con participación de seres humanos)

De acuerdo al Reglamento de la Ley General de Salud en materia de prestación de servicios de atención médica, Capítulo IV, Art. 80, 81, 82 y 83. NOM-158-SSA-1-1996, numeral 4.2 y 30.1

Tlalpan, México, D.F., Fecha: _____

El (s) que suscribe: _____ en mi carácter de _____ de _____ años de edad, manifiesto que el Dr. _____ me informó en forma verbal, sin presión alguna, de manera clara, sencilla y completa sobre mi participación en el protocolo de investigación: _____

Se me han explicado las alternativas que quizá me sean de ayuda, procedimientos a seguir para la atención y la forma de acceso a estudios, investigaciones o ensayos clínicos relevantes para las necesidades de tratamiento, así como la posibilidad de refusarme a participar o dejar de participar, sin que mi acceso a los servicios del INER se encuentren comprometidos por esta decisión, por lo que libremente acepto mi participación. Así mismo se me explicaron los riesgos y posibles complicaciones de de mi participación, y estoy enterado (a) de que cualquier procedimiento o la administración de medicamentos representan riesgos de complicaciones, pero que el beneficio de dichos procedimientos redundará en un diagnóstico y tratamiento adecuado de mi padecimiento o de la población en general.

Acepto los riesgos mencionados en razón de ser mayor el beneficio esperado. Por consiguiente, en pleno uso de mis facultades y de acuerdo al contenido del presente documento, autorizo al equipo de salud del INER, a integrarme en el protocolo de estudio antes señalado, en el cual el Dr. _____ funja como investigador responsable y puede ser localizado en los teléfonos 54 87 17 00 extensión _____ o al celular _____, en caso de una emergencia.

PACIENTE O PERSONA AUTORIZADA

Nombre completo: _____
Domicilio: _____
Identificación: _____
Parentesco: _____

Firma y/o huella digital

En caso de cambiar de opinión, podrá ser revocado el consentimiento en cualquier momento.

TESTIGO	TESTIGOS	TESTIGO
Nombre _____	Nombre _____	Nombre _____
Domicilio _____	Domicilio _____	Domicilio _____
Identificación _____	Identificación _____	Identificación _____
Parentesco _____	Parentesco _____	Parentesco _____

Firma y/o huella digital

Firma y/o huella digital

En caso de que el paciente, persona responsable o tutor legal del mismo no sepan leer o escribir, deberán plasmar su huella digital.

INVESTIGADOR RESPONSABLE

Nombre completo: Dr. Sandra Piñero Cardona Cardona
Firma

Calzada de Tlalpan 4602, Col. Sección XVI, C.P. 14080, México, D.F. Teléfono 54.87.17.00

AGENCIA SANITARIA
No. 121404616

LA FIRMA DEL FAMILIAR O RESPONSABLE DEL PACIENTE DEBE CONFORMAR A LOS ARTÍCULOS 1 Y 31 DEL REGLAMENTO DE LA LEY GENERAL DE SALUD EN MATERIA DE PRESTACIÓN DE SERVICIOS DE ATENCIÓN MÉDICA.

INER CEEICL-83 (83-2012)

REVOCACIÓN

En caso de revocación, libere al Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, Imeair Coahuila Villages de las consecuencias de el acto de revocación.

En caso de revocación: revoco el consentimiento de _____

Por lo anterior firmo como constancia y efectos legales a que haya lugar.

PACIENTE O PERSONA QUE REVOKA

Nombre completo: _____

Domicilio: _____

Identificación: _____

Parentesco: _____

Toma y/o huella digital

INVESTIGADOR RESPONSABLE

Nombre completo: _____

Firma

FUNDAMENTO LEGAL

REGlamento DE LA LEY GENERAL DE SALUD EN MATERIA DE PRESTACIÓN DE SERVICIOS DE ATENCIÓN MÉDICA, CAPITULO IV, ARTICULOS 60, 61, 62 Y 63

Art. 60.- En todo hospital y siempre que el estado del paciente lo permita, deberá realizarse a su ingreso autorización escrita y firmada para practicar, con fines de diagnóstico o terapéuticos, los procedimientos médicos-quirúrgicos necesarios de acuerdo al padecimiento de que se trata, debiendo informarse claramente el tipo de documento que se le presenta para su firma.

Tala autorización inicial no excluye la necesidad de recibir después la correspondiente a cada procedimiento que entrañe un alto riesgo para el paciente.

Art. 61.- En caso de urgencia o cuando el paciente se encuentre en estado de incapacidad transitoria o permanente, el documento a que se refiere el artículo anterior, será suscrito por el familiar más cercano en vínculo que le acompañe, o en su caso, por su tutor o representante legal, una vez informado del carácter de la autorización.

Cuando no sea posible obtener la autorización por incapacidad del paciente y ausencia de las personas a que se refiere el párrafo que antecede, los médicos autorizados del hospital de que se trata previa valoración del caso y de acuerdo de cuando menos dos de ellos, llevarán a cabo el procedimiento terapéutico que el caso requiera, dejando constancia por escrito en el expediente clínico.

Art. 62.- El documento en que conste la autorización a que refieren los artículos 60 y 61 de este reglamento, deberá contener:

- I. Nombre de la institución a la que pertenece el hospital.
- II. Nombre, razón o denominación social del hospital.
- III. Título del documento.
- IV. Lugar y fecha.
- V. Nombre y firma de la persona que otorga la autorización, y
- VI. Nombre y firma de los testigos.

El documento deberá ser impreso, redactado en forma clara, sin abreviaturas, enmendaduras o tachaduras.

Art. 63.- En caso que de las realizarse alguna amputación, mutilación o extirpación orgánica que produzca deformación física permanente en el paciente o en la condición estética o mental del mismo, el documento a que se refiere el artículo anterior, deberá ser suscrito además por dos testigos idóneos designados por el interesado o por la persona que lo suscribe.

Estas autorizaciones se ajustarán a las normas que establecen las Normas Técnicas.

LEY GENERAL DE SALUD, REGLAMENTO EN MATERIA DE CONTROL SANITARIO DE LA DISPOSICIÓN DE SUS ÓRGANOS, TEJIDOS Y CADÁVERES DE SERES HUMANOS

Art. 12 El donante orgánico podrá en cualquier tiempo revocar el consentimiento que haya otorgado para fines de disposición de sus órganos, tejidos o productos de su propio cadáver sin que en ele responsabilidad alguna por su parte.

En caso de que el donante orgánico no haya revocado su consentimiento en vida, no tendrá validez la revocación que, en su caso, hagan los donantes secundarios.

Se entenderá por necropsia o estudio post-mortem el estudio exhaustivo de los órganos del paciente, que se obtienen cuando ésta fallece ya que permite establecer en lo posible, las causas definitivas de la muerte.

Callezada de Tlalpan 4802, Col. Sección XVI, C.P. 14000, México, D.F. Teléfono 84.87.17.00

LEONORA SANTANA
No. 024804488



INER CEE/CL-46 (03-2012)
LA FIRMA DEL ENFERMO O REPRESENTANTE DEL PACIENTE SERÁ CONFORME A LOS ARTICULOS 60 Y 61 DEL REGLAMENTO DE LA LEY GENERAL DE SALUD EN MATERIA DE PRESTACIÓN DE SERVICIOS DE ATENCIÓN MÉDICA.

ANEXO 5 Hoja de instructivo de toma y entrega de muestra de heces

INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS



Protocolo:

"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"

INSTRUCTIONS PARA LA TOMA DE MUESTRA DE HECES

Estimado(a) participante:

Gracias por participar en este protocolo de investigación. La muestra de heces podrá ser recolectada en el CIENI o en su casa. El CIENI le proporcionará el material necesario, el cual consiste en un contenedor plástico, una bolsa plástica y esta hoja de instrucciones.

Instrucciones:

1. No tocar con los dedos la parte interior de la tapa, ni del contenedor.
2. Escribir su nombre y apellido en la parte externa del contenedor.
3. Lavarse las manos con agua y jabón antes de iniciar la recolección de la muestra de heces. **No se debe orinar sobre la muestra.**
4. Abre el contenedor. Usted puede recolectar la muestra de heces del tamaño de una nuez directamente en el contenedor. Si prefiere puede recolectar la muestra en papel aluminio o equivalente. En este caso, use la cuchara incorporada a la tapa del contenedor para transferir una cantidad equivalente al tamaño de una nuez, tomando la muestra en la parte que no esté en contacto directo con el papel aluminio.
5. Lavarse bien las manos. Tapar el contenedor.
6. Colocar el contenedor en la bolsa de plástico y guardarlo en el refrigerador hasta entregarlo en el CIENI.



13. BIBLIOGRAFIA

1. Weinstock GM. Genomic approaches to studying the human microbiota. *Nature* [Internet]. Nature Publishing Group; 2012 Sep 13 [cited 2013 Aug 7];489(7415):250–6. Available from: <http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=22972298&retmode=ref&cmd=prlinks>
2. Cho I, Blaser MJ. The human microbiome: at the interface of health and disease. *Nature Reviews Genetics*. 2012. p. 260–70.
3. Fujimura KE, Slusher NA, Cabana MD, Lynch S V. Role of the gut microbiota in defining human health. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2010;8(4):435–54.
4. Tsukumo DM, Carvalho BM, Carvalho-Filho M a, Saad MJ a. Translational research into gut microbiota: new horizons in obesity treatment. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2009;53(2):139–44.
5. Peterson J, Garges S, Giovanni M, McInnes P, Wang L, Schloss J a., et al. The NIH Human Microbiome Project. *Genome Res*. 2009;19(12):2317–23.
6. Musso G, Gambino R, Cassader M. Obesity, diabetes, and gut microbiota: The hygiene hypothesis expanded? *Diabetes Care*. 2010;33(10):2277–84.
7. Petrosino JF, Highlander S, Luna RA, Richard a, Versalovic J. NIH Public Access. *Clin Chem*. 2010;55(5):856–66.
8. Sekirov I, Russell SL, Antunes LCM, Finlay BB. Gut Microbiota in Health and Disease. *Physiological Reviews*. 2010.
9. Arumugam M, Raes J, Pelletier E, Paslier D Le, Batto J, Bertalan M, et al. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*. 2013;473(7346):174–80.
10. Ursell LK, Metcalf JL, Parfrey LW, Knight R. Defining the human microbiome. *Nutr Rev* [Internet]. Department of Chemistry and Biochemistry, University of Colorado at Boulder, Boulder, Colorado 80309, USA.; 2012 Aug [cited 2013 Aug 15];70 Suppl 1:S38–44. Available from: <http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=medc&NEWS=N&AN=22861806>
11. Ogilvie L a., Jones B V. The human gut virome: a multifaceted majority. *Front Microbiol* [Internet]. 2015;6(September):1–12. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2015.00918>
12. Nossa CW. Design of 16S rRNA gene primers for 454 pyrosequencing of the human foregut microbiome. *World J Gastroenterol* [Internet]. 2010 [cited 2013 Aug 7];16(33):4135. Available from: <http://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v16/i33/4135.htm>
13. Turnbaugh PJ, Gordon JI. The core gut microbiome, energy balance and obesity. *J Physiol*. 2009;587(Pt 17):4153–8.
14. Gevers D, Pop M, Schloss PD, Huttenhower C. Bioinformatics for the Human Microbiome Project. *PLoS Comput Biol*. 2012;8(11).
15. Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, Cole JR. Naïve Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl Environ*

- Microbiol. 2007;73(16):5261–7.
16. Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature methods*. 2010.
 17. Lozupone CA, Knight R. Species divergence and the measurement of microbial diversity. *FEMS Microbiology Reviews*. 2008.
 18. Brenchley JM, Douek DC. HIV infection and the gastrointestinal immune system. *Mucosal Immunol*. 2008;
 19. Fagarasan S. HT. Intestinal IgA synthesis. *Nat Rev Immunol*. 2003;3(1):63–72.
 20. Tilg H KA. Gut Microbiome, Obesity, and metabolic dysfunction. *J Clin Invest*. 2011;121(6).
 21. Lee YK, Mazmanian SK. Has the microbiota played a critical role in the evolution of the adaptive immune system? *Science*. 2010;330(6012):1768–73.
 22. Donskey CJ. The role of the intestinal tract as a reservoir and source for transmission of nosocomial pathogens. *Clin Infect Dis*. 2004;39(2):219–26.
 23. Sullivan A, Edlund C, Nord CE. Effect of new antimicrobial agents on the ecological balance of human microflora. *Lancet Infect Dis*. 2001;1:101–14.
 24. Ubeda C, Taur Y, Jenq RR, Equinda MJ, Son T, Samstein M, et al. domination of intestinal microbiota is enabled by antibiotic treatment in mice and precedes bloodstream invasion in humans. 2010;120(12).
 25. Modi SR, Lee HH, Spina CS, Collins JJ. Antibiotic Treatment Expands the Resistance Reservoir and Ecological Network of the Phage Metagenome.
 26. Ubeda C, Pamer EG. Antibiotics, microbiota, and immune defense. *Trends Immunol* [Internet]. Elsevier Ltd; 2012 Sep [cited 2013 Aug 12];33(9):459–66. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22677185>
 27. Donskey CJ, Hanrahan JA, Hutton RA, Rice LB. Effect of parenteral antibiotic administration on persistence of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in the mouse gastrointestinal tract. *J Infect Dis* [Internet]. 1999;180(2):384–90. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10395853>
 28. Jernberg C, Löfmark S, Edlund C, Jansson JK. Long-term impacts of antibiotic exposure on the human intestinal microbiota. *Microbiology* [Internet]. 2010;156(Pt 11):3216–23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20705661>
 29. Yin J, M P, Wang S, Liao S-X, Peng X, He Y, et al. Different Dynamic Patterns of β -Lactams, Quinolones, Glycopeptides and Macrolides on Mouse Gut Microbial Diversity. *PLoS One* [Internet]. 2015;10(5):e0126712. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0126712>
 30. Atarashi K, Honda K. Microbiota in autoimmunity and tolerance. *Curr Opin Immunol* [Internet]. Elsevier Ltd; 2011 Dec [cited 2013 Aug 7];23(6):761–8. Available from: <http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=22115876&retmode=ref&cmd=prlinks>

31. Smith PM, Garrett WS. The gut microbiota and mucosal T cells. *Front Microbiol* [Internet]. 2011;2(May):111. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3153059&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
32. Feng T, Elson CO. Adaptive immunity in the host-microbiota dialog. *Mucosal Immunol* [Internet]. Nature Publishing Group; 2011 Jan [cited 2013 Aug 11];4(1):15–21. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20944557>
33. Shu Z, Ma J, Tuerhong D, Yang C, Upur H. How intestinal bacteria can promote HIV replication. *AIDS Reviews*. 2013.
34. Gori A, Tincati C, Rizzardini G, Torti C, Quirino T, Haarman M, 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):757–8.
35. Klatt NR, Funderburg NT, Brenchley JM. Microbial translocation, immune activation, and HIV disease. *Trends in Microbiology*. 2013.
36. Nwosu FC, Avershina E, Wilson R, Rudi K. Gut microbiota in HIV infection: Implication for disease progression and management. *Gastroenterol Res Pract*. 2014;
37. Lackner AA, Mohan M, Veazey RS. The gastrointestinal tract and AIDS pathogenesis. *Gastroenterology* [Internet]. 2009;136(6):1965–78. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19462506
38. Li Q, Estes JD, Duan L, Jessurun J, Pambuccian S, Forster C, et al. Simian Immunodeficiency Virus–Induced Intestinal Cell Apoptosis Is the Underlying Mechanism of the Regenerative Enteropathy of Early Infection. *J Infect Dis* [Internet]. 2008;197(3):420–9. Available from: <http://jid.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1086/525046>
39. Sankaran S, George MD, Reay E, Guadalupe M, Flamm J, Prindiville T, et al. Rapid Onset of Intestinal Epithelial Barrier Dysfunction in Primary Human Immunodeficiency Virus Infection Is Driven by an Imbalance between Immune Response and Mucosal Repair and Regeneration. *J Virol* [Internet]. 2008;82(1):538–45. Available from: <http://jvi.asm.org/cgi/doi/10.1128/JVI.01449-07>
40. Sandler NG, Douek DC. Microbial translocation in HIV infection: causes, consequences and treatment opportunities. *Nature Reviews Microbiology*. 2012.
41. Brenchley JM. CD4+ T Cell Depletion during all Stages of HIV Disease Occurs Predominantly in the Gastrointestinal Tract. *J Exp Med* [Internet]. 2004;200(6):749–59. Available from: <http://www.jem.org/cgi/doi/10.1084/jem.20040874>
42. Sandler NG, Wand H, Roque A, Law M, Nason MC, Nixon DE, et al. Plasma Levels of Soluble CD14 Independently Predict Mortality in HIV Infection. 2011;203.
43. Brenchley JM, Price DA, Schacker TW, Asher TE, Silvestri G, Rao S, et al. Microbial

- translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat Med*. 2007;
44. Estes JD, Harris LD, Klatt NR, Tabb B, Pittaluga S, Paiardini M, et al. Damaged Intestinal Epithelial Integrity Linked to Microbial Translocation in Pathogenic Simian Immunodeficiency Virus Infections. *PLoS Pathog* [Internet]. 2010;6(8):e1001052. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1001052>
 45. Guadalupe M, Sankaran S, George MD, Reay E, Verhoeven D, Shacklett BL, et al. Viral Suppression and Immune Restoration in the Gastrointestinal Mucosa of Human Immunodeficiency Virus Type 1-Infected Patients Initiating Therapy during Primary or Chronic Infection. *J Virol* [Internet]. 2006;80(16):8236–47. Available from: <http://jvi.asm.org/cgi/doi/10.1128/JVI.00120-06>
 46. Merlini E, Bai F, Bellistri GM, Tincati C, d'Arminio Monforte A, Marchetti G. Evidence for polymicrobial flora translocating in peripheral blood of HIV-infected patients with poor immune response to antiretroviral therapy. *PLoS One*. 2011;
 47. Mutlu EA, Keshavarzian A, Losurdo J, Swanson G, Siewe B, Forsyth C, et al. A Compositional Look at the Human Gastrointestinal Microbiome and Immune Activation Parameters in HIV Infected Subjects. *PLoS Pathog*. 2014;
 48. Hunt PW. Th17, gut, and HIV: therapeutic implications. *Curr Opin HIV AIDS*. 2010;
 49. Klatt NR, Brenchley JM. Th17 Cell Dynamics in HIV Infection. *Curr Opin HIV AIDS*. 2011;5(2):135–40.
 50. Lederman MM, Funderburg NT, Sekaly RP, Klatt NR, Hunt PW. Residual immune dysregulation syndrome in treated HIV infection. *Adv Immunol*. 2013;
 51. Li SK, Leung RKK, Guo HX, Wei JF, Wang JH, Kwong KT, et al. Detection and identification of plasma bacterial and viral elements in HIV/AIDS patients in comparison to healthy adults. *Clin Microbiol Infect*. 2012;
 52. Lozupone CA, Li M, Campbell TB, Flores SC, Linderman D, Gebert MJ, et al. Alterations in the gut microbiota associated with HIV-1 infection. *Cell Host Microbe*. 2013;
 53. Pérez-Santiago J, Gianella S, Massanella M. Gut lactobacillales are associated with higher CD4 and less microbial translocation during HIV infection. *Aids* [Internet]. 2013;27(12):1921–31. Available from: <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Gut+lactobacillales+are+associated+with+higher+CD4+and+less+microbial+translocation+during+HIV+infection#0>
 54. Lozupone CA, Rhodes ME, Neff CP, Fontenot AP, Campbell TB, Palmer BE. HIV-induced alteration in gut microbiota. *Gut Microbes* [Internet]. 2014;54:562–70. Available from: <http://www.tandfonline.com/loi/kgmi20>
 55. Ellis CL, Ma Z-M, Mann SK, Li C-S, Wu J, Knight TH, 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;
 56. Dillon S, Lee E, Kotter C, Austin G, Dong Z, Hecht D, et al. An altered intestinal

- mucosal microbiome in HIV-1 infection is associated with mucosal and systemic immune activation and endotoxemia.
57. Nowak P, Troseid M, Avershina E, Barqasho B, Neogi U, Holm K, et al. Gut microbiota diversity predicts immune status in HIV-1 infection. *AIDS* [Internet]. 2015;1. Available from: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=0002030-900000000-97985>
 58. Lozupone C, Lladser ME, Knights D, Stombaugh J, Knight R. UniFrac: an effective distance metric for microbial community comparison. *ISME J* [Internet]. Nature Publishing Group; 2011;5(2):169–72. Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/ismej.2010.133>
 59. Lozupone CA, Knight R. The unifrac significance test is sensitive to tree topology. *BMC Bioinformatics* [Internet]. *BMC Bioinformatics*; 2015;16(1):211. Available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2105/16/211>
 60. Lozupone C a, Stombaugh J, Gonzalez A, Ackermann G, Wendel D, Vázquez-Baeza Y, et al. Meta-analyses of studies of the human microbiota. *Genome Res* [Internet]. 2013;23(10):1704–14. Available from: http://genome.cshlp.org/content/23/10/1704.full?rss=1&utm_source=dlvr.it&utm_medium=tumblr
 61. Campos Canesso M, Lacerda Queiroz N, Marcantonio C, Lauar J, Almeida D, Gamba C, et al. Comparing the effects of acute alcohol consumption in germ-free and conventional mice: the role of the gut microbiota. *BMC Microbiol* [Internet]. 2014;14(1):240. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4177591&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 62. Biedermann L, Zeitz J, Mwinyi J, Sutter-Minder E, Rehman A, Ott SJ, et al. Smoking cessation induces profound changes in the composition of the intestinal microbiota in humans. *PLoS One* [Internet]. 2013;8(3):e59260. Available from: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0059260>
 63. Nakayama J, Watanabe K, Jiang J, Matsuda K, Chao S-H, Haryono P, et al. Diversity in gut bacterial community of school-age children in Asia. *Sci Rep* [Internet]. 2015;5:8397. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4336934&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 64. Lin A, Bik EM, Costello EK, Dethlefsen L, Haque R, Relman DA, et al. Distinct distal gut microbiome diversity and composition in healthy children from Bangladesh and the United States. *PLoS One* [Internet]. 2013;8(1):e53838. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3551965&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 65. Yasir M, Angelakis E, Bibi F, Azhar EI, Bachar D, Lagier J-C, et al. Comparison of the gut microbiota of people in France and Saudi Arabia. *Nutr Diabetes* [Internet]. Nature Publishing Group; 2015 Apr 27;5(4):e153. Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nutd.2015.3>
 66. Dupont AW, Dupont HL. The intestinal microbiota and chronic disorders of the

- gut. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2011;8(9):523–31.
67. Jenq RR, Ubeda C, Taur Y, Menezes CC, Khanin R, Dudakov J a, et al. Regulation of intestinal inflammation by microbiota following allogeneic bone marrow transplantation. *J Exp Med* [Internet]. 2012 May 7 [cited 2013 Aug 24];209(5):903–11. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3348096&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 68. Pérez-Cobas AE, Artacho A, Knecht H, Ferrús ML, Friedrichs A, Ott SJ, et al. Differential effects of antibiotic therapy on the structure and function of human gut microbiota. *PLoS One*. 2013;8(11).
 69. Vincent C, Stephens D a, Loo VG, Edens TJ, Behr M a, Dewar K, et al. Reductions in intestinal Clostridiales precede the development of nosocomial *Clostridium difficile* infection. *Microbiome* [Internet]. 2013;1(1):18. Available from: <http://www.microbiomejournal.com/content/1/1/18>
 70. Brinkworth GD, Noakes M, Clifton PM, Bird AR. Comparative effects of very low-carbohydrate, high-fat and high-carbohydrate, low-fat weight-loss diets on bowel habit and faecal short-chain fatty acids and bacterial populations. *Br J Nutr* [Internet]. 2009 May;101(10):1493. Available from: http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0007114508094658
 71. Fava F, Gitau R, Griffin BA, Gibson GR, Tuohy KM, Lovegrove JA. The type and quantity of dietary fat and carbohydrate alter faecal microbiome and short-chain fatty acid excretion in a metabolic syndrome “at-risk” population. *Int J Obes* [Internet]. Nature Publishing Group; 2013 Feb;37(2):216–23. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ijo.2012.33>
 72. Zhang C, Li S, Yang L, Huang P, Li W, Wang S, et al. Structural modulation of gut microbiota in life-long calorie-restricted mice. *Nat Commun* [Internet]. Nature Publishing Group; 2013 Jul 16;4:2163. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3717500&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 73. Le Chatelier E, Nielsen T, Qin J, Prifti E, Hildebrand F, Falony G, et al. Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature*. 2013;
 74. Wu GD, Chen J, Hoffmann C, Bittinger K, Chen Y-Y, Keilbaugh SA, et al. Linking Long-Term Dietary Patterns with Gut Microbial Enterotypes. *Science* (80-) [Internet]. 2011 Oct 7;334(6052):105–8. Available from: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1208344>
 75. Siezen RJ, Kleerebezem M. The human gut microbiome: are we our enterotypes? *Microb Biotechnol* [Internet]. 2011 Sep;4(5):550–3. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1751-7915.2011.00290.x>
 76. Clarke SF, Murphy EF, O’Sullivan O, Lucey AJ, Humphreys M, Hogan A, et al. Exercise and associated dietary extremes impact on gut microbial diversity. *Gut* [Internet]. 2014 Dec 1;63(12):1913–20. Available from: <http://gut.bmj.com/cgi/doi/10.1136/gutjnl-2013-306541> \n<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25021423>
 77. Mika A, Van Treuren W, González A, Herrera JJ, Knight R, Fleshner M. Exercise Is

- More Effective at Altering Gut Microbial Composition and Producing Stable Changes in Lean Mass in Juvenile versus Adult Male F344 Rats. Cotter PD, editor. PLoS One [Internet]. 2015 May 27;10(5):e0125889. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0125889>
78. Conlon M, Bird A. The Impact of Diet and Lifestyle on Gut Microbiota and Human Health. *Nutrients* [Internet]. 2014;7(1):17–44. Available from: <http://www.mdpi.com/2072-6643/7/1/17/>
79. Markle JGM, Frank DN, Mortin-Toth S, Robertson CE, Feazel LM, Rolle-Kampczyk U, et al. Sex Differences in the Gut Microbiome Drive Hormone-Dependent Regulation of Autoimmunity. *Science* (80-) [Internet]. 2013 Mar 1;339(6123):1084–8. Available from: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1233521>
80. Tap J, Furet J-P, Bensaada M, Philippe C, Roth H, Rabot S, et al. Gut microbiota richness promotes its stability upon increased dietary fibre intake in healthy adults. *Environ Microbiol* [Internet]. 2015 Oct;n/a – n/a. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/1462-2920.13006>
81. Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald M a, Magrini V, Mardis ER, Gordon JI. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*. 2006;444(7122):1027–31.
82. Ley RE. Obesity and the human microbiome. *Curr Opin Gastroenterol*. 2010;26(1):5–11.