



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**CARACTERIZACIÓN DE LA MICROBIOTA ORAL DE PACIENTES
CON INFECCIÓN POR EL VIRUS DE INMUNODEFICIENCIA
HUMANA (VIH) Y NEUMONÍA.**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA

NADIA LIZETH PÉREZ MONTUFAR



Ciudad Universitaria, CDMX

2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Beatriz Ruíz Villafan

VOCAL: Rocío Gabriela Tirado Mendoza

SECRETARIO: Sandra María Pinto Cardoso

1er. SUPLENTE: Genaro Jiménez Reyes

2° SUPLENTE: Manuel Gutiérrez Aguilar

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**Departamento de Investigación en Enfermedades Infecciosas, Instituto
Nacional de Enfermedades Respiratorias**

Asesor del tema:

Dra. SANDRA MARÍA PINTO CARDOSO

Sustentante:

NADIA LIZETH PÉREZ MONTUFAR

INDICE GENERAL

LISTADO DE ABREVIATURAS	4
ÍNDICE DE FIGURAS	6
ÍNDICE DE TABLAS	8
1 RESUMEN	9
2 INTRODUCCIÓN	10
2.1 GENERALIDADES SOBRE LA MICROBIOTA	10
2.1.1 Breve historia del estudio de la microbiota	10
2.1.2 Gen ARNr 16S	12
2.2 MICROBIOMA HUMANO	16
2.2.1 Proyecto del microbioma humano	16
2.2.2 La microbiota oral	16
2.3 GENERALIDADES SOBRE LA CAVIDAD ORAL	21
2.3.1 Componentes inmunológicos de la cavidad oral	21
2.4 INFECCIÓN POR EL VIRUS DE INMUNODEFICIENCIA HUMANA	23
2.4.1 Generalidades del Virus de Inmunodeficiencia Humana	23
2.4.2 Genoma viral y ciclo de replicación de VIH	23
2.4.3 Historia natural de la infección y patogénesis	24
2.4.4 Tratamiento antirretroviral	27
2.5 EL VIH Y SU TRANSMISIÓN ORAL	28
2.6 ENFERMEDADES ORALES RELACIONADAS CON VIH	29
2.7 VIH Y MICROBIOTA ORAL	32
3 JUSTIFICACIÓN	37
4 HIPÓTESIS	38
5 OBJETIVOS	39
5.1 OBJETIVO GENERAL	39
5.2 OBJETIVOS PARTICULARES	39
6 MATERIALES Y MÉTODOS	40
6.1 COHORTE DE ESTUDIO	40
6.2 OBTENCIÓN DE LOS LAVADOS ORALES	41

6.2.1 Preparación de los lavados orales para cuantificación de citocinas y extracción de DNA	42
6.3 OPTIMIZACIÓN DEL ENSAYO LUMINEX	42
6.4 CUANTIFICACIÓN DE CITOCINAS EN LAVADOS ORALES:	43
6.5 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES	45
6.6 EXTRACCIÓN DE DNA DE LAVADOS ORALES	45
6.7 PREPARACIÓN DE LIBRERÍAS DE TIPO 16S Y SECUENCIACIÓN:	49
6.7.1 Amplificación de la región V3-V4 del gen ARNr 16S (PCR V3-V4), PCR index y purificación de los productos amplificados	51
6.7.2 Cuantificación y normalización de las librerías:	55
6.7.3 Pooling de librerías	56
6.7.4 Desnaturalización y secuenciación de la librería:	56
6.8 ANÁLISIS	59
6.8.1 Datos estadísticos:	59
6.8.2 Datos de la microbiota oral:	59
7 RESULTADOS	64
7.1 CARACTERÍSTICAS DE LA COHORTE	64
7.2 DETERMINACIÓN DE LA INFLAMACIÓN LOCAL	69
7.3 ANÁLISIS DE DIVERSIDAD:	72
7.3.1 Alfa-diversidad	73
7.3.2 Beta-diversidad:	77
7.3.3 Perfil taxonómico	80
7.3.4 LEfSE	87
7.3.5 Asociaciones estado inflamatorio e infección por VIH y diversidad	88
8 DISCUSIÓN	91
9 CONCLUSIÓN	93
10 BIBLIOGRAFÍA	94
ANEXO 1. DICTAMEN DE ACEPTACIÓN DE PROTOCOLO	99
ANEXO 2. CONSENTIMIENTO INFORMADO	100
ANEXO 3. PREPARACIÓN DE REACTIVOS	108
ANEXO 4. RESUMEN DE REACTIVOS, MATERIALES, KITS Y EQUIPOS EMPLEADOS	109

Listado de abreviaturas

3TC	Lamivudina
ABC	Abacavir
ADN	Ácido desoxirribonucleótido
ARNr	ARN ribosomal
ARNr 16S	ARN ribosomal 16S
CCR5	C-C Receptor de quimiocina tipo 5
CD	Clúster de diferenciación
CENSIDA	Centro Nacional para la Prevención y el Control del VIH y el SIDA
Cobi	Cobicistat
CXCR4	C-X-C Receptor de quimiocina tipo 4
DGGE	Electroforesis en Gel de Gradiente Desnaturalizante
DTG	Dolutegravir
EFV	Efavirenz
EVG	Elvitegravir
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos, Estados Unidos, por sus siglas en inglés
FISH	Hibridación Fluorescente <i>in situ</i>
FTC	Emtricitabina
GATL	Tejido Linfoide Asociado a Intestino, por sus siglas en inglés
GM-CSF	Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos y Macrófagos
HOMD	Base de datos de Microbioma Oral Humano, por sus siglas en inglés
IFN-γ	Interferón gamma
IL	Interleucinas
LBA	Lavado bronqueoalveolar
MATL	Tejido Linfoide Asociado a Mucosas

Nef	Factor efector negativo
NGS	Secuenciación de Siguiete Generación
PAMP	Patrones Asociados a Moléculas de Patógenos
pb	Pares de bases
PCoA	Análisis de Coordenadas Principales
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PERMANOVA	Análisis Permutacional Multivariado de Varianza
PRR	Receptor de Reconocimiento de Patrones
QIIME	Quantitative Insights Into Microbial Ecology
Rev	Regulador de expresión génica
S	Grado de sedimentación
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
TAF	Tenofovir alafenamida
TAR	Tratamiento antirretroviral
Tat	Transactivador transcripcional
TDF	Tenofovir disoproxil fumarato
TDS	Tenofovir disoproxil
TLR	Receptores tipo Toll
TNF-α	Factor de Necrosis Tumoral alfa
UNAIDS	Programa de las Naciones Unidas sobre VIH/SIDA, por sus siglas en inglés
Vif	Factor de infectividad viral
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana
Vpr	Proteína viral r
Vpu	Proteína viral u
XTC	Emtricitabina o lamivudina

Índice de figuras

Figura 1 Estructura del ribosoma bacteriano

Figura 2 Estructura del ARNr 16S

Figura 3 Comunidades bacterianas que predominan cada hábitat de la cavidad oral

Figura 4 Factores que pueden afectar la microbiota oral

Figura 5 Componentes de la cavidad oral

Figura 6 Genoma del Virus de Inmunodeficiencia Humana

Figura 7 Ciclo de replicación viral

Figura 8 Historia natural de la infección por VIH

Figura 9 Componentes secretorios de la cavidad oral y su efecto sobre la replicación del VIH

Figura 10 Diagrama de flujo para Luminex.

Figura 11 Diagrama de flujo para extracción de ADN

Figura 12 La química de los secuenciadores Illumina

Figura 13 Diagrama de flujo para la preparación de librerías

Figura 14 Diagrama de la preparación de la PCR

Figura 15 Datos obtenidos a partir del programa de Agilent

Figura 16 Resumen de las corridas realizadas en el secuenciador MiSeq

Figura 17 Ejemplo de un formato FastQ

Figura 18 Secuencia de pasos para el análisis LEfSE

Figura 19 Datos clínicos de la cohorte de estudio

Figura 20 Interleucinas de importancia oral comparadas por estatus de VIH y uso de TAR

Figura 21 Rarefacción a 25 000 secuencias

Figura 22 Índice de Chao 1 para riqueza de especies

Figura 23 Índice de Shannon para diversidad

Figura 24 Gráficos de PCoA

Figura 25 Taxonomía de grupos bacterianos encontrados en todas las muestras

Figura 26 Taxonomía de grupos bacterianos presentes en los grupos de VIH

Figura 27 Taxonomía de grupos bacterianos de acuerdo con el uso de TAR

Figura 28 Taxonomía de grupos bacterianos por cuenta de linfocitos T CD4⁺

Figura 29 Análisis LEfSE para los estatus de VIH

Figura 30 Análisis LEfSE para los estatus de VIH de acuerdo con la cuenta de linfocitos T CD4⁺

Figura 31 Análisis LEfSE de acuerdo con el uso de TAR

Índice de tablas

Tabla 1 Programas para el manejo de datos de secuenciación

Tabla 2 Ciencias "ómicas" para complementar y profundizar el estudio de la microbiota

Tabla 3 Agentes causales de la neumonía

Tabla 4 Resumen artículos que han estudiado la asociación de la microbiota oral y el VIH

Tabla 5 Cuantificación de proteínas totales y ADN extraído

Tabla 6 Reactivos para PCR V3-V4

Tabla 7 Ciclos de reacción PCR V3-V4

Tabla 8 Reactivos para PCR de índice

Tabla 9 Ciclos de reacción para PCR de índice

Tabla 10 Características de la cohorte de estudio

Tabla 11 Agente causal diagnosticado de la neumonía

Tabla 12 Comparaciones de las citocinas cuantificadas

Tabla 13 Correlaciones entre citocinas de importancia oral y datos clínicos

Tabla 14 Valores de p para la métrica UniFrac usando el método PERMANOVA

Tabla 15 Géneros bacterianos presentes en las muestras. Se muestran las abundancias relativas de cada uno

Tabla 16 Correlaciones microbiota y datos clínicos

1 Resumen

Varios estudios han revelado que las alteraciones en el ambiente oral causan disbiosis en la composición de la microbiota oral misma que ha sido asociada a enfermedades orales y sistémicas. Una de las enfermedades a la que ha sido asociada dicha disbiosis es la **neumonía**, la cual es una enfermedad con tasas altas de mortalidad y morbilidad y la padecen varios de los grupos de riesgo entre ellos aquellos individuos inmunosuprimidos por infección con VIH. El objetivo de este proyecto fue caracterizar y comparar la microbiota oral de pacientes VIH positivos con y sin TAR y con neumonía contra la de individuos VIH negativos con neumonía, así como su relación con el estado inflamatorio local y los datos clínicos. Para ello, se utilizaron lavados orales de 70 individuos, de estos se obtuvo el ADN bacteriano para secuenciar y citocinas para cuantificar la inflamación local. No se encontraron diferencias en la inflamación local de los grupos de estudio y no existe una correlación entre los datos clínicos (carga viral y CD4⁺) con los niveles de IL-6 e IL-8. De igual manera, no encontramos una correlación significativa entre los géneros bacterianos encontrados con los niveles de IL-6, IL-8, carga viral y cuenta de linfocitos T CD4⁺. Se encontró que el estatus de VIH tiene un efecto sobre la diversidad microbiana siendo esta mayor en individuos VIH negativos. Al comparar diversidad entre VIH positivos con y sin TAR encontramos que el TAR no parece tener un efecto sobre la diversidad. En los perfiles taxonómicos encontramos géneros bacterianos previamente reportados en estudios de la microbiota oral entre ellos: *Campylobacter*, *Buellaidea*, *Atopobium*, *Actynomices*, *Granulicatella*, *Streptococcus Haemophilus*, *Veillonella*, *Rothia*, *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Leptotrichia*.

2 Introducción

2.1 Generalidades sobre la microbiota

2.1.1 Breve historia del estudio de la microbiota

La microbiota se define como un conjunto de microorganismos presentes en un ecosistema¹. El microbioma es un término utilizado para describir el conjunto de genes pertenecientes a la microbiota.

Fue Antonie van Leeuwenhoek quien, en 1683 en una carta dirigida a “La Real Sociedad de Londres” describe por primera vez en muestras de raspado de sus propios dientes la presencia de lo que ahora se conoce como un microorganismo^{1,2}.

Desde entonces y hasta la actualidad el estudio de los microorganismos está basado en su caracterización morfológica y metabólica mediante el uso del microscopio, realización de tinciones y su cultivo en condiciones estándares³. Fue hasta 1977 cuando Carl Woese propuso el uso del gen ADNr 16S, que codifica al ARNr 16S, para la caracterización taxonómica de las bacterias⁴. La idea del uso del gen ADNr 16S y el desarrollo de la primera tecnología de secuenciación del ADN por Fred Sanger fueron los catalizadores que impulsaron y facilitaron los estudios sobre la microbiota³. Varias técnicas fueron desarrolladas para el estudio de la microbiota: la técnica de PCR, técnica de FISH, técnica DGGE, entre otras, y más recientemente la secuenciación de siguiente generación (NGS).

Hoy en día el estudio de la microbiota consiste básicamente en secuenciar una o varias regiones del gen ADNr 16S por NGS (por ejemplo, para la plataforma Illumina el tamaño máximo aproximado de estos fragmentos es de 600 pb). Posteriormente, las secuencias obtenidas son alineadas contra secuencias completas de bacterias que están documentadas en bases de datos de tipo referencia como

GreenGenes, Ribosomal Database Project, HMD; para identificar a qué bacteria corresponde la secuencia obtenida³. Existen varias plataformas y diferentes tipos de químicas y tecnologías de secuenciación NGS que permiten la secuenciación del amplicón 16S de manera rápida, sencilla y accesible a la mayoría de los laboratorios. Tras el desarrollo de las técnicas de secuenciación y su uso para estudios de microbiota fue necesario el desarrollo de programas que fueran capaces de analizar la gran cantidad de datos proporcionados por los secuenciadores. En la Tabla 1 se muestran los programas que más comúnmente se emplean para el manejo de datos de secuenciación completa o parcial del gen ADNr 16S³.

Tabla 1 Programas para el manejo de datos de secuenciación

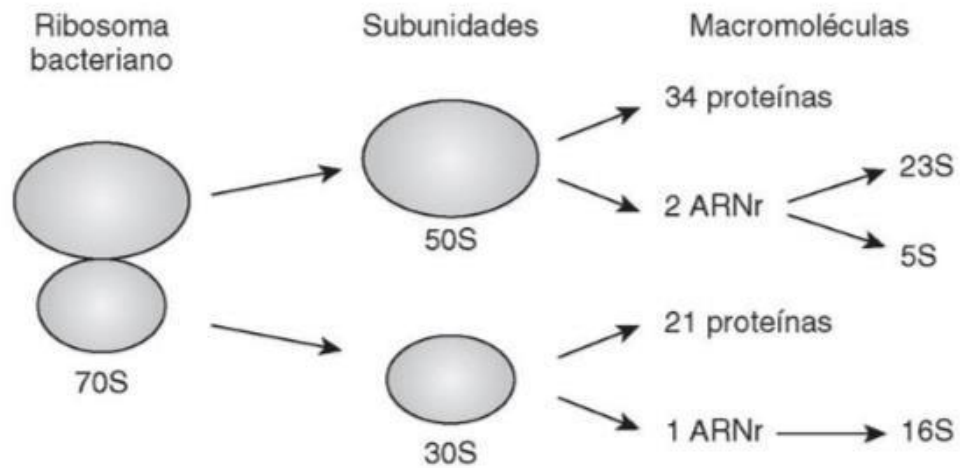
Programa	USO
FastQC	Herramienta de control de calidad
Fastx-Toolkit	Herramienta de control de calidad
PRINTSEQ	Herramienta de control de calidad
NGS QC	Herramienta de control de calidad
Meta-QC	Herramienta de control de calidad
Mothur	Análisis de calidad y clasificación taxonómica, análisis de diversidad
QIIME	Análisis de calidad y clasificación taxonómica, análisis de diversidad
MEGAN	Análisis de calidad y clasificación taxonómica, análisis de diversidad
PICRUST	Predecir el contenido funcional de metagenomas [http://picrust.github.io/picrust/]
LefSE	Determinar las características que expliquen con mayor probabilidad las diferencias entre grupos mediante varias pruebas estadísticas [https://galaxyproject.org]

Adaptada de Alejandra Escobar Zepeda, et.al., Frontier in Genetics, 2015³.

2.1.2 Gen ARNr 16S

El ribosoma bacteriano está compuesto por dos subunidades, la subunidad grande 50S y la subunidad pequeña 30S. Cada subunidad está compuesta por proteínas y ARNr. El ARNr 16S se encuentra en la subunidad 30S⁵ (Figura 1).

Figura 1 Estructura del ribosoma bacteriano



Tomada de: María del Rosario Rodicio, et.al. 2004⁵.

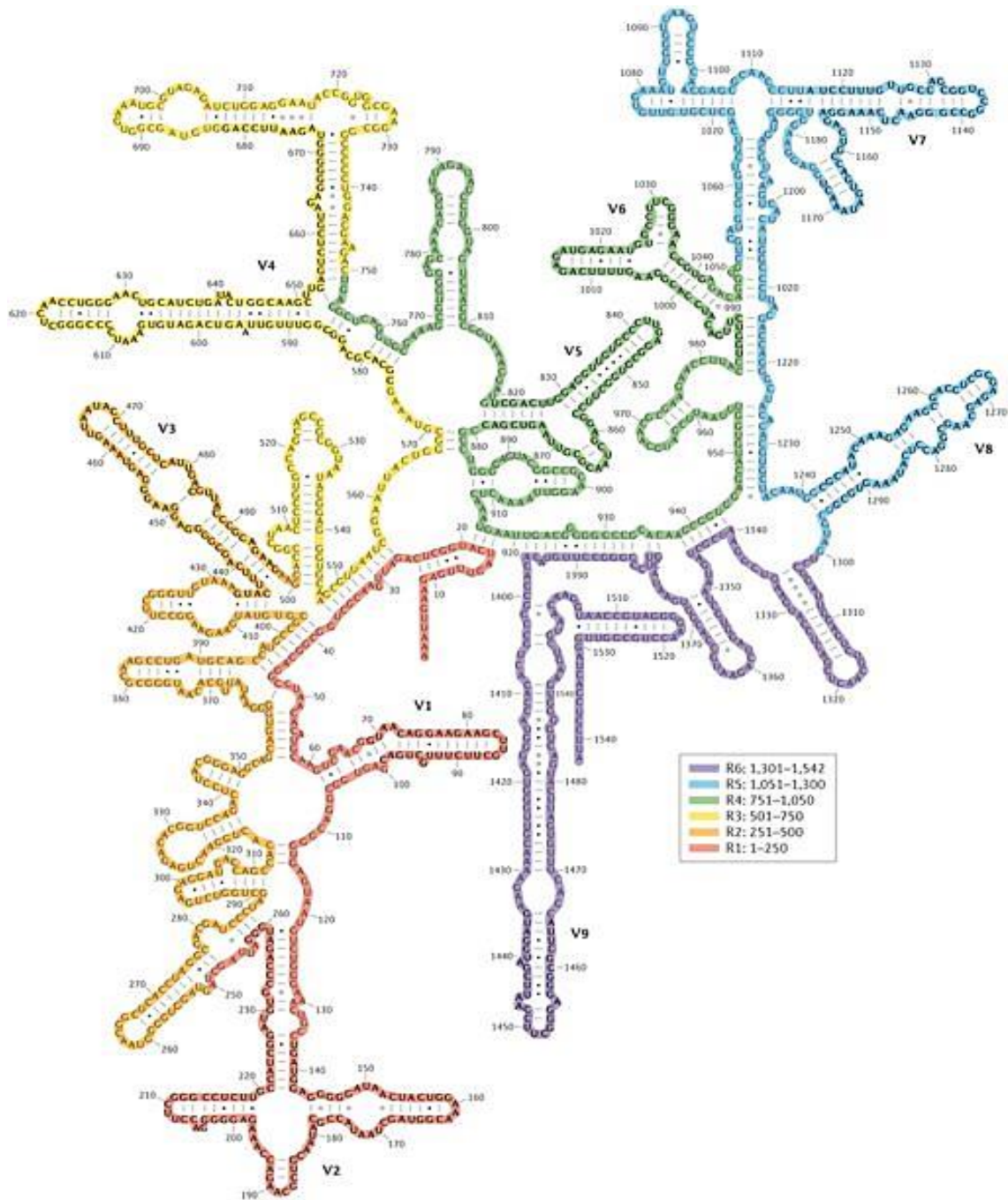
El ARNr 16S es un polirribonucleótido de aproximadamente 1500 nucleótidos codificado por el gen *rrs*, que está formado por nueve regiones hipervariables (VI-V9), donde se concentra la mayor información para análisis filogenéticos⁵ (Figura 2). El gen *rrs* está conservado por su función primordial dentro del ribosoma bacteriano es así que las regiones conservadas son aquellas que se encuentran en contacto con las proteínas. El gen *rrs* está presente en todas las bacterias esto y sus características lo hacen un marcador ideal para identificar las bacterias a nivel taxonómico⁵. Sin embargo, el gen *rrs* únicamente nos proporciona una clasificación taxonómica confiable del 97% a nivel de familia y posiblemente género. Usando la técnica de secuenciación del gen ADNr 16S, no podemos identificar especies. Además, este método no nos proporciona información sobre la función de las bacterias, es decir, perfiles metabólicos, expresión génica etc. Para conocer ese tipo de información se han desarrollado otras herramientas de investigación que permiten su estudio: 1. metagenómica (secuenciación del ADN total), 2. metatranscriptoma (secuenciación de los transcritos de ARN) y 3. metaboloma (perfil

metabólico mediante espectrofotometría de masas acoplado a cromatografía en fase líquida)⁶(Tabla 2).

Tabla 2 Ciencias "ómicas" para complementar y profundizar el estudio de la microbiota

Ciencia	Estudio
Metaranscriptómica	Expresión génica
Metaproteómica	Proteínas
Metabolómica	Perfiles metabólicos
Epigenómica	Perfiles que son el resultado de mecanismos de regulación de expresión génica (metilación, acetilación, etc)

Figura 2 Estructura del ARN 16S



Nature Reviews | Microbiology

Estructura secundaria del ARNr 16S. Se muestran seis fragmentos/regiones (R) de aproximadamente 250 nucleótidos con base en las regiones variables (V). Las regiones (R) incluyen las distintas regiones variables: R1 incluye V1 y V2, R2 incluye V3, R3 incluye a V4, R4 incluye las regiones V5 y V6, R5 las regiones V7 y V8, por último, R6 incluye la región V9. Tomada de Yarza P., et.al., Nature Microbiology, 2014⁷.

2.2 Microbioma humano

2.2.1 Proyecto del microbioma humano

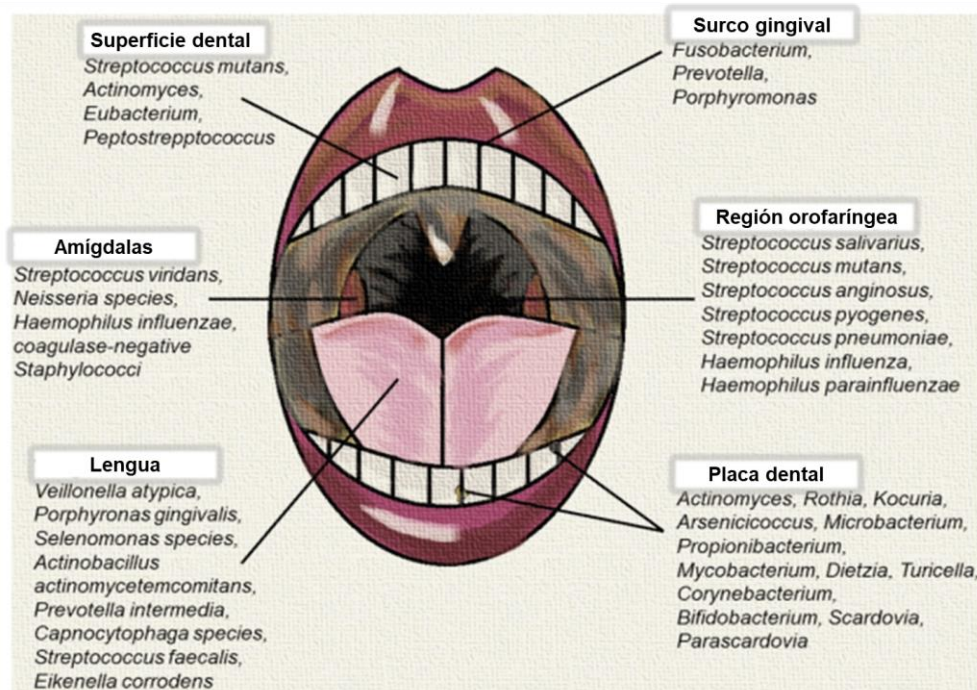
El proyecto del microbioma humano (HMP) surgió en parte por una iniciativa de los Institutos Nacionales de Salud (National Institutes of Health, NIH, Estados Unidos) en 2008 para estudiar el microbioma humano en la salud y compararlo posteriormente con varias enfermedades y trastornos metabólicos que podrían estar ligadas al microbioma como diabetes, obesidad, enfermedad de Crohn, entre otros con el objetivo de mejorar la salud humana a través del monitoreo o manipulación del microbioma⁸. En ese proyecto, se caracterizó el microbioma de cinco sitios anatómicos del cuerpo humano: tracto gastrointestinal, boca, vagina, piel y cavidad nasal de un total de 250 voluntarios, que se caracterizaron como sanos, es decir asintomáticos por enfermedades comúnmente encontradas en la población y sin uso de antibióticos⁸. Con este proyecto surgieron los primeros estudios de prueba en los cuales se encontraron asociaciones entre el microbioma de determinados sitios corporales y ciertas enfermedades, por ejemplo, la relación de la soriasis con el microbioma cutáneo, el papel del microbioma intestinal en la obesidad, el microbioma intestinal y varios cánceres, entre otros⁸. También se encontró que la microbiota del tracto gastrointestinal es la más diversa y por eso ha sido una de las más estudiadas por sus asociaciones y alteraciones con diversas enfermedades.

2.2.2 La microbiota oral

La microbiota oral se define por las comunidades bacterianas presentes en la boca (cavidad oral) y es la segunda más diversa del cuerpo humano. El microambiente de la boca es propicio al crecimiento bacteriano, con un pH de 6.5-7.5, una temperatura de 37°C y una

exposición constante al exterior. Se ha descrito que la cavidad oral alberga alrededor de 700 especies bacterianas aeróbicas y anaeróbicas⁹. Esas bacterias forman biopelículas adheriéndose a las superficies o estructuras de la cavidad oral del hospedero mediante la secreción de exopolímeros. Un ejemplo de biopelícula es la placa dental. Existen varios microambientes o hábitats en la cavidad oral y cada uno se caracteriza por una comunidad bacteriana específica¹⁰ (Figura 3).

Figura 3 Comunidades bacterianas que predominan cada hábitat de la cavidad oral



Adaptada de: Yenkaí Lim, et.al, Theranostics, 2017¹⁰.

Los principales filos que encontramos en la cavidad oral son: *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Spirochaetes*, *Fusobacteria*. Dentro de estos filos los géneros predominantes son: *Streptococcus*, *Veillonella*, *Actinomyces*, *Rothia*, *Corynebacterium*, *Bifidobacterium*, *Gardnerella*, *Atopobium*, *Fusobacterium*, *Leptotrichia*,

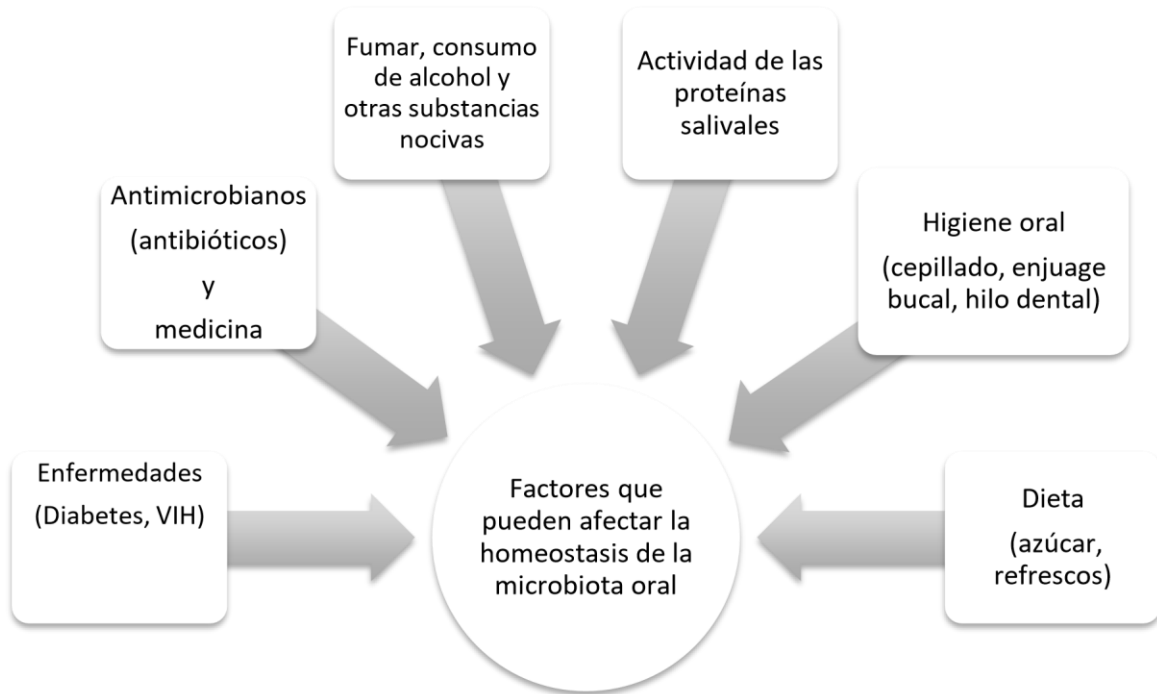
Prevotella, *Bacteroides* y *Porphyromonas*¹¹. Aunque estos géneros sean predominantes y forman parte de la microbiota oral común, cabe mencionar que existe una gran variación entre individuos con relación a la presencia y abundancia de esas bacterias.

Anteriormente se mencionó la importancia de la simbiosis entre la microbiota y el hospedero. Las comunidades bacterianas orales tienen varias funciones metabólicas, inmunológicas y fisiológicas tales como⁹:

- Diferenciación y maduración de la mucosa y del sistema inmune oral
- Digestión y nutrición
- Mantenimiento de la mucosa oral
- Homeostasis del sistema inmune: balance entre respuestas proinflamatorias y antiinflamatorias
- Prevenir el crecimiento de bacterias patógenas

Todas estas funciones ayudan a mantener un estado saludable dentro de la boca. Sin embargo, existen factores que pueden generar una alteración en la microbiota oral y por consiguiente una alteración en sus funciones llevando a un estado patológico con la aparición de lesiones orales. Entre estos factores tenemos: dieta, uso de agentes antimicrobianos, cambios hormonales, mala higiene bucal, inflamación gingival, algunas conductas como fumar, consumo de alcohol, el estatus socioeconómico, etc¹² (Figura 4).

Figura 4 Factores que pueden afectar la microbiota oral



Adaptada de M. Kilian, et.al. British Dental Journal, 2016⁹.

El estudio de la microbiota oral ha generado interés por su asociación con varias enfermedades orales como lo son la caries, gingivitis, periodontitis; pero también y de manera más relevante con enfermedades sistémicas como el cáncer ej. *Porphyromonas gingivalis* asociada a cáncer esofágico, trastorno metabólico ej. *Porphyromonas gingivalis* asociada a aterosclerosis, enfermedades respiratorias ej. *Chlamydia pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae* asociado a neumonía, y con enfermedades cardiovasculares ej. *Campylobacter rectus*, *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella nigrescens*¹² [ver Tabla 3 sección 2.7].

En la infección por VIH, se ha reportado que la microbiota oral se caracteriza por una disminución en la diversidad bacteriana y un aumento en bacterias patógenas con la adquisición de infecciones orales de origen bacteriano, fúngico o viral. Estas infecciones son

normalmente prevenidas por la presencia de bacterias comensales las cuales mediante señales moleculares conocidas como "quorum sensing" benefician la colonización, formación de biopelículas, defensa y adaptación a cambios ambientales^{9,13}. La investigación de la microbiota oral en la infección por VIH es muy importante ya que varias patologías/lesiones orales se han descrito entre ellas: micóticas como candidiasis, criptococosis, histoplasmosis; virales ocasionadas por virus como herpes zoster, papiloma virus, citomegalovirus; bacterianas como periodontitis ulcerativa necrotizante, eritema gingival lineal y neoplásicas entre ellas sarcoma de Kaposi, linfoma no Hodgkin y otras¹².

2.2.3 Concepto de disbiosis

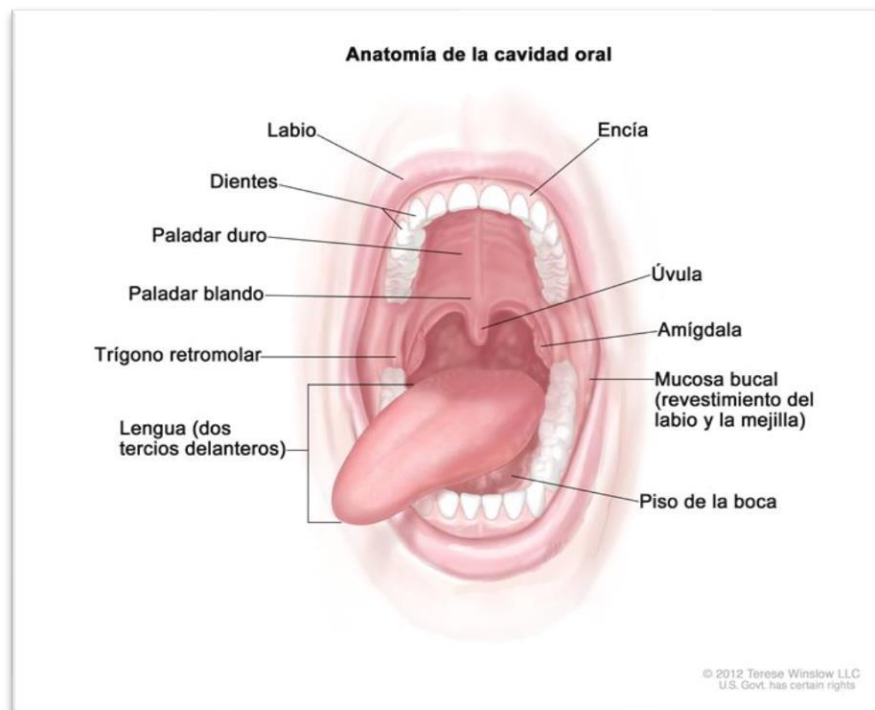
El término disbiosis refiere a una "condición" en la que la estructura, diversidad y función de la microbiota se ven alteradas y esto se acompaña de un efecto detrimental para el hospedero⁹. Es importante diferenciar entre la disbiosis y las variaciones normales que pueden ocurrir dentro de la microbiota. Por ejemplo, se sabe que la primera colonización bacteriana oral en un individuo ocurre durante el nacimiento y proviene de las comunidades bacterianas de la madre dependiendo del tipo de parto ya sea vía vaginal o cesárea. Esta primera microbiota oral irá cambiando según varias etapas importantes de la vida de un individuo como son lactancia, fórmula, aparición de la primera dentición y de la dentición adulta, hasta llegar a una microbiota diversa y estable, que generará un estado simbiótico con el individuo¹³. En la disbiosis, los cambios generados por diversos factores como los ya antes mencionados favorecen el incremento de bacterias patógenas y también bacterias comensales potencialmente patógenas, que se manifestará por un estado diferente de simbiosis. De tal manera

que la disbiosis puede ser definida en otros términos como una “perturbación a la diversidad y abundancia relativa de los taxos dentro de la microbiota”⁹.

2.3 Generalidades sobre la cavidad oral

La cavidad oral es donde inicia el tracto gastrointestinal y comprende varios elementos distintos: paladar duro, lengua, amígdalas, garganta, encías, placa subgingival, placa supragingival, dientes y labios¹² (Figura 5). Dentro de la cavidad oral también se encuentra el MATL que alberga los componentes inmunitarios que protegen la salud oral y mantienen un estado homeostático con la microbiota oral.

Figura 5 Componentes de la cavidad oral



Tomada de: <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionario/def/cavidadoral>

2.3.1 Componentes inmunológicos de la cavidad oral

La cavidad oral se encuentra en constante exposición a diversos factores, en particular bacterias patógenas y patobiontes. Esta

constante exposición ha permitido el desarrollo de defensas inmunitarias innatas y adaptativas para proteger la cavidad oral de agentes ajenos que puedan causar alguna enfermedad¹⁴.

Los componentes inmunitarios están divididos en humorales/secretorios y celulares; dentro de los primeros tenemos la inmunoglobulina A secretora (sIgA), lisozimas, defensinas e histatinas. Los componentes secretorios están presentes en saliva y son producidos por las células de la cavidad oral como lo son las células epiteliales o bien por las células del sistema inmune innato como son macrófagos, células dendríticas, neutrófilos y linfocitos. La saliva también contiene factores inmunológicos como las proteínas y péptidos antimicrobianos, peroxidasas, lactoferrinas y fosfolipasas¹⁵.

Dentro de los componentes celulares se encuentran las células epiteliales, linfocitos intraepiteliales, células NK (natural killer), granulocitos, macrófagos, células de Langerhans, células B; también está presente MALT¹⁴. Cada uno de los componentes celulares de la mucosa oral expresan receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) como los receptores tipo Toll (TLR), entre otros. Los PRRs al interactuar con patrones moleculares específicos presentes en los diferentes patógenos (PAMPs) activan al sistema inmune, con la liberación de citocinas proinflamatorias¹⁶. Debido a la constante exposición de la cavidad oral a diversos factores ajenos y potencialmente dañinos, mecanismos regulatorios han sido desarrollados e involucran la secreción de citocinas pro inflamatorias y antiinflamatorias^{16,17}. Bajo condiciones no inflamatorias, la señalización por PRRs inducida por microorganismos comensales o bien la presentación de sus antígenos en los nódulos linfáticos juega un papel importante en la homeostasis y la generación de la tolerancia inmunológica. Entre los mecanismos que pueden generar tolerancia inmune se encuentra la supresión de respuestas inmunes de las células

T ya sea directamente por la secreción de interleucina 10 (IL-10) proveniente de las células T reguladoras o de manera indirecta por la presentación de antígenos a través de una célula dendrítica inmadura¹⁶.

2.4 Infección por el Virus de Inmunodeficiencia Humana

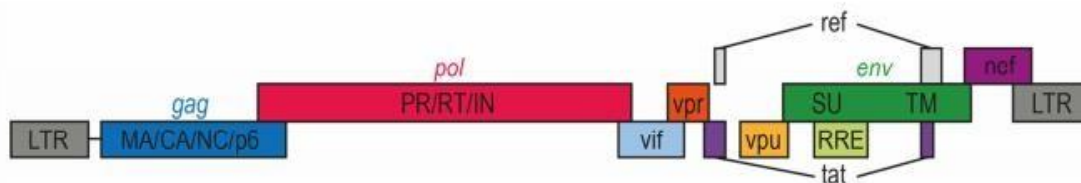
2.4.1 Generalidades del Virus de Inmunodeficiencia Humana

El Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) es el agente causal del SIDA. El VIH es una de las enfermedades con mayor prevalencia a nivel mundial. De acuerdo con el UNAIDS, a nivel mundial se estima que 36.7 millones de personas viven con VIH¹⁸. En México, CENSIDA es el órgano encargado de monitorear la prevalencia de la infección por VIH y en 2017 reportó una prevalencia del 0.2% y 72,505 casos de infección por VIH y 77,951 casos de SIDA¹⁹.

2.4.2 Genoma viral y ciclo de replicación de VIH

El VIH es un lentivirus de la familia *Retroviridae* que posee un genoma de dos hebras de ARN de 9.7 Kb. El genoma del VIH se compone de 9 genes en total: tres genes que codifican para proteínas estructurales y que son comunes a todos los retrovirus: *gag*, *pol* y *env*. Adicionalmente, el genoma del VIH posee 4 genes codificantes para proteínas accesorias: *nef*, *vif*, *vpr*, *vpu* y 2 que codifican para proteínas reguladoras: *tat*, *rev*²⁰ (Figura 6). Todas las proteínas codificadas por estos genes participan a la producción de una partícula viral denominada “virión” (Figura 7A) y son fundamentales para la replicación viral²⁰.

Figura 6 Genoma del Virus de Inmunodeficiencia Humana



El gen *gag* codifica para la matriz (MA), la cápside (CA), nucleocápside (NC) y p6. El gen *env* codifica para las fracciones proteicas de superficie (SU, gp120) y transmembranal (TM, gp41). El gen *pol* codifica para la integrasa (IN), transcriptasa reversa (RT) y proteasa (PR). Tomada de: Juan C. Becerra, et al, Microbial cell, 2016²⁰.

El VIH tiene como blanco las células que expresan la glicoproteína CD4 y los correceptores para su entrada a la célula hospedera: CCR5 y/o CXCR4, siendo los linfocitos T CD4⁺ la población celular mayormente afectada²¹.

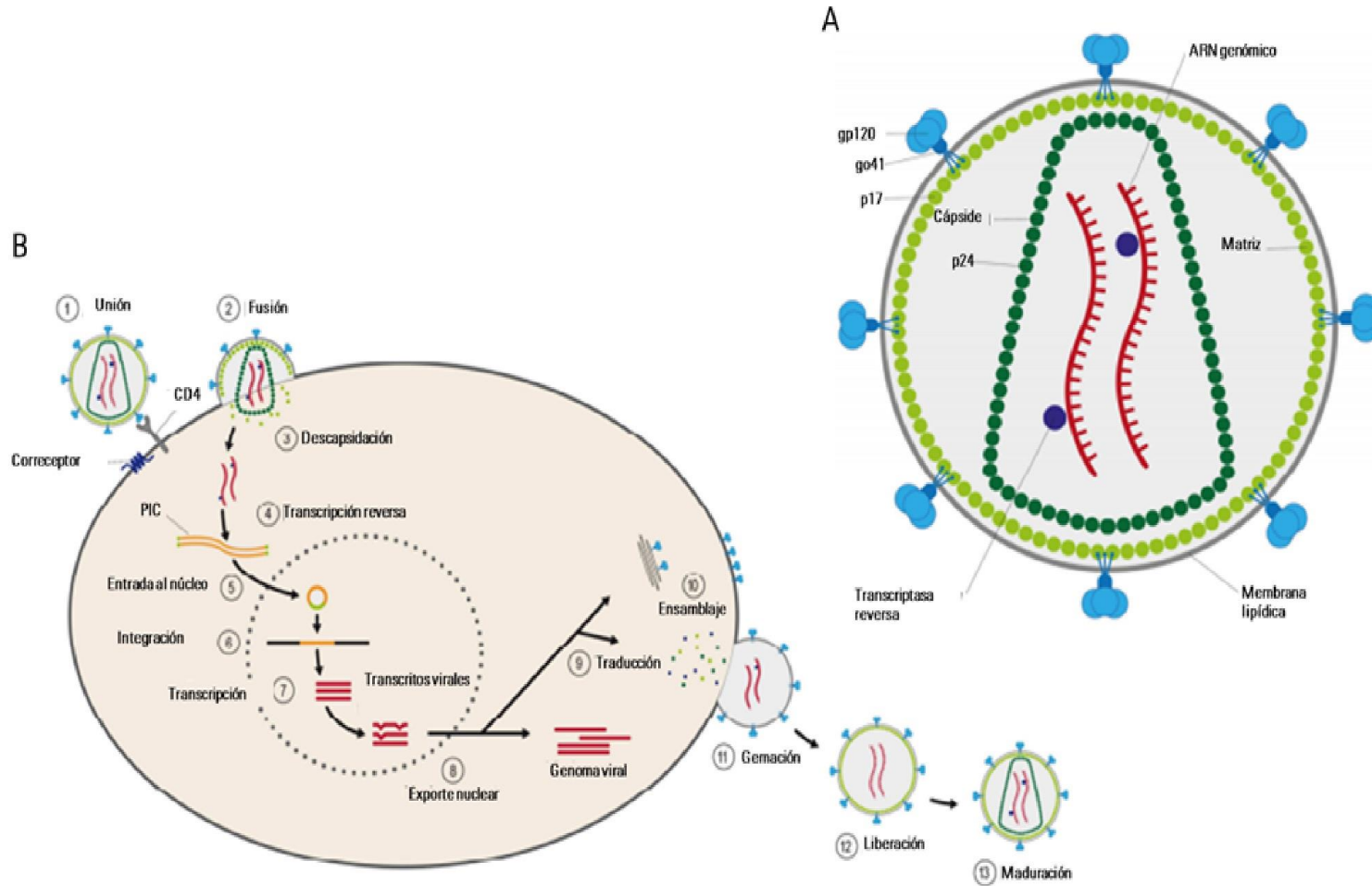
El ciclo de replicación del VIH se puede dividir en dos fases: temprana y tardía (Figura 7B). Durante la fase temprana, se llevan a cabo los procesos de unión al receptor CD4 y correceptor CCR5 o CXCR4, fusión de la membrana viral con la celular, descapsidación, transcripción reversa y la integración del genoma viral al genoma de la célula hospedera. La fase tardía comprende los eventos de expresión génica, traducción de proteínas virales y el ensamblaje, liberación y maduración de la partícula viral^{22,23}.

2.4.3 Historia natural de la infección y patogénesis

La infección por VIH puede ser adquirida por vía de transmisión sexual, transmisión vertical (madre a infante), transfusiones sanguíneas e inyección de drogas intravenosas²⁰. Una vez que el virus ha entrado al cuerpo, este tiene un tropismo hacia los tejidos linfoides primarios y secundarios donde se encuentra su blanco: linfocito T CD4⁺. La historia natural de la infección por VIH sin tratamiento (Figura 8A) se

caracteriza por 3 fases distintas. La fase aguda se distingue por una alta carga viral debido a la alta tasa de replicación que se estabiliza (set point viral), una disminución drástica en la cuenta de los linfocitos T CD4⁺ y un estado de activación inmunológica denominado como "tormenta de citocinas"^{20,24}. La mucosa del intestino es la que se ve mayormente afectada por el virus ya que contiene más del 60% del sistema inmune denominado tejido linfoide asociado a intestino (GALT) y linfocitos T CD4⁺, en particular células Th17, y es el sitio preferencial para la replicación y formación del reservorio viral (células de vida larga con el genoma viral integrado)²². La fase crónica puede durar durante años con un promedio de 10 años hasta presentarse la fase de SIDA. Durante la fase crónica la carga viral se mantiene estable y los linfocitos T CD4⁺ disminuyen progresivamente hasta llegar por debajo de 200 células por μl de sangre, que define la fase de SIDA. La etapa de SIDA es caracterizada por la aparición de enfermedades oportunistas como neumonía, candidiasis, tuberculosis, toxoplasmosis, sarcoma de Kaposi, entre otras, una carga viral alta y una inmunodeficiencia severa definido por un conteo de linfocitos T CD4⁺ menor a 200 células. Esta infección sin tratamiento lleva eventualmente a la muerte del individuo.

Figura 7 Ciclo de replicación viral



- A. Esquema de una partícula viral donde: gp12: proteína de envoltura, gp41: proteína transmembrana, p17 y p24 son fracciones de gag
- B. Diagrama del ciclo de replicación viral dentro de la célula hospedera: etapa temprana 1-6 y etapa tardía 7-13. Adaptada de Juan C. Becerra, Microbial cell, 2016²⁰ .

2.4.4 Tratamiento antirretroviral

El objetivo primario del TAR es disminuir la carga viral a niveles indetectables, es decir menos de 40 copias de VIH por mL de plasma (Figura 8B). El segundo objetivo del TAR es de propiciar una reconstitución inmune. Hoy en día la FDA (Estados Unidos) ha aprobado 36 antirretrovirales (ARV) para su uso en el tratamiento de la infección por VIH. Los fármacos ARV tienen como blanco varias etapas del ciclo de replicación del virus²⁵:

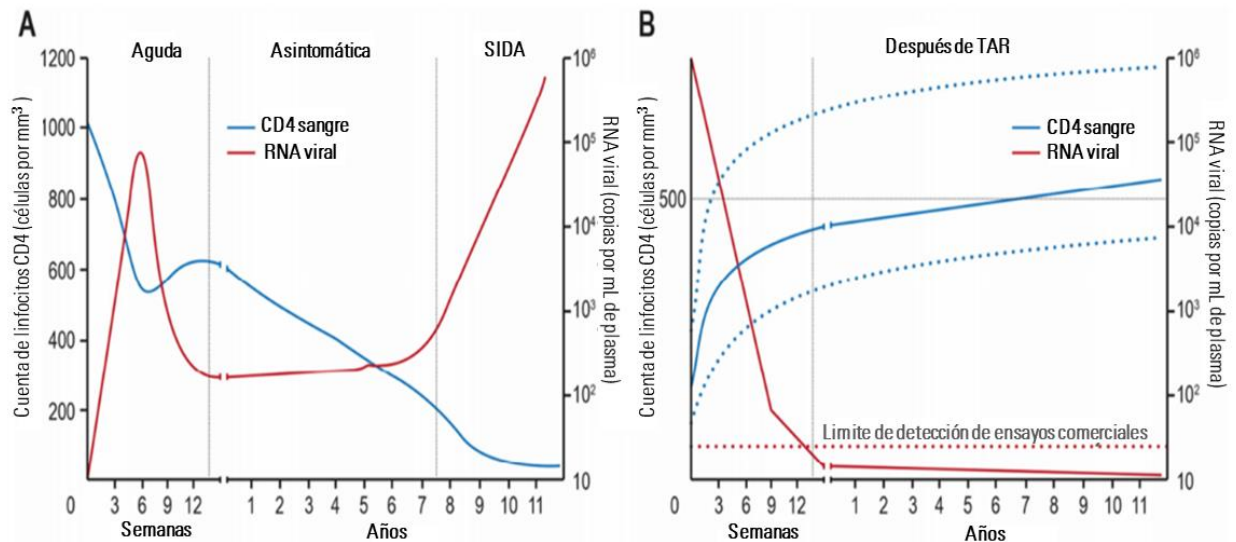
- Inhibidores de la transcriptasa reversa análogos y no análogos de nucleósidos
- Inhibidores de la proteasa
- Inhibidores de la integrasa
- Inhibidores de entrada
- Inhibidores de fusión

El TAR es una formulación de 3 fármacos. En México, de acuerdo con la "Guía de Manejo Antirretroviral de personas con VIH" expedido por CENSIDA 2018²⁶ los esquemas de preferencia son:

1. ABC / 3TC / DTG
2. TAF / FTC / EVG /cobi
3. TDF / FTC / EVG / cobinavir
4. TDF / XTC / EFV
5. TDS / XTC / EFV

El TAR ha permitido mejorar la calidad de vida de las personas que viven con VIH. Bajo TAR supresivo, la infección por VIH es una enfermedad crónica, con una esperanza de vida similar a las personas sin VIH.

Figura 8 Historia natural de la infección por VIH

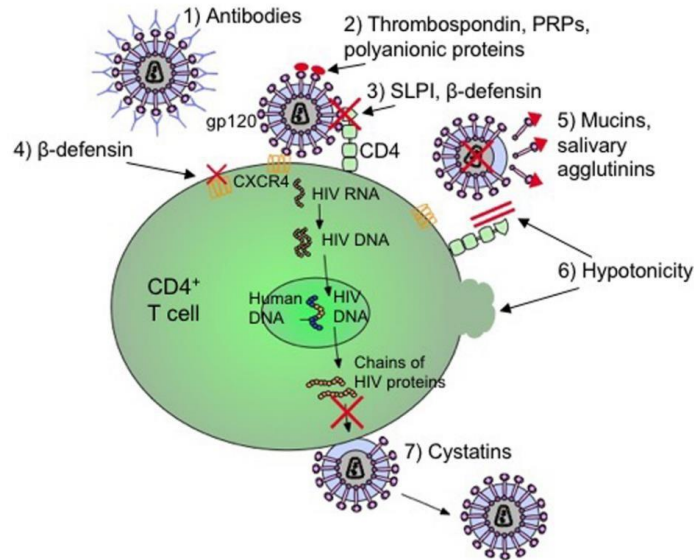


(A). Historia natural de la infección por VIH, es decir sin tratamiento antirretroviral y (B). Historia de la infección por VIH una vez iniciado el tratamiento. Adaptada de Juan C. Becerra, Microbial cell, 2016²⁰.

2.5 El VIH y su transmisión oral

El riesgo de la transmisión oral de VIH es extremadamente bajo. En conjunto con la microbiota oral, los componentes del sistema inmune de la cavidad oral confieren una protección no sólo contra las bacterias patógenas sino también contra otros agentes infecciosos ajenos como los virus, y por supuesto el VIH¹⁴ (Figura 9).

Figura 9 Componentes secretorios de la cavidad oral y su efecto sobre la replicación del VIH



1) Anticuerpos IgA neutralizan al virus, 2) Trombospondina, proteínas ricas en prolina (PRP) y proteínas polianiónicas interfieren con la unión del virus a la célula por bloqueo de gp120, 3) Inhibidor de la proteasa leucocitaria (SLPI) y β -defensina interfiere con la unión del virión a la célula T o macrófago, 4) β -defensina regula negativamente la expresión de CXCR4, 5) mucinas y aglutininas salivales se unen a gp120 y lo remueven del virion haciéndolo deficiente, 6) Hipotonicidad de la saliva lisa células infectadas y bloquea el receptor CD4 y 7) Cistatinas interfieren con el proceso de maduración del virion al inhibir a la proteasa viral. Adaptada de: Samantha E. Heron y Shokrollah Elahi, *Frontiers in Immunology*, 2017¹⁴.

2.6 Enfermedades orales relacionadas con VIH

La microbiota oral en conjunto con los componentes inmunitarios generan un estado homeostático en el hospedero y cualquier perturbación en un cualquiera de los dos componentes o ambos puede facilitar la aparición de una patología. Setenta a 90% de los individuos que viven con VIH presentaran al menos una manifestación oral a lo largo de su vida, se encuentren o no bajo TAR. Estas manifestaciones orales pueden ser clasificadas de la siguiente manera:

1. Infecciones, que pueden ser de carácter fúngico, bacteriano o viral

2. Neoplasias, sarcoma de Kaposi, linfoma no Hodgkin
3. Inmunológicas
4. Por efectos adversos al TAR

Por ejemplo, la candidiasis es la infección de carácter fúngico con mayor incidencia y ocupa el primer lugar de todas las infecciones orales^{27,28}. Se debe estar consciente que existen manifestaciones orales ocasionadas por el uso del TAR en las que también influye el nivel de inmunosupresión existente en el paciente ej. Hiperpigmentación oral, eritema multiforme, entre otras²⁷. De entre las enfermedades orales que son más comunes en la población y que han sido asociadas a un desequilibrio de la microbiota oral y de la respuesta inmune se encuentra la gingivitis y la periodontitis. La primera es caracterizada por el sangrado de las encías y una coloración rojiza en la periferia de los dientes y es el primer estadio de la enfermedad periodontal y es ocasionada por la respuesta inmunológica a bacterias.

La periodontitis es un proceso inflamatorio que conlleva un infiltrado bacteriano ocasionado por un daño al tejido tras una activación inmunológica y que puede evolucionar y causar la pérdida de los dientes²⁸. La candidiasis oral forma parte de las infecciones orales causadas por una alteración en las funciones inmunológicas del individuo y su aparición se favorece al estar inmunosuprimido²⁹. La neumonía es otra enfermedad que ha sido asociada a la microbiota oral. La neumonía es una enfermedad de las vías respiratorias que tiene como agente etiológico microorganismos de origen fúngico, viral, bacteriano o parasitario que se desglosan en la Tabla 3³⁰. Es una enfermedad que afecta principalmente a niños, pacientes geriátricos y pacientes inmunocomprometidos³¹. En México de acuerdo con el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica para el año 2017 se registraron 123,145 casos de neumonía a nivel nacional sin VIH³². Sin embargo, en pacientes con VIH al tener cuentas de linfocitos T CD4⁺ bajas y un sistema inmunológico comprometido, el riesgo de contraer neumonía es mayor.

Tabla 3 Agentes causales de la neumonía

Agente causal
Bacteriano
<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<i>Haemophilus sp.</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Fúngico
<i>Pneumocystis jiroveci</i>
<i>Cryptococcus neoformans</i>
<i>Histoplasma capsulatum</i>
<i>Coccidioides immitis</i>
<i>Penicillium marneffeii</i>
<i>Aspergillus sp.</i>
Viral
<i>Cytomegalovirus</i>
Parasitario
<i>Toxoplasma gondii</i>

Se han registrado diferentes mecanismos que pueden explicar la relación entre la neumonía con la microbiota oral; esto debido a que algunas bacterias presentes en diferentes sitios de la boca se han registrado como los causantes de las neumonías³¹: *Staphylococcus aureus*, algunos bacilos Gram negativos como *Klebsiella sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Enterobacter sp.*, cocos Gram negativos como *Moraxella catarrhalis*, *Haemophilus influenzae*, *Porphyromonas gingivalis*.

De entre los mecanismos propuestos se encuentran: 1. la aspiración de secreciones orofaríngeas que contienen agentes patógenos, 2. deficiencias de los componentes inmunitarios dentro de los pulmones responsables de prevenir la colonización de agentes patógenos, 3. daño al epitelio respiratorio

por citocinas secretadas durante la enfermedad periodontal (IL-1A, IL-1B, IL-6, IL-8, TNF), 4. destrucción de la mucosa oral ocasionada por patologías como la enfermedad periodontal que favorecen la adhesión de bacterias patógenas como BGN y *H.influenzae*³¹.

En un artículo realizado en el INER en 2018 y para determinar la utilidad diagnóstica de muestras bronqueoalveolares y biopsias para el diagnóstico de neumonía, se encontró que las coinfecciones más prevalentes en pacientes mexicanos con neumonía se deben a *Pneumocystis jirovecii/Mycobacterium tuberculosis* y *Pneumocystis jirovecii/Histoplasma capsulatum*. También los autores encontraron que la incidencia de neumonía bacteriana se incrementa cuando la cuenta de linfocitos T CD4⁺ cae por debajo de 200 células/ μ L³³.

2.7 VIH y microbiota oral

La infección por VIH se ha relacionado con cambios en la estructura y diversidad de la microbiota oral. En la Tabla 4 se resumen algunos de los artículos que han estudiado la microbiota oral en cohortes de estudio que incluyen pacientes con infección por VIH y sin infección cuyo objetivo en su mayoría es comparar los cambios en las comunidades bacterianas presentes en la cavidad oral. También la relación de la microbiota oral con otras enfermedades como cáncer.

Tabla 4 Resumen artículos que han estudiado la asociación de la microbiota oral y el VIH

Autor (es)	Cohorte de estudio	Tipo de muestra y metodología	Hallazgos principales
Kistler, et. al., 2015 ³⁴	37 individuos VIH + y 37 VIH -	Muestras de placa dental y saliva, se empleó la pirosecuenciación de genes parciales de 16s rRNA	En general la microbiota oral de ambos grupos fueron similares, sin embargo, se encontró <i>Haemophilus parainfluenzae</i> asociada a individuos VIH +, y se encontraron diferencias en la composición de la microbiota de la saliva entre ambos grupos.
Mukherjee, et. al, 2018 ³⁵	VIH-positivos fumadores n=48 VIH-positivos no fumadores n=24 VIH-negativo fumadores n=24	Caracterización de la microbiota usando la plataforma de secuenciación IonTorrent empleando lavados orales.	La microbiota oral de individuos VIH positivos fumadores se ve menos enriquecido que el del grupo VIH-negativo no fumadores además de un incremento en la abundancia de bacterias del

			filo <i>Firmicutes</i> comparado con el grupo de no fumadores. El microbioma no difiere entre grupos.
Dang A., et.al., 2012 ³⁶	12 individuos VIH positivos: 6 con sin TAR y 6 recibiendo TAR, 9 VIH-negativos	Hisopados de la superficie dorsal de la lengua. Identificación de especies bacterianas orales empleando HOMMIN (Human Oral Microbes Identification Microarray) y asociaciones con características clínicas de los individuos	Se identificaron 11 géneros bacterianos en el grupo control, para el grupo de individuos VIH positivos sin TAR se encontraron cuatro géneros más. Se encontró una correlación positiva entre la carga viral y la carga bacteriana en el grupo VIH positivo sin TAR, así como el incremento en bacterias potencialmente patógenas en el mismo grupo (<i>Prevotella</i> , <i>Veillonella</i> , <i>Campylobacter</i> , <i>Megasphaera</i>).
Presti, et. al., 2018 ³⁷	Cohorte de 35	Se comparó el	No se encontraron diferencias

	individuos VIH-positivos	microbioma oral de muestras de saliva pareadas: las primeras muestras fueron obtenidas antes de iniciado el ART el segundo muestreo se realizó después de la semana 24 de iniciado el tratamiento. Se empleó la secuenciación de gen ADNr 16S.	en la diversidad tanto alfa como beta después de haberse iniciado el TAR.
Schmidt, et al., 2014 ³⁸	Dos estudios, el primero con un total de cinco pacientes y el segundo con un total de 83 muestras tomadas de pacientes con cáncer, pre-cáncer e	Se analizó la composición de la microbiota oral las zonas anatómicas con cáncer, sin cáncer y pre-cáncer de los individuos. Se utilizaron hisopados de	Se encontró una disminución en la abundancia relativa de <i>Actinobacteria</i> y <i>Firmicutes</i> en muestras con cáncer y pre cáncer y un incremento en <i>Fusobacteria</i> en muestras de cáncer comparadas con muestras sin cáncer.

	individuos sanos	los sitios mencionados y se secuenció la región V4 del gen 16s empleando pirosecuenciación	
Yhiong Li, et al., 2014 ³⁹	Dos grupos de 10 individuos cada uno un grupo con infección por VIH y otro sin infección	Se realizó un estudio con cultivo convencional con el que hicieron asociaciones con los niveles de linfocitos T CD4 ⁺ y dos con técnicas moleculares: HOMMIN y DGGE para caracterizar la microbiota oral.	<i>Capnocytophaga</i> , <i>Slackia</i> , <i>Porphyromonas</i> , <i>Kingella</i> , <i>Peptostreptococcaceae</i> , <i>Lactobacillus</i> , y <i>Atopobium</i> , se encontraron únicamente en el grupo VIH negativo. La prevalencia de <i>Fusobacterium</i> , <i>Campylobacter</i> , <i>Prevotella</i> , <i>Capnocytophaga</i> , <i>Selenomonas</i> , <i>Actinomyces</i> , <i>Granulicatella</i> , y <i>Atopobium</i> incrementa con el uso de TAR. Se encontró que la cuenta de UFC correlaciona con los niveles de linfocitos T CD4 ⁺ .

3 Justificación

El Virus de Inmunodeficiencia Humana es el agente causal del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida y tiene como blanco principal los linfocitos que expresan el receptor CD4, así como los correceptores CCR5 y/o CXCR4. La infección por VIH se caracteriza por una disminución en la cuenta de linfocitos T CD4⁺ llevando a un estado de inmunosupresión y una activación inmunológica que propicia un estado inflamatorio persistente y la aparición de enfermedades oportunistas.

A pesar de que la transmisión oral del VIH es muy poco probable, el estudio de cómo se ven afectados los componentes orales tanto de la microbiota como del sistema inmune es de igual importancia por dos razones: 1. se han descrito varias infecciones orales de origen bacteriano en individuos con VIH, las cuales se presentaron al menos una vez en sus vidas; 2. se ha asociado la microbiota oral con la aparición de la neumonía, enfermedad respiratoria que aparece en la etapa más avanzada de la infección por VIH y es causa de mortalidad en estos pacientes.

En el presente proyecto se buscó caracterizar las poblaciones bacterianas de la cavidad oral (taxonomía y diversidad), así como determinar el estado inflamatorio dentro de la cavidad oral (local) y compararlos entre los grupos de estudio: VIH seronegativos, VIH seropositivos con y sin TAR ambos grupos con neumonía, para determinar si existe alguna relación entre la microbiota oral y el estado inflamatorio por la infección con VIH.

4 Hipótesis

En pacientes con infección por VIH la diversidad de la microbiota oral se verá alterada en comparación con individuos sin VIH, de igual manera, el uso del tratamiento antirretroviral estará influyendo en los cambios de la diversidad entre pacientes que se encuentran bajo una terapia antirretroviral al ser comparados con los pacientes positivos sin TAR. En cuanto a los niveles de inflamación local se espera que en pacientes VIH seropositivos sin TAR existan niveles más elevados comparándolos con aquellos VIH seropositivos bajo TAR y VIH seronegativos.

5 Objetivos

5.1 Objetivo general

Caracterizar la microbiota, en lavados orales de pacientes con infección por VIH, con neumonía con y sin tratamiento antirretroviral y compararlas con individuos sin infección por VIH y con neumonía.

5.2 Objetivos particulares

- Seleccionar una cohorte de estudio con los siguientes criterios: 15-20 individuos con VIH sin TAR, 15-20 individuos con VIH con TAR y de 15-20 individuos sin VIH de un protocolo activo con código B08-16.
- Describir la microbiota oral y compararla entre grupos de estudio.
- Cuantificar el estado inflamatorio local y compararlo entre grupos de estudio.
- Correlacionar el estado inflamatorio local y la microbiota oral.

6 Materiales y métodos

6.1 Cohorte de estudio

Los pacientes se seleccionaron de una base de datos de pacientes que ingresaron al protocolo con código B08-16 y titulado: "Caracterización del microbioma y poblaciones inmunes celulares de pacientes infectados por el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) y con neumonía" (Anexo 1). El protocolo recibió aprobación por parte de los 3 comités del INER: Comité de bioseguridad, Comité de Investigación y Comité de Ética en Investigación y se desarrolló en el Departamento de Investigación en Enfermedades Infecciosas (CIENI) del INER. Los pacientes que ingresaron al estudio firmaron una carta de consentimiento (Anexo 2). Los criterios de inclusión para el grupo con VIH fueron los siguientes: tener diagnóstico confirmado de neumonía y de infección por VIH, requerir un lavado bronqueoalveolar (LBA) por razones de diagnóstico, y tener una edad de 18 a 60 años. Para el grupo control: tener diagnóstico confirmado de neumonía y sin infección por VIH, confirmado por ELISA de cuarta generación, requerir un LBA por razones de diagnóstico, y tener una edad de 18 a 60 años. Se excluyeron en los 2 grupos los pacientes con quimioterapia, bajo tratamiento inmunosupresor post-trasplante y con tratamiento por corticosteroides con una duración mayor a 3 semanas antes del LBA. Al momento del inicio del proyecto de Licenciatura, se tenían reclutados 245 pacientes en total, de los cuales 22 eran VIH- y 223 eran VIH+. Los pacientes que fueron seleccionados para este proyecto son un subgrupo de los pacientes con las características antes mencionadas. La cohorte consta de un total de 70 pacientes, de estos individuos 22

son VIH- y 48 VIH+; de los pacientes VIH+ se subdividieron de acuerdo con el uso de TAR; 22 se encontraban bajo TAR y 26 sin TAR. Se buscó incluir pacientes que se reclutaron en cada año del protocolo activo (2016, 2017, 2018) y cada estación (primavera, verano, otoño e invierno) para mitigar el efecto de la temporalidad sobre los resultados. También se intentó seleccionar individuos con el mismo grado de inmunodeficiencia (cuenta de linfocitos T CD4⁺). Este proyecto es un estudio retrospectivo y observacional.

6.2 Obtención de los lavados orales

Las broncoscopias se realizaron en el servicio de Broncscopia del INER. Los pacientes fueron trasladados de sus camas al servicio de broncscopia, donde se realizó la broncscopia y toma de muestra para diagnóstico e investigación. Se tomaron muestras de: sangre periférica, lavado oral (LO) con 15 mL de solución salina NaCl 0.9%, lavado del broncscopio (LB) como control interno, y lavado bronqueoalveolar (LBA) para investigación y se recolectaron las fracciones restantes de las 3 jeringas, J1, J2, J3 ya que se manda una fracción del LBA al laboratorio de diagnóstico microbiológico del INER para determinar el agente causal de la neumonía y al CIENI para la prueba de tuberculosis con GeneExpert). En el servicio de broncscopia, se colocaron los tubos LO, LB, LBA en una hielera llena de hielo y la hielera fue transportada al Laboratorio de Bioseguridad nivel-3 (BSL-3) del CIENI dentro de los primeros 15 minutos. Dado que el presente proyecto consistió en caracterizar las poblaciones bacterianas orales usando los LO, solo se mencionará el procesamiento de esas muestras. En el BSL-3, los LO fueron procesados en una campana de bioseguridad, con equipo de protección personal (Tybec). Se transfirieron 5 mL de LO, incluyendo la fracción celular, es decir, sin previa centrifugación) en un tubo cónico

de 15 mL etiquetado apropiadamente y se guardaron las muestras a -80°C hasta su uso.

6.2.1 Preparación de los lavados orales para cuantificación de citocinas y extracción de DNA

Los LO fueron descongelados en hielo dentro de la campana de bioseguridad en el BSL-3. Una vez totalmente descongeladas, los LO fueron mezclados por inversión del tubo varias veces y se transfirieron 1.5 mL de LO en un vial y se centrifugaron a 14, 000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Se transfirió el sobrenadante a otro vial debidamente etiquetados sin tocar el pellet. El sobrenadante se empleó para la cuantificación de citocinas y el pellet para la extracción de ADN. Ambos tubos fueron almacenados a -80°C hasta su uso. Al tener un total de 70 muestras se decidió realizar tanto la cuantificación de citocinas como la extracción de ADN en dos lotes con el mismo número de muestras VIH+ TAR+, VIH+ TAR-, VIH- y controles.

6.3 Optimización del ensayo Luminex

Se utilizó el kit Human Ultrasensitive Cytokine Magnetic 10-Plex Panel (Invitrogen, ThermoFisher) para cuantificar un total de 10 analitos (9 citocinas y 1 factor de crecimiento): IL-1 β , IL-10, IL-6, IL-5, IL-2, IL-4, IL-8, GM-CSF, IFN- γ , TNF- α . Se utilizó el equipo Luminex 100/200 y el software xPONENT® 3.1. El software genera una curva estándar para cada uno de los analitos mediante un modelo log logístico de cinco parámetros (5PL), cada curva tiene un límite de detección bajo y alto (inferior/superior) que proporcionaran el valor de las concentraciones máximas y mínimas que pueden ser cuantificadas de manera confiable. En la figura 10 se muestra un diagrama de flujo de la técnica de Luminex y la preparación de los reactivos se explica en el anexo 3.

La optimización se realizó con el propósito de conocer el factor de dilución de los LO apropiado para los tres grupos de estudio: VIH + TAR +, VIH + TAR -, VIH - y determinar el número de estándares necesarios para que la determinación de todas las citocinas estuviera dentro de los límites de detección inferior y superior de la curva estándar. Con base en los resultados obtenidos en la optimización se decidió no diluir las muestras de LO y realizar una curva estándar con 10 estándares.

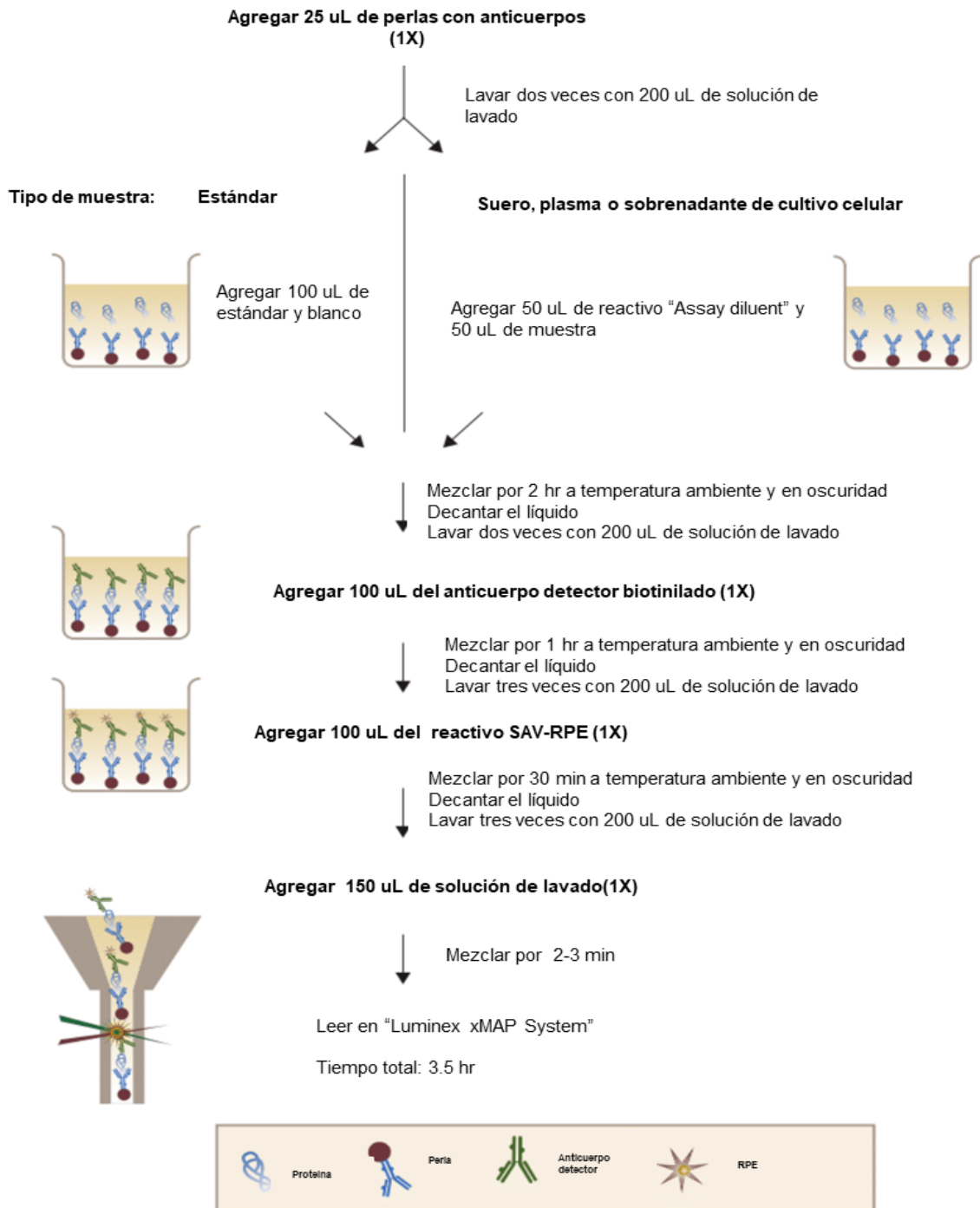
6.4 Cuantificación de citocinas en lavados orales:

Se cuantificaron las citocinas en los LO de la cohorte de estudio, de acuerdo con nuestra optimización y al manual del usuario, se emplearon 100 µL de LO sin dilución y una curva con 10 estándares. Para cada muestra se obtuvieron concentraciones para cada analito. En caso de que la concentración de algún analito encontrara por debajo del límite inferior se acotó la mitad del valor dado por el límite inferior, si el valor superaba el límite superior se acotó el valor dado por el límite superior.

Los resultados fueron normalizados con respecto a la cantidad total de proteína (ver apartado 6.5) y se empleó la siguiente fórmula para el cálculo final:

$$\text{Analito} \left(\frac{\text{pg}}{\text{mL}} \right) = \frac{\text{Log 10} \left(\frac{\text{pg}}{\text{mL}} \right)}{\text{Proteínas totales} \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right)}$$

Figura 10 Diagrama de flujo para Luminex.



Tomado de <http://www.thermofisher.com/order/catalog/product/LHC6004M> Manual Human Ultrasensitive Cytokine Magnetic 10-Plex Panel.

6.5 Cuantificación de proteínas totales

Debido a la variabilidad en los volúmenes obtenidos para los LO (15-40 ml) en el servicio de Bronscopia, se decidió cuantificar las proteínas totales de los LO para normalizar la concentración de las citocinas y minimizar el efecto del factor de dilución inicial. Para la determinación se empleó el NanodropOne™UV-VIS spectrophotometer (Termo Fisher, US) mediante la determinación a 205 nm. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 5.

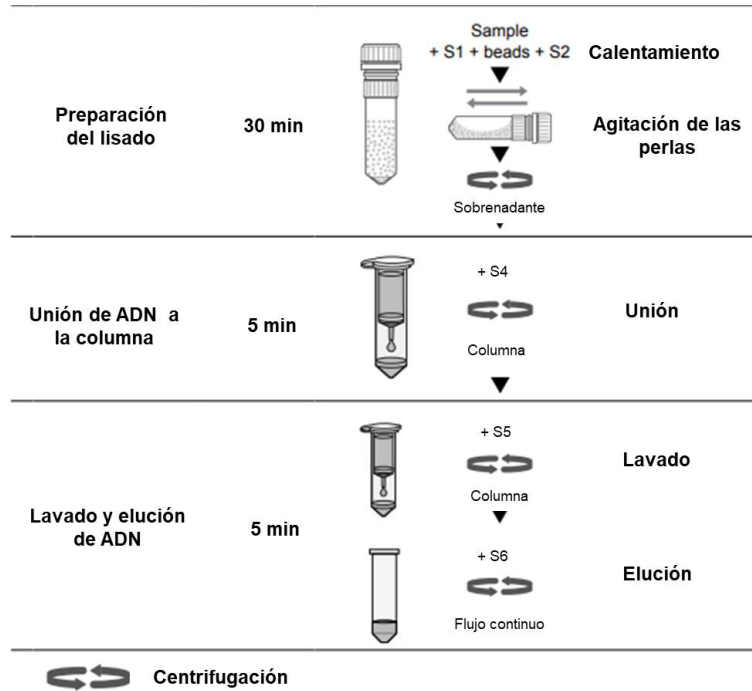
6.6 Extracción de DNA de lavados orales

La extracción de DNA se realizó con el kit DNA PureLink™ Microbiome DNA Purification DNA (Invitrogen, ThermoFisher, US) de acuerdo con las indicaciones del fabricante. El kit provee los reactivos necesarios para llevar a cabo la extracción del ADN e incluyen: buffer de lisis, potenciador de lisis, buffer de lavado y buffer de elución, tubos de colección, columnas con filtro y tubos con perlas. Brevemente, el proceso de extracción consiste en lisar las células usando un buffer y potenciador de lisis, periodos de agitación y calentamiento y una acción mecánica con perlas usando un agitador horizontal "bead beat". Una vez lisadas las células, se une el ADN a la columna con filtro usando el buffer de unión. El paso final es el lavado de la columna con una solución a base de alcohol y elución del ADN (Figura 11). Se determinó la concentración (ng/μL) y la pureza A260/280 en un rango de 1.8-2.0 usando el NanodropOne™UV-VIS spectrophotometer (Termo Fisher, US). Los resultados se muestran en la tabla 5.

La extracción de ADN de LO se realizó en dos rondas de extracción. Se incluyeron controles negativos: CTRL-SOL. SAL y CTRL-DH₂O siendo el primero la solución salina empleada para obtener los LOs y el segundo

el buffer de elución de ADN para descartar contaminación por bacterias que se encuentran en los kits de extracción y el laboratorio en general.

Figura 11 Diagrama de flujo para extracción de ADN



Adaptado de: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/A29790>

Tabla 5 Cuantificación de proteínas totales y ADN extraído

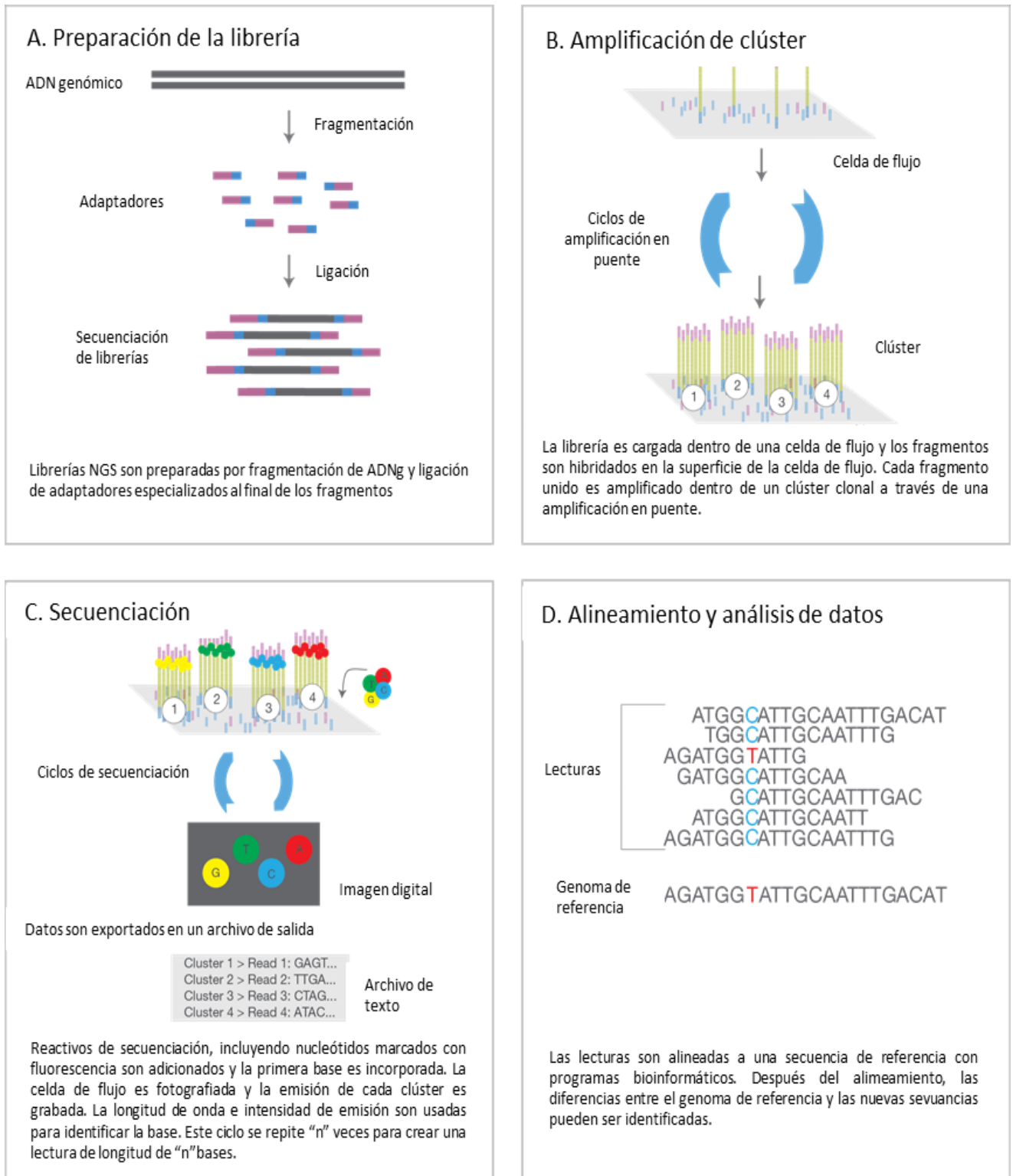
Muestra	Proteína (mg/mL)	DNA (ng/μL)	Muestra	Proteína (mg/mL)	DNA (ng/μL)	Muestra	Proteína (mg/mL)	DNA (ng/μL)
LO-1	0.763	160.5	LO-25	0.393	166.6	LO-48	0.153	4.6
LO-2	0.132	11.8	LO-26	0.492	129.7	LO-49	0.237	56.8
LO-3	0.434	35.3	LO-27	0.628	76.4	LO-50	0.108	3.2
LO-4	0.407	3.6	LO-28	0.340	22.0	LO-51	0.123	0.6
LO-5	0.627	13.8	LO-29	1.173	0	LO-52	0.099	24.0
LO-6	0.793	91.7	LO-30	0.789	40	LO-53	0.028	9.3
LO-7	0.134	17.6	LO-31	0.589	77.4	LO-54	0.151	60.1
LO-8	0.499	29.1	LO-32	0.068	5.4	LO-55	0.133	69.3
LO-9	0.349	84.5	LO-33	0.093	16.4	LO-56	0.096	10.2
LO-10	0.259	11.9	LO-34	0.322	19.4	LO-57	0.913	12.7
LO-11	0.156	8.7	LO-35	0.271	30.2	LO-58	0.214	16
LO-12	0.116	42.6	LO-36	0.065	1.06	LO-59	0.716	64.8
LO-13	0.473	17.2	LO-37	0.414	26.4	LO-60	0.191	65.2
LO-14	0.293	16.5	LO-38	0.039	2.4	LO-61	0.125	33.8

LO-15	0.187	15.1	LO-39	0.075	35.5	LO-62	0.644	114.2
LO-16	0.218	27.9	LO-40	0.054	154	LO-63	0.622	29
LO-17	0.172	58.1	LO-41	0.078	6.6	LO-64	0.317	36.4
LO-18	1.136	49.7	LO-42	0.350	7.7	LO-65	0.743	130.2
LO-19	0.750	8.2	LO-43	0.287	5.6	LO-66	0.706	150.4
LO-20	0.673	18.8	LO-44	0.301	63.9	LO-67	0.157	32.5
LO-21	0.383	33.4	LO-45	0.204	71.9	LO-68	0.090	14.4
LO-22	0.571	21.1	LO-46	0.109	34.0	LO-69	0.096	19.6
LO-23	0.216	6.9	LO-47	0.279	91.2	LO-70	0.108	17.7
LO-24	0.530	3.1	CTRL- VIH+ 1	0.107	16.3	CTRL1- VIH-	0.124	11.9
CTRL1- SOL.SAL	_____	2.0	CTRL1- DH ₂ O	_____	2.1	CTRL2- VIH+	0.108	28.3

6.7 Preparación de librerías de tipo 16S y secuenciación:

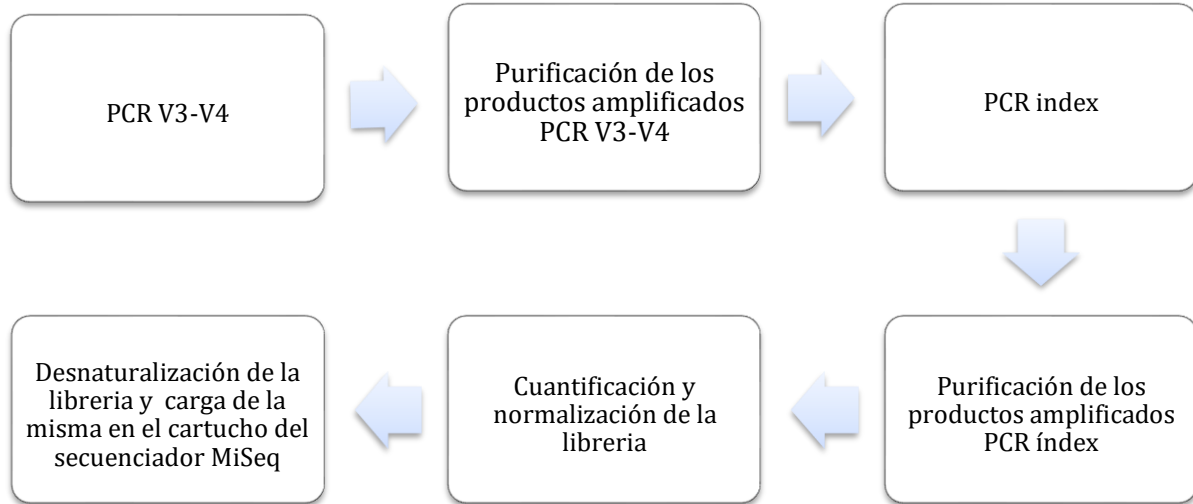
Para caracterizar las bacterias en los LO utilizamos las regiones V3 y V4 del gen 16S y se secuenciaron con el equipo MiSeq de Illumina. En la Figura 12 se muestra la química de secuenciación de fragmentos de ADN de la plataforma Illumina. Primero se generan librerías que se definen como un fragmento de ADN correspondiente a una o varias regiones del gen 16S con adaptadores necesarios para la secuenciación e identificación de estas (índex). Una vez generadas las librerías, estas se cargan en el equipo dentro de una celda de flujo que contiene oligonucleótidos. En la celda, ocurre una amplificación clonal en puente. Esta amplificación consiste en la alineación de las librerías a los oligonucleótidos dentro de la celda de flujo. Una vez alineados las cadenas se doblan y se alinean con otros oligonucleótidos formando un puente. Se genera la cadena complementaria y se repite el proceso hasta generar clústeres. El siguiente paso es la secuenciación. Illumina emplea el método basado en la terminación reversible, el cual utiliza nucleótidos marcados con fluoróforos que son incorporados a los extremos 3'-OH. Tras ser excitados por un láser, se generará una lectura del fluoróforo que corresponde al nucleótido incorporado (adenina, guanina, citosina, timina). Una vez reconocido el nucleótido incorporado, el fluoróforo es removido y se libera el extremo 3'-OH para que se incorpore el siguiente nucleótido y así sucesivamente hasta generar una secuencia de 300 pb. En la figura 13 se muestra un diagrama de flujo general desglosando las etapas necesarias para la elaboración de las librerías.

Figura 12 La química de los secuenciadores Illumina



Adaptado de www.illumina.com/documents/products/illumina_sequencing_introduction.pdf

Figura 13 Diagrama de flujo para la preparación de librerías



Tomado del manual: 16S Metagenomics Sequencing Library Preparation de Illumina

6.7.1 Amplificación de la región V3-V4 del gen rRNA 16s (PCR V3-V4), PCR índice y purificación de los productos amplificados

La preparación de las librerías empieza con la amplificación de la región V3-V4 del gen ARNr 16S usando primers específicos para generar un amplicón de aproximadamente 460 bp (Figura 14). La secuencia de los primers es:

16S Amplicón PCR Forward Primer = 5'-3'

TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG

16S Amplicón PCR Reverse Primer = 5'-3'

GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAA

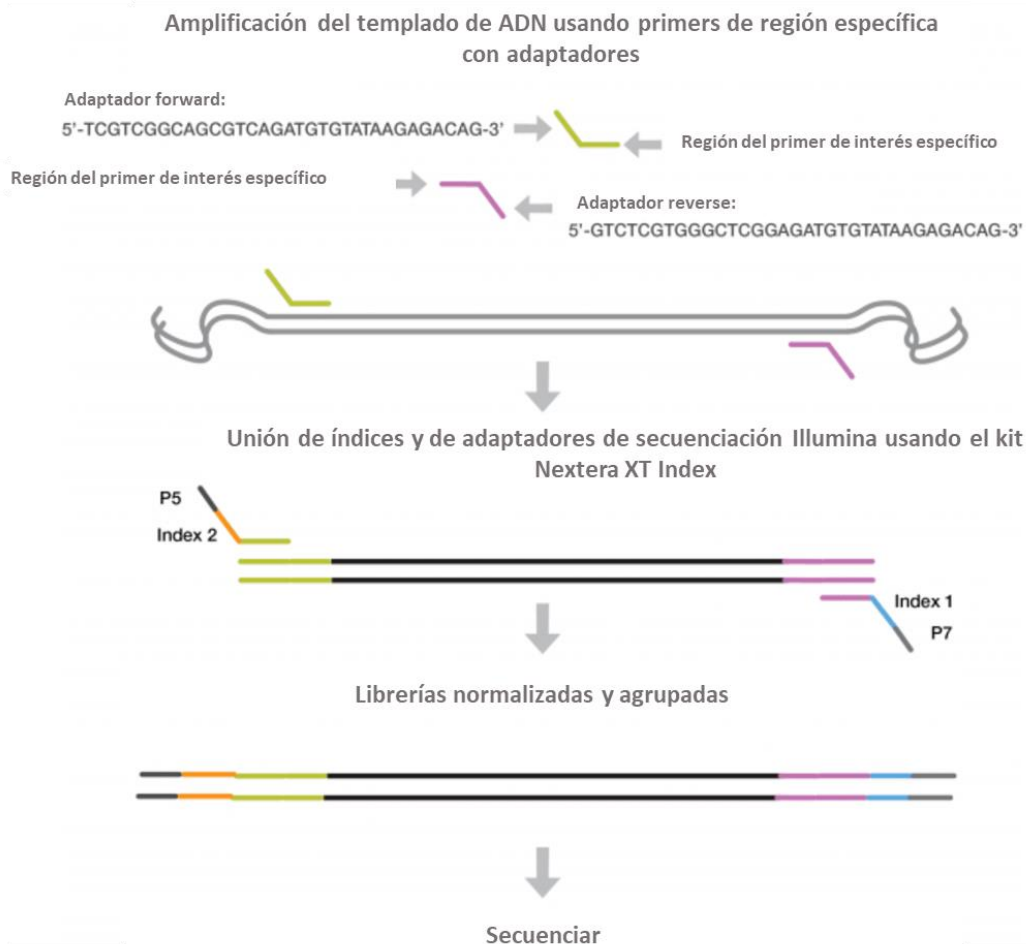
TCC

(T:timina, G:guanina, C:citosina, A:adenina).

Dentro de las secuencias de los primers se encuentran bases degeneradas según el código internacional IUPAC: W: A o T; N: A, T, C o G; H: A, C o T; y V: A, C o G

[<https://www.bioinformatics.org/sms/iupac.html>].

Figura 14 Diagrama de la preparación de la PCR



Adaptado del Manual: 16S Metagenomics Sequencing Library Preparation de Illumina

La PCR V3-V4 se realizó el mismo día para todas las muestras. Se cargaron tres placas de 96 pozos con las 70 muestras de ADN más los controles por triplicado. Además, se realizó un control de amplificación para cada placa (mismos reactivos, pero en lugar de ADN se agregó dH₂O). La Tabla 6 y 7 desglosan los reactivos y ciclos de reacción para la PCR V3-V4 respectivamente.

Se verificó la amplificación mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% (Anexo 3) y el uso del marcador de peso molecular de 100 pb. Al corroborar amplificación exitosa de los productos V3-V4, se juntaron los triplicados de cada muestra en un solo tubo y se realizó la purificación de los productos

de PCR V3-V4 como lo indica el protocolo usando 40 μ L de perlas Ampure XP por muestra.

Tabla 6 Reactivos para PCR V3-V4

Reactivo	Volumen (μ L)
HI-Fi buffer 10X	2.5
MgSO ₄ 50nM	2
dNTPs 10mM	0.5
DMSO	1.25
Primer F 10uM	0.5
Primer R 10uM	0.5
Hi-Fi Taq polimerasa	0.25
dH ₂ O	12.5
ADN (5 -20 ng/ μ L)	5
Total	25

Dónde: dH₂O, corresponde a agua MilliQ empleada para la PCR

Tabla 7 Ciclos de reacción PCR V3-V4

95°C por 3 minutos
25 ciclos de: 95°C por 30 segundos 55°C por 30 segundos 72°C por 30 segundos
72°C por 5 minutos
Mantener a 4°C

Después de la purificación del producto de PCR V3-V4, se realizó la segunda PCR. Esta PCR tiene como objetivo indexar los productos V3-V4 con un par de índices diferentes (NXXX, SXXX), lo que se define como una librería: un producto de PCR V3-V4 indexado correspondiente a una muestra. Los índices permiten identificar cada producto de PCR de manera única. Esto con la finalidad de secuenciar varias librerías al mismo tiempo y poder identificar mediante estos índices las secuencias de cada muestra. Los índices son secuencias de 8 bp proporcionadas por el kit Nextera XT index (Illumina, CAL, US). La mezcla y el ciclo de amplificación para PCR de índice se indica en la Tabla 8 y 9 respectivamente. La purificación de la PCR de índice se realizó como lo indica el protocolo usando 56 µL de perlas Ampure XP por muestra.

Tabla 8 Reactivos para PCR de índice

Reactivo	Vol. Total (µL)
HI-Fi buffer 10X	2.5
MgSO ₄ 50 mM	2
dNTPs 10 mM	0.5
DMSO	1.25
dH ₂ O	28.5
Hi-Fi Taq polymerase 0.5X	0.25
Índice SXXX	5
Índice NXXX	5
PCR V3V4 purificada	5
Total	50

Tabla 9 Ciclos de reacción para PCR de índice

95°C por 3 minutos
8 ciclos de: 95°C por 30 segundos 55°C por 30 segundos 72°C por 30 segundos
72°C por 5 minutos
Mantener a 10 °C

6.7.2 Cuantificación y normalización de las librerías:

Se cuantificaron las librerías utilizando el fluorómetro Qubit® 3.0 (Invitrogen, Life technologies) de acuerdo con las indicaciones del fabricante. Las librerías se normalizaron a 4 nM siguiendo los siguientes cálculos:

1.

$$\frac{\text{Concentración de la muestra } \left(\frac{\text{ng}}{\mu\text{L}}\right)}{660 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \times 610 \text{ pb}} \times 10^6 = \text{nM}$$

2.

$$\frac{(4 \text{ nM})(50 \mu\text{L})}{x \text{ nM}} = \text{volumen de la muestra}$$

Donde:

x nM: corresponde a la molaridad de cada muestra

4 nM: concentración final para cada muestra

50 μ L: volumen final de la muestra a 4 nM
Promedio del tamaño de la librería: 610 bp

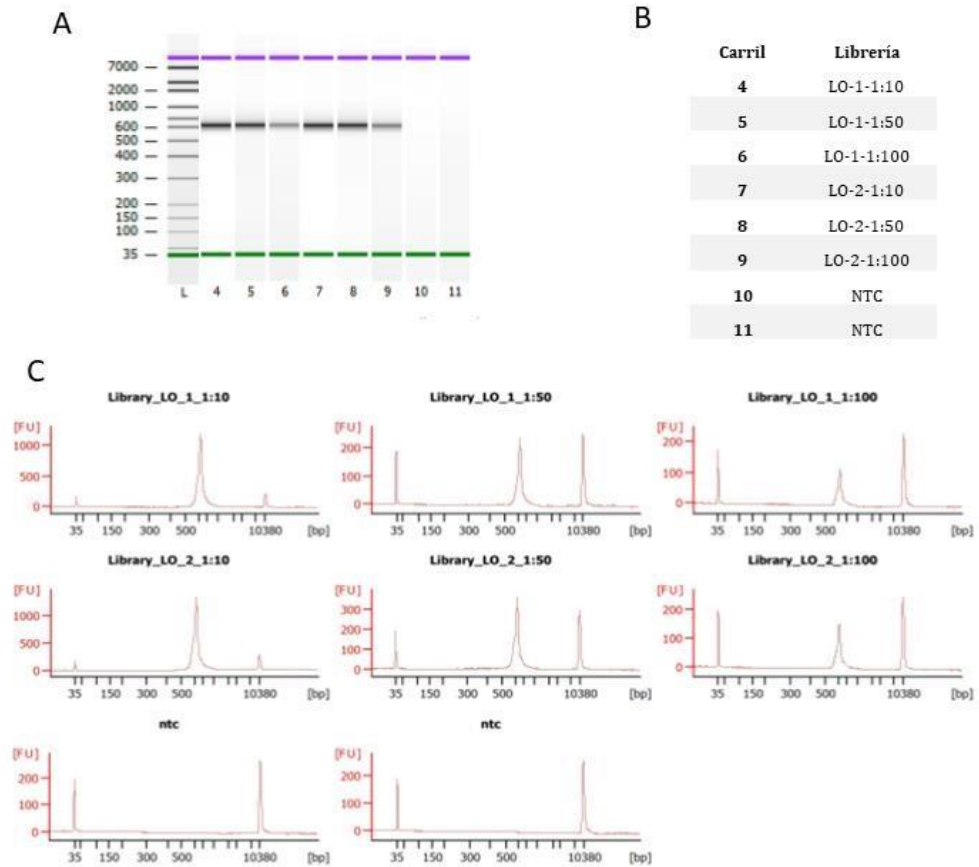
6.7.3 Pooling de librerías

Una vez normalizadas las librerías a 4 nM, se juntaron en un tubo LoBind de 1.5 mL. Se dividieron las 70 muestras más controles en dos pools de librerías (LO-1, LO-2) para la secuenciación que corresponden a los dos lotes de extracción y sus controles correspondientes. Los pools de librerías se visualizaron en el equipo bioanalizador Agilent 2100 (Agilent Technologies, Inc.) para verificar el tamaño promedio del pool de librerías, y verificar la molaridad (Figura 15). Se corrieron varias concentraciones del pool de librerías: 1:10, 1:50, 1:100 para determinar con certeza la molaridad de cada una. Esta verificación es un paso importante para realizar la secuenciación, ya que de esta depende la calidad de la corrida de secuenciación. Los 2 pools de librerías se llevaron a una molaridad final de 4 nM.

6.7.4 Desnaturalización y secuenciación de la librería:

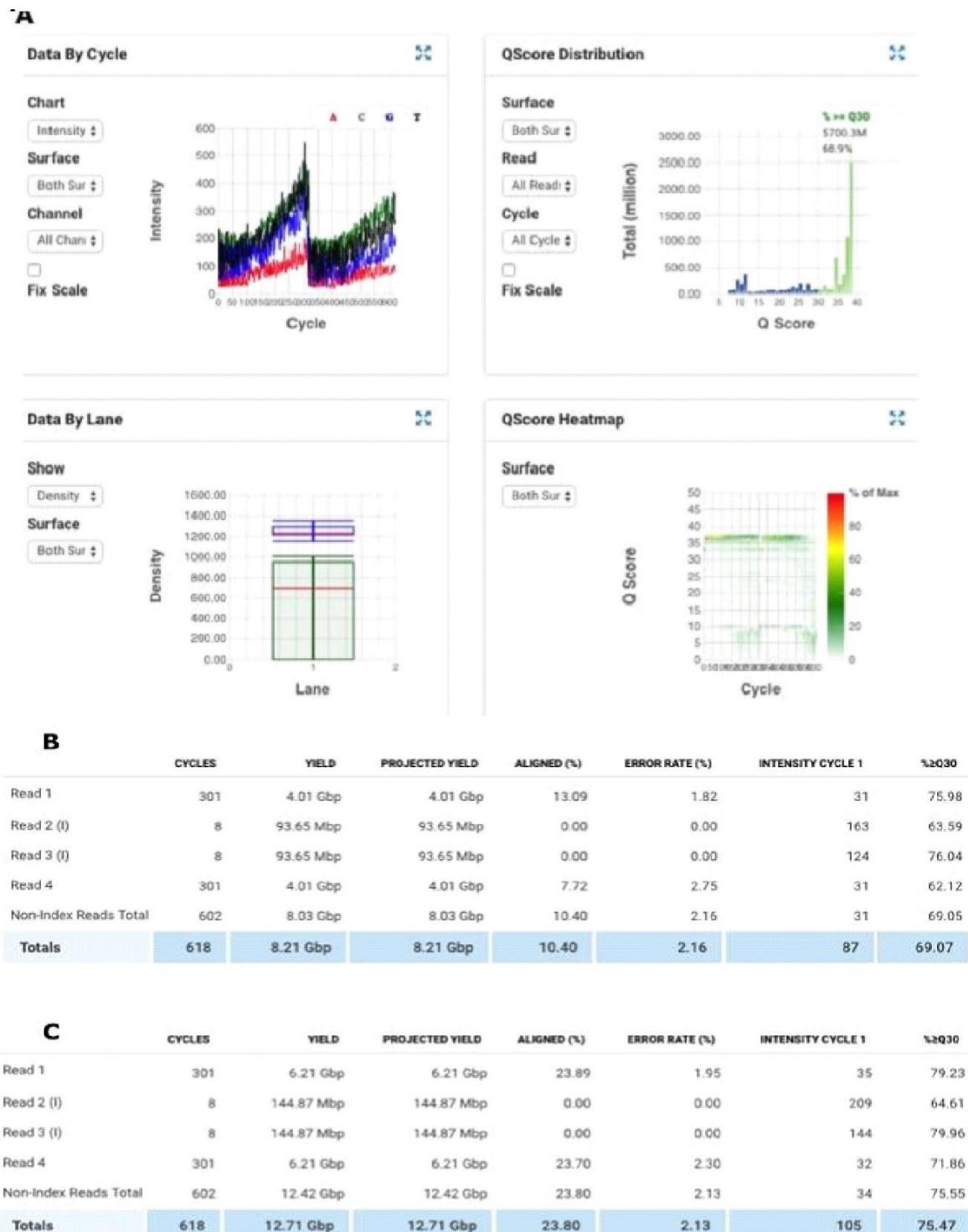
Se secuenciaron las librerías LO-1 y LO-2 en 2 corridas independientes. Ambas librerías fueron desnaturalizadas dos veces antes de cargarlas en el equipo. La primera desnaturalización se realizó mezclando 5 μ L de la librería con 5 μ L de hidróxido de sodio al 0.2 N, se incubó por 5 min y se agregaron 990 μ L de HT1 para obtener una concentración de 20 pM. La librería a 20 pM se diluyó nuevamente para obtener una concentración final de 14 pM. El mismo procedimiento se realizó para el control interno de secuenciación (PhiX). Finalmente, se mezcla 75% de la librería a 14 pM con 25% del PhiX a 14 pM. La mezcla es desnaturalizada a 96°C durante 2 min. Las librerías se corren a 2x300 ciclos. El secuenciador MiSeq da como resultado lo que se muestra en la Figura 16.

Figura 15 Datos obtenidos a partir del programa de Agilent



El programa del bioanalizador Agilent 2100 da como resultados: A. Un gel donde se representa en verde el marcador peso molecular (PM) de 35 y en morado el marcador de PM alto de 8,000. Las 2 librerías se encuentran cercanas a las 600 pb, ya que el amplicón V3-V4 es de aproximadamente 460 pb más los índices y adaptadores que fueron adicionados. B. Se indica lo que representa cada carril del gel. C. Los electroferogramas de las librerías a cada dilución (1:10, 1:50 y 1:100). El control negativo (NTC) es dH_2O en lugar de librerías

Figura 16 Resumen de las corridas realizadas en el secuenciador MiSeq



A. Gráficos obtenidos al terminar la secuenciación, cada uno son representaciones de calidad de la corrida, B. Métricas de la corrida LO-1 y LO-2 en C. Estas últimas contienen datos como ciclos realizados, el tamaño de la secuenciación, alineamiento, tasa de error y la Q obtenida.

6.8 Análisis

6.8.1 Datos estadísticos:

Se utilizó el programa de GraphPad Prism versión 6 para hacer los análisis estadísticos de la cohorte de estudio, así como para las comparaciones de las citocinas cuantificadas. Para los datos obtenidos de Luminex se realizaron las comparaciones para aquellos analitos que obtuvieron el 95% de muestras determinadas, por lo que GM-CSF no se analizó. Se utilizaron métodos no paramétricos: Mann-Whitney para comparaciones entre dos grupos y Kruskal-Wallis para 3 grupos o más, corrigiendo las p por comparaciones múltiples por el método de Dunn. Para todos los análisis estadísticos se consideró un valor de significancia menor a 0.05. Las correlaciones se realizaron con el método de Spearman, para considerar una correlación fuerte se debe tener un valor de $Rho > 0.75$, una correlación intermedia se obtendrá a una $Rho > 0.50$ y un valor de $Rho < 0.50$ corresponde a una correlación débil.

6.8.2 Datos de la microbiota oral:

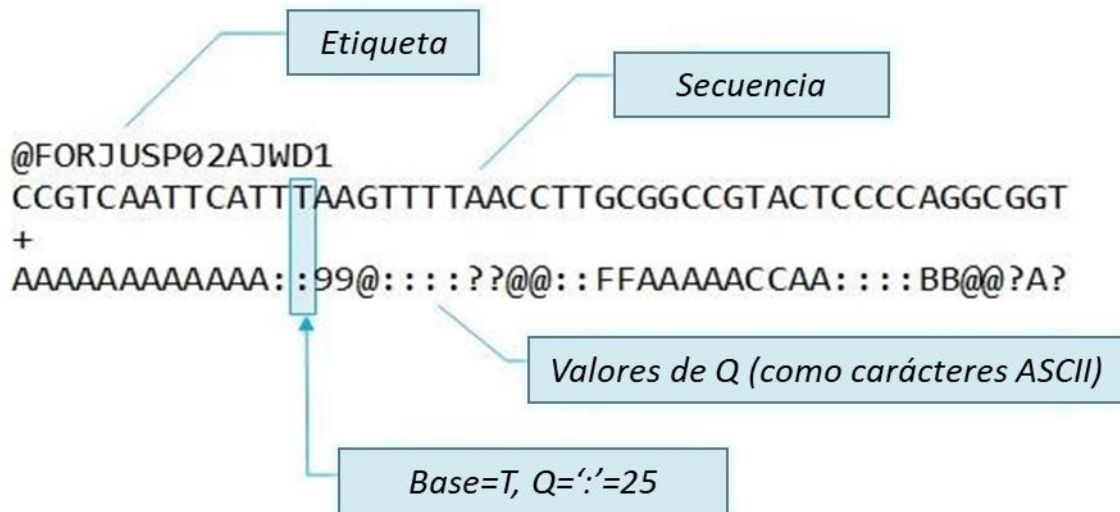
Etapa 1. Generación de las Unidades Taxonómicas de Operación (OTUs)

Para la caracterización de la microbiota oral, las secuencias obtenidas a partir del secuenciador se manejaron con el programa QIIME v 19.1. QIIME es una herramienta bioinformática que permite al investigador realizar los controles de calidad de las secuencias obtenidas, generar OTUs y asignar taxonomía a cada OTU, reconstrucciones filogenéticas, análisis de diversidad alfa y beta y sus visualizaciones en diferentes formatos (<http://qiime.org>). QIIME se utilizó a partir de las líneas de scripts en una terminal de tipo Linux.

Las secuencias crudas se encuentran en formato FastQ. El formato FastQ contiene un identificador, las secuencias forward (R1) y reverse (R2) de

cada una de las muestras, un signo de + y controles de calidad en un formato ASCII (Figura 17).

Figura 17 Ejemplo de un formato FastQ



Estas secuencias R1 y R2 deben ser unidas para obtener el fragmento completo de DNA que corresponde a las regiones V3-V4. Para unir las secuencias se empleó el script `join_paired_ends.py -f (forward reads) -r (reverse reads)`. El siguiente paso fue remover secuencias de baja calidad ($<Q20$) usando el script `split_libraries_fastq.py`. Una vez realizado este paso se obtienen las secuencias en un formato "fna". Las secuencias obtenidas se cuentan utilizando el script `count_seqs.py`. Todas las secuencias son concatenadas en un solo archivo en formato fna.

Para la generación de los OTUs y la asignación de una taxonomía a cada OTU, se utilizó el script `pick_closed_otus.py` con un porcentaje de similitud entre secuencias del 97%, con la base de datos GreenGenes versión 13_8. El programa genera una tabla de OTUs en formato BIOM, Antes de proceder a los demás análisis, se filtró la tabla de OTUs para remover OTUS con

menos de 10 secuencias debido a errores de secuenciación y con una fracción menor al 0.05% (OTUs de muy baja frecuencia). Se obtiene una tabla de OTUs finales con una asignación taxonómica a cada OTU por individuo en formato BIOM.

Etapas 2. Análisis de diversidad

La tabla de OTUs filtrada fue el punto de partida para los análisis de alfa diversidad, de beta diversidad, las correlaciones con el estado inflamatorio, las correlaciones con los datos clínicos y el análisis LefSE (Linear Discriminant Analysis Effect Size).

Al tener un número de secuencias diferentes para cada muestra se decidió hacer una rarefacción de las muestras a una profundidad de 25,000 secuencias.

Para la alfa diversidad o la riqueza y abundancia de especies dentro de una muestra, se utilizó el script: `alpha_rarefaction.py` y se calcularon 3 índices de alfa diversidad: Chao1, Shannon y `observed_OTUs`. Los resultados se visualizaron y analizaron con GraphPad Prism versión 6. Para los análisis de beta-diversidad se empleó el script `beta_diversity_through_plots.py` calculando `unweighted` y `weighted UniFrac`; donde `weighted UniFrac` considera tanto la abundancia relativa como la presencia de las especies, mientras que `unweighted UniFrac` solo considera la presencia de las especies. Los resultados se visualizaron mediante gráficos de tipo PCoA y se compararon los grupos de estudio con el script `compare_categories.py` y PERMANOVA para determinar que factor influía más sobre el agrupamiento de las comunidades bacterianas.

Etapas 3: Core microbiome

Los análisis de tipo "core microbiome" consiste en conocer qué bacterias se encuentran presentes en todos los individuos. Se utilizó el script `compute_core_microbiome.py`.

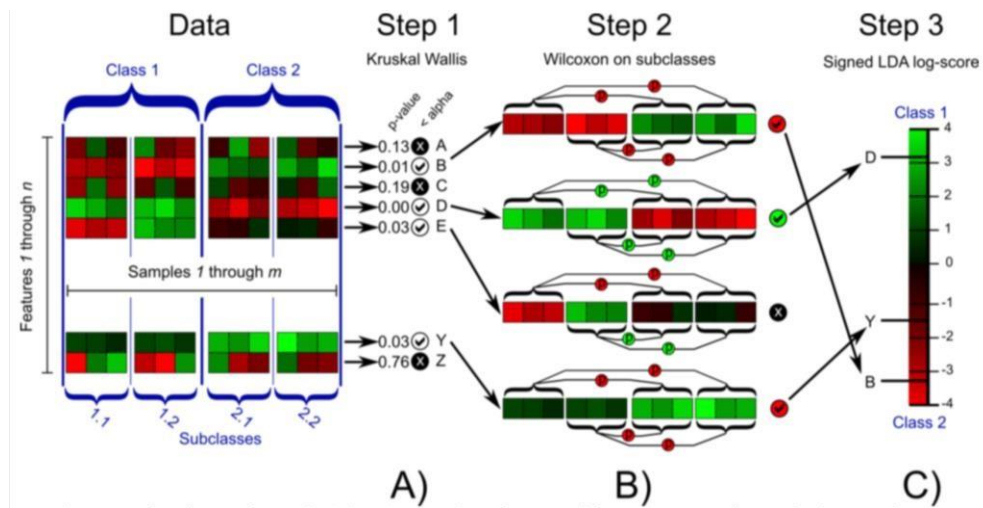
Etapas 4: Correlaciones

Las correlaciones entre OTUs, niveles de inflamación y datos clínicos se realizaron mediante el script `observation_metadada_correlation.py` utilizando el método de Spearman con un valor de p corregida asignado por el método Bootstrapping. Se analizaron aquellos géneros bacterianos con una $p < 0.05$. Las correlaciones se visualizaron con el programa de GraphPad Prism versión 6 con el método de Spearman considerando las Rho como se mencionó en la sección 6.8.1.

Etapas 5: Búsqueda de biomarcadores

El programa LEfSE es un análisis discriminante lineal (LDA) que busca encontrar biomarcadores, es decir en nuestro caso, bacterias que identifiquen y caractericen la microbiota de diferentes grupos de estudio y puedan explicar esas diferencias. El programa emplea dos pruebas estadísticas (Kruskal-Willis y Wilcoxon) para encontrar los biomarcadores y los clasifica por orden de importancia mediante el análisis LDA (Figura 18). El valor de LDA asignado para nuestro análisis fue de 3.5.

Figura 18 Secuencia de pasos para el análisis LefSE



La prueba de Kruskal-Wallis analiza las características en este caso la abundancia relativa en bacterias de ambas clases que son definidas por el usuario y busca si existen diferencias entre ellas (paso 1). Las que presenten diferencias son analizadas por la prueba de Wilcoxon (paso 2) para corroborar si las comparaciones entre subclasses coinciden con las que se encontraron en la prueba anterior. Con los valores obtenidos se designa un valor de LDA (paso 3) Tomado de <http://huttenhower.sph.harvard.edu/galaxy/>

7 Resultados

7.1 Características de la cohorte

La cohorte de estudio se compone por un total de 70 individuos: 59 son hombres (84.3%) y 11 son mujeres (15.7%) con una edad promedio de 35 años [18-59]. Los individuos fueron reclutados entre 2016 y 2018 y se seleccionaron para este protocolo a partir de una base de datos del protocolo B08-16 bajo los criterios mencionados previamente, además de verificar que se tuviera almacenada una muestra de lavado oral. De los 70 individuos, 48 son VIH+ y 22 son VIH- y todos fueron diagnosticados con neumonía. Las características de la cohorte se desglosan en la Tabla 9. Decidimos dividir los individuos VIH+ en 2 subgrupos de acuerdo con el uso de tratamiento antirretroviral: 22 estaban bajo TAR, 26 sin TAR.

Los agentes causantes de la neumonía se pudieron determinar en 27 individuos (38.6%) y esos fueron de carácter bacteriano, fúngico y viral como lo indica la Tabla 10. Se diagnosticaron 10 individuos con coinfecciones (14.3%). De 33 pacientes no se encontraban en la base de datos el agente causal de la neumonía ya que no se tenía un diagnóstico por parte de microbiología (47.1%).

Tabla 10 Características de la cohorte de estudio

Total	70			
Hombres	59			
Mujeres	11			
Edad	35 [18-59]			
Año de admisión al protocolo				
2016	13			
2017	31			
2018	26			
Estatus de VIH	VIH +		VIH -	Valor de P
	48		22	
Uso de TAR	Si	No	NA	
	22	26	NA	
CV (copias ARN/mL)	254 [40-14,660]	300802 [171038-675811]	NA	p < 0.0001
Log CV (copias ARN/ml)	2.405 [1.6-4.165]	5.465 [5.233-5.820]	NA	p < 0.0001
Células CD45 (cel/μl)	571.5 [297.3-1126]	730 [453-972.3]	1379 [1133-2027]	p < 0.0001
Linfocitos T CD4 ⁺ (cel/μl)	54.5 [22.50-155.0]	31.5 [20.0-59.0]	574 [380- 751]	p < 0.0001
Linfocitos T CD8 (cel/μl)	271 [156.5-527]	446.0 [275.5-695.8]	342 [228-751]	p = 0.3770

CD4:CD8	0.195 [0.0675-0.2825]	0.0850 [0.04-0.19]	1.29 [0.93-1.955]	p < 0.0001
Tiempo con TAR:	<5 años (16)	NA	NA	
	>5 años (5) ND (1)			
CV indetectable	8	NA	NA	

VIH: Virus Inmunodeficiencia Humana, TAR: Tratamiento antirretroviral, CV: carga viral, NA: no aplica; ND: no disponible

Tabla 11 Agente causal diagnosticado de la neumonía

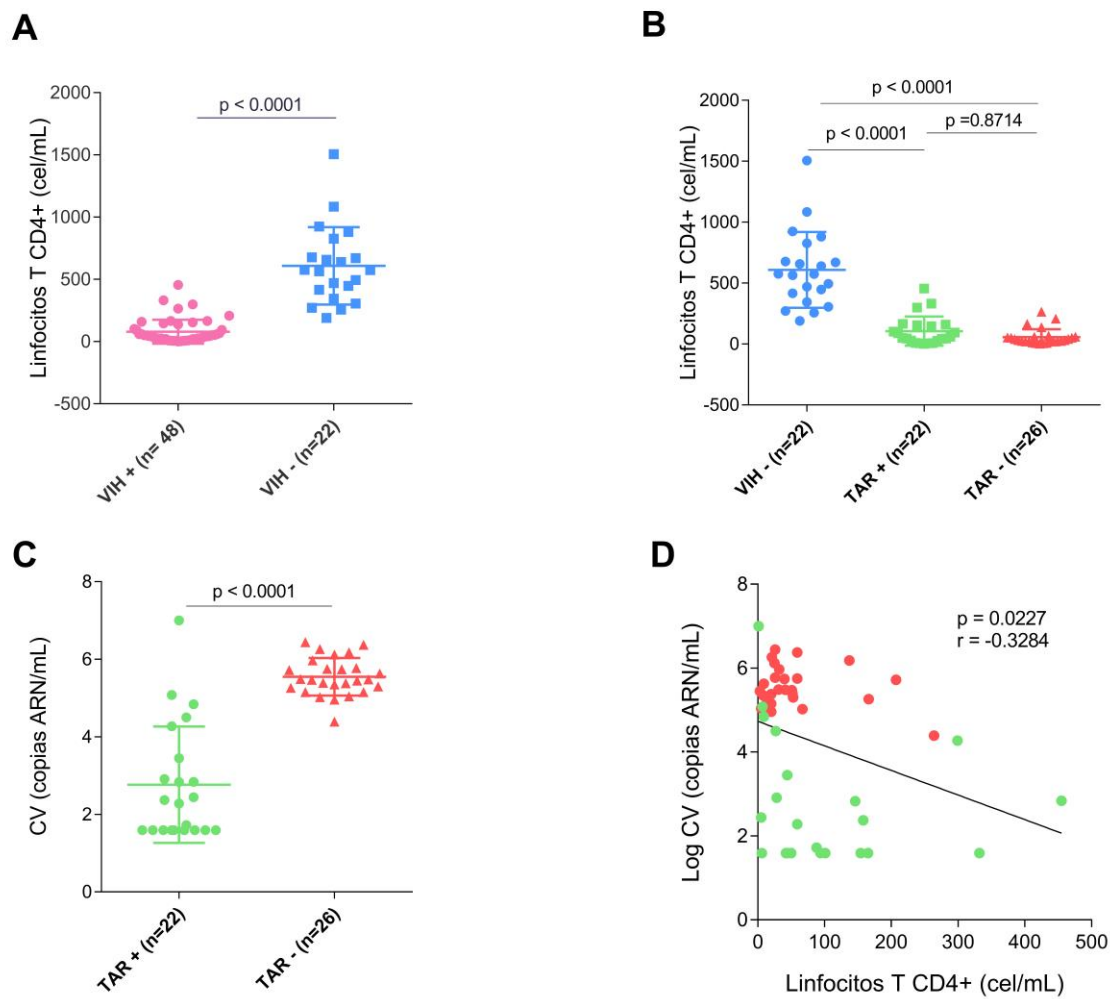
Estatus VIH	VIH +		VIH -
	48		22
Uso TAR	Si	No	NA
	22	26	NA
Agente etiológico			
Bacteriano	0	1	1
Fúngico	2	8	1
Viral	1	0	0
SD	4	4	4
ND	3	5	13
Co-infección	3	7	0
Fúngico / Viral	1	2	0
Fúngico/Bacteriano/Micobacteria	1	0	0
Fúngico / Bacteriano	1	3	0
Fúngico / Micobacteria	0	2	0

SD: sin diagnóstico, no se pudo determinar, ND: No disponible

Se obtuvieron diferencias significativas cuando se compararon los niveles de linfocitos T CD4⁺ entre individuos VIH⁺ y VIH⁻ ($p < 0.0001$), lo que se espera dado el profundo grado de inmunosupresión de la cohorte VIH⁺ (Figura 19A). Al comparar los niveles de linfocitos T CD4⁺ entre VIH⁺ con y sin TAR, no se encontraron diferencias ($p = 0.8714$, Figura 19B), sin embargo, los niveles de la carga viral eran significativamente más altos en pacientes VIH⁺ sin TAR comparado con VIH⁺ con TAR ($p < 0.001$, Figura 19C, 19D). Los resultados indican que

el uso de TAR está controlando la replicación viral, sin embargo, la falta de reconstitución del sistema inmune podría explicarse por el grado de inmunodeficiencia o bien podría reflejar el tiempo bajo tratamiento, ya que sólo 8 pacientes con VIH+ y con TAR se encuentran bajo supresión viral completa.

Figura 19 Datos clínicos de la cohorte de estudio



Gráficos de dispersión con mediana y desviación estándar. A. Comparación de los niveles de linfocitos T CD4⁺ entre grupos por estatus de VIH (Método de Mann Whitney), B. De acuerdo con el uso de TAR (ANOVA Kruskal-Wallis), C. Comparaciones entre la carga viral de acuerdo con el uso de TAR (Mann Whitney). D. Correlación de la carga viral con los niveles de linfocitos T CD4⁺ (correlación de Spearman, rojo sin uso de TAR, verde uso de TAR)).

7.2 Determinación de la inflamación local

Se analizaron un total de 9 citocinas mencionadas en el inciso 6.4 con la finalidad de comparar el estado inflamatorio entre los grupos de estudio y con los perfiles taxonómicos bacterianos. Los resultados fueron analizados con el programa GraphPad Prism versión 6 y se realizaron las pruebas estadísticas no paramétricas de Mann-Whitney (para estudio de dos grupos) y ANOVA Kruskal-Wallis con correcciones por comparaciones múltiples por el método de Dunn (para estudio de más de dos grupos). No se obtuvieron diferencias para las citocinas: IL1 β , IL-10, TFN- α , IFN- γ , IL-6, IL-8, IL-2 e IL-4 (Tabla 12).

Varias citocinas son importantes dentro de la cavidad oral, entre ellas IL-6 e IL-8. Aunque no se observaron diferencias entre los niveles de esas citocinas cuando comparamos VIH+ y VIH-, decidimos profundizar y correlacionar esas citocinas con datos clínicos de linfocitos T CD4⁺ y CV. Sin embargo, no encontramos ninguna correlación entre los niveles de linfocitos T CD4⁺ y CV con IL-6 e IL-8 (Tabla 13) y tampoco encontramos diferencias cuando se dividió la cohorte VIH+ por uso de TAR (Figura 20 A, B, C, D).

Los resultados parecen indicar que el estado inflamatorio determinado por varias citocinas no está asociado a la infección por VIH. No encontrar diferencias entre los niveles de inflamación entre VIH+ y VIH- podría explicarse por la presencia de las comunidades bacterianas en la boca ya que pueden ser estas quienes esten generando una respuesta inflamatoria y no el VIH; o bien la poca o nula existencia de carga viral en la boca. También, no podemos descartar las limitaciones de la técnica y su normalización, aunque tomamos en cuenta el factor de dilución, el método empleado no es lo más adecuado para determinar la cantidad total de proteínas ya que existen otros métodos más rigurosos que generan curvas estándares con controles.

Tabla 12 Comparaciones de las citocinas cuantificadas

Citocinas	Valor de p	Mediana [IQR]	
		VIH +	VIH -
IL-1B	0.0743	2.825 [1.304 - 4.150]	3.498 [2.255-10.83]
IL-2	0.0773	0.7534 [-0.1086-1.967]	1.493 [00.7210-6.903]
IL-4	0.3750	2.528 [1.805 -5.383]	4.415 [1.858 -8.052]
IL-5	0.4022	0.3908 [-0.2502-4.137]	0.7485 [-0.2624-8.255]
IL-6	0.6675	1.863 [0.6155-3.529]	2.351 [0.4365-4.627]
IL-8	0.3455	7.531 [4.181-14.98]	10.70 [5.104-15.93]
IL-10	0.1488	2.187 [1.021-3.313]	0.8450 [0.0739-4.295]
TNF-A	0.1286	1.142 [-0.7923-2.235]	1.871 [0.3819-4.778]
ING-G	0.2478	-1.902 [-6.049— 0.8102]	-1.368 [-4.554-0.5956]

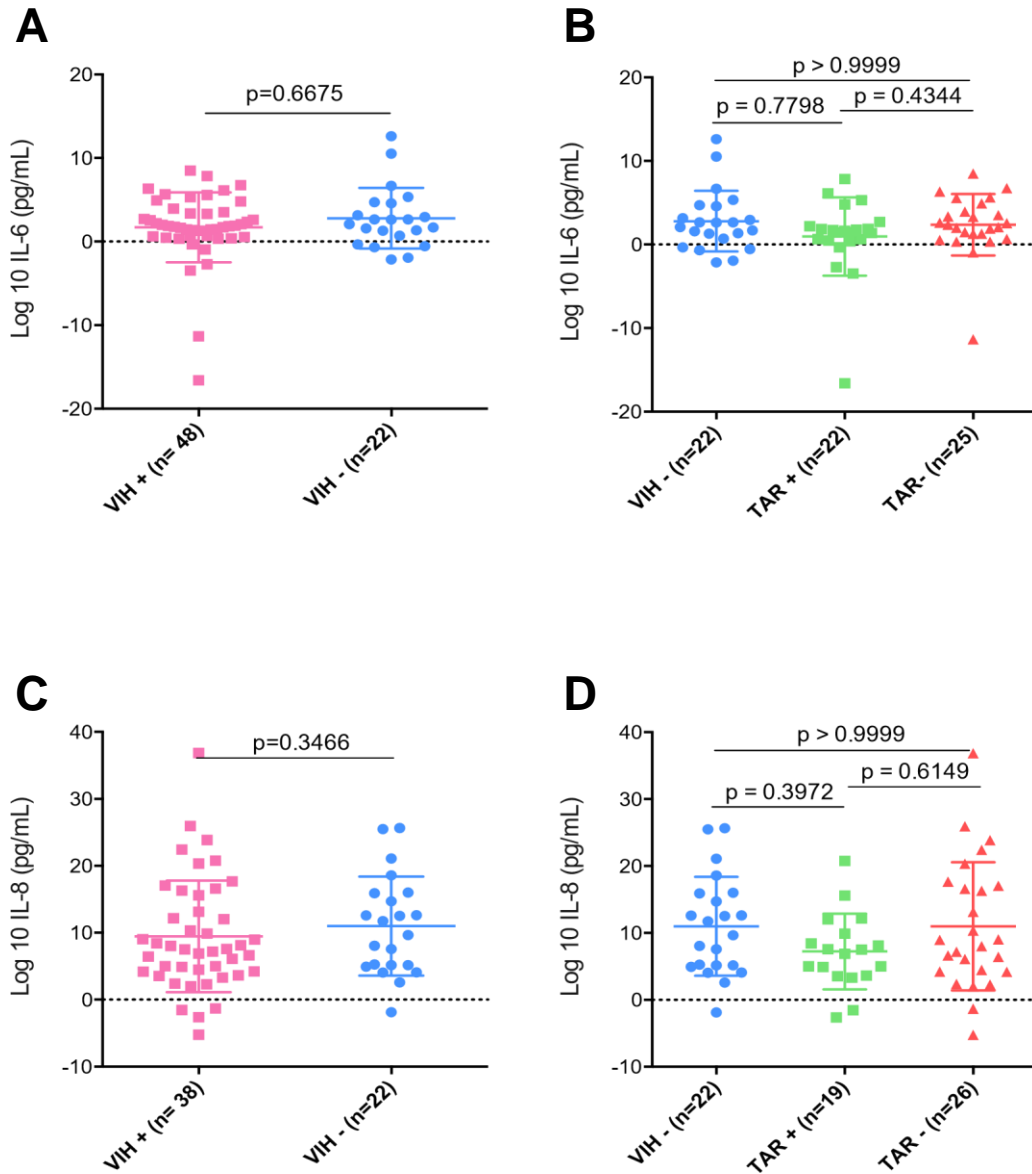
Comparaciones con la prueba de Mann-Whitney. Se muestra el valor de p y el rango expresado en Mediana y rango intercuartil [IQR] para las citocinas cuantificadas.

Tabla 13 Correlaciones entre citocinas de importancia oral y datos clínicos

Correlaciones			
Citocinas	Dato clínico	P	Rho
IL-6	CV	0.2244	0.1806
IL-6	Cuenta CD4 ⁺	0.6291	0.0596
IL-8	CV	0.4011	0.1298
IL-8	Cuenta CD4 ⁺	0.2432	0.1468

Se muestra el valor de p y rho, se utilizó la prueba de Spearman

Figura 20 Interleucinas de importancia oral comparadas por estatus de VIH y uso de TAR



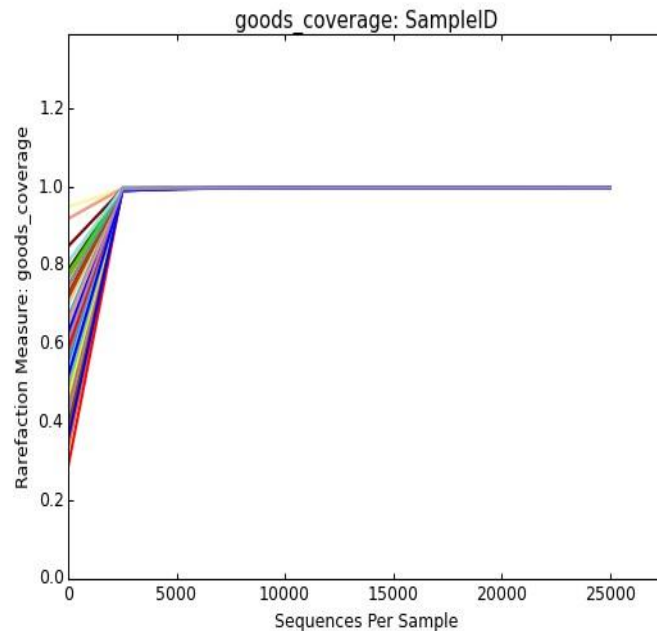
Gráficos de dispersión con mediana y desviación estándar. A y B. Comparaciones por el método de Mann-Whitney por estatus de VIH y por estatus de VIH y uso de TAR por el método de ANOVA Kruskal-Wallis para la citocina IL-6. C. y D. Comparaciones con IL-8.

7.3 Análisis de diversidad:

Como se mencionó en la metodología, para el análisis de la diversidad se utilizó el programa QIIME mediante la formación de una tabla de OTUs y su alineamiento con secuencias de referencia presentes en la base de datos GreenGenes. Se obtuvieron un total de 7,343,721 secuencias (mediana 86006 [60,484-185,901]).

Dado que el número de secuencias obtenidas para cada individuo son diferentes se realizó una rarefacción a una profundidad de 25,000 secuencias, es decir que para cada individuo se usaron 25,000 secuencias totales para los análisis. Este proceso de selección de secuencias es aleatorio y automático por parte del software. Para evaluar la idoneidad de la rarefacción se calculó la cobertura de Good's, que estima el porcentaje de las especies totales en una muestra. Lo que obtuvimos con esta rarefacción fue que a este número de secuencias se obtiene el máximo de identificación de OTUs para todas las muestras (Figura 21).

Figura 21 Rarefacción a 25 000 secuencias



Se muestran las 62 muestras a un punto final de 25,000 secuencias, medida a la cual se identifican para más del 99% de los OTUs presentes. Para poder comparar las muestras entre sí a este nivel de rarefacción se tuvieron que eliminar del análisis 8 muestras, para las cuales se obtuvieron menos de 25,000 secuencias.

7.3.1 Alfa-diversidad

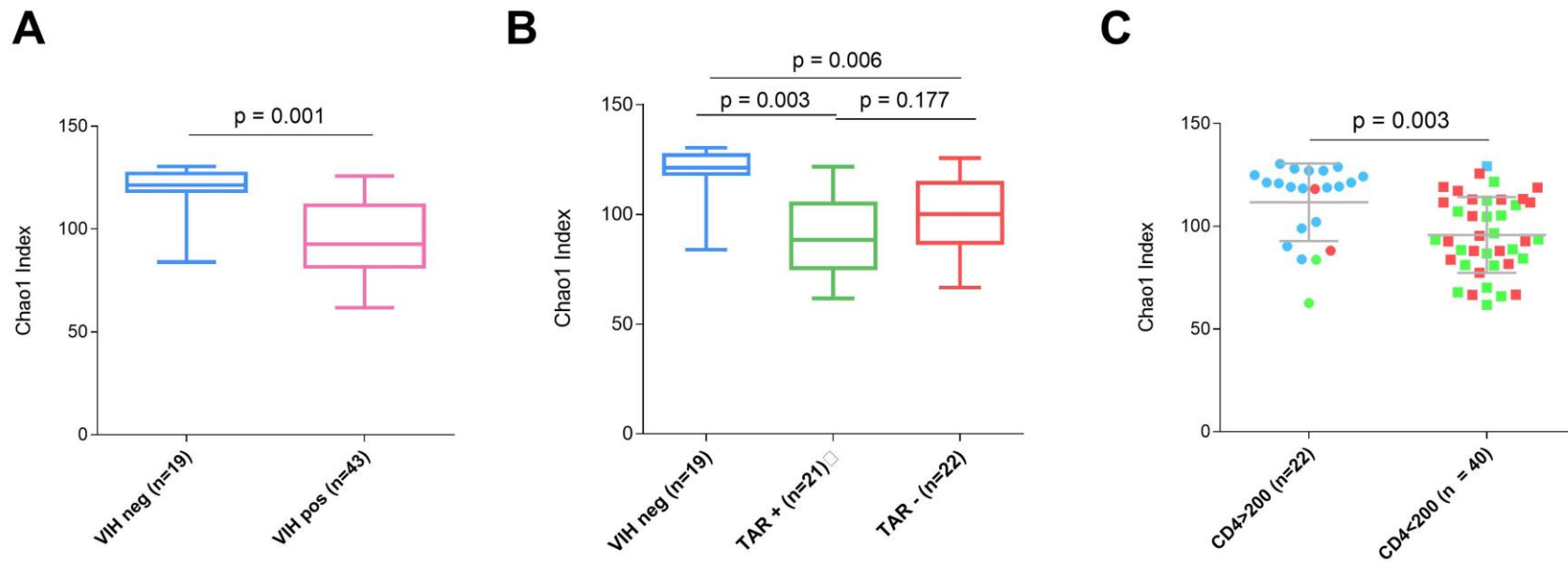
Para el análisis de la alfa-diversidad (diversidad dentro de una muestra) existen diferentes índices para cuantificarlo, algunos miden la riqueza de las especies, que es el número de especies presentes en la muestra, otros están basados en abundancia de las especies y otros en ambas. En este proyecto se analizaron el índice de Chao 1 para determinar y comparar la riqueza de especies y el índice de Shannon el cual considera abundancia y riqueza para evaluar la diversidad de las especies de los diferentes grupos de estudio.

De acuerdo con el índice de Chao 1 aquellos individuos sin infección por VIH presentan una mayor riqueza de especies (Figura 22A, $p = 0.001$) y mayor diversidad de especies (Figura 23A, $p = 0.007$) al comparar con

individuos VIH positivos. Al comparar entre subgrupos de VIH de acuerdo con el uso de TAR no existen diferencias en la riqueza de los grupos (Figura 22B, $p=0.177$) y tampoco hay diferencias en la diversidad (Figura 23B, $p=1$). Sin embargo, al comparar VIH negativos con VIH positivos con y sin TAR encontramos que la riqueza ($p = 0.003$, $p = 0.006$ respectivamente) y diversidad ($p = 0.009$, $p = 0.006$ respectivamente) son mayores en VIH negativos, este resultado podría ser simplemente un reflejo de la primera condición (de la infección por VIH) ya que, como tal, el uso de TAR no está generando ninguna diferencia significativa.

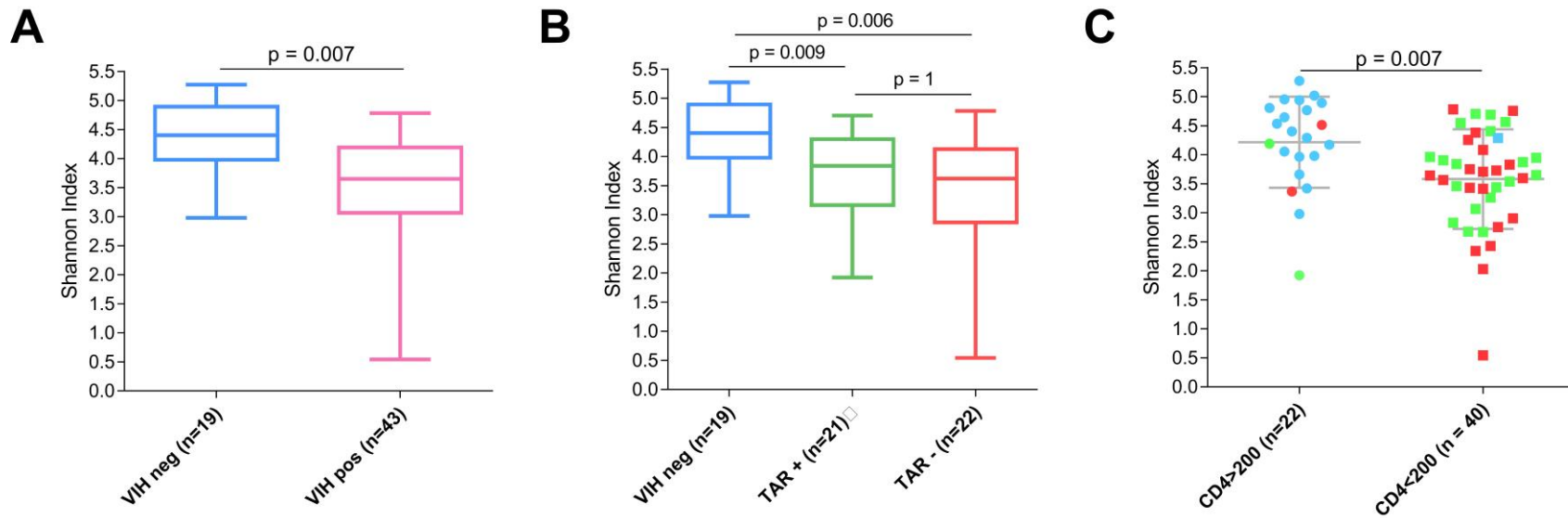
Al comparar por número de linfocitos T CD4⁺, se encuentra una mayor riqueza (Figura 22C, $p=0.003$) y diversidad (Figura 23C, $p=0.007$) en pacientes con cuenta de linfocitos T CD4⁺ mayor a 200, y esto parece ser independiente del estatus de VIH y del tratamiento antirretroviral.

Figura 22 índice de Chao 1 para riqueza de especies



Comparación de los índices de Chao de acuerdo con los grupos de estudio, (A) por estatus de VIH, (B) por estatus de VIH y TAR y (C) gráfico de dispersión mostrando el grado de inmunosupresión basado en el número de células T CD4⁺ en sangre periférica, en verde se muestran VIH+ TAR+, rojo VIH+ TAR- y en azul VIH-.

Figura 23 índice de Shannon para diversidad



Se comparan los grupos de acuerdo con el estatus de VIH (A), por estatus de VIH y TAR (B) y grado de inmunodeficiencia (C) gráfico de dispersión mostrando el grado de inmunosupresión basado en el número de células T CD4⁺ en sangre periférica, en verde se muestran VIH+ TAR+, rojo VIH+ TAR- y en azul VIH-

7.3.2 Beta-diversidad:

Para los análisis de la beta-diversidad se empleó la métrica UniFrac tanto para su parte cuantitativa (weighted) como cualitativa (unweighted). Estas dos formas para análisis de beta diversidad consideran factores como la presencia/ausencia de las especies dentro de las muestras (unweighted) y la abundancia relativa de las especies que están presentes (weighted). Ambas matrices de distancia se representaron en los gráficos de PCoA donde los ejes ortogonales (PC1, PC2, PC3, etc..) capturan la mayor cantidad de variación en todas las muestras analizadas. Los gráficos de PCoA son una representación de las matrices de disimilitud (unweighted and weighted UniFrac) donde agrupamientos entre las muestras reflejan similitud entre ellas. Los gráficos de PCoA basados en las distancias calculadas por UniFrac ayudan a visualizar datos complejos como son las comunidades bacterianas y ayudan a explorar los factores que puedan explicar el agrupamiento. Para determinar la contribución de los factores y poder explicar las diferencias de composición entre muestras, se ocupó la prueba PERMANOVA. Si el análisis por PERMANOVA es significativo ($p < 0.05$), eso significa que el factor que se utilizó para definir grupos (por ejemplo, estatus de VIH, grupos VIH- y VIH+) tiene un efecto sobre las comunidades bacterianas.

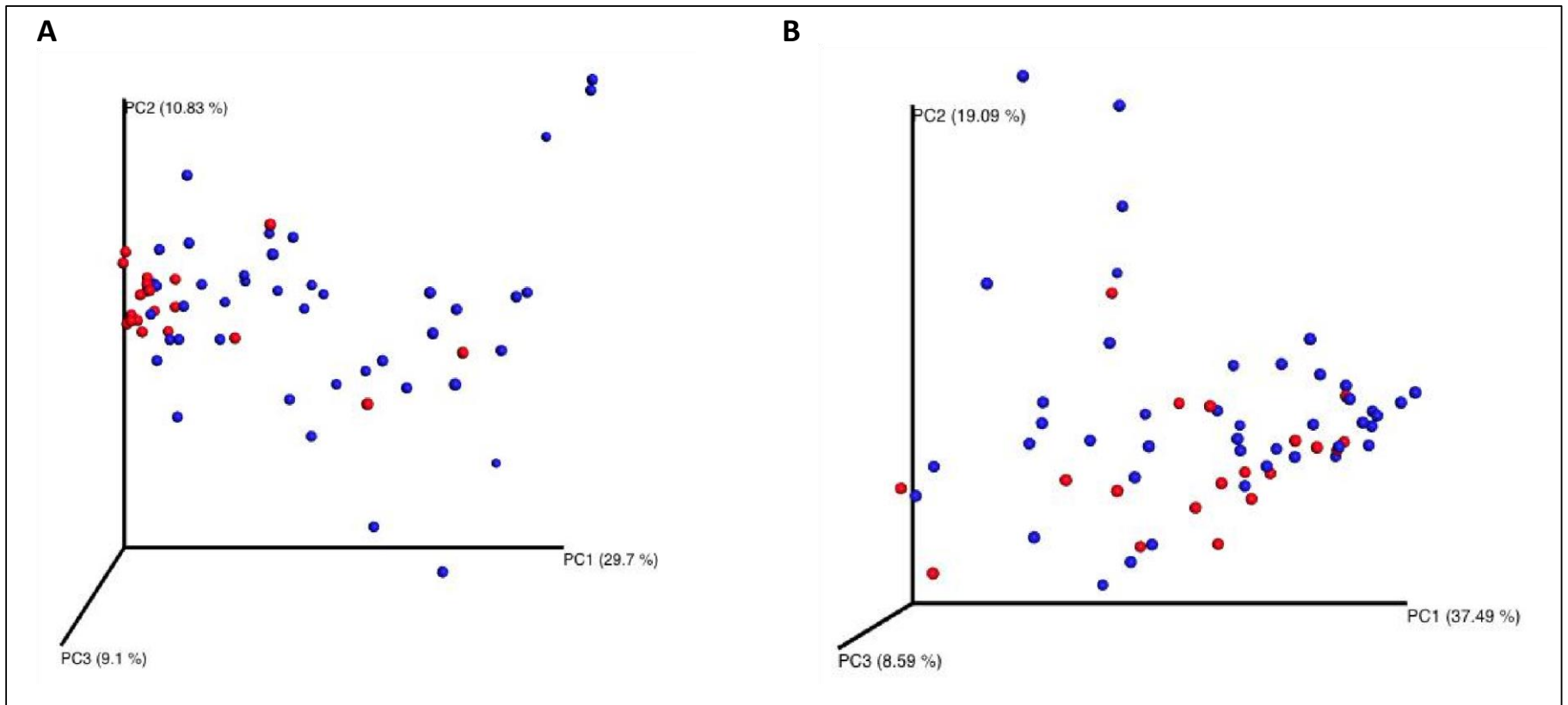
En la Figura 24A se muestra el gráfico de PCoA cualitativo para los grupos VIH+ (azul) y VIH- (rojo) donde existe una diferencia entre ambos grupos ($p = 0.0019$), en este caso podríamos decir que existen bacterias dentro de un grupo que no se encuentran en el otro y que están generando estas diferencias. Mientras que en Figura 24B se muestra la parte cuantitativa donde no existe diferencias entre los mismos grupos ($p = 0.1348$). Esta forma de UniFrac (cuantitativa) al considerar tanto la presencia/ausencia como la abundancia de las bacterias, nos puede estar indicando que la abundancia de las bacterias

que comparten las muestras no está generando una diferencia que sea significativa (Tabla 4). De tal manera que podríamos pensar que el estatus de VIH si es un factor que contribuye a las diferencias entre la diversidad microbiana de los grupos.

Tabla 14 Valores de p para la métrica UniFrac usando el método PERMANOVA

UniFrac	Grupo	Valor de p
Unweighted	Estatus de VIH	0.0019
	Estatus de VIH y uso de TAR	0.0009
Weighted	Estatus de VIH	0.1348
	Estatus de VIH y uso de TAR	0.1288

Figura 24 Gráficos de PCoA



Se muestra las matrices Unweighted (A) y Weighted (B) de UniFrac. Los ejes muestran los porcentajes de variación. VIH positivos: azules y VIH negativos: rojos

7.3.3 Perfil taxonómico

Se encontró que bacterias del género *Streptococcus* pertenecientes al filo *Firmicutes* se encuentran en todas las muestras (Figura 25). En los pacientes con VIH+ encontramos un aumento en la abundancia relativa de bacterias del género *Haemophilus*, *Veillonella* y *Rothia* y una disminución en bacterias del género *Prevotella*, *Fusobacterium* y *Leptotrichia* (Figura 26). Cuando investigamos de acuerdo con el uso de TAR, se observó que la abundancia relativa el género *Veillonella* incrementa en el grupo VIH+ sin TAR, mientras que la abundancia relativa del género *Prevotella* se encuentra disminuida en este grupo (Figura 27). *Haemophilus* y *Rothia* se encuentra en mayor proporción en el grupo que se encuentra bajo TAR y *Fusobacterium* se encuentra disminuida en el mismo grupo (Figura 28). *Prevotella* permanece ser el género bacteriano abundante en el grupo VIH- (Figura 28).

Al comparar los grupos bacterianos de acuerdo con los niveles de linfocitos T CD4⁺ (Figura 28) encontramos que *Haemophilus* y *Rothia* son más abundantes cuando los niveles de linfocitos T CD4⁺ son inferiores a 200 lo que coincide con la presencia de dicho género en el grupo VIH positivos. *Prevotella* se encuentra en mayor proporción cuando la cuenta de linfocitos T CD4⁺ es superior a 200 relacionándose con en el grupo de VIH negativo (Figura 28).

En la Tabla 15 se muestra el porcentaje las abundancias relativas de cada una de las especies encontradas.

Los géneros *s* *Campylobacter*, *Bulleidia*, *Atopobium*, *Actinomyces*, *Granulicatella* también están presentes en la boca.

Figura 25 Taxonomía de grupos bacterianos encontrados en todas las muestras

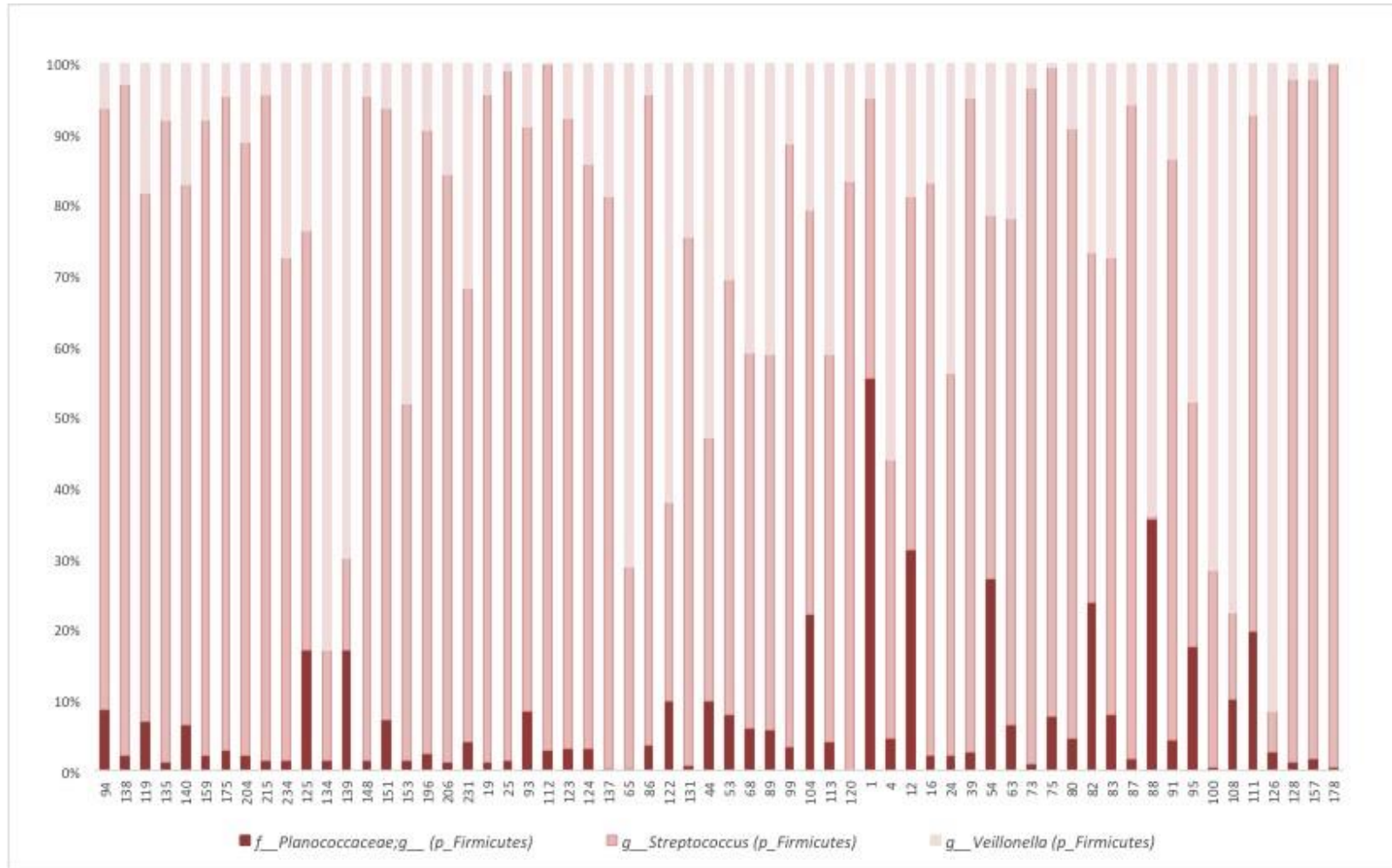


Figura 26 Taxonomía de grupos bacterianos presentes en los grupos de VIH

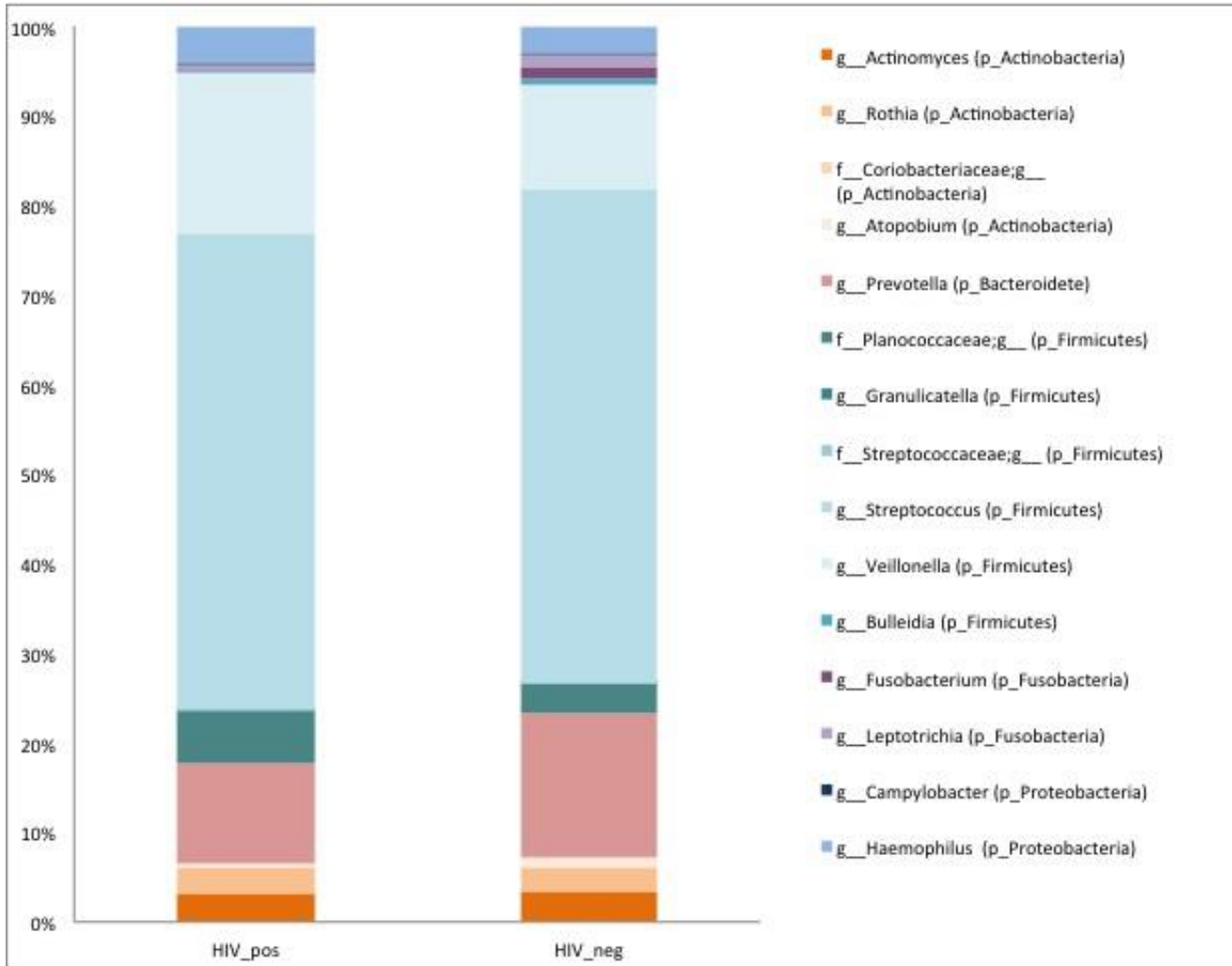


Figura 27 Taxonomía de grupos bacterianos de acuerdo con el uso de TAR

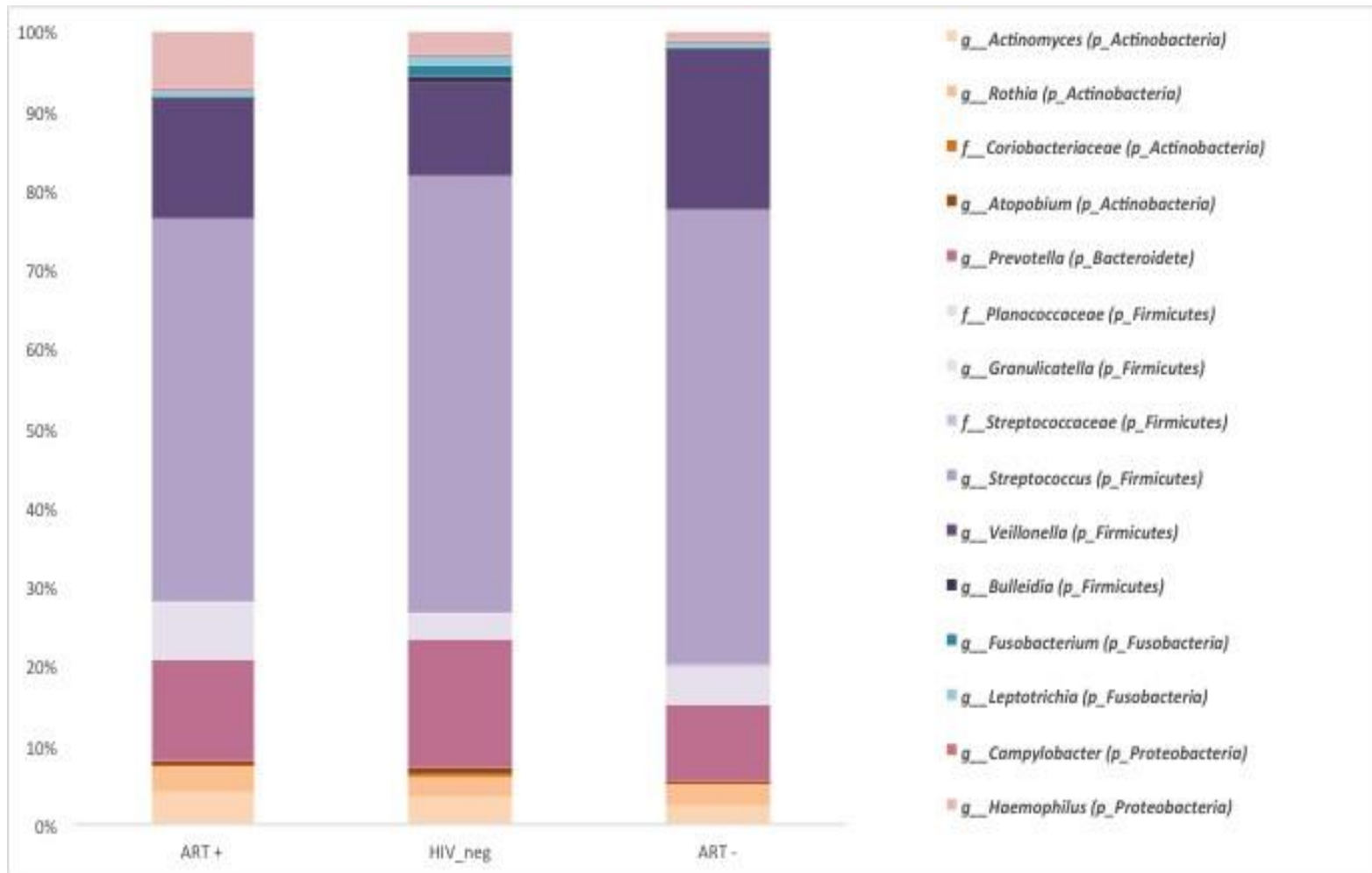


Figura 28 Taxonomía de grupos bacterianos por cuenta de linfocitos T CD4⁺

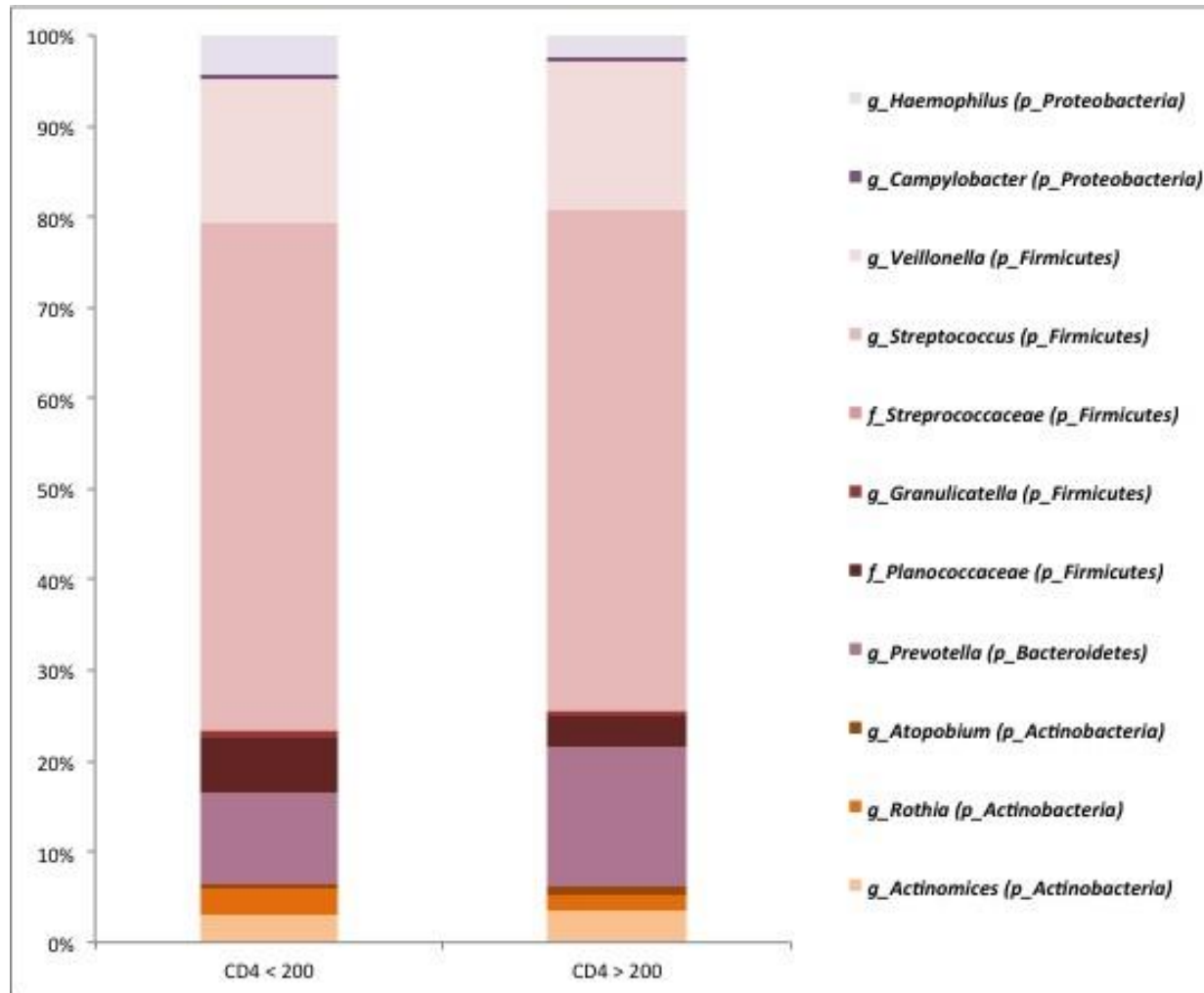


Tabla 15. Géneros bacterianos presentes en las muestras. Se muestran las abundancias relativas de cada uno

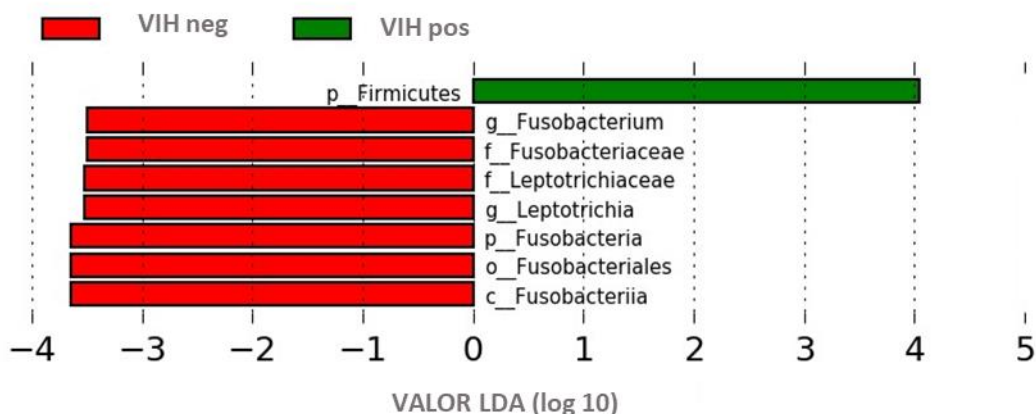
OTU ID	VIH negativo	VIH Positivo	VIH+ Uso de TAR	VIH+ Sin uso de TAR	CD4+ <200	CD4+ >200
<i>g__Actinomyces</i> (<i>p_Actinobacteria</i>)	3.50 %	3.11 %	3.93 %	2.41 %	3.10%	3.60%
<i>g__Rothia</i> (<i>p_Actinobacteria</i>)	2.51 %	3.02 %	3.34 %	2.74 %	2.90%	1.70%
<i>f__Coriobacteriaceae</i> (<i>p_Actinobacteria</i>)	0.13 %	0.04 %	0.01 %	0.06 %	—	—
<i>g__Atopobium</i> (<i>p_Actinobacteria</i>)	0.97 %	0.42 %	0.62 %	0.25 %	0.30%	0.80%
<i>g__Prevotella</i> (<i>p_Bacteroidete</i>)	16.14 %	11.05 %	12.74 %	9.60 %	10.10%	15.50%
<i>f__Planococcaceae</i> (<i>p_Firmicutes</i>)	3.29 %	5.84 %	7.14 %	4.72 %	6.10%	3.40%

<i>g__Granulicatella</i> (<i>p__Firmicutes</i>)	0.14 %	0.25 %	0.30 %	0.20 %	0.80%	0.50%
<i>f__Streptococcaceae</i> (<i>p__Firmicutes</i>)	0.06 %	0.10 %	0.07 %	0.13 %	0.20%	0.10%
<i>g__Streptococcus</i> (<i>p__Firmicutes</i>)	55.10 %	53.11 %	48.11 %	57.39 %	55.80%	55.10%
<i>g__Veillonella</i> (<i>p__Firmicutes</i>)	11.48 %	17.80 %	15.20 %	20.02 %	16.00%	16.50%
<i>g__Bulleidia</i> (<i>p__Firmicutes</i>)	0.79 %	0.18 %	0.14 %	0.22 %	—	—
<i>g__Fusobacterium</i> (<i>p__Fusobacteria</i>)	1.42 %	0.17 %	0.07 %	0.25 %	—	—
<i>g__Leptotrichia</i> (<i>p__Fusobacteria</i>)	1.26 %	0.64 %	0.79 %	0.51 %	—	—
<i>g__Campylobacter</i> (<i>p__Proteobacteria</i>)	0.32 %	0.26 %	0.29 %	0.23 %	0.30%	0.30%
<i>g__Haemophilus</i> (<i>p__Proteobacteria</i>)	2.89 %	4.02 %	7.24 %	1.27 %	4.40%	2.50%

7.3.4 LEfSE

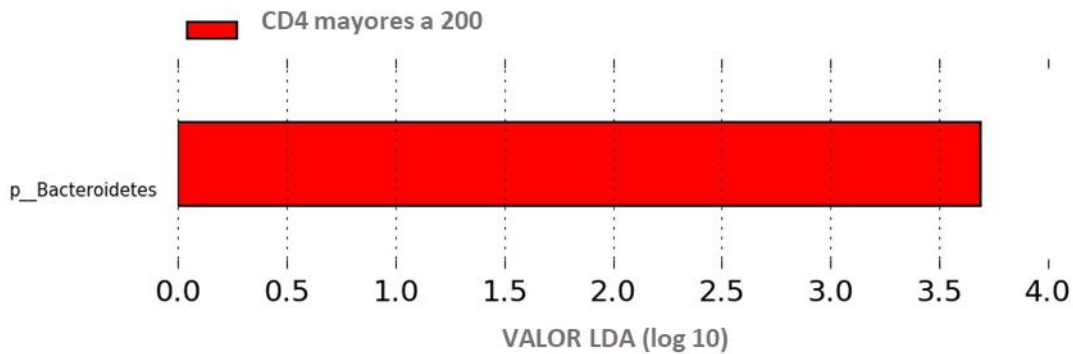
El análisis LEfSE se empleó para determinar aquellas especies que pueden explicar las diferencias encontradas entre los grupos de estudio. Para determinar estas especies se decidió trabajar con un valor de LDA > 3.5. Con lo anterior al comparar entre grupos de VIH como nuestra clase principal encontramos que la presencia de *Firmicutes* en el grupo de VIH+ tiene un efecto sobre las diferencias encontradas entre los grupos. Mientras que para el grupo de VIH- son las bacterias de género *Fusobacterium* y *Leptotrichia* (Figura 29). Lo anterior concuerda con el análisis taxonómico de la microbiota común (ver Tabla 15 de abundancias relativas).

Figura 29 Análisis LEfSE para los estatus de VIH



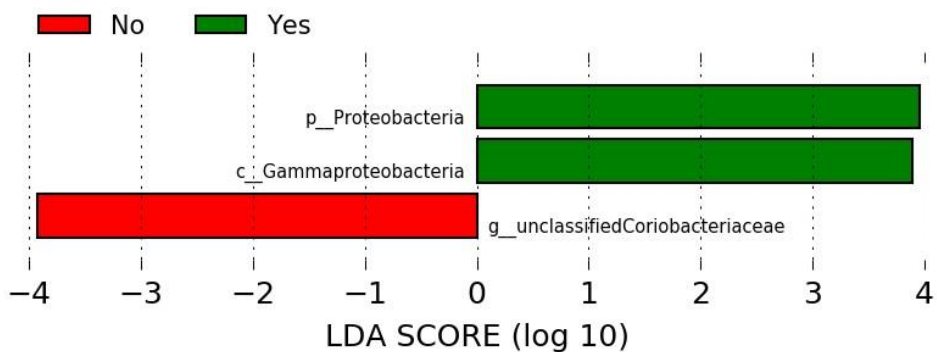
Para la comparación entre grupos por niveles de linfocitos T CD4⁺ encontramos que a mayor cuenta de linfocitos T CD4⁺ el filo *Bacteroidetes* tiene un efecto sobre dicho grupo (Figura 30).

Figura 30 Análisis LEfSE para los estatus de VIH de acuerdo con la cuenta de linfocitos T CD4⁺



Al comparar con base en el uso de tratamiento antirretroviral encontramos que el filo *Proteobacteria* define el grupo VIH+ bajo TAR mientras que para el grupo sin TAR se encontró a la familia *Coriobacteriaceae* (Figura 31).

Figura 31 Análisis LEfSE de acuerdo con el uso de TAR



7.3.5 Asociaciones estado inflamatorio e infección por VIH y diversidad microbiana

Se realizaron correlaciones de la taxonomía encontrada, con el estado inflamatorio considerando principalmente interleucinas 6 y 8 (IL-6, IL-8) por ser de importancia dentro de la cavidad oral y con las características

clínicas (carga viral; CV, niveles de linfocitos T CD4⁺) por ser determinantes de la infección por VIH. Como se mencionó, fueron analizados aquellos géneros bacterianos cuya p corregida dada por QIIME fuese menor a 0.05. Los resultados se muestran en la tabla 16 donde se observan los valores de Rho obtenidos para las bacterias con una p < 0.05 y que aparecieron en el análisis de la microbiota común. Los valores de Rho obtenidos nos indican la presencia de una correlación positiva y en su totalidad al ser menores a 0.5 corresponden a una correlación débil.

Tabla 16 Correlaciones microbiota y datos clínicos

Taxonomía	Dato clínico	Rho
<i>g_Actinomyces</i> (<i>p_Actinobacteria</i>)	IL-8	0.2223
	Linfocitos T CD4 ⁺	0.3504
<i>g_Aggregatibacter</i> (<i>p_Proteobacteria</i>)	IL-6	0.2852
	Linfocitos T CD4 ⁺	0.3992
<i>g_Atopobium</i> (<i>p_Actinobacteria</i>)	Linfocitos T CD4 ⁺	0.4063
<i>g_Bulleida</i> (<i>p_Firmicutes</i>)	Linfocitos T CD4 ⁺	0.3492
<i>g_Haemophilus</i> (<i>p_Proteobacteria</i>)	IL-8	0.2815

<i>g_Haemophilus</i> (<i>p_Proteobacteria</i>)	Linfocitos T CD4 ⁺	0.1429
<i>g_Leptotrichia</i> (<i>p_Fusobacteria</i>)	Carga viral	0.2455
	Linfocitos T CD4 ⁺	0.1949
<i>g_Megasphaera</i> (<i>p_Firmicutes</i>)	Linfocitos T CD4 ⁺	0.2781
<i>g_Moryella</i> (<i>p_Firmicutes</i>)	Carga viral	0.2673
<i>g_Porphyrromonas</i> (<i>p_Bacteroidetes</i>)	IL-6	0.2607
	Linfocitos T CD4 ⁺	0.2668
<i>g_Prevotella</i> (<i>p_Bacterioidetes</i>)	IL-8	0.0611
	IL-6	0.0136
<i>g_Rothia</i> (<i>p_Actinobacteria</i>)	IL-8	0.0776
<i>g_Streptococcus</i> (<i>p_Firmicutes</i>)	IL-6	0.0556
<i>g_Veillonella</i> (<i>p_Firmicutes</i>)	IL-8	0.0873

8 Discusión

El presente proyecto tuvo como objetivo determinar el estado inflamatorio de la cavidad oral y caracterizar la microbiota oral de individuos con neumonía, con y sin infección por VIH.

Cuando analizamos los niveles de inflamación local en relación con el estatus de VIH, no encontramos diferencias significativas. Este resultado parece indicar que la inflamación local no está relacionada con la infección por VIH. Nittayananta y colaboradores⁴⁰ determinaron la expresión de citocinas proinflamatorias (IL-6, IL-8 y TNF- α) en muestras de saliva de pacientes con infección por VIH con y sin TAR y de individuos sin infección por VIH con la técnica de ELISA. Ellos encontraron que IL-6 está influenciada por el uso de cigarro, disminuida en individuos VIH positivos y no se ve influenciada por el uso de TAR. Cabe mencionar que existen diferencias entre nuestro estudio y el de Nittayananta y colaboradores: los métodos empleados para cuantificar citocinas fueron diferentes, la cohorte de Nittayananta estaba constituida por un número más amplio de pacientes y de ellos se contaba con información sobre su estado de salud oral (presencia de lesiones orales, uso de cigarro, consumo de alcohol, higiene oral, etc.) factores que influyen sobre los niveles de inflamación. Nuestra cohorte carece de ese tipo de información. En este proyecto, exploramos asociaciones entre la microbiota oral y los niveles de IL-6 e IL-8 así como carga viral y cuenta de linfocitos T CD4⁺ encontrando que hay una asociación débil. Otra limitante importante de nuestro trabajo es el método empleado para cuantificar proteínas totales y normalizar los niveles de citocinas entre individuos, este factor podría eliminarse al emplear un método que nos permita cuantificar las proteínas con mayor exactitud como el método de Bradford/Lowry. Además, la saliva es una secreción más concentrada y el lavado oral está más diluido.

Con respecto a la diversidad bacteriana, encontramos que individuos sin infección por VIH presentan una mayor diversidad que aquellos con infección por VIH; de igual manera, individuos con una cuenta de linfocitos T CD4⁺ mayor a 200 células presentan una mayor diversidad en la microbiota. Ambos resultados concuerdan con lo reportado por Kistler, et.al. y Presti, et.al. Los resultados indican que VIH y el grado de inmunodeficiencia parecen afectar la diversidad bacteriana oral. El TAR parece no afectar la diversidad de la microbiota. Encontramos géneros previamente reportados como parte de la microbiota oral. De manera interesante, el género *Haemophilus* prevaleció en los individuos VIH positivos, siendo *Haemophilus parainfluenzae* un agente causal de la neumonía bacteriana (Kistler, 2015). Los análisis de PcoA/Unifrac nos indican que existen diferencias por estatus de VIH. Para identificar qué tipo de bacterias podrían estar determinando esas diferencias usamos el programa LefSE. Los análisis con LefSE nos permitieron explorar diferencias entre grupos de estudio, pero esos análisis únicamente reportaron diferencias a nivel de filo y no a nivel de género, lo que limita mucho proponer mecanismos o especular sobre lo que está pasando. Nuestro estudio exploró las posibles asociaciones entre la microbiota oral, el nivel de inflamación y VIH (por medio de la carga viral y conteo de linfocitos T CD4⁺). Encontramos asociaciones débiles ($\rho < 0.50$) aunque esas correlaciones fueran significativas (p corregida < 0.05). En estudios de microbiota, es importante ser estricto en las correlaciones ya que este tipo de estudios pueden generar asociaciones espurias por la cantidad de datos analizados, es decir, encontrar una asociación falsa entre géneros de bacterias y factor de estudio. Finalmente, la falta de datos adicionales sobre la salud oral en general no nos permitió analizar más profundamente qué factores, además del VIH, podrían estar asociados con los perfiles bacterianos que se

caracterizan en ambos grupos. Igualmente, no podemos concluir ni formular hipótesis sobre la relación entre microbiota oral y neumonía, como es el caso mencionado de la presencia de *Haemophilus* en el grupo VIH+, ya que no se realizaron los estudios de lavados bronqueoalveolares de esos individuos.

9 Conclusión

Reportamos que no hubo diferencias en los niveles de inflamación local por estatus de VIH mientras que la diversidad bacteriana parece estar asociada con VIH y con el grado de inmunodeficiencia.

10 Bibliografía

- 1 Ursell, L. K., Metcalf, J. L., Parfrey, L. W. & Knight, R. Defining the human microbiome. *Nutr Rev* **70 Suppl 1**, S38-44, doi:10.1111/j.1753-4887.2012.00493.x (2012).
- 2 Grogan, D. The microbes within. *Nature* **518**, S2, doi:10.1038/518S2a (2015).
- 3 Escobar-Zepeda, A., Vera-Ponce de Leon, A. & Sanchez-Flores, A. The Road to Metagenomics: From Microbiology to DNA Sequencing Technologies and Bioinformatics. *Front Genet* **6**, 348, doi:10.3389/fgene.2015.00348 (2015).
- 4 Woese, C. R. & Fox, G. E. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 5088-5090 (1977).
- 5 María del Rosario Rodicio, M. d. C. M. Identification of bacteria through 16S rRNA sequencing: Principles, methods and applications in clinical microbiology. *Enferm Infecc Microbiol Clin* **22**, 238-245, doi:doi:10.1016/S0213-005X(04)73073-6 (2004).
- 6 Frigolet, M. E. & Aguilar, R. G. in *Revista Digital Universitaria, UNAM* Vol. 18 (2017).
- 7 Yarza, P. *et al.* Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences. *Nat Rev Microbiol* **12**, 635-645, doi:10.1038/nrmicro3330 (2014).
- 8 Group, N. H. W. *et al.* The NIH Human Microbiome Project. *Genome Res* **19**, 2317-2323, doi:10.1101/gr.096651.109 (2009).
- 9 Kilian, M. *et al.* The oral microbiome - an update for oral healthcare professionals. *Br Dent J* **221**, 657-666, doi:10.1038/sj.bdj.2016.865 (2016).

- 10 Lim, Y., Totsika, M., Morrison, M. & Punyadeera, C. Oral Microbiome: A New Biomarker Reservoir for Oral and Oropharyngeal Cancers. *Theranostics* **7**, 4313-4321, doi:10.7150/thno.21804 (2017).
- 11 Dewhirst, F. E. *et al.* The human oral microbiome. *J Bacteriol* **192**, 5002-5017, doi:10.1128/JB.00542-10 (2010).
- 12 Jia, G. *et al.* The oral microbiota - a mechanistic role for systemic diseases. *Br Dent J* **224**, 447-455, doi:10.1038/sj.bdj.2018.217 (2018).
- 13 Sampaio-Maia, B., Caldas, I. M., Pereira, M. L., Perez-Mongiovi, D. & Araujo, R. The Oral Microbiome in Health and Its Implication in Oral and Systemic Diseases. *Adv Appl Microbiol* **97**, 171-210, doi:10.1016/bs.aambs.2016.08.002 (2016).
- 14 Heron, S. E. & Elahi, S. HIV Infection and Compromised Mucosal Immunity: Oral Manifestations and Systemic Inflammation. *Front Immunol* **8**, 241, doi:10.3389/fimmu.2017.00241 (2017).
- 15 Naafs, M. A. Oral Mucosal Immune Suppression, Tolerance and Silencing: A Mini-Review. *Mod App Dent Oral Health* **1**, 26-36, doi:doi: 10.32474/MADOHC.2018.01.000109 (2018).
- 16 Feller, L. *et al.* Oral mucosal immunity. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* **116**, 576-583, doi:10.1016/j.oooo.2013.07.013 (2013).
- 17 Cavalla, F., Araujo-Pires, A. C., Bigueti, C. C. & Garlet, G. P. Cytokine Networks Regulating Inflammation and Immune Defense in the Oral Cavity. *Curr Oral Health Rep.* **1**, 104-113, doi:doi:10.1007/s40496-014-0016-9 (2014).
- 18 UNAIDS. *F A C T S H E E T - W O R L D A I D S D A Y 2018* (2018).

- 19 CENSIDA. Vigilancia epidemiológica de casos de VIH/SIDA en México, Registro Nacional de casos de SIDA actualización al cierre 2017. (2017).
- 20 Becerra, J. C., Bildstein, L. S. & Gach, J. S. Recent Insights into the HIV/AIDS Pandemic. *Microb Cell* **3**, 451-475, doi:10.15698/mic2016.09.529 (2016).
- 21 Deeks, S. G., Overbaugh, J., Phillips, A. & Buchbinder, S. HIV infection. *Nat Rev Dis Primers* **1**, 15035, doi:10.1038/nrdp.2015.35 (2015).
- 22 Maartens, G., Celum, C. & Lewin, S. R. HIV infection: epidemiology, pathogenesis, treatment, and prevention. *Lancet* **384**, 258-271, doi:10.1016/S0140-6736(14)60164-1 (2014).
- 23 Freed, E. O. HIV-1 assembly, release and maturation. *Nat Rev Microbiol* **13**, 484-496, doi:10.1038/nrmicro3490 (2015).
- 24 McMichael, A. J., Borrow, P., Tomaras, G. D., Goonetilleke, N. & Haynes, B. F. The immune response during acute HIV-1 infection: clues for vaccine development. *Nat Rev Immunol* **10**, 11-23, doi:10.1038/nri2674 (2010).
- 25 Volberding, P. A. & Deeks, S. G. Antiretroviral therapy and management of HIV infection. *Lancet* **376**, 49-62, doi:10.1016/S0140-6736(10)60676-9 (2010).
- 26 CENSIDA. Guía de manejo antirretroviral de las personas con VIH. 195 (2018).
- 27 Bajpai, S. & Pazare, A. R. Oral manifestations of HIV. *Contemp Clin Dent* **1**, 1-5, doi:10.4103/0976-237X.62510 (2010).
- 28 Altamirano, G. A., León, M. G. F. D., Reyes-Montes, M. d. R., Solís, P. & Reyes, M. d. R. A. Inmunomoduladores y enfermedades bucodentales *Rev Hosp Jua Mex* **78**, 107-111 (2011).

- 29 Coogan, M. M., Greenspan, J. & Challacombe, S. J. Oral lesions in infection with human immunodeficiency virus. *Bull World Health Organ* **83**, 700-706, doi:/S0042-96862005000900016 (2005).
- 30 Huang, L. & Crothers, K. HIV-associated opportunistic pneumonias. *Respirology* **14**, 474-485, doi:10.1111/j.1440-1843.2009.01534.x (2009).
- 31 Gomes-Filho, I. S., Passos, J. S. & Seixas da Cruz, S. Respiratory disease and the role of oral bacteria. *J Oral Microbiol* **2**, doi:10.3402/jom.v2i0.5811 (2010).
- 32 Boletín epidemiológico, Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Secretaria de Salud **34** (2017).
- 33 Sanchez-Cabral, O. *et al.* Diagnostic discrepancy between bronchoalveolar lavage and transbronchial biopsy from bronchoscopies of HIV patients with pneumonia: toward an integral diagnosis. *HIV AIDS (Auckl)* **10**, 115-123, doi:10.2147/HIV.S161899 (2018).
- 34 Kistler, J. O., Arirachakaran, P., Poovorawan, Y., Dahlen, G. & Wade, W. G. The oral microbiome in human immunodeficiency virus (HIV)-positive individuals. *J Med Microbiol* **64**, 1094-1101, doi:10.1099/jmm.0.000128 (2015).
- 35 Mukherjee, P. K. *et al.* Dysbiosis in the oral bacterial and fungal microbiome of HIV-infected subjects is associated with clinical and immunologic variables of HIV infection. *PLoS One* **13**, e0200285, doi:10.1371/journal.pone.0200285 (2018).
- 36 Dang, A. T. *et al.* Evidence of an increased pathogenic footprint in the lingual microbiome of untreated HIV infected patients. *BMC Microbiol* **12**, 153, doi:10.1186/1471-2180-12-153 (2012).
- 37 Presti, R. M. *et al.* Alterations in the oral microbiome in HIV-infected participants after antiretroviral therapy administration are

- influenced by immune status. *AIDS* **32**, 1279-1287, doi:10.1097/QAD.0000000000001811 (2018).
- 38 Schmidt, B. L. *et al.* Changes in abundance of oral microbiota associated with oral cancer. *PLoS One* **9**, e98741, doi:10.1371/journal.pone.0098741 (2014).
- 39 Li, Y. *et al.* HIV infection and microbial diversity in saliva. *J Clin Microbiol* **52**, 1400-1411, doi:10.1128/JCM.02954-13 (2014).
- 40 Nittayananta, W., Amornthatree, K., Kemapunmanus, M., Talungchit, S. & Sriplung, H. Expression of oral cytokines in HIV-infected subjects with long-term use of antiretroviral therapy. *Oral Dis* **20**, e57-64, doi:10.1111/odi.12135 (2014).

Guías y Manuales consultados:

1. An introduction to Next Generation-Sequencing technologies, Illumina
2. Manual 16s Metagenomic Sequencing Library Preparation: Preparing 16S Ribosomal RNA gene amplicóns for the Illumina MiSeq System, Illumina
3. MiSeq reporter generate FastQ workflow, Illumina
4. An introduction to Next Generation Sequencing Technology, Illumina
5. PureLink™ Microbiome DNA Purification Kit (Saliva and Urine samples), User Guide, Invitrogen
6. Human Ultrasensitive Cytokine Magnetic 10-plex panel, Information Sheet, Invitrogen.

Anexo 1. Dictamen de aceptación de protocolo



Instituto Nacional de
Enfermedades Respiratorias
Ismael Cosío Villegas
1936-2016
¡Comprometidos con tu Salud!

Comité de Ética en Investigación

Ciudad de México a 18 de Abril de 2016
INER/CEI/104/16

Dr. Gustavo Reyes Terán
Investigador Principal

Asunto: DICTAMEN DEL COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN.
APROBACIÓN.

Título del Proyecto: CARACTERIZACIÓN DEL MICROBIOMA Y DE LAS POBLACIONES INMUNES CELULARES EN EL TRACTO RESPIRATORIO INFERIOR DE PACIENTES INFECTADOS POR EL VIH Y CON NEUMONÍA.

Código asignado por el Comité: **B08-16**

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, Abril 2016	APROBADO
Consentimiento Informado Personas con VIH	Versión 1, Abril 2016	APROBADO
Consentimiento Informado Personas sin VIH	Versión 1, Abril 2016	APROBADO
Hoja de Registro de datos	Versión 1, Enero 2016	APROBADO

Este protocolo tiene vigencia de abril 2016 a abril 2021.

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

Atentamente

Dra. Rocio Chapela Mendoza
Presidente del Comité

Calzada de Tlalpan No. 4502, Colonia Sección XVI, Deleg. Tlalpan, Ciudad de México, C.P. 14080
Tel. (55) 54 87 17 00 www.iner.salud.gob.mx

Anexo 2. Consentimiento informado



Caracterización del microbioma y de las poblaciones inmunes celulares en el tracto respiratorio inferior de pacientes infectados por el VIH y con neumonía.
Personas con VIH



HOJA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO Personas con VIH

Título del protocolo: CARACTERIZACIÓN DEL MICROBIOMA Y DE LAS POBLACIONES INMUNES CELULARES EN EL TRACTO RESPIRATORIO INFERIOR DE PACIENTES INFECTADOS POR EL VIH Y CON NEUMONÍA

Patrocinador: Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER)

Sitio de Investigación: Departamento de Investigación en Enfermedades Infecciosas (CIENI)

Investigador principal y responsable del proyecto:

Gustavo Reyes Terán, Jefe del Departamento de Investigación en Enfermedades Infecciosas.

Investigadores y médicos participantes:

Dra. Celia Boukadida, investigadora en Ciencias Médicas, CIENI, INER
Dra. Olivia Sánchez Cabral, neumóloga intervencionista adscrita a Broncoscopia, INER
Dra. Perla Mariana Del Río Estrada, investigadora en Ciencias Médicas, CIENI, INER
Dra. Sandra María Pinto Cardoso, investigadora en Ciencias Médicas, CIENI, INER
Dra. Dina Martínez Mendoza, médica adscrita a Clínica de Tuberculosis, INER
Dr. Santiago Ávila Ríos, investigador en Ciencias Médicas, CIENI, INER



Sitio de la Investigación: Departamento de Investigación en Enfermedades Infecciosas (CIENI) del INER

Dirección:

Calzada de Tlalpan #4502, Col. Sección XVI

CP 14080, México DF.

Tel. 5171-4697 ó 5171-4718

Correo electrónico: reyesteran@iner.gob.mx, reyesteran@cieni.org.mx

Estimado(a) paciente:

Esta es una invitación para que usted participe en una investigación que se realizará en un grupo de personas con neumonía y que viven con el VIH (virus de la inmunodeficiencia humana), el agente causal del SIDA (síndrome de inmunodeficiencia adquirida). Su participación es completamente voluntaria. Este estudio se realizará con el apoyo económico del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER), institución con reconocido prestigio en el desarrollo de proyectos de investigación, necesarios para el avance científico de nuestro país. Ninguna empresa farmacéutica ni otra compañía privada tiene o tendrá participación directa o indirecta en esta investigación.

En México existen instituciones reguladoras de la salud que requieren que usted esté completamente informado de la naturaleza, objetivos y riesgos de cada uno de los procedimientos que se harán para llevar a cabo este estudio. Si este documento contiene palabras desconocidas o frases que no comprenda bien, por favor tenga la libertad y toda confianza de preguntarle al médico, o al personal con quien discute este documento, el significado de las palabras o de la información que usted no comprenda o tenga dudas. Usted debe recibir una copia de este documento, llamado

Versión 1 / Personas con VIH / Abril 2016

Calzada de Tlalpan 4502, Colonia Sección XVI, Delegación Tlalpan, C.P. 14080 México, D.F. 54871700

Página 1 de 8



carta de consentimiento informado, para que lo lea y, si usted quiere, pueda discutirlo con su familia o amistades antes de participar en este estudio. Antes de que usted firme esta carta de consentimiento, le preguntaremos si ha leído y comprendido su contenido, especialmente los potenciales beneficios o molestias que puedan resultar de su participación en este estudio de investigación.

RESUMEN DEL ESTUDIO.

Objetivos e importancia

Este estudio tiene el objetivo principal de contribuir en el conocimiento de los mecanismos que favorecen el desarrollo de neumonía en personas con VIH. El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) infecta las células del sistema inmunitario y las destruye o altera su funcionamiento, produciendo un deterioro progresivo del sistema de defensas. Se habla de inmunodeficiencia cuando el sistema inmunitario ya no puede cumplir su función de lucha contra las infecciones y enfermedades. Las infecciones que acompañan a la inmunodeficiencia grave se denominan «oportunistas» porque los agentes patógenos aprovechan la debilidad del sistema inmunitario. En particular, las personas que viven con VIH tienen un mayor riesgo de adquirir infecciones respiratorias causadas por bacterias, hongos o virus (neumonía).

Los resultados de algunos estudios realizados por otros grupos, sugieren que la infección por el VIH podría causar cambios en la cantidad y tipo de microbios y ocasionar defectos del sistema inmunitario en el pulmón. Estas alteraciones son importantes porque pueden favorecer el desarrollo de infecciones respiratorias graves.

Para saber cuáles son los mecanismos que favorecen el desarrollo de neumonías en personas con VIH, compararemos el sistema inmunitario y los microbios (bacterias, virus y hongos) en los pulmones de pacientes con neumonía y con o sin VIH. ¿Por qué es importante conocer estos mecanismos? Es importante por varias razones pero una de las principales es porque podría permitir mejorar el diagnóstico y el tratamiento de neumonías en las personas con VIH.

Si usted participa en nuestras investigaciones, estudiaremos los microbios y las células del sistema inmunitario presentes en **los remanentes de lavado bronquioloalveolar**, el lavado bucal y la sangre que nos done. Con ello, podríamos saber cómo el VIH altera el sistema inmunitario en el pulmón y si el VIH provoca un aumento en la abundancia de algunos microbios.

Si logramos responder esto, que es nuestro propósito principal, y por eso lo estamos invitando a participar, podríamos contribuir para el desarrollo de nuevas estrategias alternativas de diagnóstico y/o tratamiento para reducir el riesgo de desarrollo de neumonías graves en personas con VIH. En este contexto, su participación tendría un enorme valor para lograr esos objetivos. Sin embargo, es muy importante también que usted sepa que nuestras suposiciones, que comparten otros grupos de investigación en el mundo, pueden no ser correctas. En el caso que este estudio demuestre que no son correctas, de todas formas el conocimiento generado con su participación será de mucha ayuda porque dirigirá las investigaciones hacia otras hipótesis para conocer los mecanismos que favorecen el desarrollo de infecciones respiratorias en pacientes con VIH.





Procedimientos, riesgos y molestias

- Toma de muestra de sangre

La extracción de sangre se utiliza frecuentemente para diversos análisis de laboratorio e implica la punción de una vena con una aguja, generalmente del antebrazo. La seguridad de esta técnica se ha comprobado ampliamente y requiere de una limpieza con antisépticos antes y después de cada extracción de sangre y el empleo de material estéril. El procedimiento para la obtención de una muestra de su sangre será realizado por personal calificado. La extracción de sangre produce dolor y molestias pasajeras en el sitio de punción con la aguja, es probable que sienta comezón y ardor. En ocasiones, la formación de moretones (formados por pequeños derrames de sangre) que no ocasionan ningún problema y generalmente desaparecen en una o dos semanas. En casos muy raros, el sitio de obtención de muestra se infecta, en cuyo caso la infección sería manejada por el personal médico del CIENI.

Se obtendrán 60 mililitros o menos de sangre de una vena del brazo en cada una de las sesiones de toma de muestra. Aunque esta cantidad puede parecerle excesiva, sobre todo por el número de tubos que se utilizan, debe usted saber que equivale a unas 6 cucharadas soperas y no tiene efectos sobre su estado de salud. Esta toma de muestra formará parte de las visitas de muestreo y seguimiento clínico.

- Lavado bucal

El lavado bucal consiste en un enjuague vigoroso con 15 mL de solución salina durante un minuto. Permite obtener una muestra del tracto respiratorio superior (boca). Este procedimiento no es invasivo y los riesgos asociados a este procedimiento son mínimos.

- Broncoscopia

Usted ha sido invitado a participar en este estudio porque tiene neumonía y necesita una broncoscopia con lavado bronquioloalveolar para el diagnóstico de neumonía. En este protocolo de investigación, utilizaremos los remanentes de lavado bronquioloalveolar. Su participación en este protocolo de investigación no modificará ni interferirá con las decisiones y los procedimientos clínicos. El lavado bronquioloalveolar se realizará según los procedimientos validados por el Servicio de Broncoscopia y Endoscopia del INER, independientemente de su participación en este estudio.

Así mismo, se le informa que, para algunos estudios de este protocolo, algunas muestras de lavado bronquioloalveolar, lavado bucal y sangre o sus componentes como plasma y células se podrán mandar a varios laboratorios de Estados Unidos, con los que tenemos colaboraciones de investigación, respetando siempre la confidencialidad de los datos. Los investigadores de esos laboratorios, todos de gran prestigio internacional, son: Dr. Michael Betts (Universidad de Pensilvania, Filadelfia), Dr. Jake Estes (Instituto Nacional de Alergia y Enfermedades Infecciosas, Bethesda), Dr. Costas Petrovas, (Instituto Nacional de Alergia y Enfermedades Infecciosas, Bethesda) y Dr. Doug Nixon (Universidad George Washington, Washington, DC).

Beneficios

Usted no obtendrá ningún beneficio económico del INER por su participación. Su participación es totalmente voluntaria. El día que usted asista a la broncoscopia se le podrán hacer **sin costo** los siguientes estudios de laboratorio que son de rutina en un *Check Up* (reconocimiento médico que con frecuencia hacen las personas para saber su estado de salud): biometría hemática completa, química sanguínea, pruebas de función hepática, electrolitos séricos; además, nosotros le haremos un conteo de linfocitos T CD4+ (células fundamentales para la



defensa del cuerpo humano contra infecciones), un estudio de la carga viral de VIH (cantidad de virus presente en la sangre) y pruebas de diagnóstico de los virus de Epstein Barr, Herpesvirus humano 8, Citomegalovirus y de bacterias como *Mycobacterium tuberculosis*. En las muestras que nos done, le haríamos tinciones y estudios microbiológicos para la determinación de microorganismos presentes, como bacterias, hongos y virus. Usted recibirá y se le informará con detalle los resultados *clínicos* que se obtengan tanto de su sangre como de sus muestras de broncoscopia (lavado bronquioloalveolar y biopsias).

Usted estará participando en un estudio que permitirá obtener información importante que podría abrir, en un futuro, nuevas vías de investigación de estrategias terapéuticas para permitir un mejor y mayor control de las infecciones oportunistas asociadas a la infección por VIH, particularmente las pulmonares.

Es importante que usted tenga muy claro que la decisión sobre el tratamiento antirretroviral es totalmente independiente de su participación en este estudio y será tomada exclusivamente por su médico en conjunto con usted. Su participación en este estudio no influye en la eficacia del tratamiento antirretroviral.

Costos

Todos los gastos de atención clínica y de diagnóstico relacionados con este estudio serán cubiertos por el INER. Estos estudios incluyen los procedimientos clínicos y las pruebas de diagnóstico de neumonía, VIH y co-infecciones. Es importante establecer que el INER no se hará responsable de los costos que no estén relacionados con esta investigación.

Participación voluntaria y retiro

Su participación en este estudio es totalmente voluntaria, esto implica que usted puede decidir no participar. Si usted decide no participar en el estudio, su decisión será absolutamente respetada y tenga la certeza que no habrá sanciones o represalias por ello. Si decide participar puede retirarse de este estudio (interrumpir su participación) en cualquier momento. Cualquiera de estas decisiones será respetada y los beneficios (atención clínica, de laboratorio, y otros estudios) que usted obtiene como paciente del INER no cambiarán. Su tratamiento y sus relaciones con los médicos y el personal que participa en esta investigación no se afectarán en ningún momento.

Su participación en este estudio puede darse por terminada por el médico o por el INER por cualquiera de las siguientes razones:

1. Requiere medicamentos adicionales que puedan interferir en el estudio
2. No toma el tratamiento como se le indicó o recibe alguno que no está permitido.
3. No desea cooperar con los procedimientos del estudio
4. Por recomendación de su médico del estudio

Por su propia seguridad, mientras forme parte de esta investigación, debe seguir al pie de la letra las indicaciones que reciba por parte de los médicos que participan en este estudio. Además, debe cumplir formalmente con las citas para la revisión clínica y hacerse estudios de laboratorio que le indiquen.





Confidencialidad

La información de este estudio puede ser sometida a la Administración de Alimentos y Medicamentos de los EUA (FDA o *Food and Drugs Administration*). Los registros médicos donde usted puede ser identificado y el consentimiento informado, autorizado por usted con su firma, podrían ser requeridos y copiados para una inspección de los datos o resultados de los estudios por las siguientes instituciones nacionales o extranjeras:

- Comité de Ética en Investigación del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (México).
- La Secretaría de Salud (México)
- Agencias del departamento de Salud y Servicios Humanos (DHHS, EUA).
- Agencias gubernamentales de otros países.

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

Compensación por daño

Si hubiese algún daño adicional causado por la broncoscopia, el INER le proporcionará el tratamiento médico que requiera. El INER no le proporcionará ninguna otra compensación.

Dudas y comentarios

El Dr. Gustavo Reyes Terán tendrá la responsabilidad ética de velar por su bienestar en el contexto de esta investigación. Si usted tiene dudas o comentarios sobre su participación o sobre el estudio mismo, puede consultar en todo momento a los responsables de este proyecto: Dr. Gustavo Reyes Terán, infectólogo investigador principal y jefe del CIENI (celular: +55 1510 3322); Dra. Olivia Sánchez Cabral, neumóloga intervencionista; en la dirección y teléfonos indicados en la primera página de este documento. Del mismo modo, usted puede optar por dirigirse al Dra. Rocío Chapela, presidenta del Comité de Ética en Investigación del INER, órgano encargado de vigilar la investigación del Instituto, que se encuentra en la Unidad de Investigación INER, Calzada de Tlalpan 4502, Colonia Sección XVI (Tlalpan), 14080 México, D.F. o al teléfono 5171 4697.





CONSENTIMIENTO

Tengo el documento de forma de consentimiento informado. Me han explicado los métodos y procedimientos que me realizarán en este estudio. He hablado directamente con _____, quien ha respondido a mi satisfacción todas mis preguntas con respecto a este estudio. Todas mis dudas han sido aclaradas. Acepto donar 60 mL de mi sangre, que me realicen un lavado bucal y **que utilicen los remanentes** lavado bronquioloalveolar (LBA) para que se estudien las células y los microbios en ellos. Sé también que mis muestras de LBA, lavado bucal y sangre o sus componentes podrían ser enviados a varios grupos en los EEUU, que colaboran con el CIENI del INER. Y, finalmente, también tengo claro que mis muestras de LBA, lavado bucal y sangre o sus componentes serán guardados durante un tiempo indefinido y que podrán ser estudiadas nuevamente en el futuro en el contexto de otros proyectos de investigación sobre la infección por VIH que se conduzcan en el CIENI.

Doy mi consentimiento de participación en esta investigación y sé bien que puedo cancelarla o retirarme en cualquier momento en que yo lo quiera. Sé que esto no tendrá repercusiones en mi atención como paciente de este instituto.

Autorizo la revelación de mis registros médicos a las instituciones nacionales o internacionales (FDA, DHHS de los Estados Unidos, y el Comité de Ética en Investigación) en el caso de que sean requeridos.

He comprendido que no seré identificado en el caso de que los resultados que se obtengan en el estudio de mi sangre, lavado bucal y lavado bronquioloalveolar se publiquen en reuniones o revistas científicas nacionales o internacionales.

Al firmar este consentimiento, no renuncio a alguno de mis derechos legales a los que tendría como paciente en un estudio de investigación.

LA PARTICIPACIÓN EN INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA ES VOLUNTARIA

Me he quedado con una copia de este documento y del de la Declaración de derechos de las personas en experimentación.

Nombre completo (persona que participa en el estudio)

Dirección

Firma

Fecha

Testigo 1 (nombre completo)

Dirección

Parentesco con el paciente





Caracterización del microbioma y de las poblaciones inmunes celulares en el tracto respiratorio inferior de pacientes infectados por el VIH y con neumonía.
Personas con VIH



Firma

Fecha

Testigo 2 (nombre completo)

Dirección

Parentesco con el paciente

Firma

Fecha

Médico/investigador que realizó la discusión de este documento

Dirección

Firma

Fecha

Dr. Gustavo Reyes Terán (Investigador principal)





DECLARACION DE LOS DERECHOS DE LAS PERSONAS EN EXPERIMENTACIÓN

Los derechos que enseguida se describen son los que todas las personas a quienes se les solicitan participar en un estudio de investigación. Por tanto, como un individuo en experimentación, yo tengo los siguientes derechos:

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

Si tengo otras dudas o preguntas, puedo solicitar al Dr. Gustavo Reyes Terán (Tel. 5666 7985, extensiones 151, 163; Celular: +55 1510 3322), investigador principal y jefe del Departamento de Investigación en Enfermedades Infecciosas (CIENI) del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) o a los co-investigadores de este estudio, para que me las resuelvan. Además, puedo establecer comunicación con el Comité de Ética en Investigación INER, que se preocupa por la protección de los voluntarios de los proyectos, con su presidenta Dra. Rocío Chapela Mendoza de lunes a viernes, de 8:00 AM a 4:00 PM, a los teléfonos: 52 55 5487 1700, extensiones 5110 y 5254. También puedo escribir al correo electrónico: czyb@iner.gob.mx.

Recibí declaración de derechos de las personas en investigación

Fecha: _____



Anexo 3. Preparación de reactivos

Nota: Los reactivos empleados y proporcionados en los kits de citocinas y extracción de DNA se prepararon como lo indica en su respectivo instructivo con las siguientes modificaciones:

- **Wash buffer:**

Para 500 mL de Wash buffer: adicionar 25 mL de la solución de lavado concentrada a 475 ml de agua desionizada.

- **Solución 50% assay diluent:50% solución salina para lavados orales:**

En un tubo Falcon de 50 mL mezclar 25 mL de assay diluent y 25 mL de la solución salina empleada para los lavados orales.

- **Perlas magnéticas:**

Mezclar las perlas con vórtex por 30 segundos y sonicar por 30 segundos. Agregar 250 μ L de perlas a 2500 μ L de wash buffer.

Mezclar sin vórtex por 30 segundos y sonicar por 30 segundos.

Preparación del gel de agarosa al 2%

Pesar 4 g de agarosa y agregarlos a 200 mL de Tris 10x, calentar hasta que la agarosa se haya disuelto completamente, agregar 10 μ L de GelRed. Vaciar el gel y esperar a que solidifique. Correr el gel a 100 volts durante 30 min. Las dimensiones de la cámara de electroforesis son de: longitud 19 cm, ancho 20 cm, altura 10 cm.

Anexo 4. Resumen de reactivos, materiales, kits y equipos empleados

Human Ultrasensitive Cytokine Magnetic Invitrogen
10-Plex Panel

PureLink™ Microbiome DNA Purification Invitrogen
DNA

Nextera XT (Primers N7XX)	Illumina
---------------------------	----------

Nextera XT (Primers S5XX)	Illumina
---------------------------	----------

Qubit Assay kit

Equipos:

NanodropOne™ spctrophotometer	UV-VIS	ThermoFisher
----------------------------------	--------	--------------

Termociclaror	ThermoFisher
---------------	--------------

Qubit® 3.0 fluorometer	ThermoFisher
------------------------	--------------

Luminex 100/200	Luminex
-----------------	---------

Secuenciador MiSeq	Illumina
--------------------	----------

Centrifuga

Centrifuga de placas

Campana de bioseguridad

Reactivos

Agua desionzada

Agua Mili-Q

Etanol 70%

Solución Salina NaCl 0.9%

Agarosa

Solución Tris 10X

Marcador de DNA GelRed

Buffer de carga

Marcador de peso molecular 100 pb

Buffer HI-Fi

MgSO₄

dNTP

DMSO

Primers de PCR

Taq polimerasa

Perlas Ampure XP

Etanol 80%

NaOH 0.2N

Tween 20

Materiales

Viales de 1.5 mL

Tubos LoBind 1.5 mL

Tubos Falcon 50 mL

Placas para PCR de 96 pozos

Cartucho MiSeq

Illumina

Flow Cel MiSeq

Illumina