



Universidad Popular Autónoma del Estado de Puebla  
Posgrados en Ciencias de la Salud  
Maestría en Ciencias de la Salud

**“Análisis comparativo de virus y bacterias intestinales en niños con  
leucemia linfoblástica aguda y niños sanos”**

Tesis que para obtener el grado de Maestra en Ciencias de la Salud

PRESENTA

**Mariana Salmorán Pacheco**

Química Farmacobióloga

mariana.salmoran@upaep.edu.mx

Directora de tesis (Metodológica y experta):

**Ma. del Rocío Baños Lara**

Doctora en Ciencias

Docente-investigadora: posgrados UPAEP/CIO-UNE

**Sede del estudio:**

Centro de Investigación Oncológica (CIO)

Una Nueva Esperanza-UPAEP



UPAEP

Puebla, Pue; México

Octubre 2018



**UPAEP – Secretaría General**

Dirección General de Apoyos Académicos

Dirección del Centro de Recursos para el Aprendizaje y la Investigación.

Biblioteca Central - **Karol Wojtyła**

**Tesis Digitales Restricciones de uso:**

**DERECHOS RESERVADOS ©**

**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

El uso de textos, imágenes, gráficas, 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 de donde la obtuvo mencionando el autor o autores involucrados en el documento.

Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## ÍNDICE GENERAL

1. AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIAS.....	1
2. ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS Y SÍMBOLOS.....	3
3. RESUMEN.....	5
4. ABSTRACT.....	6
5. ANTECEDENTES.....	7
5.1 ANTECEDENTES GENERALES .....	7
5.1.1 Leucemias agudas.....	7
5.1.2 Leucemia linfoblástica aguda (LLA) .....	7
5.1.2.1 Incidencia.....	8
5.1.2.2 Clasificación.....	8
5.1.2.3 Genética molecular.....	10
5.1.2.4 Cuadro clínico.....	11
5.1.2.5 Diagnóstico .....	11
5.1.2.6 Tratamiento.....	12
5.1.3 Microbiota intestinal.....	13
5.1.4 Viroma.....	14
5.1.4.1 Bacteriófagos.....	16
5.2 ANTECEDENTES ESPECÍFICOS.....	17
5.2.1 Microbiota intestinal y su relación con patologías.....	18
5.2.2 Microbiota intestinal y cáncer.....	19
5.2.3 Microbiota intestinal y leucemia linfoblástica aguda (LLA) .....	19
5.2.4 Estudios del viroma intestinal.....	21
5.2.4.1 Viroma intestinal en los primeros años de vida.....	22
5.2.4.2 Viroma intestinal y los cambios relacionados con el tipo de dieta.....	22
5.2.4.3 Diferencias en el viroma intestinal entre cohabitantes.....	23
5.2.4.4 Cambios en el viroma intestinal durante la terapia con antibióticos.....	23
5.2.5 Viroma y su relación con patologías.....	24
6. JUSTIFICACIÓN.....	27
7. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	28
8. HIPÓTESIS.....	29
9. OBJETIVOS.....	29
9.1 Objetivo general.....	29
9.2 Objetivos particulares.....	29
10. MATERIAL Y MÉTODOS.....	30
10.1 TIPO Y DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN.....	30
10.1.1 Tipo de estudio.....	30
10.1.2 Características del estudio.....	30
10.2 DEFINICIÓN DEL UNIVERSO DE TRABAJO.....	30
10.2.1 Población fuente.....	30
10.2.2 Población elegible.....	30
10.3 DEFINICIÓN DEL GRUPO DE OBSERVACIÓN Y DEL GRUPO CONTROL.....	30
10.3.1 Criterios de inclusión.....	30
10.3.2 Criterios de exclusión.....	31
10.3.3 Criterios de eliminación.....	31

10.4 ESTRATEGIA DE MUESTREO.....	31
10.4.1 Cálculo del tamaño de la muestra.....	31
10.4.2 Tipo de muestreo.....	31
10.5 DEFINICIÓN DE VARIABLES Y ESCALAS DE MEDICIÓN.....	32
10.5.1 Definición conceptual.....	32
10.5.2 Cuadro de operacionalización de variables.....	33
10.6 MÉTODOS ANALÍTICOS.....	35
10.6.1 Recolección de las muestras y procesamiento de las heces fecales.....	35
10.6.1.1 Extracción de ADN total de las heces.....	36
10.6.1.2 Extracción de ARN total de las heces.....	37
10.6.1.3 Extracción de ADN y ARN viral de las heces.....	38
10.6.2 Cuantificación y determinación de la calidad de las extracciones.....	40
10.6.3 Identificación de bacterias y virus por PCR en tiempo real.....	40
10.6.3.1 Condiciones de PCR para la identificación de bacterias.....	43
10.6.3.1.1 <i>Bacteroides</i> spp.....	43
10.6.3.1.2 <i>Lachnospiraceae</i> spp.....	44
10.6.3.1.3 <i>Firmicutes</i> spp.....	44
10.6.3.2 Condiciones de PCR para la identificación de virus.....	45
10.6.3.2.1 Torquetenovirus (TTV).....	45
10.6.3.2.2 Fago de <i>Bacteroides</i> (B40-8).....	45
10.6.3.2.3 <i>Enterovirus</i> y <i>Parechovirus</i> .....	46
10.6.3.3 Condiciones de PCR para la identificación del control interno (GAPDH).....	47
10.7 RECOLECCIÓN DE LA INFORMACIÓN.....	47
10.7.1 Fuentes de información.....	47
10.8 TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS.....	47
11. RESULTADOS.....	48
11.1 REVISIÓN DE LA LITERATURA: MIEMBROS DEL VIROMA INTESTINAL.....	48
11.2 CUANTIFICACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS.....	53
11.3 VALIDACIÓN DE LA ESPECIFICIDAD DE LOS PRIMERS.....	55
11.3.1 <i>Bacteroides</i> spp.....	55
11.3.2 <i>Lachnospiraceae</i> spp.....	56
11.3.3 <i>Firmicutes</i> spp.....	57
11.3.4 Torquetenovirus (TTV).....	57
11.3.5 Fago de <i>Bacteroides</i> B40-8.....	58
11.3.6 <i>Enterovirus</i> y <i>Parechovirus</i> .....	58
11.3.7 Control interno (GAPDH).....	60
11.4 ANÁLISIS COMPARATIVO DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE BACTERIAS Y VIRUS DE LA MICROBIOTA INTESTINAL EN CONTROLES SANOS Y PACIENTES CON LLA.....	61
11.5 CARACTERÍSTICAS DE LA MUESTRA.....	65
11.6 ANÁLISIS COMPARATIVO DE VARIABLES CUALITATIVAS DE CONTROLES SANOS Y PACIENTES CON LLA.....	66
11.6.1 Género.....	67
11.6.2 Ingesta de medicamentos.....	67
11.6.3 Antecedente de cáncer en la familia.....	68
11.6.4 Ingesta de probióticos.....	69
11.6.5 Enfermedades virales.....	70
11.6.6 Exposición al humo del tabaco.....	71
11.6.7 Alergia y/o intolerancia a alimentos y/o medicamentos.....	72
11.6.8 Enfermedades diarreicas en el último mes.....	73
11.6.9 Estreñimiento frecuente.....	74
11.6.10 Asistencia a guarderías o estancias infantiles durante un periodo prolongado.....	75

11.7 ANÁLISIS COMPARATIVO DE VARIABLES CUANTITATIVAS DE CONTROLES SANOS Y PACIENTES CON LLA.....	75
11.7.1 Edad (años), talla (m) y peso (kg) .....	76
11.7.2 Hábitos de alimentación.....	76
11.7.2.1 Número de comidas y litros de agua al día.....	76
11.7.2.2 Grupos de alimentos consumidos durante una semana (7/7) .....	77
11.7.3 Número de evacuaciones al día.....	78
11.7.4 Tiempo desde el diagnóstico y tiempo con tratamiento de quimioterapia.....	79
11.8 CORRELACIÓN ESTADÍSTICA DE VARIABLES CUALITATIVAS Y CUANTITATIVAS.....	80
11.8.1 Gráficas de dispersión de las variables cuantitativas con correlación estadísticamente significativa que se cumple para los controles sanos.....	81
11.8.2 Gráficas de dispersión de las variables cuantitativas con correlación estadísticamente significativa que se cumple para los pacientes con tratamiento.....	82
11.9 CORRELACIÓN ESTADÍSTICA DE LAS VARIABLES CUANTITATIVAS EXPERIMENTALES.....	85
11.9.1 Gráficas de dispersión de las variables cuantitativas experimentales con correlación estadísticamente significativa que se cumple para los controles sanos .....	86
11.9.2 Gráficas de dispersión de las variables cuantitativas experimentales con correlación estadísticamente significativa que se cumple para los pacientes con tratamiento.....	87
11.9.3 Gráficas de dispersión de las variables cuantitativas experimentales con correlación estadísticamente significativa que se cumple para ambos grupos de estudio .....	87
12. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	88
13. CONCLUSIONES.....	97
14. PERSPECTIVAS.....	99
15. LINEAMIENTOS BIOÉTICOS.....	100
15.1 Procedimiento y personas responsables de comunicar a los participantes los resultados del estudio.....	100
15.2 Planes para la divulgación de los resultados.....	100
15.3 Carta de consentimiento informado.....	100
15.4 Carta de asentimiento informado para la participación en el estudio.....	105
15.5 Carta de revocación de participación en el estudio.....	106
15.6 Carta de compromiso del investigador.....	107
16. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	108
17. ANEXOS.....	113
17.1 Aprobación del comité de bioética.....	113
17.2 Instrumento de recolección de información e instructivos de aplicación.....	114
17.3 Herramientas e instructivos de aplicación (instrucciones para recolectar las heces fecales).....	116
17.3.1 Diagrama de flujo para recolectar las heces fecales.....	117
17.4 Preparación de soluciones y reactivos.....	118
17.4.1 Agarosa al 2% (geles de electroforesis).....	118
17.4.2 Agua DEPC (agua libre de nucleasas).....	118
17.4.3 Buffer TBE de corrida (10x) .....	118
17.4.4 Colorante Orange-D (electroforesis en geles de agarosa) .....	118
17.4.5 Solución de etanol al 70%.....	118
17.5 Hoja de cesión de derechos de la tesis a la UPAEP.....	119
17.6 Hoja de autorización de la tesis firmada por todos los directores de la tesis.....	120

## ÍNDICE DE TABLAS, CUADROS Y FIGURAS

### TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Familias de virus reportados con mayor frecuencia en el viroma intestinal (Columpsi <i>et al.</i> , 2016).....	17
<b>Tabla 2.</b> Criterios de inclusión del estudio.....	31
<b>Tabla 3.</b> Criterios de exclusión del estudio.....	31
<b>Tabla 4.</b> Cuadro de variables (definición conceptual y operacional, escala de medición y unidades de medición).....	33
<b>Tabla 5.</b> Secuencias (5'—3') de primers y sondas empleados para detectar las bacterias y virus seleccionados en este estudio.....	43
<b>Tabla 6.</b> Condiciones de reacción para la PCR en tiempo real que identifica al género <i>Bacteroides</i> spp....	44
<b>Tabla 7.</b> Condiciones de reacción para la PCR en tiempo real que identifica a la familia <i>Lachnospiraceae</i> spp.....	44
<b>Tabla 8.</b> Condiciones de reacción para la PCR en tiempo real que identifica al filo <i>Firmicutes</i> spp.....	45
<b>Tabla 9.</b> Condiciones de reacción para la PCR en tiempo real que identifica Torquetenovirus (TTV).....	45
<b>Tabla 10.</b> Condiciones de reacción para la PCR en tiempo real que identifica al fago de <i>Bacteroides</i> B40-8.....	45
<b>Tabla 11.</b> Condiciones de reacción para la PCR en tiempo real que identifica a los virus: <i>Enterovirus</i> y <i>Parechovirus</i> .....	46
<b>Tabla 12.</b> Condiciones de reacción para la PCR en tiempo real que identifica el gen de la enzima GAPDH.....	47
<b>Tabla 13.</b> Revisión de la literatura de los virus reportados como miembros constantes y abundantes del viroma intestinal.....	49
<b>Tabla 14.</b> Valores mínimos y máximos de las concentraciones de ADN y ARN total y viral registradas para cada grupo de estudio.....	53
<b>Tabla 15.</b> Estadísticos de grupo y prueba T de Student de las variables: concentración de ADN y ARN total y viral (ng/ $\mu$ L y $\mu$ g/gr de heces).....	54
<b>Tabla 16.</b> Valores mínimos y máximos del Ct, $\Delta$ Ct y $2^{\Delta\Delta Ct}$ de: <i>Bacteroides</i> spp, <i>Lachnospiraceae</i> spp, <i>Firmicutes</i> spp y Torquetenovirus.....	62
<b>Tabla 17.</b> Estadísticos de grupo y prueba T de Student de los valores Ct, $\Delta$ Ct y $2^{\Delta\Delta Ct}$ de: <i>Bacteroides</i> spp, <i>Lachnospiraceae</i> spp, <i>Firmicutes</i> spp y Torquetenovirus.....	62
<b>Tabla 18.</b> Características demográficas de la muestra (controles sanos y pacientes con tratamiento).....	66
<b>Tabla 19.</b> Análisis de la variable cualitativa: <i>género</i> .....	67
<b>Tabla 20.</b> Análisis de la variable cualitativa: <i>toma algún medicamento</i> .....	67
<b>Tabla 21.</b> Lista de medicamentos, dosis y diagnóstico que los controles sanos estaban recibiendo en el momento de la toma de muestra.....	68
<b>Tabla 22.</b> Análisis de la variable cualitativa: <i>antecedente de cáncer</i> .....	68
<b>Tabla 23.</b> Análisis de la variable cualitativa: <i>ingesta de probióticos</i> .....	69
<b>Tabla 24.</b> Tipo de probióticos reportados que se consumen con frecuencia entre los participantes del estudio.....	70
<b>Tabla 25.</b> Frecuencia de consumo de probióticos durante una semana.....	70
<b>Tabla 26.</b> Análisis de la variable cualitativa: <i>enfermedades virales</i> .....	70
<b>Tabla 27.</b> Tipos de enfermedades virales reportadas por los participantes del estudio.....	71
<b>Tabla 28.</b> Análisis de la variable cualitativa: <i>exposición al humo de tabaco</i> .....	72
<b>Tabla 29.</b> Análisis de la variable cualitativa: <i>alergia/intolerancia a alimentos-medicamentos</i> .....	72
<b>Tabla 30.</b> Recuento de alimentos y medicamentos a los que se presentan alergia o intolerancia.....	73
<b>Tabla 31.</b> Análisis de la variable cualitativa: <i>diarrea en el último mes</i> .....	73
<b>Tabla 32.</b> Análisis de la variable cualitativa: <i>estreñimiento con frecuencia</i> .....	74
<b>Tabla 33.</b> Análisis de la variable cualitativa: <i>asistencia a guarderías o estancias infantiles durante un periodo prolongado</i> .....	75
<b>Tabla 34.</b> Estadísticos de grupo y prueba T de Student de las variables cuantitativas <i>edad, talla y peso</i> ...	76
<b>Tabla 35.</b> Estadísticos de grupo y prueba T de Student de la variable cuantitativa <i>número de comidas y litros de agua al día</i> .....	77

<b>Tabla 36.</b> Estadísticos de grupo y prueba T de Student de las variables cuantitativas <i>hábitos de alimentación por grupos de alimentos</i> .....	78
<b>Tabla 37.</b> Estadísticos de grupo y prueba T de Student de la variable cuantitativa <i>número de evacuaciones al día</i> .....	79
<b>Tabla 38.</b> Estadísticos de grupo de las variables cuantitativas: <i>tiempo desde el diagnóstico y tiempo con tratamiento</i> .....	79
<b>Tabla 39.</b> Diferencias entre el tiempo del diagnóstico y el tiempo en que los pacientes iniciaron el tratamiento.....	79
<b>Tabla 40.</b> Correlaciones estadísticas de las variables cualitativas: valor $p$ ( $p < 0.05$ ) y coeficiente Rho de Spearman ( $r$ ) de cada par de variables.....	80
<b>Tabla 41.</b> Correlaciones estadísticas de las variables cuantitativas: valor $p$ ( $p < 0.05$ ) y coeficiente de correlación de Pearson ( $r$ ) de cada par de variables.....	80
<b>Tabla 42.</b> Correlaciones estadísticas de las variables cuantitativas experimentales, valor $p$ ( $p < 0.05$ ) y coeficiente de correlación de Pearson de cada par de variables.....	85

## FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Morfología diferencial de los tres tipos de leucemia linfoblástica aguda. (Ruíz Arguelles, 2003)..	9
<b>Figura 2.</b> Géneros bacterianos más abundantes, encontrados de manera diferencial en pacientes pediátricos con LLA y controles sanos (Rajagopala <i>et al.</i> , 2016).....	21
<b>Figura 3.</b> Componentes del kit de extracción de ADN total QIAamp DNA Stool Mini Kit de Qiagen®.....	37
<b>Figura 4.</b> Componentes del kit de extracción de ARN total: RNeasy Mini Kit de Qiagen®.....	38
<b>Figura 5. a)</b> Componentes del kit de extracción de ADN y ARN viral: Allprep PowerViral DNA/RNA de Qiagen® <b>b)</b> Adaptador para vórtex (24 tubos).....	39
<b>Figura 6. a)</b> Equipo espectrofotómetro QIAxpert de Qiagen® para cuantificar ácidos nucleicos <b>b)</b> Laminilla de 16 pozos para efectuar las cuantificaciones en el equipo.....	40
<b>Figura 7.</b> Termociclador Rotor Gene Q® de Qiagen.....	42
<b>Figura 8.</b> Electroforesis en agarosa al 2% de los productos de PCR en tiempo real para <i>Bacteroides</i> spp.....	56
<b>Figura 9.</b> Electroforesis en agarosa al 2% de los productos de PCR en tiempo real para <i>Lachnospiraceae</i> spp.....	56
<b>Figura 10.</b> Electroforesis en agarosa al 2% de los productos de PCR en tiempo real para <i>Firmicutes</i> spp.....	57
<b>Figura 11.</b> Electroforesis en agarosa al 2% de los productos de PCR en tiempo real para Torquetenovirus (TTV).....	58
<b>Figura 12.</b> Electroforesis en agarosa al 2% de los productos de PCR en tiempo real para identificar <i>Enterovirus</i> y <i>Parechovirus</i> .....	59
<b>Figura 13.</b> Electroforesis en agarosa al 2% de los productos de PCR en tiempo real para GAPDH.....	61

## GRÁFICAS

<b>Gráfica 1.</b> Gráficas de barras que muestran la media, desviación estándar y los valores individuales ( $n=30$ ) de las concentraciones de ADN total y ARN total.....	54
<b>Gráfica 2.</b> Gráficas de barras que muestran la media, desviación estándar y los valores individuales ( $n=30$ ) de las concentraciones de ADN y ARN viral.....	55
<b>Gráfica 3.</b> Gráficas de barras que muestran la media, desviación estándar y los valores individuales del Ct.....	63
<b>Gráfica 4.</b> Gráficas de barras que muestran la media y desviación estándar del valor $\Delta Ct$ .....	64
<b>Gráfica 5.</b> Gráficas de barras que muestran la media y desviación estándar del valor $2^{\Delta \Delta Ct}$ .....	65
<b>Gráfica 6.</b> Gráfica de barras que muestra el número de hombres y mujeres que formaron parte del estudio.....	67
<b>Gráfica 7.</b> Gráfica de barras que muestra el número de participantes que respondieron sí tener o no un antecedente de cáncer en su familia.....	68

<b>Gráfica 8.</b> Gráfica de barras que muestra el número de participantes que respondieron tomar regularmente algún probiótico y los que no lo hacen.....	69
<b>Gráfica 9.</b> Gráfica de barras que muestra el número de participantes que respondieron haber padecido alguna enfermedad viral o no.....	71
<b>Gráfica 10.</b> Gráfica de barras que muestra el número de participantes que respondieron tener o no haber tenido exposición frecuente al humo del tabaco.....	72
<b>Gráfica 11.</b> Gráfica de barras que muestra el número de participantes que respondieron si tener alguna alergia y/o intolerancia a algún medicamento y/o alimento y los que no presentan ninguna.....	73
<b>Gráfica 12.</b> Gráfica de barras que muestra el número de participantes que respondieron sí haber padecido diarrea antes o durante la toma de muestra y los que no presentaron diarrea.....	74
<b>Gráfica 13.</b> Gráfica de barras que muestra el número de participantes que respondieron tener estreñimiento frecuente y los que no presentan el síntoma.....	74
<b>Gráfica 14.</b> Gráfica de barras que muestra el número de participantes que respondieron haber asistido a una guardería o estancia infantil durante un periodo prolongado y los que no.....	75
<b>Gráfica 15.</b> Gráficas de barras que muestran la media, la desviación estándar y los valores individuales de: <b>a)</b> número de comidas al día que realizan los participantes del estudio y <b>b)</b> litros de agua que toman al día.....	77
<b>Gráfica 16.</b> Gráfica de barras que muestra la media del número de veces que se consumen (durante una semana: 7/7) los diferentes grupos de alimentos registrados.....	78
<b>Gráfica 17.</b> Gráfica de barras que muestra la media y la desviación estándar del número evacuaciones al día.....	79
<b>Gráfica 18.</b> Gráficas de dispersión de las variables: <b>a)</b> ADN total ( $\mu\text{g}/\text{gr}$ de heces) y consumo de verdura (7/7); <b>b)</b> ADN total ( $\mu\text{g}/\text{gr}$ de heces) y consumo de embutidos (7/7); <b>c)</b> ADN total ( $\mu\text{g}/\text{gr}$ de heces) y consumo de productos procesados (7/7).....	81
<b>Gráfica 19.</b> Gráficas de dispersión de las variables: <b>a)</b> ARN total ( $\mu\text{g}/\text{gr}$ de heces) y consumo de embutidos (7/7); <b>b)</b> ARN viral ( $\mu\text{g}/\text{gr}$ de heces) y consumo de carne roja (7/7).....	81
<b>Gráfica 20.</b> Gráficas de dispersión de las variables: <b>a)</b> $2^{\Delta\Delta\text{Ct}}$ <i>Bacteroides</i> spp y consumo de productos procesados (7/7); <b>b)</b> $2^{\Delta\Delta\text{Ct}}$ <i>Lachnospiraceae</i> spp y litros de agua en un día; <b>c)</b> $2^{\Delta\Delta\text{Ct}}$ <i>Firmicutes</i> spp y litros de agua en un día.....	82
<b>Gráfica 21.</b> Gráficas de dispersión de las variables: <b>a)</b> ARN total ( $\mu\text{g}/\text{gr}$ de heces) y edad (años); <b>b)</b> ARN total ( $\mu\text{g}/\text{gr}$ de heces) y talla (metros); <b>c)</b> ARN total ( $\mu\text{g}/\text{gr}$ de heces) y peso (Kg).....	83
<b>Gráfica 22.</b> Gráfica de dispersión de las variables: <b>a)</b> Ct <i>Bacteroides</i> spp y talla (metros); <b>b)</b> $2^{\Delta\Delta\text{Ct}}$ <i>Bacteroides</i> spp y consumo de productos lácteos (7/7).....	83
<b>Gráfica 23.</b> Gráfica de dispersión de las variables: <b>a)</b> Ct <i>Lachnospiraceae</i> spp y talla (metros); <b>b)</b> $2^{\Delta\Delta\text{Ct}}$ <i>Lachnospiraceae</i> spp y peso (Kg).....	84
<b>Gráfica 24.</b> Gráfica de dispersión de las variables: <b>a)</b> Ct <i>Firmicutes</i> spp y consumo de leguminosas (7/7); <b>b)</b> $2^{\Delta\Delta\text{Ct}}$ <i>Firmicutes</i> spp y edad (años); <b>c)</b> $2^{\Delta\Delta\text{Ct}}$ <i>Firmicutes</i> spp y talla (metros); <b>d)</b> $2^{\Delta\Delta\text{Ct}}$ <i>Firmicutes</i> spp y peso (Kg).....	84
<b>Gráfica 25.</b> Gráficas de dispersión de las variables: <b>a)</b> Ct Torquetenovirus y consumo de leguminosas (7/7); <b>b)</b> Ct Torquetenovirus y talla (metros); <b>c)</b> $2^{\Delta\Delta\text{Ct}}$ Torquetenovirus y talla (metros).....	85
<b>Gráfica 26.</b> Gráficas de dispersión de las variables: <b>a)</b> ADN total ( $\mu\text{g}/\text{gr}$ de heces) y $2^{\Delta\Delta\text{Ct}}$ <i>Bacteroides</i> spp; <b>b)</b> ARN total ( $\mu\text{g}/\text{gr}$ de heces) y $2^{\Delta\Delta\text{Ct}}$ <i>Bacteroides</i> spp; <b>c)</b> ARN total ( $\mu\text{g}/\text{gr}$ de heces) y $2^{\Delta\Delta\text{Ct}}$ Torquetenovirus.....	86
<b>Gráfica 27.</b> Gráficas de dispersión de las variables $2^{\Delta\Delta\text{Ct}}$ <i>Bacteroides</i> spp y $2^{\Delta\Delta\text{Ct}}$ Torquetenovirus.....	86
<b>Gráfica 28.</b> Gráficas de dispersión de las variables <b>a)</b> ARN total ( $\mu\text{g}/\text{gr}$ de heces) y $2^{\Delta\Delta\text{Ct}}$ <i>Lachnospiraceae</i> spp; <b>b)</b> Ct <i>Lachnospiraceae</i> spp y Ct Torquetenovirus.....	87
<b>Gráfica 29.</b> Gráficas de dispersión de las variables $2^{\Delta\Delta\text{Ct}}$ <i>Lachnospiraceae</i> spp y $2^{\Delta\Delta\text{Ct}}$ <i>Firmicutes</i> spp.....	87

## 1. AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIAS

A Dios, porque me conoces y sabes que aunque tarde, he de aprender la lección que preparaste para mí; no siempre tengo la claridad para entenderte pero ando por la senda que marcaste, hasta que me dejes volver a casa...

A mí, porque no es egoísmo, narcisismo, ni presunción...se llama amor propio; porque solo yo sé lo que me ha costado llegar aquí, las batallas internas que tuve que sortear, todas las veces que se me hizo fácil olvidar quién soy y me tuve que recordar de donde vengo y a dónde voy. Me reconozco y me amo ante todo, me dedico cada segundo en el que me sentí pequeña, porque esos días ahora me recuerdan lo fuerte que soy y todo lo que soy capaz de lograr, porque todo está bien; aquí y ahora...

A mi mamá, porque sus ojos me reconocen y su amor me mantiene fuerte, a veces habla poco, pero cuando habla...lo dice todo. Gracias por tu amor, porque todo lo que siento son tus ganas inmensas de verme feliz.

A mis hermanas, que con el paso de los años la complicidad y el amor se hacen más fuertes, son mi motor, mi impulso, mi alegría, mi orgullo; Ana Tere y Sandra, este logro es también de ustedes. Las amo.

A mi amor bonito, te dedico y comparto este logro, sin ti no hubiera sido igual, gracias por los días en los que me sostuviste y no me dejaste caer, porque nunca había sentido un amor así, tan grande, tan puro y tan real...gracias por compartir lo bueno y lo malo de este proceso, las palabras sobran cuando los ojos lo dicen todo. Te amo, todo contigo y nada sin ti.

A Jaime que me ha querido tanto y juntos aprendimos que un papá también puede llegar tarde, con diferente sangre y apellido...pero siempre llega. Te quiero.

A mi directora de tesis, Dra. Rocío Baños, que me enseñó de paciencia (mucho), compromiso, valentía, esfuerzo, trabajo en equipo, ayuda a los demás, tenacidad, templanza, honestidad, forjar el carácter...¡ah! y también biología molecular. Gracias por ser un maestra de vida.

A mis compañeras de UNE: Pam, Mitzi, Monse A., Sandy, Dey, Maritza, Rous, Monse O... porque cada una me enseñó algo importante, no solo en el laboratorio sino para mi vida y eso es lo más valioso que me llevo de ustedes, se convirtieron en grandes maestras y ahora compartimos una historia. Gracias.

A mis compañeros de la maestría: Jana, Fede, Ana, Selene, Gregorio y Doc. Jaime; juntos compartimos dos años de aprendizaje, de risas, de uno que otro bostezo, litros de café, complicidad en los exámenes, algunos tropiezos. Gracias por encontrarnos en el camino.

A mis sinodales, Mtra. Valeria Magali Rocha Rocha y Dra. Beatriz Pérez Armendariz, por su tiempo y apoyo para concluir este trabajo.

Al Hospital Infantil de Tlaxcala, especialmente a mi amigo Dr. Federico Osorio, que me apoyó en la recolección de las muestras y sobre todo por ser ejemplo de un gran ser humano y doctor.

A UNE-CIO, por permitirme tener un gran espacio de investigación, por las facilidades otorgadas para hacer mi tesis, especialmente a Don Francisco Álvarez, por la gran labor que realiza con todo su equipo y su apoyo.

## 2. ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS Y SÍMBOLOS

ADN: ácido desoxirribonucleico.	gr: gramos.	nM: nanomolar.
ALL: por sus siglas en inglés <i>acute lymphoblastic leukemia</i> .	H: hombre	NMDAR: receptor N-metil-D-aspartato.
ARN: ácido ribonucleico.	HastV: Astrovirus.	NOM: norma oficial mexicana.
BDNF: por sus siglas en inglés <i>brain derived neurotrophic factor</i> .	HEV: <i>Enterovirus</i> .	O <sub>2</sub> : oxígeno molecular.
BLAST: por sus siglas en inglés <i>basic local alignment search tool</i> .	HGyV: <i>Gyrovirus</i> .	OMS: Organización Mundial de la Salud.
°C: grados centígrados.	HIT: Hospital Infantil de Tlaxcala.	pb: pares de bases.
c.c.p: con copia para.	HPeV: <i>Parechovirus</i> .	PCR: reacción en cadena de la polimerasa.
CIO: Centro de Investigación Oncológica.	IBD: por sus siglas en inglés <i>inflammatory bowel disease</i> .	PT: paciente con tratamiento.
CIOMS: Consejo de Organizaciones Internacionales de las Ciencias Médicas.	IDT: por sus siglas en inglés <i>integrated DNA technologies</i> .	QFB: químico(a) farmacobiólogo.
CMV: Citomegalovirus.	kb: kilobases.	R: primer <i>reverse</i> .
CRC: cáncer colorectal.	kg: kilogramos.	RPBI: residuos peligrosos biológicos infecciosos.
CS: control sano.	LDH: lactato deshidrogenasa.	rpm: revoluciones por minuto.
Ct: del inglés <i>crossing treshold</i> .	LGC: leucemia granulocítica crónica.	RT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa, tiempo real.
DEPC: dietil pirocarbonato.	LLA: leucemia linfoblástica aguda.	SIDA: síndrome de inmunodeficiencia adquirida.
DM1: diabetes mellitus 1.	LMA: leucemia mieloblástica aguda.	SNC: sistema nervioso central.
DM2: diabetes mellitus 2.	LPS: lipopolisacárido.	SPSS: por sus siglas en inglés <i>statistical package for the social sciences</i> .
Dra: doctora.	M: mujer.	Sr(a): señor/señora.
Dx: diagnóstico.	m: metros.	TBE: solución tampón de TRIS, borato y EDTA.
EDTA: ácido etilendiaminotetraacético.	mm: milímetros.	Tel: teléfono.
EV: <i>Enterovirus</i> .	MASS: maestra en administración de servicios de la salud.	Tm: del inglés <i>melting temperature</i> .
F: primer <i>forward</i> .	mg: miligramos.	TNF: por las siglas en inglés <i>tumor necrosis factor</i> .
FAB: grupo franco-americano-británico.	mL: mililitros.	TRIS: tris(hidroximetil)-amino metano.
g: gravedades.	Mtra: maestra.	TTMV: Torqueteno-like mini virus.
GABA: ácido $\gamma$ -amino butírico.	N/A: no aplica.	
GAPDH: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa.	NCBI: por sus siglas en inglés: <i>National Center for Biotechnology Information</i> .	
	ng: nanogramos.	
	nm: nanómetros.	

TTV: Torquetenovirus.

Tx: tratamiento.

UNE: Una Nueva Esperanza.

UPAEP: Universidad Popular

Autónoma del Estado de

Puebla.

UTR: del inglés *untranslated region*.

VIH: virus de inmunodeficiencia humana.

VLTH: virus de la leucemia linfocítica humana.

VLTH-I: virus de la leucemia linfocítica humana tipo I.

VLTH-II: virus de la leucemia linfocítica humana tipo II.

VPH: virus del papiloma humano.

VSR: virus sincitial respiratorio.

VSV: virus de la estomatitis vesicular.

μL: micro litros.

μg: micro gramos.

### 3. RESUMEN

La leucemia linfoblástica aguda (LLA) es un tipo de cáncer que provoca un aumento no controlado de leucocitos en la médula ósea. La LLA era considerada fatal en los niños hasta hace 30 años; hoy, su tasa de supervivencia a cinco años supera el 70%, lo que implica que la mayoría de los pacientes pueden curarse, sin embargo, la situación es diferente para los niños de los países en desarrollo; se estima que su supervivencia al cáncer es entre 10% y 20% menor que la de aquellos en su misma situación en países desarrollados. En México existen anualmente entre 5,000 y 6,000 casos nuevos de cáncer en menores de 18 años, entre los que destacan principalmente las leucemias (LLA, 52% del total), seguido de linfomas (10%) y los tumores del SNC (10%). Es importante comprender los factores que están involucrados en el inicio y evolución de la LLA, con el fin de aumentar la esperanza de vida, disminuir la incidencia y reducir el gasto que se genera en el sistema de salud. Se conoce como microbiota intestinal al conjunto de microorganismos que residen en el intestino y establecen relaciones simbióticas entre ellos y el huésped, esta despertó gran interés en la última década a partir de trabajos que la vincularon con diversas patologías, entre ellas algunos tipos de cáncer, como el de colon. Existe evidencia de que hay diferencias en las poblaciones de bacterias y virus intestinales entre sujetos sanos y pacientes que cursan con alguna patología; en cuanto a la LLA pediátrica, se han estudiado algunos cambios que sufre la población bacteriana intestinal y también se ha apostado por la influencia de la población viral en la dinámica del ecosistema intestinal y su posible papel en el inicio y desarrollo de este tipo de cáncer. El objetivo de este trabajo fue analizar la expresión de algunas bacterias y virus de la microbiota intestinal en una población pediátrica con LLA y compararla con una población pediátrica sana; para ello se obtuvieron muestras de heces a partir de las cuales se hicieron extracciones de ácidos nucleicos (ADN y ARN total y viral) y posteriormente la identificación por PCR en tiempo real de *Bacteroides* spp, *Lachnospiraceae* spp, *Firmicutes* spp y Torquetenovirus. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las concentraciones de ácidos nucleicos totales y virales entre los dos grupos de estudio. Los controles sanos mostraron tendencia a una mayor expresión génica de los tres grupos bacterianos que los pacientes con LLA. Los pacientes con LLA mostraron una mayor expresión génica de Torquetenovirus (diferencia estadísticamente significativa en el valor Ct,  $p=0.004$ ). En cuanto a las características de la muestra, se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el consumo de productos lácteos, ahumados y embutidos, entre controles y pacientes. Se hallaron algunas correlaciones entre variables, como la expresión génica de *Firmicutes* spp ( $p=0.005$ ,  $r=0.679$ ) con el peso (kg) en el grupo de pacientes, la concentración de ARN viral y el consumo de carne roja ( $p=0.038$ ,  $r=0.539$ ) en el grupo de controles; entre otras correlaciones estadísticamente significativas ( $p<0.05$ ). Este estudio permitió adquirir una visión general sobre el estado y la dinámica de la microbiota y el viroma intestinal, en población pediátrica con LLA al compararla con controles pediátricos sanos.

**Palabras clave:** cáncer, leucemia, microbiota, bacterias, virus.

#### 4. ABSTRACT

Leukemia is a malignant disease that causes an uncontrolled increase in white blood cells in the bone marrow. It is the most common cancer in children and it is cured in 90% out of the cases. Thirty years ago, ALL was considered lethal in children, today, their 5-year survival rate is over 70%, implying that most patients can be cured; however, the situation is different for children in developing countries. It is estimated that their survival to cancer is between 10% and 20% lower than those in their same situation in developed countries. In Mexico, there are annually between 5,000 and 6,000 new cases of cancer in children under 18 years. Among the most common are leukemias (ALL, 52% of the total) lymphomas (10%) and CNS tumors (10%). It is extremely important to understand all the factors that are involved in the onset and evolution of ALL, with the purpose of increasing life expectancy, reducing the incidence and the costs that are generated in the health system. It is known as gut microbiota to the set of microorganisms that reside in the gut and establish symbiotic relationships between them and the host. Gut microbiota aroused a great interest in the last decade from works that linked it with various pathologies, including some cancers such as colon cancer. There is evidence that there are differences in the populations of intestinal bacteria and viruses between healthy subjects and patients with any pathology. There have been studied some changes suffered by the intestinal bacterial population and the influence of the viral population on the dynamics of the intestinal ecosystem in pediatric ALL and the possible role of the viruses in the initiation and development of this type of cancer. The objective of this study was to analyze the expression of some bacteria and viruses of the gut microbiota in a pediatric population with ALL and to compare it with a healthy pediatric population. Stool samples were obtained from which nucleic acid extractions were made (total and viral DNA and RNA) and subsequently the identification by real-time PCR of *Bacteroides* spp, *Lachnospiraceae* spp, *Firmicutes* spp and Torquetenovirus. No statistically significant differences were found in the concentrations of total and viral nucleic acids between the two study groups. Healthy controls showed a tendency to greater gene expression of the three bacterial genera than patients with ALL. Patients with ALL showed a higher gene expression of Torquetenovirus (statistically significant difference in the Ct value,  $p=0.004$ ). Regarding the characteristics of the sample, statistically significant differences were found in the consumption of dairy, smoked and sausage products, between controls and patients. Some correlations were found between variables such as the gene expression of *Firmicutes* spp ( $p=0.005$ ,  $r=0.679$ ) with the weight (kg) in the group of patients, the concentration of viral RNA and the consumption of red meat ( $p=0.038$ ,  $r=0.539$ ) in the control group; among other statistically significant correlations ( $p<0.05$ ). This study allowed to acquire a general vision about the state and dynamics of the microbiota and the intestinal virome, in pediatric population with ALL, when we compared it with healthy pediatric controls.

**Key words:** cancer, leukemia, microbiota, bacteria, virus.

## 5. ANTECEDENTES

### 5.1 ANTECEDENTES GENERALES

#### 5.1.1 Leucemias agudas

Las leucemias agudas son enfermedades clonales malignas de las células hematopoyéticas de la médula ósea caracterizadas por la presencia de blastos, que sustituyen progresivamente el tejido hematopoyético normal, por lo que ocasionan un descenso progresivo de las células normales de las tres series hematopoyéticas (eritrocitaria, leucocitaria y plaquetaria). Esta panmielopatía se caracteriza por la aparición de una alteración clonal de los progenitores hematopoyéticos que les confiere, por un lado, ventaja proliferativa o de supervivencia por distintos mecanismos y, por otro lado, incapacidad para la diferenciación hematopoyética normal, con la consiguiente persistencia de estadios inmaduros en forma de blastos. Se considera diagnóstico de leucemia aguda la presencia de al menos 20% de blastos en la médula ósea o sangre periférica. Las leucemias agudas constituyen el 3% de las neoplasias y el 50% de todas las leucemias. Desde el punto de vista etiológico, se clasifican en leucemias *de novo* y leucemias secundarias (tratamiento quimioterapéutico/radio-terapéutico previo o evolución clonal de otra enfermedad hematológica) (Obeso Fernández, Carretero López, y Pérez Corral, 2014). Se reconocen dos grandes familias de leucemia aguda: la linfoblástica (LLA) de líneas linfocitoide B o T y la mieloblástica (LMA) (Jaime Pérez y Gómez Almaguer, 2009).

#### 5.1.2 Leucemia linfoblástica aguda (LLA)

La LLA es la consecuencia de la transformación maligna de una célula progenitora linfocitoide inmadura que tiene la capacidad de expandirse y formar un clon de células progenitoras idénticas bloqueadas en un punto de su diferenciación (Lassaletta Atienza, 2010).

La leucemia puede infiltrar cualquier órgano o tejido, si bien lo más común es observar infiltración en el bazo, ganglios e hígado; la variedad linfoblástica infiltra los dos primeros con más frecuencia que la mieloblástica. La causa exacta de la leucemia aguda se desconoce. Hay una tendencia familiar, ya que los hermanos de un paciente con leucemia, sobre todo si se trata de gemelos idénticos, tienen mayor riesgo de ser afectados que los que no tienen familiares con este problema. En algunos casos se corrobora claramente la exposición a agentes mutágenos, como la radiación o a químicos como los derivados del benceno. También es posible que algunos medicamentos como el cloranfenicol, o los antineoplásicos alquilantes, como la ciclofosfamida puedan causar alteraciones que ocasionen la aparición de la leucemia. Por otra parte, la leucemia aguda es más frecuente en individuos con trisomía 21 y otros trastornos hereditarios al igual que en los sujetos con inmunodeficiencias congénitas o adquiridas (Jaime Pérez y Gómez Almaguer, 2009).

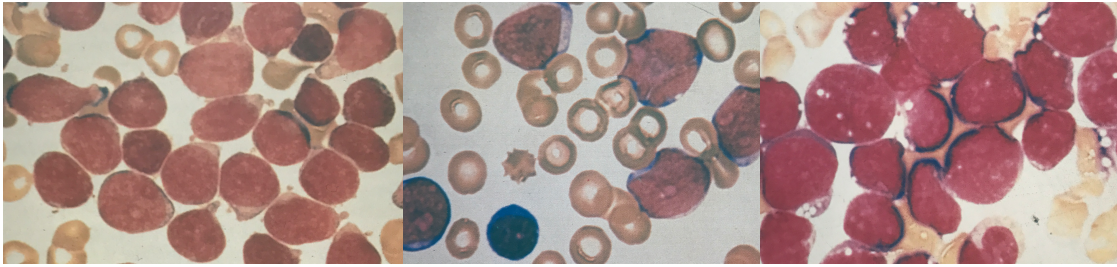
Se ha dado mucha importancia al papel de los virus en el estudio de la etiología de las leucemias. Esto es debido a que la mayoría de las LLA se producen en un periodo de la vida en el cual el sistema inmune está en desarrollo y podría ser más susceptible a los efectos oncogénicos de determinados agentes virales. Hasta el momento, el virus de Epstein-Barr, en la LLA-L3, y los VLTH I y II, en algunos casos de leucemias del adulto, han sido los únicos con una clara asociación (Lassaletta Atienza, 2010).

#### **5.1.2.1 Incidencia**

La leucemia linfoblástica aguda (LLA) es la neoplasia más frecuente en la infancia, constituyendo el 75-80% de todas las leucemias agudas de la edad pediátrica. El 25% y el 19% de todos los tumores en menores de 15 y 19 años, respectivamente, son LLA. La supervivencia de los pacientes con LLA se ha incrementado notablemente en las últimas décadas, pasando de una supervivencia de menos del 10% en los años 60, a presentar con los tratamientos actuales, una supervivencia libre de enfermedad que actualmente se aproxima e incluso supera al 90% en los países más desarrollados. A pesar de estos excelentes resultados, todavía un pequeño grupo de pacientes, en torno al 10-20% fracasan al tratamiento. El pico de incidencia máximo se establece entre los dos y los cinco años de edad. En cuanto al sexo, la LLA predomina ligeramente en los varones, sobre todo en la edad puberal. Las diferencias geográficas son notables en esta enfermedad: mientras que, en los países menos desarrollados, como el Norte de África y Oriente Medio, predominan los linfomas y las LLA de estirpe T, en los países industrializados, la LLA de estirpe B es la más frecuente de las hemopatías malignas. Este hecho se ha relacionado con la mayor facilidad para la exposición a determinados agentes medioambientales “leucemógenos” en los países industrializados. En los países con poblaciones heterogéneas, se ha observado una mayor incidencia de LLA en la raza blanca (Lassaletta Atienza, 2010).

#### **5.1.2.2 Clasificación**

*Morfológica.* La leucemia linfoblástica aguda presenta por lo menos tres variantes morfológicas definidas: L1, L2 y L3; la diferencia entre un grupo y otro se basa en el tamaño, el grado de maduración del núcleo, la presencia de nucléolos y vacuolas. La L1 es la más uniforme de todas y la menos indiferenciada, con células de tamaño pequeño y escaso citoplasma; la L2 consiste en linfoblastos de tamaño variable, nucléolos más evidentes y menos diferenciados, la L3 (tipo Burkitt) se caracteriza por células grandes, indiferenciadas, con nucléolos evidentes y numerosas vacuolas que incluyen el núcleo y el citoplasma similares a las observadas en el linfoma de Burkitt (Figura 1). Esta clasificación la propuso hace más de 20 años un grupo de investigadores franco-americano-británicos (FAB); es la clasificación morfológica de mayor aceptación internacional (Jaime Pérez y Gómez Almaguer, 2009).



**Figura 1.** Morfología diferencial de los tres tipos de leucemia linfoblástica aguda. De izquierda a derecha: L1, L2 y L3 (Ruíz Arguelles, 2003).

La aparición de los anticuerpos monoclonales y las mejoras que se han realizado en las técnicas de citometría de flujo y de reacción en cadena de la polimerasa han permitido clasificar las LLA en distintos tipos, según el estadio madurativo de sus linfoblastos (Lassaletta Atienza, 2010).

*Inmunológica.* Según la existencia de ciertos marcadores inmunológicos que definen la línea linfoide o, dicho de otra forma, el estadio madurativo de origen, la LLA se subdivide en los siguientes grupos:

- Inmunofenotipo B/leucemia linfoblástica B. Definido por los marcadores CD79a citoplasmático, CD22 citoplasmático, CD19 positivos.
  - LLAB1, pre-B o pro-B. LLA de precursor B precoz. Se caracteriza por la positividad de marcadores (TdT+ y CD34+) y negatividad de marcadores CD20- y CD10-.
  - LLAB2. LLA B común. Se caracteriza por tener además positividad para el marcador CALLA o CD10.
  - LLAB3. LLA pre-B. Sus células presentan, por su estadio algo más de maduración, cadenas pesadas de las inmunoglobulinas intra-citoplasmáticas, que son negativas en los estadios anteriores.
  - LLAB4 o LLAB madura o tipo Burkitt. El rasgo distintivo es que los blastos tienen, debido a su madurez, inmunoglobulinas de superficie positivas. Además, son negativas para TdT, a diferencia del resto de variantes de inmunofenotipo B. Son positivas también para los marcadores más maduros.

La LLA B1, B2 y B3 según la clasificación inmunológica pueden corresponder a variantes morfológicas L1 o L2 mientras que LLAB4 o madura o tipo Burkitt se corresponde siempre con la variedad morfológica L3 (Obeso Fernández *et al.*, 2014).

- Inmunofenotipo T/leucemia linfoblástica T. Definido por el marcador CD3 citoplasmático +. Son TdT positivas y se corresponden con las formas L1 y L2. También presentan cuatro variantes: LLAT1 o pro-T, LLAT2 o pre-T, LLAT3 o cortical y LLAT4 o madura (Obeso Fernández *et al.*, 2014).

### 5.1.2.3 Genética molecular

El estudio de las alteraciones en la genética molecular de la LLA ha permitido mayor avance en la comprensión de la fisiopatología de las leucemias, su pronóstico y la elección racional del tratamiento más adecuado. Los hechos que en general se relacionan con el desarrollo de LLA son tres: la expresión aberrante de protooncogenes, las translocaciones cromosómicas que dan origen a genes de fusión que codifican cinasas activas y factores de transcripción alterados, y la hiperdiploidia, resultante en la presencia de más de 50 cromosomas (Jaime Pérez y Gómez Almaguer, 2009).

Las alteraciones genéticas descritas contribuyen a la transformación leucémica de la célula hematoprogenitora de la médula ósea o de su descendencia inmediata; se alteran así las funciones celulares más indispensables, principalmente se aumenta el potencial de autorrenovación de manera ilimitada o se impide la diferenciación celular y promueve la resistencia a las señales de apoptosis o muerte celular, todo lo cual contribuye a la supremacía y la perpetuación de las células hematopoyéticas malignizadas. Un ejemplo importante de una anomalía primaria es la translocación 9;22 (cromosoma Filadelfia), que produce una proteína de fusión denominada BCR-ABL que altera los mecanismos de proliferación, supervivencia y autorrenovación de las células hematoprogenitoras, lo que conduce a grandes ventajas de proliferación de la clona leucémica; este trastorno se presenta en la leucemia granulocítica crónica (LGC), pero también en el 25% de la LLA del adulto y en menor grado en la LLA de la infancia (3%) (Jaime Pérez y Gómez Almaguer, 2009).

El ejemplo más notable de los factores de transcripción quiméricos, es decir, los que resultan de la fusión de dos diferentes factores, es el TEL-AML1, que depende de la translocación 12;21, lo que conduce al cierre de la estructura cromatínica e inhibición de la transcripción, alterando las propiedades de diferenciación y autorrenovación de la célula madre hematopoyética. Las translocaciones y los reordenamientos genéticos resultantes tal vez sean por sí mismos insuficientes para causar la leucemia aguda; es probable que se requiera de un segundo grupo de mutaciones que alteran tanto la proliferación como la supervivencia de las células hematoprogenitoras malignizadas. En este grupo de hechos se encuentra la sobreexpresión del receptor FLT-3 de la cinasa de tirosina y las proteínas que participan de manera colectiva en la llamada vía del retinoblastoma, p53, p107 y p130, cuyo papel es controlar la entrada de las células al ciclo celular (Jaime Pérez y Gómez Almaguer, 2009).

#### 5.1.2.4 Cuadro clínico

La presentación clínica de los pacientes con LLA refleja la infiltración de la médula ósea por parte de los blastos y la extensión extra-medular de la enfermedad. Los síntomas más frecuentes al diagnóstico son aquellos relacionados con la insuficiencia medular: anemia (palidez, astenia), trombopenia (equimosis, petequias) y neutropenia (fiebre) (Lassaletta Atienza, 2010). Otros síntomas frecuentes de la LLA son: compromiso del estado general (81%), palidez (66%), fiebre (60%), dolor óseo (30%) y púrpura (24%). Los hallazgos más comunes en el examen físico son: hepatomegalia, adenomegalia, esplenomegalia. El hemograma siempre es anormal con anemia, trombocitopenia, neutropenia y/o linfoblastos (Torres Ramos, Anticona Huaynate, Gálvez Calla, y Florián, 2006).

Los pacientes que sufren LLA presentan generalmente síndromes hemorrágicos, anémico, o infiltrativo, aisladamente o en combinación. La hemorragia puede deberse a trombocitopenia por invasión leucémica de la médula ósea. La anemia se debe también a la invasión tumoral de la médula ósea y habitualmente es más grave en la leucemia linfoblástica. De manera interesante, la anemia grave es un dato de buen pronóstico en la leucemia linfoblástica infantil. El síndrome infiltrativo supone crecimiento de ganglios, bazo o hígado. La expansión de la cavidad medular por proliferación celular monoclonal puede causar dolores óseos. Las LLA de linfocitos T con frecuencia generan crecimiento de timo visible en radiografía de tórax. Sólo la mitad de los enfermos con leucemia aguda muestran incremento en los leucocitos, una cuarta parte tiene cifras de leucocitos en rangos normales y otra cuarta parte presenta disminución de los leucocitos. Por ende, nunca debe descartarse diagnóstico de LLA sólo porque la cuenta de leucocitos sea normal (Ruíz Arguelles, 2003).

En algunos individuos, las primeras manifestaciones de la leucemia son en cavidad oral, entre las que se encuentran: sangrado de las encías, úlceras en la boca, agrandamiento gingival, candidiasis y periodontitis. Se sabe que la microbiota oral está involucrada en la ocurrencia y exacerbación de esas complicaciones; se ha demostrado que ciertos miembros de la microbiota contribuyen con el desarrollo de septicemia, lo cual podría retrasar el tratamiento antineoplásico, comprometiendo su eficacia o poniendo en riesgo la vida del paciente (Wang *et al.*, 2014).

#### 5.1.2.5 Diagnóstico

La confirmación del diagnóstico se realiza mediante el estudio morfológico, citogenético y molecular del aspirado de médula ósea. La exploración debe ser exhaustiva y minuciosa. Se debe explorar la presencia de equimosis, petequias, adenopatías, palidez cutánea, etc. Se debe palpar hígado y bazo, realizar una buena exploración neurológica y en los varones, palpar siempre los testículos (Lassaletta Atienza, 2010).

En la extensión de la sangre periférica al microscopio, se suelen observar los linfoblastos (aunque no siempre aparecen). Se realizará examen del líquido cefalorraquídeo siempre en toda leucemia al diagnóstico, para descartar la afectación inicial del SNC. Una radiografía de tórax inicial permite conocer la existencia de una masa mediastínica. Otros estudios que se realizan al diagnóstico son: ecografía abdominal, estudio cardiológico (previo al tratamiento, que incluye fármacos cardiotoxicos), bioquímica sanguínea (LDH, ácido úrico, calcio, fósforo, transaminasas, etc.), estudio de coagulación, pruebas serológicas (hepatitis viral, VIH, herpes, CMV, etc.) e inmunoglobulinas. Si el paciente presenta fiebre, se deben obtener cultivos de sangre, orina y de cualquier lesión sospechosa e iniciar el tratamiento antibiótico adecuado. El diagnóstico diferencial se realiza con otros cánceres que afectan a niños de este grupo de edad y que pueden invadir la médula ósea, como son el neuroblastoma, linfoma, rhabdomyosarcoma, histiocitosis, algunas infecciones subagudas y crónicas como brucelosis tuberculosis, Epstein Barr y Citomegalovirus (Lassaletta Atienza, 2010).

#### **5.1.2.6 Tratamiento**

El tratamiento de un individuo con leucemia aguda siempre debe ser conducido por un hematólogo u oncólogo capacitado. En la actualidad el tratamiento está encaminado no solo a mejorar la calidad y tiempo de vida del paciente, sino que el objetivo debe ser la curación total de la enfermedad. Esta se trata con fármacos que atacan la célula leucémica de diferente manera, para ello se utilizan una combinación de medicamentos que permite eliminar de manera gradual las células leucémicas en la mayor parte de los pacientes, en especial los niños para obtener la curación total. En condiciones óptimas, esta curación puede lograrse en el 80% de los niños y hasta en 40% de los adultos que sufren LLA (Jaime Pérez y Gómez Almaguer, 2009). El tratamiento consta de cuatro etapas:

I. *Inducción a la remisión.* El objetivo del tratamiento de inducción a la remisión es erradicar más del 99% de la masa leucémica inicial, restaurar la hematopoyesis normal y alcanzar un estado funcional normal. Se dice que un paciente está en remisión completa, cuando no existe evidencia de leucemia ni en su exploración física ni en el examen de sangre periférica ni de médula ósea (Lassaletta Atienza, 2010). La inducción a la remisión consiste en la asociación de fármacos como la vincristina, prednisona, L-asparaginasa, antraciclinas y ciclofosfamida (Obeso Fernández *et al.*, 2014).

Los valores en sangre periférica deben ajustarse a los normales para la edad del paciente y la médula ósea debe tener una celularidad normal, con menos del 5% de blastos. La remisión completa incluye también la ausencia de afectación del SNC o de afectación extra medular. Obtener la remisión completa es la base del tratamiento de la LLA y un requisito imprescindible para tener una supervivencia prolongada. Tras el ingreso inicial (aproximadamente 10-15 días), el paciente acude casi a diario al hospital para recibir la quimioterapia, mientras en casa recibe quimioterapia oral (Lassaletta Atienza, 2010).

II. *Intensificación/consolidación*. Tras alcanzar la remisión completa, se realiza una consolidación con metotrexato, Ara-C y otros fármacos (Obeso Fernández *et al.*, 2014). Este esquema es generalmente usado para erradicar la resistencia a drogas de las células leucemias residuales reduciendo el riesgo de recaída. Los pacientes ingresan en el hospital durante periodos de 4-6 días para recibir los ciclos de quimioterapia. Posteriormente, se realiza una reinducción, que consiste en la repetición del tratamiento de inducción con ligeras modificaciones a los tres meses de adquirir la remisión completa (Lassaletta Atienza, 2010).

III. *Mantenimiento*. Los pacientes con LLA requieren tratamientos de mantenimiento muy prolongados. Se ha comprobado que algunos pacientes que están en aparente remisión completa, al analizar sus células con técnicas de biología molecular, se encuentra enfermedad mínima residual. Es por ello que los tratamientos de mantenimiento se mantienen, al menos, durante dos años, con reevaluaciones frecuentes para la detección de recaídas. El tratamiento estándar de mantenimiento consiste en la administración de mercaptopurina a diario y de metotrexato semanal. Los pacientes realizan el tratamiento de forma ambulatoria, acudiendo a sus revisiones cada 2-4 semanas. Durante el mismo, reciben profilaxis anti infecciosa (Lassaletta Atienza, 2010).

Siempre se debe hacer una neuroprofilaxis junto con cada ciclo de quimioterapia, ya que sin ella se produce recidiva meníngea hasta en el 50% de los casos, al persistir las células leucémicas dentro del sistema nervioso por la dificultad de la quimioterapia para atravesar la barrera hematoencefálica. Realizando neuroprofilaxis, el porcentaje de recidivas meníngeas baja hasta el 3%. La neuroprofilaxis se realiza con quimioterapia intratecal con metotrexato, Ara-C y esteroides. En la LLA Filadelfia positiva se debe asociar al tratamiento el imatinib u otros inhibidores de tirosina cinasa, ya que mejoran la respuesta y la supervivencia de estos pacientes. En los casos de alto riesgo, en los que se pueda realizar, está indicado el trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos (Obeso Fernández *et al.*, 2014). El objetivo del tratamiento del SNC es destruir las células que potencialmente se pudieron o se puedan introducir al SNC. Si todas las etapas anteriores se completaron o hubo recaída de la LLA y ésta se trató con éxito se pasa a una etapa de vigilancia por un periodo mínimo de dos años. Lo ideal es que la vigilancia sea de por vida del paciente (Jaime Pérez y Gómez Almaguer, 2009).

### **5.1.3 Microbiota intestinal**

Se denomina microbiota intestinal al conjunto de microorganismos que reside en el intestino humano y que establece relaciones simbióticas entre ellos y con el huésped. El material genético de las bacterias que colonizan el cuerpo, denominado microbioma, contiene entre 100 y 150 veces más genes que el propio genoma humano; es decir que, de cada 10 células, nueve son bacterianas y una es humana. El intestino contiene 1,014 especies bacterianas (es la mayor densidad microbiana de cualquier hábitat en todo el mundo), de las cuales el 95% vive en el colon (Kawior *et al.*, 2014).

La masa de bacterias en la materia fecal representa el 1-3% del peso corporal. Gracias al desarrollo de técnicas modernas de secuenciación del ADN se han analizado poblaciones completas de microorganismos en sus hábitats naturales sin necesidad de aislarlos ni cultivarlos. La metagenómica analiza los genes microbianos y las proteínas expresadas por la microbiota, lo cual permite dilucidar su función potencial (Holmes, Li, Marchesi, y Nicholson, 2012).

La microbiota intestinal, como un órgano exteriorizado o virtual, aumenta la capacidad fisiológica y metabólica del huésped, ya que favorece el desarrollo de la red capilar submucosa y del sistema inmune, y posee 80 familias de glucosa-hidrolasas capaces de degradar la fibra no digerible por los seres humanos. Es por ello que el metabolismo debe entenderse como la suma del metabolismo del huésped y el de las bacterias que lo habitan, en su conjunto. La microbiota es crucial para la salud y el bienestar; actúa como barrera intestinal y protege contra ciertos patógenos, participa en el desarrollo de las microvellosidades intestinales y en la transformación de ácidos biliares conjugados, produce vitaminas (B<sub>12</sub> y K), colabora en la extracción de energía de la dieta a través de la fermentación de la fibra y es un importante regulador del desarrollo del sistema inmune. Diversas moléculas producidas por la microbiota intestinal tienen actividad inmuno-moduladora: oligonucleótidos, péptidos y proteínas, ácidos grasos de cadena corta, lipo-polisacáridos, peptidoglicanos, ácidos biliares, productos de degradación de la colina y endocannabinoides (Holmes *et al.*, 2012).

Mientras que hay muchas especies de microorganismos en común en todos los humanos, los estudios han demostrado que la composición de la microbiota puede variar ampliamente entre individuos. Estas diferencias se han relacionado a varios factores como la lactancia, el sexo y la dieta. En adición a los factores ambientales, estudios recientes apoyan un papel clave de la genética en el tipo de microbiota intestinal. De hecho, la composición es similar en individuos relacionados que en personas que no lo están. Adicionalmente se encontró que la composición del microbioma está relacionada con el tipo de tejido y, por lo tanto, influenciada por la expresión genética del hospedero en el tejido específico que interactúa con la microbiota. En conjunto, estos resultados sugieren que la variación genética del hospedero afecta la composición de la microbiota a través de los genes y la expresión de proteínas. A pesar de esto, se conoce poco a cerca del juego entre la variación de genética humana, la expresión de los genes y la variación en la composición de la microbiota y el efecto de estos factores en la susceptibilidad a enfermedades complejas (Richards *et al.*, 2016).

#### **5.1.4 Viroma**

Los virus son las entidades biológicas más abundantes en la biosfera, se han determinado y clasificado en múltiples especies y ecosistemas, como ecosistemas marinos, agua fresca de lagos y en el intestino humano, sin embargo, debido a la gran diversidad de sus genomas y morfología es difícil cultivar nuevos virus o explorar las poblaciones de manera extensa (L. Guo *et al.*, 2017).

A través de la metagenómica se ha logrado una aproximación en el conocimiento de la diversidad molecular de los virus incluyendo los virus que forman parte del viroma (L. Guo *et al.*, 2017). El componente viral del microbioma humano se conoce como viroma, el cual es una colección de todos los virus que se encuentran en los humanos, incluyendo virus que causan infecciones agudas, persistentes o latentes y los virus integrados dentro del genoma humano como los retrovirus endógenos. El viroma humano incluye virus eucariontes y procariontes (bacteriófagos). Los virus eucariontes claramente tienen efectos importantes en la salud de los humanos. Las infecciones virales de humanos incluyen infecciones agudas y auto-limitadas, infecciones agudas fulminantes y sin controlar e infecciones crónicas que pueden ser asintomáticas o asociadas a enfermedades serias, incluso fatales como el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) (Wylie, Weinstock, y Storch, 2012).

La conformación del viroma de cada persona está influenciada por su localización geográfica, edad, estilo de vida, incluso la estación del año, mientras que la susceptibilidad a enfermedades virales es afectada por la inmunidad pre-existente y la genética tanto humana como de los virus (Delwart, 2013).

Actualmente el estudio del viroma representa un reto por diversas razones. En primer lugar, los virus no contienen regiones genéticas conservadas como el gen 16S rRNA que es usado para clasificar bacterias; en su lugar la comunidad viral completa debe ser muestreada y las secuencias genómicas virales se comparan con secuencias de referencia virales conocidas. El éxito de este proceso está actualmente limitado por el hecho que muchos virus aún no han sido caracterizados y no se incluyen en las bases de datos de referencia viral. El segundo reto en estudiar el viroma es que el material genético viral puede ser una proporción pequeña del total de los ácidos nucleicos en la comunidad bacteriana debido al tamaño pequeño del genoma de la mayoría de los virus y su baja presencia en algunos casos (Wylie *et al.*, 2012).

Caracterizar todos los virus humanos requiere coleccionar una gran cantidad de muestras alrededor del mundo, de un gran número de pacientes que puedan presentar síntomas de origen inexplicable, así como los sujetos sanos que estén epidemiológicamente relacionados; se deben realizar estudios metagenómicos de muestras como sangre, secreciones respiratorias, heces, orina, piel, tejidos; entre otros. Todo esto hace complicado tener una visión completa del viroma humano (Delwart, 2013). Las aplicaciones inmediatas del estudio del viroma están relacionadas con el descubrimiento de nuevos patógenos virales o virus con tropismos que no se conocían (Wylie *et al.*, 2012). También el estudio del viroma nos podría aportar información del origen viral de algunas enfermedades auto-inmunes como diabetes, que podría estar relacionada con ellos o de muchos virus humanos carcinogénicos que continúan sin caracterizar (Delwart, 2013).

#### 5.1.4.1 Bacteriófagos

Los bacteriófagos o fagos que se definen como virus que infectan a bacterias, se descubrieron en la segunda década del siglo XX, pero recientemente han tomado importancia como reguladores de las poblaciones bacterianas en sus ecosistemas naturales; por lo tanto, aparecen también como actores que se relacionan directamente con la salud humana. Las poblaciones bacterianas pueden cambiar y evolucionar mediante la adquisición de nuevos genes transferidos por fagos, pero también mediante depredación y lisis causada por fagos. Considerando que los fagos afectan a las poblaciones bacterianas existen dos opciones posibles: los cambios en las bacterias pueden causar variaciones en la distribución de fagos o cambios en la población de fagos puede causar disbiosis. Aún no es claro si los fagos pueden ser detectados fácilmente por el sistema inmune o pueden interactuar con él; justo después de su descubrimiento, se observó que existen anticuerpos circulantes contra algunos fagos en suero de humanos y animales (Navarro y Muniesa, 2017).

Se sabe que los bacteriófagos actúan en contra de las bacterias, pero son inertes para células eucariotas por las diferencias que existen en las moléculas de la superficie celular y la maquinaria intracelular que es clave en la replicación de los fagos, lo cual quiere decir que los fagos no son patógenos de humanos, sin embargo, nuevas observaciones sugieren que los fagos no son neutrales para los organismos superiores pues pueden afectar procesos fisiológicos e inmunológicos. Los bacteriófagos son un grupo muy diferenciado de virus y al menos algunos de ellos, se sabe que pueden influenciar en procesos cancerosos, así como afectar al sistema inmune activando la respuesta, por ejemplo, la excreción de citocinas. Algunos virus son conocidos como oncolíticos, pues se propagan en células tumorales mucho más eficientemente que en células normales, por ejemplo, Adenovirus se replica efectivamente en células cuando la proteína p53 está inactivada. El virus de la estomatitis vesicular (VSV) se replica en células tumorales, pues muchas de estas carecen de interferón alfa. Por otro lado, se ha propuesto que los fagos podrían tener actividad anti cancerígena. Bloch en 1940 mostró que la acumulación de fagos en tejido canceroso causó la inhibición en el crecimiento tumoral. Algunos datos presentados después por Kantoch y Mordarski en 1950, demostraron la unión de fagos a células cancerosas de forma *in vivo* e *in vitro*. Otros estudios posteriores realizados por Dabrowska en 2004, demostraron la unión del bacteriófago T4 a células de melanoma y propuso el mecanismo posible. También se sabe que los bacteriófagos inducen y modulan la respuesta inmune en organismos superiores; pueden afectar la producción de radicales libres y la función fagocítica de células, inhiben la activación y proliferación de células T, pueden regular a la baja la migración de células mononucleares y granulocitos hacia los aloinjertos y mitigar su pérdida. Los fagos pueden inhibir la interleucina 2, el factor de necrosis tumoral (TNF, por sus siglas en inglés: *tumoral necrosis factor*) y algunos tipos de interferón como el gamma. Todas estas observaciones abren una nueva perspectiva en el entendimiento de la biología de los bacteriófagos y el desarrollo de terapias con agentes virales (Budynek, Dąbrowska, Skaradziński, y Górski, 2010).

## 5.2 ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

El intestino humano alberga un gran número de microorganismos como bacterias, archaeas, hongos y virus; que en conjunto se conocen como la microbiota intestinal. Estos microorganismos realizan una gran cantidad de funciones, las cuales tienen un impacto de largo alcance en la salud de los seres humanos; dentro de estas actividades se encuentran: extraer energía de carbohidratos que no son asimilables por el huésped, producción de vitaminas, promueven la homeostasis del sistema inmune y pueden prevenir la colonización del intestino por patógenos; entre otras (Hall, Tolonen, y Xavier, 2017). Hoy en día se reconoce que el microbioma humano es un componente importante de la salud de las personas; los estudios realizados, demuestran que existen diversos factores que determinan la estructura la microbiota humana como la edad, la dieta, la localización geográfica, el tratamiento con antibióticos y las enfermedades (De Vlamincck *et al.*, 2013).

Los virus habitan todas las superficies del cuerpo humano incluyendo la boca, el tracto gastrointestinal, vías aéreas y el torrente sanguíneo que antes estaba considerado como un ambiente estéril; la mayoría de los virus son bacteriófagos. El viroma intestinal ha sido objeto de estudio desde 2003, cuando Breitbart *et al.* identificaron las secuencias virales de una muestra de materia fecal de un individuo sano, encontrando 1,200 virotipos diferentes los cuales pertenecen en su mayoría a la familia *Siphoviridae* y fagos temperados; seguidos por los miembros de la familia *Podoviridae* (Tabla 1). Se sabe que la composición del viroma es dinámica y cambia en función de muchos factores como la alimentación y el ambiente (Columpsi *et al.*, 2016).

**Tabla 1.** Familias de virus reportados con mayor frecuencia en el viroma intestinal (Columpsi *et al.*, 2016).

Tipo de virus (por su material genético)	Familia/especie
ADN de cadena simple	<i>Microviridae, Inoviridae.</i>
ADN de doble cadena	<i>Myoviridae, Siphoviridae, Podoviridae, Tectiviridae, Leviviridae, Inoviridae.</i>
ARN	<i>Rotavirus, Astrovirus, Calicivirus, Norovirus, virus de Hepatitis E, Coronavirus, Torovirus, Adenovirus (serotipos 40 y 41).</i>

En el caso de los virus ya se tienen algunos estudios que esclarecen su papel en la dinámica del ecosistema intestinal y su relación con algunas patologías, sin embargo, es un área de estudio reciente en la cual no se ha indagado lo suficiente. Extrapolando los datos disponibles de la diversidad viral, se llegó a estimar que aún hay 320,000 virus de mamíferos que aún no han sido descubiertos, lo cual provee evidencia que el viroma debe ser considerado en estudios del microbioma bacteriano (Handley, 2016).

### 5.2.1 Microbiota intestinal y su relación con patologías

La microbiota intestinal despertó gran interés en la última década a partir de trabajos que la vincularon con diversas patologías, como enfermedades inflamatorias del intestino, trastornos alérgicos y autoinmunes, cáncer de colon, síndromes neuro-psiquiátricos, enfermedades metabólicas, como obesidad, enfermedad cardiovascular y diabetes mellitus tipo 2 (DM2). Se ha postulado que algunos síndromes neuro-psiquiátricos estarían relacionados o se deberían al efecto de comunicación cruzada entre el cerebro y el sistema inmune intestinal: esquizofrenia, trastornos del ánimo, autismo, trastorno obsesivo-compulsivo, trastorno por déficit de atención, anorexia, narcolepsia y síndrome de fatiga crónica. La influencia de la microbiota en la química del cerebro fue demostrada en forma convincente en roedores. Las alteraciones cognitivas y conductuales en individuos genéticamente susceptibles podrían resultar de la alteración de la barrera hematoencefálica y la formación de auto-anticuerpos. Algunas bacterias intestinales producen sustancias neuroactivas, como ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) y serotonina, que tienen efectos ansiolíticos y antidepresivos en el eje intestino-cerebro y han sido denominadas psicobióticos. La microbiota participa, además, en la expresión de factores vitales para el SNC, como el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y el receptor del N-metil-D-aspartato (NMDAR). Estas sustancias están disminuidas en ratones *germ-free* (sin gérmenes), mientras que aumentan con la administración de pre y probióticos y muestran efectos ansiolíticos. Los lipo-polisacáridos (LPS) alteran la actividad neuronal del sistema límbico y comprometen la función serotoninérgica (Bested, Logan, y Selhub, 2013).

Recientemente se ha establecido de manera clara la relación entre la microbiota intestinal y la fisiopatología de la obesidad y se sabe que juega un papel significativo en el desarrollo de la misma. Los estudios que se han realizado en humanos y en roedores sugieren que la presencia del microbioma intestinal incrementa el riesgo de ganar peso y desarrollar resistencia a la insulina. Se han propuesto varios mecanismos para explicar el rol de la microbiota intestinal en la progresión de la obesidad, por ejemplo, aumento en la capacidad energética, inflamación en bajo grado, endotoxemia y otras interferencias metabólicas. Recientemente se ha generado gran cantidad de literatura para explorar el rol de la microbiota intestinal (especialmente la comunidad bacteriana) en la regulación metabólica. Por lo tanto, la modulación de la microbiota intestinal ha sido considerada una de las estrategias más importantes para desarrollar terapias en contra de la obesidad y diabetes. El microbioma intestinal es conocido principalmente por su composición bacteriana y la asociación que ya se ha estudiado con la obesidad, sin embargo, otros microorganismos como los virus han sido descuidados o no se han estudiado a fondo. Los virus juegan un rol crítico en mantener la población bacteriana en un ambiente específico, por ejemplo, el intestino, en donde establecen una relación comensal con sus compañeros. Partículas virales específicas, como los bacteriófagos podrían jugar un papel importante en mantener ciertas líneas del microbioma intestinal que están relacionadas con la presencia de obesidad (Yadav, Jain, Nagpal, y Marotta, 2016).

### **5.2.2 Microbiota intestinal y cáncer**

La microbiota modula la inflamación, influye la estabilidad del genoma de las células del huésped y produce metabolitos que funcionan como inhibidores de las deacetilasas de histonas. De este modo la microbiota podría regular epigenéticamente la expresión de genes del huésped. Ciertos metabolitos de las bacterias, como el sulfuro de hidrógeno, especies reactivas de O<sub>2</sub> y los ácidos biliares, han sido involucrados en la carcinogénesis, mutaciones y alteraciones del ADN, proliferación de células epiteliales y formación de criptas aberrantes en el desarrollo de cáncer colorectal. La inflamación crónica y la secreción de citocinas inflamatorias vinculan la colitis ulcerosa con el cáncer de colon. De hecho, se investiga la potencial acción terapéutica de pre y probióticos como inmunomoduladores en estas patologías. Distintos trabajos sugieren la influencia de la microbiota en el metabolismo de los estrógenos y su relación con el cáncer de mama y de próstata (Kawior *et al.*, 2014).

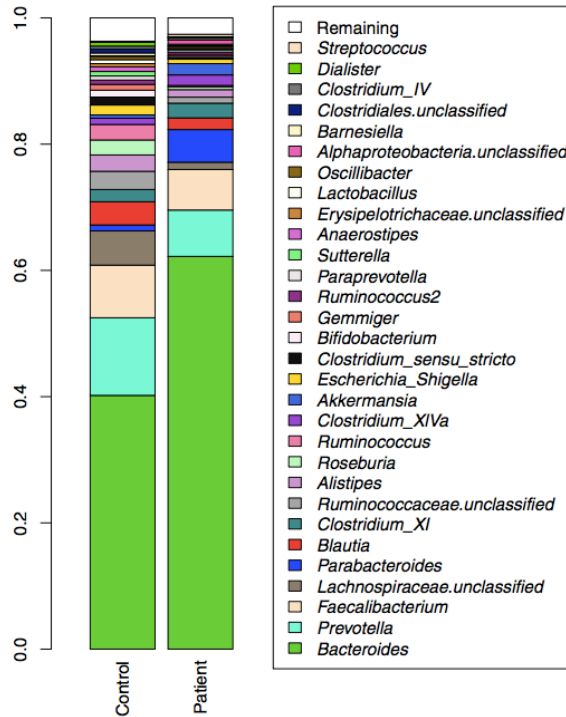
Hay evidencia que sugiere que las alteraciones en la regulación del ambiente del hospedero (disbiosis, crecimiento excesivo de algunas especies de bacterias comensales, factores en la dieta, co-presencia de patógenos facultativos incluyendo a los virus y cambios en las características de la mucosa) pueden desencadenar señalización aberrante de sistema inmune innato, así contribuyendo al desarrollo de inflamación intestinal y cáncer de colon asociado al individuo susceptible. La mala función de la respuesta inmune innata determinada genéticamente puede crear un ambiente inflamatorio que promueva el desarrollo de un tumor, como la mutación TLR4-D299G. Se ha descubierto que factores genéticos, ambientales y la dieta de las personas influyen en el desarrollo y la progresión de cáncer colorectal (CRC). Recientemente se ha acumulado evidencia que asocian la microbiota intestinal con el inicio y la progresión de la enfermedad. Los estudios recientes han demostrado que los individuos con cáncer colorectal presentan alteraciones en la composición de las bacterias intestinales, sin embargo, aún no es claro si esas diferencias conducen al desarrollo de cáncer o si son una respuesta a la formación de tumores; estas conclusiones se han obtenido en la comparación con controles sanos. La evidencia de la asociación de las bacterias intestinales humanas con CRC han derivado de la tecnología de secuenciación masiva hasta la fecha, provista de tres estudios independientes que investigaron la composición microbiana en pacientes sanos y etapa tardía de CRC (Cario, 2013).

### **5.2.3 Microbiota intestinal y leucemia linfoblástica aguda (LLA)**

La LLA es el tipo más común de leucemia en niños y adolescentes, los cuales después de su diagnóstico recibirán quimioterapia como parte de su plan de tratamiento, comprometiendo severamente su salud como resultado de las drogas de quimioterapia, las cuales pueden dañar las células sanas en el revestimiento del sistema digestivo, por lo que algunos disturbios gastrointestinales se inducen como respuesta a la quimioterapia (Rajagopala *et al.*, 2016)

La quimioterapia y el tratamiento antimicrobiano tienen un gran impacto en el ecosistema microbiano del huésped, el cuál es esencial para la protección de las mucosas del huésped. El efecto citotóxico de estos tratamientos lleva a un estado de inmunosupresión adicional, lo que implica episodios febriles de neutropenia e infecciones potenciales de la sangre. El uso de antibióticos profilácticos o de tratamiento rompe el balance del microbioma intestinal. Los resultados de la quimioterapia en la salud gastrointestinal por cambios en la ecología microbiana incluyen: vómito, diarrea, constipación e infecciones por *Clostridium difficile* asociada a diarrea. En distintos grados, los niños y los adolescentes que sobreviven después del tratamiento con cáncer experimentan resultados adversos en el crecimiento y desarrollo, funciones de los órganos, fertilidad y reproducción, así como daños psicológicos. El crecimiento de la población de sobrevivientes de cáncer pediátrico refleja un grupo elevado de individuos vulnerables que probablemente experimentarán resultados adversos en la calidad de vida durante el transcurso de su vida; como resultado del tratamiento contra cáncer. Como ya se ha mencionado anteriormente, hay evidencia que va en aumento la cual indica que la composición gastrointestinal la microbiota puede afectar y es modulada por el sistema inmune de las personas. Los microbiomas perturbados han sido asociados con competencia inmune deficiente, cambios metabólicos como obesidad y mal nutrición, susceptibilidad a infecciones gastrointestinales y síndromes inflamatorios. Igualmente, muchos estudios del microbioma han examinado el impacto de los antibióticos en la microbiota de los individuos utilizando secuencias genéticas 16s rRNA o combinado con meta transcritos. Estos estudios han demostrado que la administración de antibióticos puede perturbar la microflora temporalmente y en algunos casos de manera permanente. La alteración del microbioma intestinal puede convertir todo el perfil metabólico global a favor de la germinación y crecimiento de *Clostridium difficile*. Además, los quimioterapéuticos tienen un efecto en la composición de la microbiota intestinal. A pesar de la información que ya se tiene, hay un entendimiento limitado de la composición del microbioma gastrointestinal en pacientes pediátricos y adolescentes con leucemia y el impacto de los tratamientos (Rajagopala *et al.*, 2016).

Se han realizado estudios en los que se han estudiado las poblaciones de bacterias en pacientes pediátricos con LLA, en los cuales se ha visto que predominan los géneros *Bacteroides*, *Prevotella* y *Faecalibacterium*; tanto en pacientes pediátricos con LLA y niños controles sanos; ambos grupos de estudio comparten muchos géneros en común, pero la diversidad de la microbiota en el grupo de pacientes es significativamente más baja que en el grupo control (Figura 2). Los géneros bacterianos *Lachnospiraceae* y *Roseburia* (bacteria productora de butirato, el cuál juega un papel importante como fuente de energía en células epiteliales y el mantenimiento del homeostasis del colon) se encontraron notablemente disminuidos en los pacientes con LLA lo cual pueden incrementar el riesgo de desarrollar mucositis por quimioterapia y otras complicaciones gastrointestinales. Los cambios observados en la microbiota son el resultado de diversos factores incluyendo una influencia directa de los componentes terapéuticos en la microbiota intestinal y un efecto indirecto de la quimioterapia en el sistema inmune el cual afecta a la microbiota (Rajagopala *et al.*, 2016).



**Figura 2.** Géneros bacterianos más abundantes, encontrados de manera diferencial en pacientes pediátricos con LLA y controles sanos (Rajagopala *et al.*, 2016).

#### 5.2.4 Estudios del viroma intestinal

Los seres humanos son colonizados por una inmensa población viral, de la cual se sabe por estudios metagenómicos que en su mayoría es única para cada individuo. Minot y su grupo de estudio, en el 2013, investigaron el origen y la evolución del viroma intestinal humano, analizando la comunidad viral de un individuo durante 2.5 años por secuenciación metagenómica profunda (56 billones de bases de secuencias virales purificadas de 24 muestras de materia fecal). Se encontraron en su mayoría genomas de bacteriófagos no estudiados. El 80% de estos bacteriófagos persistieron a lo largo de los 2.5 años de duración del estudio, indicando estabilidad global a largo plazo. Entre los distintos tipos virales variaron los mecanismos de sustitución de bases, las tasas de acumulación y la cantidad de variación. Los fagos temperados mostraron tasas de mutación relativamente menores, consistente con la replicación por ADN polimerasas en el estado de profago integrado. En contraste la familia *Microviridae* que son bacteriófagos líticos con un genoma de ADN circular de una sola cadena, mostraron tasas de sustitución altas ( $>10^{-5}$  por nucleótido cada día), así que esa divergencia en la secuencia durante el periodo de 2.5 años acercó los valores suficientes para distinguir nuevas especies virales. En este estudio se infirió que la diversidad extrema de la comunidad viral intestinal entre cada individuo proviene de dos fuentes: la persistencia de una proporción pequeña del viroma global dentro de intestino de cada individuo y la rápida evolución de algunos miembros del viroma a largo plazo (Minot *et al.*, 2013).

#### **5.2.4.1 Viroma intestinal en los primeros años de vida**

Se han realizado estudios en niños para conocer la dinámica del viroma intestinal en los primeros años de vida, pues los primeros años son importantes en el desarrollo e influencia de la salud en la vida adulta. Se conoce bien como se establece la microbiota bacteriana después del nacimiento, sin embargo, se conoce poco sobre cómo se establece el viroma. Lim y su grupo de investigación, realizaron una investigación para conocer la dinámica del viroma en los primeros dos años de vida; los virus de ARN que se encontraron con mayor frecuencia en las muestras de materia fecal fueron *Enterovirus*, *Parechovirus*, *Tombamovirus* y *Sapovirus*, además se encontraron con mayor frecuencia bacteriófagos que virus de eucariontes de ARN y ADN. En este estudio también se encontró que la composición del viroma era más parecida entre gemelos que niños sin relación alguna, además observaron que la población de virus eucariontes era pobre en los primeros meses de vida e incrementa después, sugiriendo que esta población se establece por el contacto con el ambiente. Los virus de ADN que se encontraron con mayor frecuencia fueron *Anellovirus* los cuales incrementan de manera significativa entre los 6 a 12 meses de edad. En contraste con el viroma eucarionte la riqueza de bacteriófagos fue mayor en los primeros meses de vida e iba decreciendo con la edad. Los bacteriófagos más abundantes que se encontraron fueron del orden *Caudovirus* (Familias: *Siphoviridae*, *Inoviridae*, *Myoviridae* y *Podoviridae*) y la familia *Microviridae*. Al examinar las tendencias a lo largo del tiempo encontraron que la microbiota de los niños en los primeros años de vida, cambia de una diversidad alta en bacteriófagos y baja diversidad de bacterias a una diversidad baja de bacteriófagos y alta diversidad bacteriana a los 24 meses de vida (Lim *et al.*, 2015) Los factores que pueden influenciar la composición del viroma intestinal en niños se relacionan con las diferencias en la forma de nacimiento (cesárea o parto natural), la dieta (leche materna o fórmula), circunstancias que condicionan a un estado de mal nutrición, la edad, entre otros que aún no han sido completamente dilucidados (Carding, Davis, y Hoyles, 2017).

#### **5.2.4.2 Viroma intestinal y los cambios relacionados con el tipo de dieta**

Se han investigado también los cambios del viroma en relación a la dieta, Minot y su grupo de investigación realizaron un estudio con sujetos sanos a los que se les realizó una intervención en el tipo de dieta que consumieron (alta en grasa/baja en fibra, baja en grasa/alta en fibra y de libre consumo), observaron que los viromas permanecieron estables en cada individuo y la variación interpersonal fue la fuente de variación más grande, incluso cuando los individuos estuvieron sometidos a la misma dieta, esto otorga la noción de que la población de fagos son adquiridos diariamente en un periodo de tiempo prolongado porque los individuos que llevaron la misma dieta no convergieron en viromas similares (Minot *et al.*, 2011).

#### 5.2.4.3 Diferencias en el viroma intestinal entre cohabitantes

Se sabe que la mayoría de los virus de la microbiota son bacteriófagos, virus que infectan bacterias, con las que establecen relaciones antagonicas o mutualistas. Estudios del viroma han demostrado que estos bacteriófagos llevan numerosas funciones genéticas que incluyen degradación del complemento y de inmunoglobulinas y unión de plaquetas entre otras que otorgan beneficios al huésped. Los bacteriófagos del microbioma pueden ser persistentes y se pueden compartir entre personas por contacto directo. Ly y su grupo de investigación realizaron un estudio de cohorte, en el que se tomó muestra de materia fecal y saliva de 20 sujetos sin relación genética entre ellos, para discernir si los miembros virales del microbioma pueden ser transmitidos entre personas como resultado del contacto directo. En este estudio se demostró que numerosos virus del intestino y de la cavidad bucal son compartidos entre individuos que cohabitan y no están genéticamente relacionados. La mayoría de estos virus fueron bacteriófagos y cada individuo tuvo una ecología viral oral e intestinal diferente a las personas con las que cohabitan a pesar del hecho que muchos bacteriófagos son compartidos. La distribución de los bacteriófagos a lo largo del tiempo entre cohabitantes indica que fueron transmitidos frecuentemente por contacto directo (Ly *et al.*, 2016).

#### 5.2.4.4 Cambios en el viroma intestinal durante la terapia con antibióticos

La terapia con antibióticos puede influenciar la composición del viroma, no modificando directamente a las partículas virales sino afectando a la comunidad procarionte, por ejemplo, se ha observado que en la terapia con quinolonas se induce la producción de la toxina Shiga mediada por profagos en *E. coli*, esto en un modelo murino que llevó finalmente a la muerte de los ratones. En un estudio longitudinal con individuos que recibieron terapia intravenosa a largo plazo contra *Staphylococcus* se vio afectado el viroma oral más que el fecal y no hubo un aumento significativo en los genes de resistencia a antibióticos, por otro lado, se han detectado fagos en muestras de sangre de pacientes sanos y también se han identificado fagos circulantes en muestras de pacientes después de la administración oral de antibióticos a pacientes con infecciones bacterianas, mientras que no se habían detectado estos fagos antes de recibir la terapia (Carding *et al.*, 2017).

Abeles y su grupo de investigación, en 2015 estudiaron la ecología de la comunidad viral en la boca y en la materia fecal y su respuesta a la terapia a largo plazo con antibióticos en un estudio realizado en cuatro adultos y cinco controles, hombres y mujeres de diferentes razas (latina, caucásica, afro-americana y asiática) y edades (25-73 años). En esta investigación se encontraron diferencias significativas entre las comunidades virales de cada parte del cuerpo, con una comunidad viral más heterogénea en la materia fecal comparada con los virus en la saliva, también midieron la diversidad relativa de los virus y encontraron que los viromas orales fueron significativamente más diversos que los viromas en materia fecal (Abeles, Ly, Santiago-Rodríguez, y Pride, 2015).

En el mismo estudio se encontraron cambios característicos en los miembros de la comunidad bacteriana oral y fecal en respuesta a los antibióticos, pero los cambios en la comunidad viral fecal fueron menos distintivos. La mayoría de los virus identificados en ambas superficies corporales fueron bacteriófagos. En la cavidad oral encontraron abundancia de papiloma virus en las personas que estaban tomando antibióticos, lo que sugiere una asociación entre los antibióticos y la producción de papiloma virus. A pesar de la abundancia de papiloma virus identificados, la terapia con antibióticos tuvo un impacto significativo sobre toda la diversidad viral, sin embargo, hubo una expansión aparente del reservorio de genes involucrados en la resistencia a numerosos tipos de antibióticos en el viroma fecal que no fue paralelo en el viroma oral. La aparición de resistencia a los antibióticos en el viroma fecal en respuesta a antibióticos a largo plazo en humanos, sugiere que los virus juegan un rol importante en la resiliencia de las comunidades humanas microbianas a las perturbaciones por antibióticos. Estos autores también caracterizaron las familias de virus identificadas en todos los sujetos, para determinar si existían diferencias entre la cavidad oral y el intestino. Se encontraron virus homólogos de la familia *Caudovirus*, incluyendo *Myoviridae*, *Podoviridae* y *Siphoviridae*. Los *Siphovirus* generalmente tienen estilos de vida temperados y representan la mayoría de las familias de virus identificados. También identificaron virus de ADN de una sola hebra, dentro de los que incluían las familias *Inoviridae* y *Microviridae*. La familia *Microviridae* fue más común en el viroma intestinal, mientras que solo algunos fueron encontrados en la cavidad oral. Dentro de otros virus identificados, presentes en los viromas intestinales y orales estuvieron *Herpesvirus*, *Phycodnavirus*, *Poxvirus*, *Mimivirus* y *Baculovirus* (Abeles *et al.*, 2015).

### 5.2.5 Viroma y su relación con patologías

Hoy en día se tiene un gran interés en estudiar el viroma humano y entender como éste puede contribuir a mantener la salud y en la patogénesis de enfermedades crónicas. El viroma humano es estable y único para cada persona, está dominado principalmente por fagos y se desarrolla después del nacimiento paralelamente a la comunidad de procariontes hasta que se establece durante los primeros años de vida. Infectando ciertas poblaciones de bacterias los fagos pueden alterar la estructura de la microbiota, destruyendo las células del huésped o afectando su fenotipo; lo cual puede llevar a un estado de homeostasis o disbiosis. Algunas alteraciones en el viroma intestinal, caracterizadas por una reducción de la diversidad de microorganismos y alteraciones en la barrera intestinal se han asociado con enfermedades infecciosas y auto inmunes, desórdenes metabólicos y enfermedades cardiovasculares. Un mecanismo que se ha propuesto es la translocación de los virus presentes en la microbiota intestinal a través de la barrera del epitelio, particularmente en situaciones que alteran y aumentan la permeabilidad del mismo. Se sabe que el VIH-1 y algunos Rotavirus pueden escapar del intestino y migrar a los tejidos periféricos, por lo tanto, los pacientes infectados pueden verse afectados por estos mecanismos de translocación y presentar procesos de inflamación sistémica (Carding *et al.*, 2017).

Estudios recientes han demostrado el aumento de la población de bacteriófagos intestinales, que se correlaciona de manera inversa con cambios en la diversidad bacteriana durante la enfermedad inflamatoria del intestino (IBD por sus siglas en inglés, *inflammatory bowel disease*); esto mostró el rol contribuyente del viroma entérico en esta enfermedad y la disbiosis bacteriana, lo cual provee evidencia que el viroma debe ser considerado en estudios del microbioma bacteriano (Handley, 2016).

Algunas infecciones virales han sido asociadas con el inicio del proceso que daña las células  $\beta$  del páncreas y llevan a diabetes tipo I, pero de manera general el rol de los virus permanece sin resolver. En el 2015, Kramná y su grupo de investigación, secuenciaron el viroma intestinal de niños que desarrollaron autoinmunidad temprana contra los islotes del páncreas antes de los dos años de edad y posteriormente desarrollaron diabetes tipo I. El estudio consistió en secuenciar el viroma intestinal en muestras de materia fecal de 19 niños y 19 sujetos de control, recolectadas a los 3, 6 y 9 meses antes del inicio de la auto-inmunidad. Los resultados encontrados por este grupo, sugieren que no hay cambios dramáticos en el viroma intestinal entre los niños que desarrollaron autoinmunidad contra las células de los islotes y los sujetos control. Los virus humanos que se detectaron con mayor frecuencia pertenecen a la familia *Picornavirus*: *Parechovirus* humano y *Enterovirus* humano, que es el candidato viral más estudiado que desarrolla autoinmunidad de los islotes y diabetes tipo 1. Los autores señalan que los virus no humanos merecen estudios posteriores debido a que la población de fagos en este estudio, fue abundante y más estable con el paso del tiempo que los virus humanos (Kramná *et al.*, 2015).

Hariom y su grupo de investigadores, abordaron la hipótesis básica que los virus son una parte importante del mundo microbiano y se encuentran en abundancia en el intestino humano. Este grupo de investigación estudió si el contenido viral tenía alguna correlación con la obesidad en modelos murinos. De manera interesante encontraron que el contenido de ADN y ARN viral en la materia fecal estaba significativamente aumentado en ratones obesos comparado con los ratones con normo peso. También observaron que la concentración de ADN y ARN viral se correlaciona positivamente con el grupo de bacterias *Firmicutes*, el cual está asociado con obesidad y se correlaciona de manera negativamente con los grupos bacterianos *Bacteroides* y *Bifidobacterium* los cuales se sabe están asociados con delgadez. Esto sugiere que la población viral podría tener un rol en la regulación del metabolismo del hospedero y podría impactar en la prevalencia de la obesidad por a través de la alteración de la composición del microbioma intestinal. Estos descubrimientos abrieron una nueva área de investigación que explora el rol de viroma intestinal en la obesidad y en otras enfermedades complejas como diabetes, cáncer, artritis, entre otras, en las que se han observado cambios en la microbiota (Yadav *et al.*, 2016).

Algunas leucemias linfoblásticas agudas (LLA) pueden ser remontadas a un origen prenatal, en donde una infección puede estar involucrada en el primer desarrollo clonal pre-leucemia. El viroma de 95 niños que después desarrollaron LLA fue caracterizado a partir de muestras de sangre de neonatos, utilizando tecnología de secuenciación y comparado con el viroma de 95 controles negativos para LLA. Las secuencias virales identificadas en ambos grupos fueron retrovirus humanos endógenos y fagos de bacterias propiónicas, considerados parte de la flora microbiana normal. También fueron identificados algunos patógenos potenciales de humanos como *Herpesvirus* tipo 6 y Parvovirus B19, pero únicamente en algunas cuantas muestras, tanto de LLA como en los controles. A pesar de que varios candidatos de origen viral fueron identificados por secuenciación masiva, la confirmación posterior por PCR en tiempo real no muestra una diferencia significativa de expresión diferencial de estos virus entre la población con LLA y pacientes sanos. La frecuencia de Herpesvirus 6 en niños con LLA es reportada con la misma frecuencia que en la población general. Hasta antes de este estudio únicamente se habían identificado Adenovirus, en donde se observó una frecuencia aumentada de ADN de Adenovirus en LLA en comparación con los pacientes sanos (Bogdanovic *et al.*, 2016).

## 6. JUSTIFICACIÓN

Es importante comprender los factores que están involucrados en el inicio y la evolución de la LLA, con el fin de aumentar la esperanza de vida, disminuir la incidencia y reducir el gasto que se genera en el sistema de salud. La microbiota intestinal despertó gran interés en la última década a partir de trabajos que la vincularon con diversas patologías, entre ellas el cáncer colorectal. Actualmente no existen muchos estudios que determinen con claridad la relación de la microbiota con el desarrollo de cáncer, aunque ya se ha avanzado en el estudio de estos cambios y ya se sabe que la microbiota modula la inflamación, influye en la estabilidad del genoma de las células del huésped y produce metabolitos que funcionan como inhibidores de las deacetilasas de histonas, de ese modo puede regular epigenéticamente la expresión de genes del huésped; además ciertos metabolitos de las bacterias, como el sulfuro de hidrógeno, especies reactivas de  $O_2$  y los ácidos biliares, han sido involucrados en la carcinogénesis, mutaciones y alteraciones del ADN, proliferación de células epiteliales y formación de criptas aberrantes, en algunos tipos de cáncer. Existe evidencia de que hay diferencias en las poblaciones de la microbiota intestinal, entre sujetos sanos y sujetos que cursan con alguna patología, del mismo modo ya se han encontrado diferencias entre las poblaciones bacterianas de pacientes pediátricos con LLA y controles sanos. Es importante conocer el estado de la microbiota para entender mejor el curso de la LLA y los cambios que se generan en las bacterias y virus intestinales, con esta información se puede coadyuvar al tratamiento de los pacientes, mejorando su estado gastrointestinal, evitando o previniendo los cambios que a su vez pueden predisponer a los pacientes al desarrollo de algunas complicaciones. Finalmente es importante mencionar que aunque ya existen estudios que identificaron cambios en la población de bacterias intestinales en pacientes pediátricos con LLA, este tipo de estudios no se han realizado en una población mexicana, la cual presenta otras características que aquellas en las que ya se realizaron estos hallazgos; todo esto contribuirá a entender mejor las causas que originan la LLA, siendo esta una enfermedad multifactorial y compleja de la cual aún hay mucho por investigar.

## 7. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) el cáncer es la principal causa de muerte en todo el mundo, en 2015 se atribuyeron a esta enfermedad 8.8 millones de defunciones y se prevé que el número de nuevos casos aumente aproximadamente un 70% en los próximos 20 años. A nivel global, solo uno de cada cinco países de ingresos medianos o bajos dispone de los datos necesarios para impulsar políticas de lucha contra la enfermedad. En México se estima que existen anualmente entre 5,000 y 6,000 casos nuevos de cáncer en menores de 18 años; entre los que destacan principalmente las leucemias, que representan el 75-80% del total de los casos; linfomas el 10% y los tumores del sistema nervioso central el 10%. En diferentes partes del mundo, incluida la ciudad de México, la frecuencia de las leucemias agudas se ha incrementado.

Conforme información del Instituto Mexicano del Seguro Social, la ciudad de México presenta una de las tasas de LLA más altas del mundo. En la ciudad de Puebla la leucemia es la primera causa de muerte en niños con cáncer. La LLA era considerada fatal en los niños hasta hace 30 años; hoy, su tasa de sobrevivida a 5 años supera el 70%, lo que implica que la mayoría de los pacientes pueden curarse, sin embargo, la situación es diferente para los niños de los países en desarrollo. Se estima que su sobrevivencia al cáncer es entre 10% y 20% menor que la de aquellos en su misma situación en países desarrollados. En una nación con pocos recursos para la atención médica y que no puede garantizar una sobrevivida elevada en enfermedades como el cáncer, se considera una prioridad instrumentar medidas preventivas específicas que puedan disminuir los casos de esta enfermedad. No hay una única causa conocida para todos los distintos tipos de leucemia que existen. Las causas conocidas, que no son factores intrínsecos de la persona, representan relativamente pocos casos. Cada leucemia distinta puede tener varias causas diferentes.

Así como se han encontrado diferencias en la población bacteriana de la microbiota intestinal en pacientes que cursan con ciertas patologías al compararlos con sujetos sanos; y también se sabe que existen diferencias en la población viral de la microbiota intestinal influenciada por diversos factores como el entorno, la dieta y enfermedades; resulta importante resolver la pregunta de investigación: ¿Existen diferencias en la población bacteriana y viral intestinal en un paciente pediátrico con LLA y un niño sano?, la cual será de utilidad para comprender mejor el papel de la microbiota intestinal en la LLA que se presenta en edad pediátrica y específicamente conocer las diferencias en la expresión genómica de algunos virus y bacterias intestinales.

## **8. HIPÓTESIS**

Se encontrarán diferencias en la concentración del material genético (ADN y ARN total y viral) y en la expresión genómica de bacterias y virus intestinales, en pacientes pediátricos con leucemia linfoblástica aguda al compararlos con una población pediátrica sana.

## **9. OBJETIVOS**

### **9.1 Objetivo general**

Identificar diferencias en la expresión de bacterias y virus intestinales en pacientes pediátricos con leucemia linfoblástica aguda al compararlos con una población pediátrica sana.

### **9.2 Objetivos particulares**

1. Determinar, mediante una revisión en la literatura, las bacterias y los virus que se buscarán en heces de pacientes pediátricos con leucemia linfoblástica aguda y controles sanos.
2. Cuantificar el contenido de ADN y ARN, total y viral en heces de pacientes pediátricos con leucemia linfoblástica aguda y controles sanos.
3. Identificar por PCR en tiempo real, la expresión génica de las bacterias y virus seleccionados, en las muestras de heces de pacientes pediátricos con leucemia linfoblástica aguda y controles sanos.
4. Analizar estadísticamente los datos obtenidos mediante los cuestionarios y los experimentos comparando ambos grupos de estudio.

## **10. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **10.1 TIPO Y DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN**

**10.1.1 Tipo de estudio:** descriptivo, observacional, transversal, prospectivo.

#### **10.1.2 Características del estudio**

- ✓ Asignación de la exposición: no aplica.
- ✓ Por su objetivo: descriptivo.
- ✓ Por la recolección de los datos: retrolectivo.
- ✓ Por la asignación del agente: examen.
- ✓ Por su temporalidad: transversal.
- ✓ Por los componentes del grupo: heterodémico.

### **10.2 DEFINICIÓN DEL UNIVERSO DE TRABAJO**

#### **10.2.1 Población fuente**

Población mexicana, proveniente de la ciudad de Puebla y sus alrededores, en edad pediátrica, comprendida entre 0 y 18 años, ambos sexos.

#### **10.2.2 Población elegible**

Población mexicana proveniente de la ciudad de Puebla y sus alrededores, en edad pediátrica, comprendida entre 0-18 años, ambos sexos, que padezcan leucemia linfoblástica aguda (LLA), beneficiarios de la asociación Una Nueva Esperanza (UNE) y el Hospital Infantil de Tlaxcala (HIT). En el caso de los controles sanos, población mexicana proveniente de la ciudad de Puebla y sus alrededores (incluyendo población sana de Tlaxcala), en edad pediátrica, comprendida entre 0 y 18 años, ambos sexos, que cumplieron con los criterios de selección.

### **10.3 DEFINICIÓN DEL GRUPO DE OBSERVACIÓN Y DEL GRUPO CONTROL**

#### **10.3.1 Criterios de inclusión**

Población en edad pediátrica, en el rango de edad de 0 a 18 años. El grupo de pacientes con cáncer (LLA) fueron beneficiarios del albergue UNE y el HIT; los niños sanos (controles) debieron cumplir con el requisito de edad y no padecer la patología en estudio (LLA) (Tabla 2).

**Tabla 2.** Criterios de inclusión del estudio.

<b>Criterios de inclusión</b>	
<i>Grupo de pacientes con LLA</i>	<i>Grupo de controles sanos</i>
Población pediátrica (0-18 años).	Población pediátrica (0-18 años).
Provenientes de Puebla y alrededores.	Provenientes de Puebla y alrededores.
Beneficiarios de Una Nueva Esperanza y el Hospital Infantil de Tlaxcala (beneficiarios de UNE).	Familiares (hermanos) de los beneficiarios de Una Nueva Esperanza y el Hospital Infantil de Tlaxcala. Población pediátrica, aparentemente sana, elegidos de forma aleatoria.
Ambos sexos.	Ambos sexos.
Pacientes con LLA que ya estén recibiendo quimioterapia.	Población pediátrica que no tenga síntomas clínicos o diagnóstico de LLA.
Consentimiento informado y carta de asentimiento por escrito.	Consentimiento informado y carta de asentimiento por escrito.

### 10.3.2 Criterios de exclusión

Se eliminaron como candidatos a aquellos pacientes o niños sanos que aun cumpliendo las características mencionadas en el apartado anterior estuvieran recibiendo tratamiento antimicrobiano de algún tipo (antibacteriano, antiviral o antifúngico) (Tabla 3).

**Tabla 3.** Criterios de exclusión del estudio.

<b>Criterios de exclusión</b>	
<i>Grupo de pacientes con LLA</i>	<i>Grupo de controles sanos</i>
Pacientes con infección sistémica, que estén recibiendo tratamiento de tipo antibacteriano, antiviral o antifúngico.	Controles con infección sistémica, que estén recibiendo tratamiento de tipo antibacteriano, antiviral o antifúngico.

### 10.3.3 Criterios de eliminación

Pacientes o controles sanos que decidieron no continuar en el estudio, aun cuando se recolectara la muestra, esta debió ser eliminada del estudio.

## 10.4 ESTRATEGIA DE MUESTREO

### 10.4.1 Cálculo del tamaño de la muestra

El tamaño de la muestra de este estudio se basó en el recurso disponible para la investigación. Se recolectaron 15 muestras para cada grupo de estudio (15 controles sanos y 15 pacientes con tratamiento) en base al número de extracciones que se podían realizar con cada uno de los kits (50 columnas de extracción en cada uno de los kits).

### 10.4.2 Tipo de muestreo

Se llevará a cabo un muestreo a conveniencia, pues la selección de los elementos no dependerá de la probabilidad, sino de causas relacionadas con las características de la investigación, el lugar de estudio y los recursos económicos disponibles para la investigación.

## 10.5 DEFINICIÓN DE VARIABLES Y ESCALAS DE MEDICIÓN

### 10.5.1 Definición conceptual

- Concentración de ADN/ARN total y viral: concentración de ácidos nucleicos (obtenidos a partir de extracciones químicas) expresada en ng/ $\mu$ L y  $\mu$ g/gr de heces, se obtiene a partir de mediciones por espectroscopia a 260 nm empleando el equipo de medición QIAxpert de la marca Qiagen®.
- Expresión génica de virus y bacterias: valor resultante del análisis del Ct (número del ciclo de PCR en el cual se comienza la amplificación de un gen específico de virus o bacterias, empleando los primers seleccionados) y por medio del análisis de  $\Delta$ Ct y  $2^{\Delta\Delta$ Ct.
- Edad: tiempo de vida de los participantes del estudio expresada en años.
- Talla: altura de los participantes del estudio expresada en metros (m).
- Peso: masa corporal de los participantes del estudio expresada en kilogramos (kg).
- Género: condición orgánica que distingue al macho de la hembra.
- Tiempo transcurrido desde el diagnóstico: periodo desde que el paciente recibió un diagnóstico confirmatorio de LLA, expresado en años.
- Tiempo que ha recibido quimioterapia: periodo transcurrido desde que el paciente comenzó a recibir un tratamiento de quimioterapia, expresado en años.
- Ingesta de otros medicamentos: los pacientes o controles reciben algún tratamiento farmacológico no incluido dentro del esquema de quimioterapia (cuando aplica) (SI/NO).
- Antecedentes familiares de cáncer: los pacientes o controles tienen algún familiar directo que padezca o haya padecido algún tipo de cáncer (SI/NO).
- Toma probióticos: los pacientes o controles ingieren regularmente algún alimento probiótico (SI/NO).
- Enfermedades virales: los pacientes o controles han tenido o cursan actualmente con alguna infección viral (herpes, VIH, CMV, virus del papiloma, etc.) (SI/NO).
- Exposición a humo de tabaco: los pacientes o controles han estado expuestos por periodos prolongados al humo del tabaco como fumadores pasivos o activos (SI/NO).
- Alergias, atopia o intolerancia a alimentos/medicamentos: los pacientes o controles presentan alguna alergia, atopia o intolerancia a ciertos alimentos o medicamentos (SI/NO).
- Número de comidas al día: comidas que realizan los pacientes o controles durante un día expresada en números enteros.
- Hábitos de alimentación: número de días a la semana que los pacientes o controles ingieren el listado de alimentos que se presenta a continuación: fruta, verdura, carne roja, carne blanca, lácteos, embutidos, productos ahumados, productos procesados o en bolsa, productos enlatados, huevo, cereales y leguminosas; se expresa en números enteros (0-7).
- Litros de agua al día: litros de agua que el paciente o los controles toman durante un día.

- Enfermedades diarreicas: el paciente o los controles presentan diarrea (alteración intestinal que se caracteriza por la mayor frecuencia, fluidez y a menudo, volumen de las deposiciones) en el momento de la recolección de la muestra o un mes antes de la toma de muestra (SI/NO).
- Estreñimiento: los pacientes o controles sufren de estreñimiento (alteración del intestino que consiste en una excesiva retención de agua en el intestino grueso y el consiguiente endurecimiento de las heces, por lo cual se hace muy difícil su expulsión) (SI/NO).
- Número de evacuaciones: número de deposiciones durante un día, expresada en números enteros.

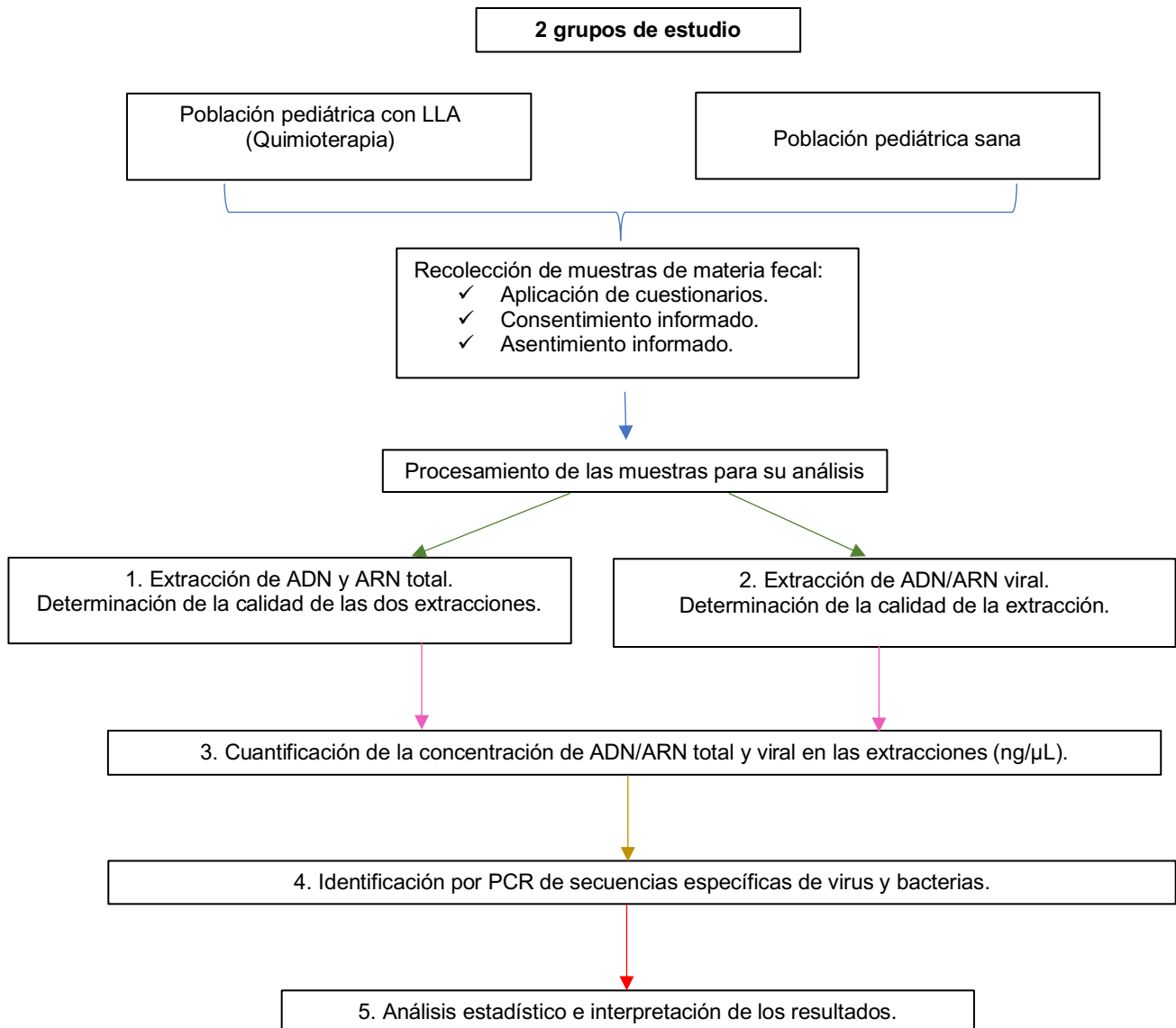
### 10.5.2 Cuadro de operacionalización de variables

**Tabla 4.** Cuadro de variables (definición conceptual y operacional, escala de medición y unidades de medición).

Variable	Tipo de variable Definición conceptual	Definición operacional	Escala de medición	Tipo de variable (dependencia)	Unidades de medición
Concentración de ADN/ARN total y viral	Cuantitativa continua	Espectrofotometría	Razón	Dependiente	ng/ $\mu$ L $\mu$ g/gr de material fecal
Expresión génica	Cuantitativa continua	PCR en tiempo real	Razón	Dependiente	Valor Ct, $\Delta$ Ct y $2^{\Delta\Delta Ct}$
Edad	Cuantitativa Continua	Cuestionario	Razón	Independiente	Años
Talla	Cuantitativa Continua	Cuestionario	Razón	Independiente	Metros (m)
Peso	Cuantitativa Continua	Cuestionario	Razón	Independiente	Kilogramos (kg)
Género	Cualitativa Nominal	Cuestionario	Nominal	Independiente	1: Hombre (H) 2: Mujer (M)
Tiempo transcurrido desde el diagnóstico	Cuantitativa Continua	Cuestionario	Razón	Independiente	Años
Tiempo que ha recibido quimioterapia	Cuantitativa Continua	Cuestionario	Razón	Independiente	Años
Ingesta de otros medicamentos	Cualitativa Nominal	Cuestionario	Nominal	Independiente	1: Si 2: No
Antecedentes familiares de cáncer	Cualitativa Nominal	Cuestionario	Nominal	Independiente	1: Si 2: No
Ingesta de probióticos	Cualitativa Nominal	Cuestionario	Nominal	Independiente	1: Si 2: No
Enfermedades virales	Cualitativa Nominal	Cuestionario	Nominal	Independiente	1: Si 2: No
Exposición a humo de tabaco	Cualitativa Nominal	Cuestionario	Nominal	Independiente	1: Si 2: No
Alergias y/o intolerancia a alimentos y/o medicamentos	Cualitativa Nominal	Cuestionario	Nominal	Independiente	1: Si 2: No
Número de comidas al día	Cuantitativa Discreta	Cuestionario	Razón	Independiente	# comidas/día
Fruta (7/7)	Cuantitativa Discreta	Cuestionario	Razón	Independiente	# frutas/semana

Verdura (7/7)	Cuantitativa Discreta	Cuestionario	Razón	Independiente	# verduras/semana
Carne roja (7/7)	Cuantitativa Discreta	Cuestionario	Razón	Independiente	# carne roja/semana
Carne blanca (7/7)	Cuantitativa Discreta	Cuestionario	Razón	Independiente	# carne blanca/semana
Lácteos (7/7)	Cuantitativa Discreta	Cuestionario	Razón	Independiente	# lácteos/semana
Embutidos (7/7)	Cuantitativa Discreta	Cuestionario	Razón	Independiente	# embutidos/semana
Productos ahumados (7/7)	Cuantitativa Discreta	Cuestionario	Razón	Independiente	# productos ahumados/semana
Productos procesados o en bolsa (7/7)	Cuantitativa Discreta	Cuestionario	Razón	Independiente	# productos procesados/semana
Productos enlatados (7/7)	Cuantitativa Discreta	Cuestionario	Razón	Independiente	# enlatados/semana
Huevo (7/7)	Cuantitativa Discreta	Cuestionario	Razón	Independiente	# huevos/semana
Cereales (7/7)	Cuantitativa Discreta	Cuestionario	Razón	Independiente	# cereales/semana
Leguminosas (7/7)	Cuantitativa Discreta	Cuestionario	Razón	Independiente	# leguminosas/semana
Litros de agua al día	Cuantitativa Continua	Cuestionario	Razón	Independiente	# litros de agua/día
Enfermedades: diarrea	Cualitativa Nominal	Cuestionario	Nominal	Independiente	1: Si 2: No
Estreñimiento	Cualitativa Nominal	Cuestionario	Nominal	Independiente	1: Si 2: No
Evacuaciones	Cuantitativa Discreta	Cuestionario	Razón	Independiente	# evacuaciones/día

## 10.6 MÉTODOS ANALÍTICOS



### 10.6.1 Recolección de las muestras y procesamiento de las heces fecales

La recolección de las muestras de heces fecales se realizó preferentemente por la mañana, se les entregó a los participantes del estudio un frasco de recolección estéril, un abate-lenguas, una etiqueta para identificar las muestras y una bolsa de plástico con cierre hermético para colocar el frasco una vez que se tuviera lista la muestra. Previo a la recolección de las heces, se les explicó mediante un instructivo y un diagrama (Anexo 17.3 y 17.3.1) la manera correcta de recolectar la muestra. Todos los participantes llenaron previamente el consentimiento y asentimiento informado y se les aplicó un cuestionario de recolección de información que complementó la investigación (Anexo 17.2).

La muestra de heces fue transportada al laboratorio del CIO en frío, lo más pronto posible; al llegar al laboratorio, se realizaron las extracciones del material genético ADN y ARN total y viral, empleando los kits de extracción correspondientes (kit de extracción de ADN total: QIAamp DNA Stool Mini Kit de Qiagen®, kit de extracción de ARN total: RNeasy Mini Kit de Qiagen® (técnica modificada) y kit de extracción de material genético viral: Allprep PowerViral DNA/RNA Kit de Qiagen®). Una vez que se realizaron las extracciones, las muestras se almacenaron a -20 °C; también se guardó una porción de la muestra (un gramo de heces frescas y un gramo de heces con un mililitro del conservador de ARN: RNA later de Qiagen®) a -80 °C, para futuras referencias y/o extracciones. El resto del material biológico fue desechado de manera adecuada, siguiendo el protocolo establecido en el laboratorio y las normas oficiales sobre disposición de Residuos Peligrosos Biológicos Infecciosos (RPBI).

#### **10.6.1.1 Extracción de ADN total de las heces**

La extracción de ADN total se realizó con el kit QIAamp DNA Stool Mini Kit de Qiagen® (Lote 157053079, REF 51504) (Figura 3), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para cada una de las extracciones de pacientes y controles, se pesaron 0.22 gramos de heces (220 mg) en un tubo estéril de 2 mL. En el caso de muestras congeladas, se tuvo cuidado de no descongelar la muestra hasta añadir el buffer ASL (provisto con el kit) para lisar la muestra, pues se puede degradar el ADN. Después de agregar el buffer ASL, todos los pasos siguientes se realizaron a temperatura ambiente. Se agregaron 1.4 mL de buffer ASL a cada muestra de heces, se mezcló en vórtex continuamente por 1 minuto o hasta que la muestra estuviera homogenizada. Se calentó la suspensión 5 minutos a 70 °C y posteriormente se mezcló con vórtex por 15 segundos, seguido de una centrifugación a máxima velocidad (20,000 g o 14,000 rpm), para obtener la pastilla de heces. Se transfirieron 1.2 mL del sobrenadante a un tubo nuevo de 2 mL (se desechó la pastilla) y se añadió una tableta de “Inhibit Ex” (provista con el kit), se mezcló inmediata y continuamente por un minuto o hasta que la tableta estuviera completamente resuspendida. Se incubó la suspensión por 1 minuto a temperatura ambiente, para permitir que los inhibidores se absorbieran a la matriz de la tableta; una vez concluido el tiempo, se centrifugó la muestra a máxima velocidad (20,000 g o 14,000 rpm) por 3 minutos, para obtener la pastilla de los inhibidores que se unieron a la matriz; se transfirió todo el sobrenadante en un tubo nuevo de 1.5 mL y se desechó la pastilla, se centrifugó nuevamente la muestra a máxima velocidad (20,000 g o 14,000 rpm) por 3 minutos; por otro lado, se transfirieron 15 µL de proteinasa K (provista con el kit) en un tubo nuevo de 1.5 mL y se transfirieron 200 µL del último sobrenadante, se añadieron 200 µL de buffer AL (provisto con el kit) y se mezcló con vórtex por 15 segundos; esta mezcla se incubó a 70 °C por 10 minutos. Una vez que finalizó la incubación, se añadieron 200 µL de etanol al 100% (grado biología molecular) al lisado y se mezcló con ayuda del vórtex. Se colocó toda la mezcla (lisado) en una columna nueva (provista con el kit) y se centrifugó a máxima velocidad (20,000 g o 14,000 rpm) por 1 minuto, se desechó el filtrado.

Los últimos dos lavados consistieron en agregar 500  $\mu$ L de buffer AW1 (provisto con el kit), centrifugando a máxima velocidad un minuto y 500  $\mu$ L de buffer AW2 (provisto con el kit) centrifugando a máxima velocidad tres minutos, en este último paso se cambió de tubo colector y se repitió una centrifugación a máxima velocidad por 1 minuto para eliminar los restos de buffer AW2. Finalmente se cambió la columna a un tubo nuevo de 1.5 mL y se transfirieron 100  $\mu$ L de buffer AE (provisto con el kit) para eluir el ADN de la columna; se incubó por 1 minuto y se centrifugó 1 minuto a máxima velocidad. Las extracciones que se realizaron con este procedimiento, favorecieron la obtención de ADN proveniente de bacterias, parásitos y virus (ADN no humano). El ADN se almacenó a -20 °C hasta su uso posterior.



**Figura 3.** Componentes del kit de extracción de ADN total QIAamp DNA Stool Mini Kit de Qiagen®.

#### 10.6.1.2 Extracción de ARN total de las heces

La extracción de ARN total se realizó con el kit RNeasy Mini Kit de Qiagen® (Lote 154044728, REF 74106) (Figura 4) siguiendo las instrucciones del fabricante y modificando la técnica para poder extraer el material genético de las heces (Vemulapalli, Gulani, y Santrich, 2009). En la primera parte de la técnica se hizo una suspensión de heces al 20% peso-volumen (w/v) en agua libre de nucleasas (se pesaron 0.20 gr de heces y se agregó 1 mL de agua DEPC), se tomaron 250  $\mu$ L de la suspensión de heces y se transfirieron a un tubo de 1.5 mL, con 750  $\mu$ L de Trizol (mezclando fuertemente con ayuda de vórtex por 15 segundos), se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos y se agregaron 200  $\mu$ L de cloroformo (se mezcló brevemente con ayuda de vórtex). Posteriormente, se incubó esta mezcla por tres minutos a temperatura ambiente y se centrifugó el tubo a 12,000 g por 10 minutos, se transfirieron 600  $\mu$ L de la fase acuosa a un tubo nuevo que contenía 600  $\mu$ L de etanol al 70% y se mezcló por inversión. Se transfirió el contenido completo del tubo (600  $\mu$ L cada vez) por las columnas del kit RNeasy Mini Kit y se continuó con la segunda parte de la técnica siguiendo el protocolo del fabricante Qiagen®. En la segunda parte se centrifugó la columna por 15 segundos a  $\geq 8000 \times g$  y se desecharon los filtrados.

Una vez que se terminó de pasar la mezcla por la columna, se añadieron 700  $\mu\text{L}$  del buffer RW1 (provisto con el kit) a la columna, se centrifugó por 15 segundos a  $\geq 8000 \times g$  y se desechó el filtrado; posteriormente, se añadieron 500  $\mu\text{L}$  de buffer RPE (provisto con el kit) a la columna, se cerró la tapa y se centrifugó por 15 segundos a  $\geq 8000 \times g$ , se desechó el filtrado. Se añadieron 500  $\mu\text{L}$  de buffer RPE a la columna y se centrifugó por 2 minutos a  $\geq 8000 \times g$ . Por último, se colocó la columna en un tubo colector nuevo de 2 mL y se centrifugó a máxima velocidad por 1 minuto para secar la membrana; se colocó la columna en un tubo nuevo de 1.5 mL; se añadieron 50  $\mu\text{L}$  de agua libre de RNasas directamente en la membrana de la columna y se dejó incubando por 1 minuto, se centrifugó la columna por 1 minuto a  $\geq 8000 \times g$  para eluir el ARN. Se repitió el paso anterior con el filtrado (pues se requería mayor concentración de ARN). El ARN se almacenó a  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  hasta su uso posterior.



**Figura 4.** Componentes del kit de extracción de ARN total: RNeasy Mini Kit de Qiagen®.

#### 10.6.1.3 Extracción de ADN y ARN viral de las heces

La extracción de ADN y ARN viral se realizó con el kit Allprep PowerViral DNA/RNA de Qiagen® (Lote 157018039, REF. 28000-50) (Figura 5a), siguiendo las instrucciones del fabricante. Antes de comenzar el procedimiento, se calentó la solución PM1 (provista con el kit) a  $55 \text{ }^\circ\text{C}$  por 10 minutos para disolver los precipitados y se mezcló antes de usar. Para hacer el aislamiento de ARN se añadió  $\beta$ -mercaptoetanol ( $\beta$ -ME) a la solución PM1 para producir una solución de mezcla PM1/ $\beta$ -ME con una concentración final de  $\beta$ -ME de  $10 \mu\text{L}/\text{mL}$ . La solución PM1/ $\beta$ -ME pierde su efectividad con el paso del tiempo, así que se preparó un lote nuevo cada vez que se utilizó el kit. Se requieren 600  $\mu\text{L}$  de la solución mezcla PM1/ $\beta$ -ME por cada corrida. Para hacer esta extracción se empleó un adaptador para el vórtex (vórtex Genie 2: adaptador para 24 tubos Qiagen®, Cat. No.13000-V1-24) (Figura 5b), el cual permitió llevar a cabo una homogenización completa de la muestra de heces por medio de los tubos con cuentas (“PowerBead”) que provee el kit.

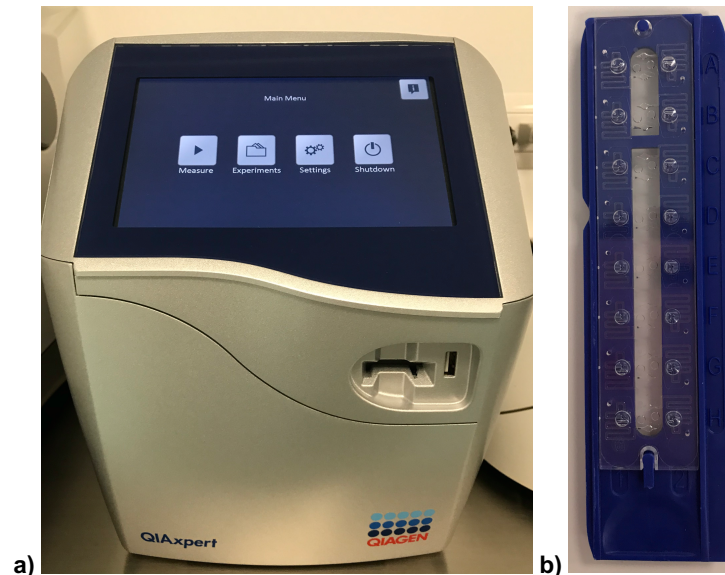
Se pesaron 0.25 gramos de heces (250 mg) dentro del tubo de vidrio “PowerBead” con cuentas de 0.1 mm y se agregaron 600  $\mu$ L de la solución mezcla PM1/ $\beta$ -ME al tubo, para realizar la extracción de ARN y ADN viral simultáneamente; se aseguraron los tubos con cuentas horizontalmente al adaptador del vórtex (las tapas de los tubos debían estar apuntando hacia el centro del adaptador del vórtex) y se mezclaron a máxima velocidad por 10 minutos. Posteriormente, se centrifugó el homogenizado de heces a 13,000 x g por 1 minuto a temperatura ambiente, se transfirió el sobrenadante a un tubo colector limpio de 2 mL y se añadieron 150  $\mu$ L de la solución IRS (provista con el kit); se mezcló brevemente y se incubó a 4 °C por 5 minutos; pasado el tiempo de incubación, se centrifugaron los tubos a 13,000 x g por 1 minuto y evitando la pastilla, se transfirió el sobrenadante a un tubo limpio de 2.2 mL (no más de 700  $\mu$ L), se añadieron 600  $\mu$ L de cada solución PM3 y PM4 (provistas con el kit) respectivamente y se mezcló brevemente con ayuda de vórtex. Se cargaron 625  $\mu$ L del sobrenadante a una columna “MB Spin” (provista con el kit) y se centrifugó a 13,000 x g por 1 minuto, se desechó el filtrado y se repitió el procedimiento hasta que todo el sobrenadante hubiera sido cargado en la columna. Se añadieron a la columna 600  $\mu$ L de la solución PM5 (provista con el kit) y se centrifugó a 13,000 x g por 1 minuto (se desechó el filtrado), se añadieron 600  $\mu$ L de la solución PM4 y se centrifugó a 13,000 x g por 1 minuto (se desechó el filtrado) y la columna se centrifugó a 13,000 x g por 2 minutos para eliminar los residuos de la solución PM4. Finalmente se colocó la columna “MB Spin” dentro de un tubo colector limpio de 2 mL (provisto con el kit) para recolectar el filtrado final y se agregaron 50  $\mu$ L de agua libre de RNAsas (provista con el kit) al centro de la membrana blanca de la columna, se incubó por al menos 1 minuto; al finalizar el tiempo se centrifugó la columna a 13,000 x g por 1 minuto para obtener el filtrado de ácidos nucleicos virales. Se desechó la columna “MB Spin” y el ADN/ARN viral fue almacenado a -20 °C hasta su uso.



**Figura 5. a)** Componentes del kit de extracción de ADN y ARN viral: Allprep PowerViral DNA/RNA de Qiagen® **b)** Adaptador para vórtex (24 tubos).

### 10.6.2 Cuantificación y determinación de la calidad de las extracciones

Se determinó la concentración de ADN y ARN total y viral en las extracciones correspondientes, por medio de espectrofotometría, empleando el equipo: QIAxpert de Qiagen® (Figura 6) (se utilizaron 3 µL del filtrado final para cada determinación y el buffer de elución que proporciona cada kit como blanco). Para determinar la calidad de las extracciones se tomó en cuenta el ratio de absorbancias 260/280, el cual se emplea para asegurar la pureza y calidad de ADN y ARN, un ratio aproximado de 1.8 es generalmente aceptado para asegurar que se tiene un ADN puro; un ratio aproximado de 2.0 es generalmente aceptado para asegurar que se tiene un ARN puro. Si el ratio es apreciablemente bajo en cada caso puede indicar la presencia de contaminantes como proteínas, fenol u otros que absorben cerca de 280 nm. Como una medida secundaria de la pureza de las extracciones se tomó en cuenta el ratio 260/230, los cuales tiene valores superiores que los correspondientes al ratio 260/280; los valores de este segundo ratio están alrededor de 2.0- 2.2, si el rango es apreciablemente más bajo que lo esperado puede indicar la presencia de contaminantes que absorben a 230 nm (boletín técnico, Thermo Scientific).



**Figura 6.** a) Equipo espectrofotómetro QIAxpert de Qiagen® para cuantificar ácidos nucleicos b) Laminilla de 16 pozos para efectuar las cuantificaciones en el equipo.

### 10.6.3 Identificación de bacterias y virus por PCR en tiempo real

Para elegir que microorganismos se estudiarían, se realizó una revisión extensa de la literatura (ver resultados 11.1), en dónde se identificaron las bacterias y los virus que se han reportado como miembros constantes y abundantes de la microbiota intestinal. Como primer criterio de selección se eligieron aquellos que en la mayoría de los estudios habían sido excretados e identificados en las heces de las personas, es decir, que fueran miembros constantes de la microbiota intestinal, el segundo criterio fue su relevancia para este estudio y las características de la muestra. A continuación se presentan algunas características relevantes de las bacterias y virus elegidos para este estudio:

***Bacteroides* spp:** es una de las bacterias más abundantes de la microbiota intestinal. Son bacilos anaerobios, gramnegativos, resistentes a la bilis, sacarolíticos, cuyos productos metabólicos finales son el succinato y el acetato, principalmente. En este momento, se incluyen más de veinte especies en el género. Estos microorganismos pueden encontrarse como agentes etiológicos en múltiples infecciones importantes por su morbilidad y mortalidad. La transformación de un microorganismo comensal en uno patógeno puede deberse a la adquisición de genes que codifican para factores de virulencia, como ocurre con *B. fragilis* (Quesada-Gómez, 2010).

***Lachnospiraceae* spp:** familia del orden *Clostridiales*, bacterias abundantes en la microbiota intestinal. Degradan cadenas complejas de polisacáridos a cadenas cortas de ácidos grasos, incluyendo acetato, butirato y propionato, que pueden ser usadas como energía por el hospedero. Esta familia está formada por 24 géneros que comparten una gran similitud en sus secuencias 16S rDNA. En adultos los miembros de esta familia se han asociado a una protección contra infecciones por *C. difficile* y obesidad (Sagheddu, Patrone, Miragoli, y Puglisi, 2016). En pacientes pediátricos con LLA se ha observado una disminución en la abundancia de esta familia, lo cual los puede predisponer a desarrollar complicaciones como mucositis por quimioterapia (Rajagopala *et al.*, 2016).

***Firmicutes* spp:** es una de las filos de bacterias más abundantes de la microbiota intestinal, bacterias gramnegativas, normalmente formadoras de esporas. Este filo bacteriano se ha asociado a una mayor predisposición para desarrollar obesidad (Yadav *et al.*, 2016).

**Torquetenovirus:** es uno de los virus más abundantes del viroma intestinal, forma parte de la familia de *Anellovirus*; poseen la habilidad para producir infecciones crónicas sin manifestaciones clínicas. Por sus características de ubicuidad y resistencia se ha considerado como un modelo ideal para el estudio de la contaminación de aguas con heces humanas (Focosi, Antonelli, Pistello, y Maggi, 2016). Se ha observado que podría tener algún papel en el desarrollo de algunos tipos de cáncer como la LLA (Bogdanovic *et al.*, 2016).

**Fago de *Bacteroides* B40-8:** bacteriófago de ADN de cadena doble, forma parte de la familia *Siphoviridae*; infecta a algunos miembros bacterianos del género *Bacteroides* spp, especialmente a *B. fragilis*. Se tiene poca información acerca de este fago a pesar de que en muchos estudios ya se está considerando como un marcador de contaminación fecal en aguas (Girones, 2018). Resulta interesante el estudio de su expresión genómica si se compara con la dinámica del género bacteriano a la que infecta regularmente (*Bacteroides* spp).

**Enterovirus y Parechovirus:** se han identificado como miembros del viroma intestinal sin asociación directa a enfermedades, estos virus son excretados en la heces de forma regular. Son la causa más común de meningitis aséptica y encefalitis; en niños causan síndromes similares a sepsis. *Enterovirus* puede causar la enfermedad de mano, pies y boca en niños, sin embargo, muchas infecciones son asintomáticas (Noordhoek, Weel, Poelstra, Hooghiemstra, y Brandenburg, 2008).

Una vez elegidos los microorganismos, se prosiguió a buscar en artículos científicos, las secuencias de primers que permitieron identificar a cada uno de estos virus y bacterias. Los criterios de selección de los primers u oligonucleótidos fueron los siguientes: que identificara el virus o bacteria (o familias de estos) que se había elegido por medio de la técnica de PCR en tiempo real, la muestra a partir de la cual se hicieron los experimentos debía ser preferentemente heces, cuando se analizaron en la herramienta del NCBI, BLAST se eligieron los que tuvieran el “e value” menor de todos los primers seleccionados y que no identificara otra especie que no fuera la buscada. La PCR cuantitativa se realizó en el termociclador Rotor Gene Q® de Qiagen (Figura 7) con capacidad de detectar la fluorescencia emitida; a partir de este principio se identificaron las secuencias específicas de los virus y bacterias que se eligieron por su relevancia como miembros de la microbiota intestinal (Tabla 5).



**Figura 7.** Termociclador Rotor Gene Q® de Qiagen (sistema óptico de dos canales de detección: verde  $510 \pm 5$  nm y amarillo  $557 \pm 5$  nm).

Los primers y sondas fueron sintetizados por la empresa T4OLIGO, una vez que se recibieron los primers liofilizados, se resuspendieron en agua libre de RNasas para obtener una concentración de 100 nM, a partir de la cual se hicieron diluciones de trabajo con una concentración final de 20 nM. Las sondas se diluyeron para obtener una concentración final de 50 nM y se realizaron alícuotas diluidas con una concentración de 10 nM, se guardaron en tubos ámbar. Tanto las sondas como los primers se almacenaron a  $-20$  °C hasta su uso (Tabla 5).

**Tabla 5.** Secuencias (5'—3') de primers y sondas empleados para detectar las bacterias y virus seleccionados en este estudio.

<b>BACTERIAS</b>	<b>Gen o región blanco</b>	<b>Secuencia de los primers (5'—3')</b>	<b>Referencia</b>
<i>Bacteroides</i> spp	16S rRNA HF183	<b>Bac-F:</b> ATCATGAGTTCACATGTCCG <b>Bac-R:</b> TACCCGCCTACTATCTAATG	(Seurinck, Defoirdt, Verstraete, y Siciliano, 2005)
<i>Lachnospiraceae</i> spp	16S rRNA	<b>Lac-F:</b> CGGTACCTGACTAAGAAGC <b>Lac-R:</b> AGTTT(C/T) ATTCTTGCGAACG	(Kassinen, Malinen, Krogius, Palva, y Rinttila, 2004)
<i>Firmicutes</i> spp	16S rRNA	<b>Firm934F:</b> GGAGYATGTGGTTTAATTCGAAGCA <b>Firm1060R:</b> AGCTGACGACAACCATGCAC	(X. Guo <i>et al.</i> , 2008)
<b>VIRUS</b>	<b>Gen o región blanco</b>	<b>Secuencia de los primers y sondas (5'—3')</b>	<b>Referencia</b>
Torquetenovirus (TTV)	UTR (del inglés <i>untranslated region</i> )	<b>TTV-F:</b> CGGGTGCCGDAGGTGAGTTTACAC <b>TTV-R:</b> GAGCCTTGCCCATRGCCCGGCCAG	(Haramoto, Kitajima, Katayama, y Ohgaki, 2010)
Fago de <i>Bacteroides</i> B40-8	Proteína putativa de la cola (Banco de genes: ACH81942.1)	<b>B40-8-F:</b> GTTGGTGAGGTTGTTGCTAATG <b>B40-8-R:</b> GTTAGGACACCGCCAGAAATA	Este estudio
<i>Enterovirus</i> (EV)	Región 5'UTR (del inglés <i>untranslated region</i> )	<b>EV-F:</b> CCCCTGAATGCGGCTAAT <b>EV-R:</b> CAATTGTCACCATAAGCAGCCA <b>Sonda: EV-Pr</b> <b>FAMAACACGGACACCCAAAGTAGTCT TAMRA</b>	(Noordhoek <i>et al.</i> , 2008)
<i>Parechovirus</i> (HPeV)	Región 5'UTR (del inglés <i>untranslated region</i> )	<b>HPeV-F:</b> CACTAGTTGTAAGGCCACG <b>HPeV-R:</b> GGCCCCAGATCAGATCC <b>Sonda: HPeV-Pr</b> <b>FAMAGAAGGTACCCGCAGGTAACAAGAGAC TAMRA</b>	(Noordhoek <i>et al.</i> , 2008)
<b>CONTROL INTERNO</b>	<b>Gen o región blanco</b>	<b>Secuencia de los primers (5'—3')</b>	<b>Referencia</b>
Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	<i>Homo sapiens</i> GAPDH	<b>F:</b> ACCCAGAAGACTGTGGATGG <b>R:</b> TTCAGCTCAGGGATGACCTT	(Xu, Wu, Li, y He, 2017)

### 10.6.3.1 Condiciones de PCR para la identificación de bacterias

Todas las PCR de controles y pacientes se estandarizaron para agregar 70 ng de ADN provenientes de la extracción de ADN total, ajustando el volumen de agua libre de RNasas y muestra (4.5 µL de un volumen final de reacción de 10 µL). Por cada reacción de 10 µL se agregaron: 0.25 µL de cada uno de los primers (F: *forward* y R: *reverse*) diluidos a 20 nM, 5 µL del máster mix: *Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X)* y 4.5 µL de la mezcla de agua y ADN.

#### 10.6.3.1.1 *Bacteroides* spp

Las condiciones de amplificación se ejecutaron como lo refieren (Seurinck *et al.*, 2005) (Tabla 6). La fluorescencia que se emite por la amplificación se adquirió en el paso de extensión (canal verde), optimizando la ganancia. Todos los productos de PCR fueron almacenados a -20 °C.

**Tabla 6.** Condiciones de reacción para la PCR en tiempo real que identifica al género *Bacteroides* spp.

Ciclo de la reacción	Temperatura	Tiempo
Hold 1	50 °C	2 minutos
Hold 2	95 °C	10 minutos
<b>40 ciclos</b>		
Desnaturalización	95 °C	30 segundos
Alineamiento	53 °C	60 segundos
Extensión	60 °C	60 segundos

#### 10.6.3.1.2 *Lachnospiraceae* spp

Las condiciones de amplificación se ejecutaron como lo refieren (Kassinen *et al.*, 2004) (Tabla 7). La fluorescencia que se emite por la amplificación se adquirió en el paso de extensión (canal verde), optimizando la ganancia. Todos los productos de PCR fueron almacenados a -20 °C.

**Tabla 7.** Condiciones de reacción para la PCR en tiempo real que identifica a la familia *Lachnospiraceae* spp\*.

Ciclo de la reacción	Temperatura	Tiempo
Hold 1	95 °C	5 minutos
<b>35 ciclos</b>		
Desnaturalización	95 °C	15 segundos
Alineamiento	55 °C	20 segundos
Extensión	72 °C	30 segundos
Hold 2	80 °C	30 segundos

\* El set de primers que se empleó para estudiar la expresión génica de esta familia bacteriana incluyen a los siguientes géneros bacterianos (grupo *C. coccooides*–*E. rectale*) según la base de datos ribosomal (Kassinen *et al.*, 2004):

- *Clostridium*: *Cl. coccooides*, *Cl. proteoclasticum*, *Cl. aminophilum*, *Cl. symbiosum*, *Cl. sphenoides*, *Cl. celerecrecens*, *Cl. aerotolerans*, *Cl. xylanolyticum*, *Cl. clostridiiforme*, *Cl. fusiformis*, *Cl. nexile*, *Cl. oroticum*, *Cl. populeti*, *Cl. aminovalericum*, *Cl. indolis*, *Cl. herbivorans*, *Cl. polysaccharolyticum*,
- *Eubacterium*: *E. xylanophilum*, *E. ruminantium*, *E. saburreum*, *E. fissicatena*, *E. hadrum*, *E. rectale*, *E. ramulus*, *E. contortum*, *E. eligens*, *E. hallii*, *E. formicigenerans*, *E. cellulosolvens*.
- *Ruminococcus*: *R. productus*, *R. obeum*, *R. schinkii*, *R. hydrogenotrophicus*, *R. hansenii*, *R. torques*, *R. lactaris*, *R. gnavus*.
- *Butyrivibrio*: *B. fibrisolvens*, *B. crossotus*, *B. fibrisolvens*.
- *Desulfotomaculum guttoideum*, *Roseburia cecicola*, *Pseudobutyrvibrio ruminis*, *Lachnospira multipara*, *Lachnospira pectinoschiza*, *Acetitomaculum ruminis*, *Catonella morbi*.

#### 10.6.3.1.3 *Firmicutes* spp

Las condiciones de amplificación se ejecutaron como lo refieren (X. Guo *et al.*, 2008) (Tabla 8). La fluorescencia que se emite por la amplificación se adquirió en el paso de alineamiento-extensión (canal verde), optimizando la ganancia. Todos los productos de PCR fueron almacenados a -20 °C.

**Tabla 8.** Condiciones de reacción para la PCR en tiempo real que identifica al filo *Firmicutes* spp.

Ciclo de la reacción	Temperatura	Tiempo
Hold 1	50 °C	2 minutos
Hold 2	95 °C	10 minutos
<b>40 ciclos</b>		
Desnaturalización	95 °C	15 segundos
Alineamiento y extensión	60 °C	60 segundos

### 10.6.3.2 Condiciones de PCR para la identificación de virus

#### 10.6.3.2.1 Torquetenovirus (TTV)

Todas las PCR para Torquetenovirus (TTV) de controles y pacientes se estandarizaron para agregar 70 ng de ADN provenientes de la extracción de ADN total, ajustando el volumen de agua libre de RNasas y muestra (4.5 µL de un volumen final de reacción de 10 µL). Por cada reacción de 10 µL se agregaron: 0.25 µL de cada uno de los primers (F: *forward* y R: *reverse*) diluidos a 20 nM, 5 µL del máster mix: *Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X)* y 4.5 µL de la mezcla de agua y ADN. Las condiciones de amplificación se ejecutaron como lo refieren (Haramoto *et al.*, 2010) (Tabla 9). La fluorescencia que se emite por la amplificación se adquirió en el paso de alineamiento-extensión (canal verde), optimizando la ganancia. Todos los productos de PCR fueron almacenados a -20 °C.

**Tabla 9.** Condiciones de reacción para la PCR en tiempo real que identifica Torquetenovirus (TTV).

Ciclo de la reacción	Temperatura	Tiempo
Hold 1	95 °C	10 minutos
<b>50 ciclos</b>		
Desnaturalización	95 °C	10 segundos
Alineamiento y extensión	62 °C	30 segundos

#### 10.6.3.2.2 Fago de *Bacteroides* (B40-8)

Los primers se diseñaron empleando la herramienta de la página de IDT (por sus siglas en inglés *Integrated DNA Technologies*), la secuencia de referencia (NCBI) a partir de la cual se diseñaron fue NC\_011222.1, que corresponde al genoma completo del fago de *Bacteroides* B40-8 (ID: 99179); una vez que se obtuvieron las secuencias, se analizaron con la herramienta BLAST (por sus siglas en inglés *Basic Local Alignment Search Tool*), obteniendo un “*e value*” de 0.018 para el primer *forward* y 0.071 para el primer *reverse*; finalmente se sintetizaron en la empresa T4OLIGO y se hicieron las pruebas de estandarización de la PCR empleando las siguientes condiciones (Tabla 10):

**Tabla 10.** Condiciones de reacción para la PCR en tiempo real que identifica al fago de *Bacteroides* B40-8.

Ciclo de la reacción	Temperatura	Tiempo
Hold 1	95 °C	10 minutos
<b>40 ciclos</b>		
Desnaturalización	95 °C	15 segundos
Alineamiento	63.35 °C (media de la <i>Tm</i> de los primers, reportada por la empresa T4OLIGO)	30 segundos
Extensión	72 °C	30 segundos

Las pruebas se hicieron con las extracciones de ADN total y cDNA sintetizado. Para la reacción con ADN directo se emplearon 70 ng de ADN provenientes de la extracción de ADN total, ajustando el volumen de agua libre de RNasas y muestra (4.5  $\mu\text{L}$  de un volumen final de reacción de 10  $\mu\text{L}$ ). Por cada reacción de 10  $\mu\text{L}$  se agregaron: 0.25  $\mu\text{L}$  de cada uno de los primers (F: *forward* y R: *reverse*) diluidos a 20 nM, 5  $\mu\text{L}$  del máster mix: *Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X)* y 4.5  $\mu\text{L}$  de la mezcla de agua y ADN. El cDNA se sintetizó a partir de la extracción de ADN/ARN viral (síntesis de cDNA empleando el kit de Thermo scientific: *Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR* con 4  $\mu\text{L}$  de buffer, 2  $\mu\text{L}$  de enzima y se ajustaron 14  $\mu\text{L}$  de agua y ARN según la cantidad a agregar: 250 ng de ARN; con las condiciones de temperatura: 25 °C por 10 minutos, 50 °C por 30 minutos y 85 °C por 5 minutos). Una vez sintetizado el cDNA, se agregaron las mismas concentraciones de primers (0.25  $\mu\text{L}$  de cada uno) y máster mix (5  $\mu\text{L}$ ) que se emplearon con la reacción de ADN total, más agua (3.5  $\mu\text{L}$ ) y cDNA (1  $\mu\text{L}$ ) por cada reacción.

#### 10.6.3.2.3 *Enterovirus* y *Parechovirus*

Para realizar las pruebas de estandarización de la PCR para *Enterovirus* y *Parechovirus* se sintetizó cDNA a partir del ARN de la extracción de ácidos nucleicos virales, ajustando a 250 ng de material genético, empleando el kit de Thermo scientific: *Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR* con 4  $\mu\text{L}$  de buffer, 2  $\mu\text{L}$  de enzima y se ajustaron 14  $\mu\text{L}$  de agua y ARN según la cantidad a agregar. Las condiciones de temperatura del termociclador: 25 °C por 10 minutos, 50 °C por 30 minutos y 85 °C por 5 minutos. Una vez sintetizado el cDNA, para cada reacción de 10  $\mu\text{L}$  se agregaron: 0.25  $\mu\text{L}$  de cada uno de los primers (F: *forward* y R: *reverse*) diluidos a 20 nM, 5  $\mu\text{L}$  del máster mix: *Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X)* y 4.5  $\mu\text{L}$  de la mezcla de agua y cDNA (3.5  $\mu\text{L}$  de agua y 1  $\mu\text{L}$  de cDNA). Las condiciones de amplificación se ejecutaron como lo refieren (Noordhoek *et al.*, 2008) (Tabla 11). La fluorescencia que se emite por la amplificación se adquirió en el paso de extensión (canal verde), optimizando la ganancia. Todos los productos de PCR fueron almacenados a -20 °C.

**Tabla 11.** Condiciones de reacción para la PCR en tiempo real que identifica a los virus: *Enterovirus* y *Parechovirus*.

Ciclo de la reacción	Temperatura	Tiempo
Hold 1	95 °C	10 minutos
<b>50 ciclos</b>		
Desnaturalización	95 °C	15 segundos
Alineamiento	53 °C	30 segundos
Extensión	72 °C	30 segundos
Hold 2	40 °C	30 segundos

### 10.6.3.3 Condiciones de PCR para la identificación del control interno (GAPDH)

Como control interno de las reacciones se utilizó un set de primers dirigidos contra el gen que codifica para la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH). Todas las PCR para GAPDH de controles y pacientes se estandarizaron para agregar 70 ng de ADN provenientes de la extracción de ADN total, ajustando el volumen de agua libre de RNAsas y muestra (4.5  $\mu$ L de un volumen final de reacción de 10  $\mu$ L). Por cada reacción de 10  $\mu$ L se agregaron: 0.25  $\mu$ L de cada uno de los primers (F: *forward* y R: *reverse*) diluidos a 20 nM, 5  $\mu$ L del máster mix: *Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X)* y 4.5  $\mu$ L de la mezcla de agua y ADN. Las condiciones de amplificación se ejecutaron como lo refieren (Xu *et al.*, 2017) (Tabla 12). La fluorescencia que se emite por la amplificación se adquirió en el paso de extensión (canal verde), optimizando la ganancia. Todos los productos de PCR fueron almacenados a -20 °C.

**Tabla 12.** Condiciones de reacción para la PCR en tiempo real que identifica el gen de la enzima GAPDH.

Ciclo de la reacción	Temperatura	Tiempo
Hold 1	95 °C	10 minutos
<b>40 ciclos</b>		
Desnaturalización	95 °C	15 segundos
Alineamiento	65.8 °C	30 segundos
Extensión	72 °C	30 segundos

## 10.7 RECOLECCIÓN DE LA INFORMACIÓN

### 10.7.1 Fuentes de información

- ✓ Cuestionarios aplicados al familiar más cercano, padre o tutor o a la persona encargada del cuidado del niño (pacientes pediátricos con cáncer y niños sanos).
- ✓ Muestras de materia fecal que fueron recolectadas de los dos grupos de estudio

## 10.8 TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

Se llevó a cabo el análisis estadístico empleando el programa IBM SPSS Statistics®, versión 22, con el cual se realizaron las pruebas de estadística descriptiva (distribución de frecuencias, medidas de tendencia central: media; medidas de variabilidad: rango, desviación estándar y gráficas) y pruebas de estadística inferencial para llevar a cabo la estimación de parámetros y pruebas de hipótesis (prueba T de Student, Chi cuadrada), correlación de variables (Spearman y Pearson). También se empleó el software GraphPad PRISM® 7.0a para realizar gráficas y obtener análisis de los datos (estadística descriptiva).

## 11. RESULTADOS

El presente trabajo se realizó durante los años 2017-2018 en el Centro de Investigación Oncológica de Una Nueva Esperanza-UPAEP; durante el primer año se desarrolló la base teórica de la investigación a través de la revisión en la literatura, con lo que se pudieron determinar: los métodos de extracción de ácidos nucleicos (ADN y ARN total; ADN y ARN viral) en heces, la información que sería recolectada a través de los cuestionarios aplicados a los participantes, los lineamientos bioéticos con los que se conduciría la investigación, la selección de virus y bacterias que se buscarían en las heces, así como la elección/diseño de las secuencias de primers para detectarlos por PCR en tiempo real. Una vez que se concluyó la base teórica del proyecto, se comenzó la recolección de las muestras de heces fecales (UNE y HIT) durante el mes de enero y se concluyó en julio del año 2018.

### 11.1 REVISIÓN DE LA LITERATURA: MIEMBROS DEL VIROMA INTESTINAL

Concluida la recolección de las 30 muestras de los dos grupos de estudio (15 muestras de controles sanos y 15 muestras de pacientes con LLA en tratamiento) y las extracciones de ácidos nucleicos, se prosiguió a realizar las RT-PCR de las bacterias y virus que se eligieron para este estudio. Las bacterias (*Bacteroides* spp, *Firmicutes* spp y *Lachnospiraceae* spp), son miembros constantes y de gran abundancia en el microbiota intestinal de adultos y niños, se excretan regularmente en las heces y se ha observado como los cambios de estas bacterias están asociados a algunas enfermedades, como se explicó anteriormente en los antecedentes.

En el caso de los virus la información sobre los miembros constantes y de mayor abundancia en la microbiota intestinal no era tan clara, así que se realizó una profunda revisión de la literatura, con la que se pudieron identificar las familias, géneros y especies más abundantes de virus que se excretan en las heces fecales y así poder elegir aquellos que tuvieran relevancia para este estudio. A continuación, se presenta la revisión de la literatura, que concentra los estudios más importantes y las características generales de los virus que son miembros constantes del viroma intestinal (Tabla 13). A partir de esta información se realizó la selección de los virus que se analizarían en las muestras de los controles sanos y pacientes.

**Tabla 13.** Revisión de la literatura de los virus reportados como miembros constantes y abundantes del viroma intestinal (taxonomía, genoma, estructura, miembros importantes, características relevantes, autor y características del estudio).

Taxonomía del virus	Características generales del virus	Estudios (autor)	Características del estudio/hallazgos principales
<b>Orden:</b> <i>Caudovirales</i>  <b>Familia:</b> <i>Siphoviridae</i>  (grupo I del sistema Baltimore)	<b>Genoma y estructura:</b> ADN de cadena doble, lineal, cápside (55-60 nm) sin envoltura, simetría binal, cabeza icosaédrica y cola helicoidal (570 nm).  <b>Algunos miembros:</b> fago 5093 de <i>Streptococcus</i> , fago P2559S de <i>Croceibacter</i> , fago KS9 de <i>Burkholderia</i> , fago P9 de <i>Streptococcus</i> , fago lambda de enterobacterias, fago SMP de <i>Streptococcus</i> , fago BCJA1c de <i>Bacillus</i> , fago RAP44 de <i>Riemerella</i> , fago ReqiPoco6 de <i>Rhodococcus</i> , fago PH15 y fago YMC-2011 de <i>Streptococcus</i> , "Lambdalikevirus", fago PhiS63 de <i>Clostridium</i> .	(Minot <i>et al.</i> , 2011)	Análisis comparativo de 6 adultos sanos, estudió cambios del viroma con la dieta. Representan el 18% de los fagos encontrados.
		(Minot <i>et al.</i> , 2013)	Viroma de un adulto sano durante 2.5 años (24 muestras total).
		(Dalmasso, Hill, y Ross, 2014)	Describe que son los fagos más abundantes.
		(Lim <i>et al.</i> , 2015)	Describe que son los bacteriófagos más comunes. Estudió niños sanos (0-2 años, gemelos).
		(Abeles <i>et al.</i> , 2015)	Describe que son los fagos más abundantes.
		(Columpsi <i>et al.</i> , 2016)	Los más abundantes (fagos temperados).
<b>Orden:</b> <i>Caudovirales</i>  <b>Familia:</b> <i>Podoviridae</i>  (grupo I del sistema Baltimore)	<b>Genoma y estructura:</b> ADN de cadena doble, cápside sin envoltura, simetría binal, cabeza icosaédrica y cola helicoidal corta.  <b>Algunos miembros:</b> fago de <i>Cellulophaga</i> phi4:1 y phi18:3, fago vB de enterobacterias, virus "Sp6like" sin clasificar, fago MG-B1 de <i>Bacillus</i> .	(Minot <i>et al.</i> , 2011)	Análisis comparativo de 6 adultos sanos, estudió cambios del viroma con la dieta. Representan 4.8% del total de los fagos.
		(Minot <i>et al.</i> , 2013)	Viroma de un adulto sano durante 2.5 años (24 muestras total).
		(Dalmasso, Hill, y Ross, 2014)	Describe que son los segundos fagos más abundantes.
		(Lim <i>et al.</i> , 2015)	Describe que son de los bacteriófagos más comunes. Estudió niños sanos (0-2 años, gemelos).
		(Abeles <i>et al.</i> , 2015)	Describe que son los segundos fagos más abundantes.
		(Columpsi <i>et al.</i> , 2016)	Describe que son los segundos fagos más abundantes.
<b>Orden:</b> <i>Caudovirales</i>  <b>Familia:</b> <i>Microviridae</i>  (grupo II del sistema Baltimore)	<b>Genoma y estructura:</b> ADN de cadena simple, 4-6 kb, simetría de la cápside: icosaédrica, sin envoltura, tamaño de la cápside: 25-35 nm.  <b>Algunos miembros:</b> S13, fago phiX174 de <i>E. coli</i> , alpha3, fago phiMH2K de <i>Bdellovibrio</i> , Gokushovirus marino, Chlamydia microvirus, <i>Microviridae</i> phi-CA82, <i>Gokushovirinae</i> .	(Minot <i>et al.</i> , 2011)	Análisis comparativo de 6 adultos sanos, estudió cambios del viroma con la dieta. Representan 0.9 % del total de los fagos.
		(Minot <i>et al.</i> , 2013)	Viroma de un adulto sano durante 2.5 años (24 muestras total).
		(Dalmasso, Hill, y Ross, 2014)	Describe que son de los fagos más abundantes.
		(Lim <i>et al.</i> , 2015)	Describe que son de los bacteriófagos más comunes. Niños sanos (0-2 años, gemelos).
		(Abeles <i>et al.</i> , 2015)	Describe que son de los fagos más abundantes.
		(Columpsi <i>et al.</i> , 2016)	Bacteriófagos (en adultos).

<p><b>Orden:</b> <i>Caudovirales</i></p> <p><b>Familia:</b> <i>Myoviridae</i></p> <p>(grupo I del sistema Baltimore)</p>	<p><b>Genoma y estructura:</b> ADN de cadena doble, 39-169 kb, simetría de la cápside: binal, sin envoltura, tamaño de la cápside: cabeza y cola (110) nm.</p> <p><b>Algunos miembros:</b> Fago K, fago phiSM de <i>Cellulophaga</i>, fagos BCD7 y G de <i>Bacillus</i>, fago phiC2 de <i>Clostridium</i>, fago RR1-B de <i>Rhizobium</i>.</p>	(Minot <i>et al.</i> , 2011)	Análisis comparativo de 6 adultos sanos, estudió cambios del viroma con la dieta. Representan 10% del total.
		(Minot <i>et al.</i> , 2013)	Viroma de un adulto sano por 2.5 años (24 muestras): grupo mayoritario de virus.
		(Dalmasso, Hill, y Ross, 2014)	Bacteriófagos abundantes.
		(Lim <i>et al.</i> , 2015)	Bacteriófagos muy comunes. Niños sanos (0-2 años, gemelos).
		(Abeles <i>et al.</i> , 2015) (Columpsi <i>et al.</i> , 2016)	Bacteriófagos abundantes. Bacteriófagos abundantes.
<p><b>Familia:</b> <i>Picornaviridae</i></p> <p><b>Género:</b> <i>Enterovirus humano</i> (HEV)</p> <p>(grupo IV del sistema Baltimore)</p>	<p><b>Genoma y estructura:</b> ARN de cadena simple sentido +, sin envoltura, simetría de la cápside: icosaédrica de 20-30 nm, compuesta por 5 unidades de proteína (pentámeros) y con cuatro poli-péptidos (protómeros), sitio de embalaje de la cápside: citoplasma.</p> <p><b>Algunos miembros:</b> polio virus, Coxsackie virus, Echovirus. Los <i>Enterovirus</i> genotipos 1 y 2 son comunes en heces de humanos.</p> <p><b>Otras características:</b> en humanos son causantes de la polio y asociados a casos de meningitis.</p>	(Lecuit y Eloit, 2013)	Excretados por niños menores de 5 años sin asociación con enfermedad.
		(Kramná <i>et al.</i> , 2015)	Observó su excreción en heces de niños que desarrollaron autoinmunidad en los islotes y posteriormente DM1.
		(Lim <i>et al.</i> , 2015)	Estudió a niños sanos (hasta los 2 años, gemelos).
		(Columpsi <i>et al.</i> , 2016)	Excreción común sin enfermedad en niños menores de 5 años, los más comunes fueron:  -Genotipos 1 y 2 (humanos). -Genotipos 3 y 4 (reservorio de animales, virus zoonóticos que se adquieren por consumir alimentos contaminados).
<p><b>Familia:</b> <i>Picornaviridae</i></p> <p><b>Género:</b> <i>Parechovirus humano</i> (HPeV)</p> <p>(grupo IV del sistema Baltimore)</p>	<p><b>Genoma y estructura:</b> ARN de cadena simple sentido +, sin envoltura, simetría de la cápside: icosaédrica de 20-30 nm, compuesta por 5 unidades de proteína (pentámeros) y con cuatro poli-péptidos (protómeros), sitio de embalaje de la cápside: citoplasma.</p> <p><b>Algunos miembros:</b> genotipos 1 y 6, comunes en heces de humanos.</p> <p><b>Otras características:</b> la infección con <i>Parechovirus</i> está asociada a síntomas de diarrea, meningitis y encefalitis.</p>	(Lecuit y Eloit, 2013)	Excretados por niños menores de 5 años sin asociación con enfermedad.
		(Kramná <i>et al.</i> , 2015)	Observó su excreción en heces de niños (genotipo 1) que desarrollaron autoinmunidad en los islotes y posteriormente DM1.
		(Lim <i>et al.</i> , 2015)	Estudió a niños sanos (hasta los 2 años, gemelos).
		(Columpsi <i>et al.</i> , 2016)	Estudió muestras de heces de dos hermanos sanos. Se excretan en heces de niños sanos, menores de 5 años. Los genotipos 1 y 6 son comunes en humanos.
<p><b>Familia:</b> <i>Anelloviridae</i></p> <p><b>Géneros:</b> <i>Alphatorquevirus</i> <i>Betatorquevirus</i></p>	<p><b>Genoma y estructura:</b> ADN de doble cadena, sentido -, <math>\approx</math> 3.8 kb.</p>	(Lecuit y Eloit, 2013)	Estudio longitudinal de 1 año, de dos niños sanos (hermanos).
		(Kramná <i>et al.</i> , 2015)	Niños que desarrollaron autoinmunidad en islotes y después DM1 (TTV-5 y TTMV).

<p><i>Gammatorquevirus</i> <i>Deltatorquevirus</i> <i>Epsilontorquevirus</i> <i>Zetatorquevirus</i> <i>Etorquevirus</i> <i>Thetatorquevirus</i> <i>Iotatorquevirus</i></p> <p>(grupo II del sistema Baltimore)</p>	<p><b>Algunos miembros:</b> Torquetenavirus (TTV) y TT-like mini virus (TTMV)</p> <p><b>Otras características:</b> la prevalencia de TTV en la población es alta &gt;90%, se adquieren por diversas rutas como placenta, respiratoria y transfusiones.</p>	(Lim <i>et al.</i> , 2015)	Niños sanos (hasta 2 años, gemelos).
		(Columpsi <i>et al.</i> , 2016)	Muestras tomadas a dos hermanos sanos.
<p><b>Orden:</b> <i>Caudovirales</i></p> <p><b>Familia:</b> <i>Inoviridae</i></p> <p>(grupo II del sistema Baltimore)</p>	<p><b>Genoma y estructura:</b> ADN de cadena simple, 7-9 kb, simetría de la cápside: helicoidal, sin envoltura, tamaño de la cápside: 6 x 900-1900 nm.</p> <p><b>Algunos miembros:</b> fago f1 de enterobacterias, fago B5 de <i>Propionibacterium</i>, fago fd.</p>	(Abeles <i>et al.</i> , 2015)	Bacteriófagos abundantes en la microbiota.
		(Lim <i>et al.</i> , 2015)	Bacteriófagos comunes. Niños sanos (0-2 años, gemelos).
		(Columpsi <i>et al.</i> , 2016)	Bacteriófagos abundantes en la microbiota.
<p><b>Familia:</b> <i>Picobirnaviridae</i></p> <p><b>Género:</b> <i>Picobirnavirus</i></p> <p>(grupo III de la clasificación de Baltimore)</p>	<p><b>Genoma y estructura:</b> ARN de doble cadena, lineal, incluye un segmento de 1 – 2.5 kb y un segmento de 2-1.7 kb.</p> <p><b>Algunos miembros:</b> la familia solo posee un género.</p> <p><b>Otras características:</b> están asociados con gastroenteritis en animales y humanos.</p>	(Zhang <i>et al.</i> , 2006)	Muestras de dos adultos sanos. Virus de ARN (el más común identificado).
		(Lecuit y Eloit, 2013)	Estudio longitudinal de 1 año, de dos niños sanos (hermanos).
		(Columpsi <i>et al.</i> , 2016)	Muestras de dos hermanos sanos.
<p><b>Familia:</b> <i>Circoviridae</i></p> <p><b>Género:</b> <i>Gyrovirus humano</i> (HGyV)</p> <p>(grupo II del sistema Baltimore)</p>	<p><b>Genoma y estructura:</b> ADN de cadena simple circular, sentido -, 2,300 nucleótidos, 19-27 nm, sin envoltura, cápside icosaédrica con simetría T1.</p> <p><b>Algunos miembros:</b> virus de la anemia de pollos.</p>	(Minot <i>et al.</i> , 2013)	Viroma de un adulto durante 2.5 años (24 muestras), se ha reportado recientemente que infecta a humanos, detección incierta.
		(Lecuit y Eloit, 2013)	Identificados asociados a: CAV (virus de la anemia de pollos), HGyV y AGV2 (virus similar).
		(Lecuit y Eloit, 2013)	GyV4: identificado en pollos y heces de humanos (China).
<p><b>Familia:</b> <i>Astroviridae</i></p> <p><b>Géneros:</b> <i>Mamastrovirus</i> que infecta a los humanos y <i>Avastrovirus</i> que infecta a aves</p> <p><b>Especie:</b> <i>Astrovirus</i> (HastV)</p> <p>(grupo IV de la clasificación de Baltimore)</p>	<p><b>Genoma y estructura:</b> virus redondos, desnudos, de 28 a 32 nm de diámetro, con aspecto de estrella de seis puntas, el diámetro total del virus es de 41 nm. El genoma es de ARN monocatenario positivo, presenta una cápside con tres o más proteínas y simetría icosaédrica.</p> <p><b>Algunos miembros:</b> se conocen 8 serotipos de H-ast1 al H-ast8.</p> <p><b>Otras características:</b> son causantes de gastroenteritis aguda, con prevalencia del 3 a 9%.</p>	(Lim <i>et al.</i> , 2015)	Niños sanos (hasta 2 años, gemelos).
		(Columpsi <i>et al.</i> , 2016)	Virus eucariontes de ARN en intestino delgado y colon.

<p><b>Familia:</b> <i>Caliciviridae</i></p> <p><b>Género:</b> <i>Calicivirus</i></p> <p>(grupo IV del sistema Baltimore)</p>	<p><b>Genoma y estructura:</b> ARN de cadena sencilla en sentido +, 7.5 kb, el diámetro del virión mide 35 nm, estructuralmente presentan 32 indentaciones superficiales en forma de copa.</p> <p><b>Algunos miembros:</b> virus de Norwalk, de Hawaii, de Taunton y de las Montañas Nevadas.</p> <p><b>Otras características:</b> infectan a una amplia variedad de hospederos, como mamíferos, aves, reptiles y peces.</p>	(Lim <i>et al.</i> , 2015)	Niños sanos (hasta 2 años, gemelos).
		(Columpsi <i>et al.</i> , 2016)	Virus eucariontes de ARN en intestino delgado y colon.
<p><b>Familia:</b> <i>Adenoviridae</i></p> <p><b>Géneros:</b> <i>Mastadenovirus</i> y <i>Aviadenovirus</i></p> <p><b>Especie:</b> Adenovirus</p> <p>(grupo I del sistema Baltimore)</p>	<p><b>Genoma y estructura:</b> ARN de cadena doble lineal, 36 kb. El diámetro del virión es de 80-110 nm aproximadamente, estructura icosaédrica, algunos poseen fibras o filamentos largos que sobresalen de los ápices.</p> <p><b>Algunos miembros:</b> los serotipos 40 y 41 que causan gastroenteritis.</p> <p><b>Otras características:</b> su participación en las enfermedades diarreicas aún no es clara.</p>	(Lecuit y Eloit, 2013)	Estudio longitudinal de 1 año, de dos niños sanos (hermanos).
		(Columpsi <i>et al.</i> , 2016)	Virus eucariontes de ARN en intestino delgado y colon, serotipos 40 y 41.
<p><b>Familia:</b> <i>Caliciviridae</i></p> <p><b>Género:</b> <i>Sapovirus</i></p> <p>(grupo IV del sistema Baltimore)</p>	<p><b>Genoma y estructura:</b> ARN de cadena simple, sentido +, sin envoltura, 7.7 kb, estructura icosaédrica.</p> <p><b>Otras características:</b> se han relacionado con gastroenteritis.</p>	(Kramná <i>et al.</i> , 2015)	Observó su excreción en heces de niños que desarrollaron auto-inmunidad en los islotes y posteriormente DM1.
		(Lim <i>et al.</i> , 2015)	Niños sanos (hasta 2 años, gemelos).
<p><b>Familia:</b> <i>Parvoviridae</i></p> <p><b>Subfamilia:</b> <i>Parvovirinae</i></p> <p><b>Género:</b> <i>Bocaparvovirus</i></p> <p><b>Especie:</b> Bocavirus</p> <p>(grupo II del sistema Baltimore)</p>	<p><b>Genoma y estructura:</b> ADN lineal de una sola cadena, 5.5 kb, los viriones son pequeños de 18-26 nm, de simetría icosaédrica, sin envoltura.</p> <p><b>Algunos miembros:</b> genotipos 1 y 2 infectan a humanos.</p> <p><b>Otras características:</b> asociados a enfermedades en humanos como gastroenteritis.</p>	(Lecuit y Eloit, 2013)	Estudio longitudinal de 1 año, de dos niños sanos (hermanos).
		(Kramná <i>et al.</i> , 2015)	Observó su excreción en heces de niños que desarrollaron auto-inmunidad en los islotes y posteriormente DM1 (genotipos 1 y 2).

## 11.2 CUANTIFICACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Se realizaron las extracciones de ADN y ARN total y viral como se explicó detalladamente en la sección de material y métodos (ver 10.6.1 “Recolección de las muestras y procesamiento de las heces fecales”) y posteriormente se determinaron las concentraciones de material genético de cada muestra. A continuación, se muestran los valores mínimos y máximos de las concentraciones registradas de ADN y ARN total y viral de cada grupo de estudio y del total de la muestra (Tabla 14).

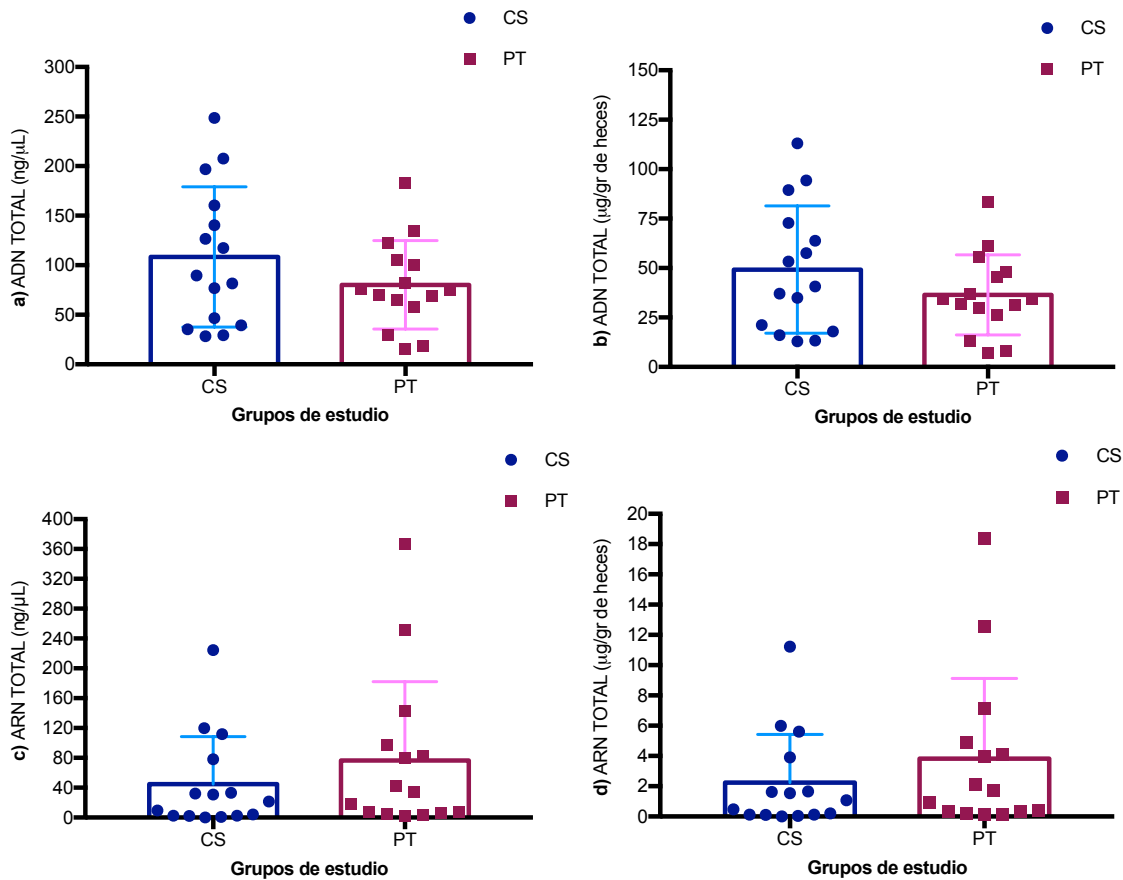
**Tabla 14.** Valores mínimos y máximos de las concentraciones de ADN y ARN total y viral registradas para cada grupo de estudio (n=15; controles sanos y pacientes con LLA) y el total de la muestra (n=30).

Variable	Control sano (n=15) Mínimo	Control sano (n=15) Máximo	Paciente con LLA (n=15) Mínimo	Paciente con LLA (n=15) Máximo	TOTAL (n=30) Mínimo	TOTAL (n=30) Máximo
ADN total (ng/μL)	28.40	248.70	15.50	182.90	15.50	248.70
ADN total (μg/gr de heces)	12.90	113.04	7.04	83.14	7.04	113.04
ARN total (ng/μL)	0.00	224.60	2.50	367.30	0.00	367.30
ARN total (μg/gr de heces)	0.00	11.23	0.12	18.36	0.00	18.36
ADN viral (ng/μL)	128.40	997.10	109.80	1506.70	109.80	1506.70
ADN viral (μg/gr de heces)	25.68	199.42	21.96	301.34	21.96	301.34
ARN viral (ng/μL)	117.50	1009.70	86.70	1171.40	86.70	1171.40
ARN viral (μg/gr de heces)	23.50	201.94	17.34	234.28	17.34	234.28

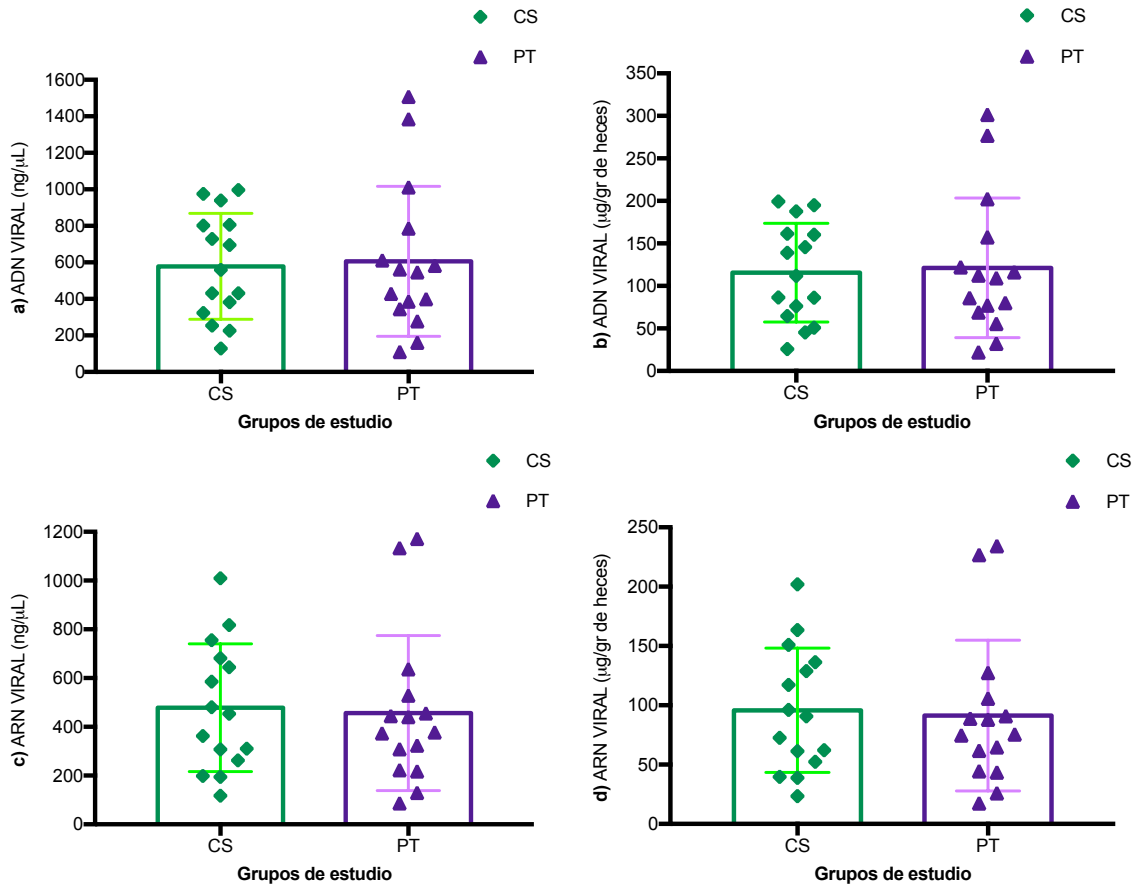
Se analizaron estadísticamente los datos de cada grupo de estudio (media y desviación estándar) y se realizó la prueba T de Student para observar si existían diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos. Para la variable concentración de ADN total se obtuvo un valor  $p=0.205$ , para la variable concentración de ARN total se obtuvo un valor  $p=0.332$ , para la variable concentración de ADN viral, se obtuvo un valor  $p=0.832$  y para la variable ARN viral se obtuvo un valor  $p=0.836$  lo que indica que no hay diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de estudio para ninguna de las variables de concentración (Tabla 15, gráficas 1 y 2).

**Tabla 15.** Estadísticos de grupo y prueba T de Student de las variables: concentración de ADN y ARN total y viral (ng/μL y μg/gr de heces). Se presenta la media y la desviación estándar de cada variable según la ausencia o presencia de enfermedad (LLA), así como del total de los sujetos muestreados. Se indica el valor *p* de la prueba T de Student de cada variable.

Variable	Control sano (n=15) M ± DE	Paciente con LLA (n=15) M ± DE	Total (n=30) M ± DE	Valor <i>p</i>
ADN total (ng/μL)	108.32 ± 70.74	80.18 ± 44.64	94.25 ± 59.86	0.205
ADN total (μg/gr de heces)	49.23 ± 32.15	36.44 ± 20.29	42.84 ± 27.20	0.205
ARN total (ng/μL)	44.89 ± 63.71	76.39 ± 105.90	60.64 ± 87.35	0.332
ARN total (μg/gr de heces)	2.24 ± 3.18	3.81 ± 5.29	3.03 ± 4.36	0.332
ADN viral (ng/μL)	578.64 ± 290.21	606.38 ± 410.78	592.51 ± 349.74	0.832
ADN viral (μg/gr de heces)	115.72 ± 58.04	121.27 ± 82.15	118.50 ± 69.94	0.832
ARN viral (ng/μL)	478.82 ± 262.04	456.60 ± 318.00	467.71 ± 286.52	0.836
ARN viral (μg/gr de heces)	95.76 ± 52.40	91.32 ± 63.60	93.54 ± 57.30	0.836



**Gráfica 1.** Gráficas de barras que muestran la media, desviación estándar y los valores individuales (n=30) de las concentraciones de: **a)** ADN total expresada en ng/μL, **b)** ADN total expresada en μg/gr de heces, **c)** ARN total expresada en ng/μL y **d)** ARN total expresada en μg/gr de heces; de los dos grupos de estudio (controles sanos: CS y pacientes con LLA: PT).



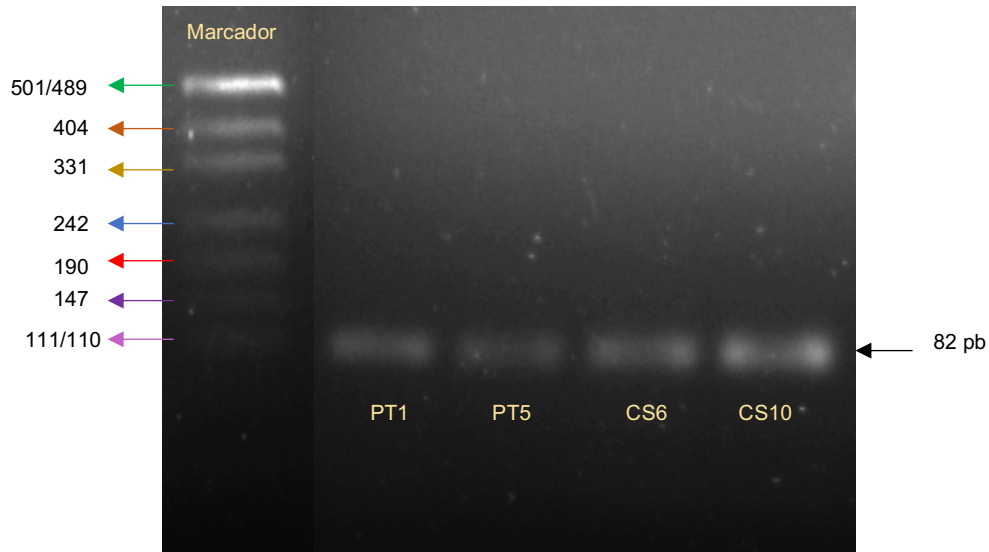
**Gráfica 2.** Gráficas de barras que muestran la media, desviación estándar y los valores individuales (n=30) de las concentraciones de: **a)** ADN viral expresada en ng/ $\mu$ L, **b)** ADN viral expresada en  $\mu$ g/gr de heces, **c)** ARN viral expresada en ng/ $\mu$ L y **d)** ARN viral expresada en  $\mu$ g/gr de heces; de los dos grupos de estudio (controles sanos: CS y pacientes con LLA: PT).

### 11.3 VALIDACIÓN DE LA ESPECIFICIDAD DE LOS PRIMERS

Una vez que se eligieron/diseñaron los primers para cada una de las bacterias y los virus, se llevaron a cabo las reacciones de PCR para estandarizar el procedimiento como se describió en la sección de material y métodos. Para asegurar la especificidad de los primers y evitar obtener un resultado falso positivo, se corrió un gel en agarosa al 2% que nos permitió observar el fragmento amplificado y corroborar el tamaño (según el peso aproximado esperado).

#### 11.3.1 *Bacteroides spp*

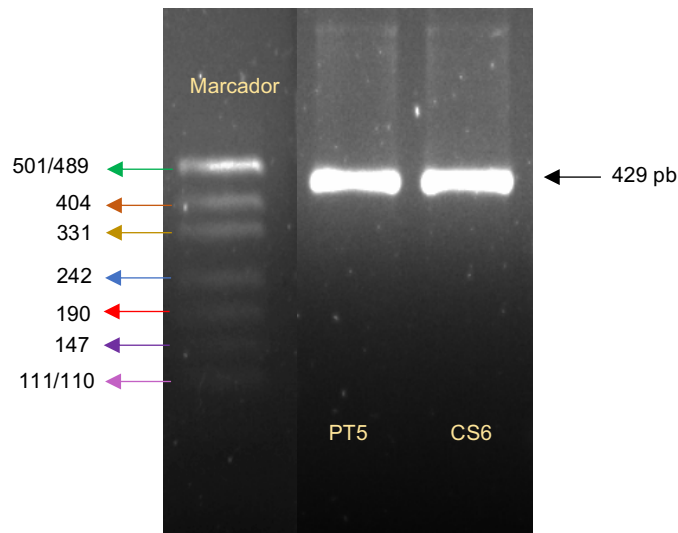
Para asegurar que la reacción de PCR generara un solo amplicón del tamaño esperado (82 pb), los productos obtenidos de cuatro muestras (pacientes con tratamiento 1 y 5; controles sanos 6 y 10) se analizaron en geles de agarosa al 2%, lo que permitió observar los fragmentos amplificados y corroborar el tamaño. En el gel de electroforesis observamos las cuatro bandas (PT1, PT5, CS6, CS10) por debajo de 111 pb del marcador de peso molecular, que correspondió al peso esperado del fragmento (82 pb); con este resultado se pudo corroborar la especificidad de los primers y se prosiguió a realizar las PCR para todas las muestras de pacientes y controles restantes (Figura 8).



**Figura 8.** Electroforesis en agarosa al 2% de los productos de PCR en tiempo real para *Bacteroides* spp de los pacientes con tratamiento 1 y 5 y los controles sanos 6 y 10 (PT1, PT5, CS6, CS10), se observa una banda abajo de 111 pb del marcador de peso molecular de ADN (rango bajo, marca BioTecMol®).

### 11.3.2 *Lachnospiraceae* spp

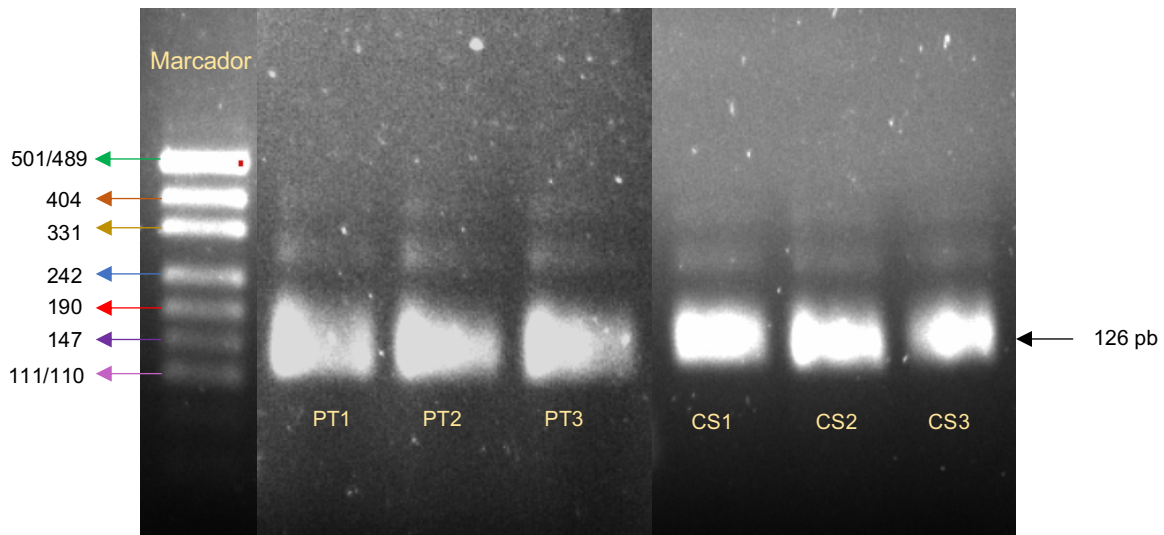
Para asegurar que la reacción de PCR generara un solo amplicón del tamaño esperado (429 pb), los productos obtenidos de dos muestras (paciente con tratamiento 5 y control sano 6) se analizaron en geles de agarosa al 2%, lo que permitió observar los fragmentos amplificados y corroborar el tamaño. En el gel de electroforesis observamos las dos bandas (PT5 y CS6) por debajo de 489 pb y arriba de 404 pb del marcador de peso molecular, que correspondió al peso esperado del fragmento (429 pb); con este resultado se pudo corroborar la especificidad de los primers y se prosiguió a realizar las PCR para todas las muestras de pacientes y controles restantes (Figura 9).



**Figura 9.** Electroforesis en agarosa al 2% de los productos de PCR en tiempo real para *Lachnospiraceae* spp del paciente con tratamiento 5 y el control sano 6 (PT5, CS6), se observa una banda abajo de 489 pb y arriba de 404 pb del marcador de peso molecular de ADN (rango bajo, marca BioTecMol®).

### 11.3.3 *Firmicutes* spp

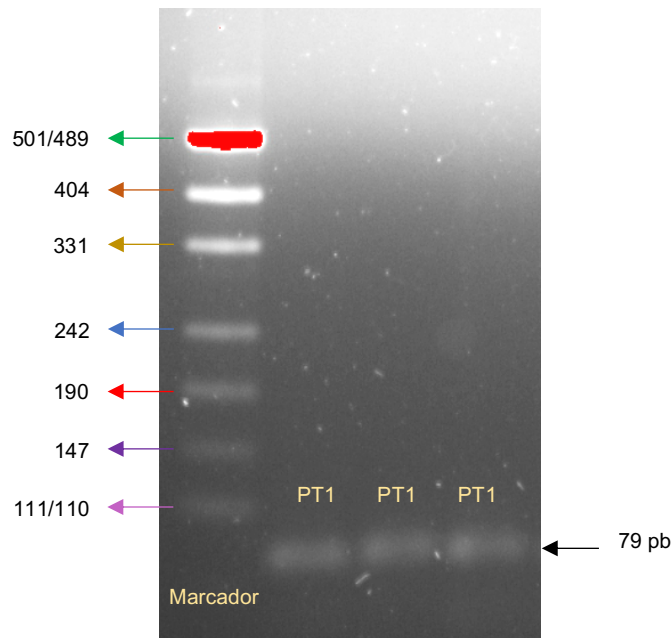
Para asegurar que la reacción de PCR generara un solo amplicón del tamaño esperado (126 pb), los productos obtenidos de seis muestras (pacientes con tratamiento 1, 2 y 3; controles sanos 1, 2 y 3) se analizaron en geles de agarosa al 2%, lo que permitió observar los fragmentos amplificados y corroborar el tamaño. En el gel de electroforesis observamos las seis bandas (PT1, PT2, PT3, CS1, CS2, CS3) por debajo de 147 pb y arriba de 111 pb del marcador de peso molecular, que correspondió al peso esperado del fragmento (126 pb); con este resultado se pudo corroborar la especificidad de los primers y se prosiguió a realizar las PCR para todas las muestras de pacientes y controles restantes (Figura 10).



**Figura 10.** Electroforesis en agarosa al 2% de los productos de PCR en tiempo real para *Firmicutes* spp de los pacientes con tratamiento 1, 2 y 3 (PT1, PT2, PT3) y los controles sanos 1, 2 y 3 (CS1, CS2, CS3) se observa una banda abajo de 147 pb y arriba de 111 pb del marcador de peso molecular de ADN (rango bajo, marca BioTecMol®).

### 11.3.4 Torquetenovirus (TTV)

Para asegurar que la reacción de PCR generara un solo amplicón del tamaño esperado (79 pb), los productos obtenidos de una muestra (paciente con tratamiento 1) se analizaron en geles de agarosa al 2%, lo que permitió observar los fragmentos amplificados y corroborar el tamaño. En el gel de electroforesis observamos tres bandas (PT1) por debajo de 110 pb del marcador de peso molecular, que correspondió al peso esperado del fragmento (79 pb); con este resultado se pudo corroborar la especificidad de los primers y se prosiguió a realizar las PCR para todas las muestras de pacientes y controles restantes (Figura 11).



**Figura 11.** Electroforesis en agarosa al 2% de los productos de PCR en tiempo real para Torquetenovirus (TTV) del paciente con tratamiento 1 (PT1) de se observa una banda abajo de 110 pb del marcador de peso molecular de ADN (rango bajo, marca BioTecMol®).

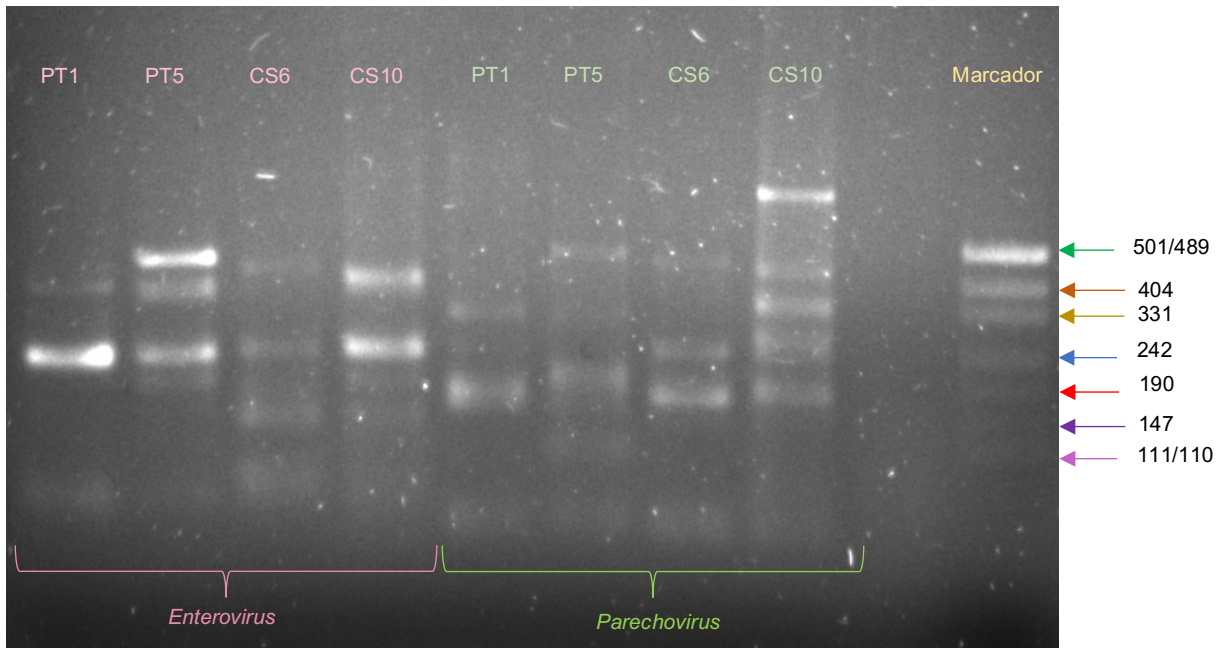
### 11.3.5 Fago de *Bacteroides* B40-8

Al llevar a cabo la estandarización (pruebas de amplificación y especificidad de los primers) de la reacción, con las muestras PT1, PT5, CS6 y CS10 no se observó una señal de amplificación en el equipo. Se realizó una segunda prueba haciendo un gradiente de temperatura para observar si había alguna que favorecía la amplificación con los primers; este se llevó a cabo por PCR en punto final empleando el kit: *FastStart Taq DNA Polymerase dNTPack* de Roche®; siguiendo las indicaciones del fabricante. Se probaron 5 temperaturas con intervalos de 0.5 °C y los productos de reacción se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 2% para observar la amplificación; al revelar el gel, no se observó ninguna banda de amplificación. Por la escasez de recursos materiales, financieros y de tiempo no se continuó con la estandarización de las pruebas; se recomienda buscar otro par de primers o emplear sondas marcadas junto con el par de primers diseñados en esta investigación.

### 11.3.6 *Enterovirus* y *Parechovirus*

Para la estandarización de la reacción de PCR se emplearon las muestras PT1, PT5, CS6 y CS10, y se siguió la metodología como se describió anteriormente. La reacción de PCR empleando el par de primers elegidos para estos dos virus sí generó una señal en el equipo, es decir, gráficas de amplificación y un valor de Ct para cada una de las muestras analizadas, lo que sugería una amplificación de algún o algunos fragmentos de ADN.

Para asegurar que la reacción de PCR generaba un solo amplicón (se desconocía el tamaño del fragmento), los productos de reacción obtenidos de las cuatro muestras (pacientes con tratamiento 1 y 5; controles sanos 6 y 10) se analizaron en geles de agarosa al 2%, lo que permitió observar los fragmentos amplificados y corroborar el tamaño. En el gel de electroforesis se puede apreciar que no se obtuvo una sola banda como se esperaba, lo cual indica una falta de especificidad en la reacción para identificar únicamente a estos dos virus (Figura 12).



**Figura 12.** Electroforesis en agarosa al 2% de los productos de PCR en tiempo real para identificar *Enterovirus* y *Parechovirus* de los pacientes con tratamiento 1 y 5 (PT1, PT5) y de los controles sanos 6 y 10 (CS6, CS10), se observan múltiples bandas para cada muestra; a la derecha del gel el marcador de peso molecular de ADN (rango bajo, marca BioTecMol®).

Se emplearon distintas estrategias para lograr obtener un solo fragmento, las cuales se mencionan a continuación:

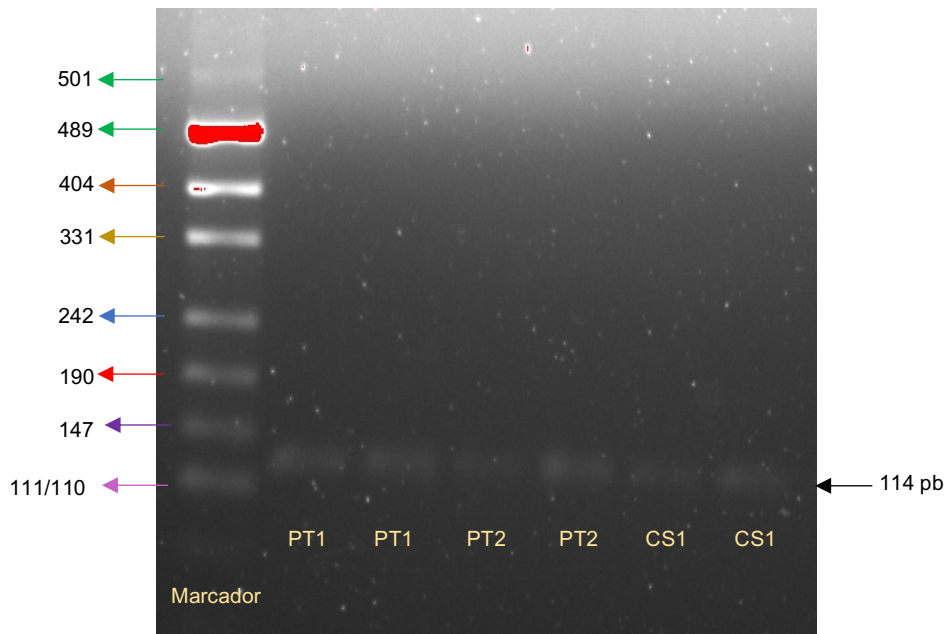
- ✓ Cambiar las temperaturas de amplificación: se ajustaron con el promedio de la  $T_m$  reportada por la empresa que sintetizó los primers (T4OLIGO): se registró un valor Ct en el equipo, pero se siguieron observando fragmentos inespecíficos en los geles de agarosa.
- ✓ Degradar el ADN de la extracción de ARN/ADN viral con el kit de Qiagen®: DNase Max KIT, a partir de esta extracción de ARN sin ADN se volvió a sintetizar cDNA y se realizaron las reacciones con las condiciones de reacción originales (Tabla 11): se registró una valor Ct en el equipo, pero se siguieron observando fragmentos inespecíficos en los geles de agarosa.
- ✓ Emplear la extracción de ARN total para sintetizar cDNA y realizar las reacciones de PCR: se registró un valor Ct en el equipo, pero se siguieron observando fragmentos inespecíficos en los geles de agarosa.

- ✓ Se emplearon las sondas específicas para cada virus (que sintetizó la empresa T4OLIGO), la reacción de PCR se llevó a cabo empleando el kit: *Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X)* con las condiciones de reacción originales (Tabla 11): se registró un valor Ct en el equipo, pero se siguieron observando fragmentos inespecíficos en los geles de agarosa.
- ✓ Se emplearon las sondas específicas para cada virus, la reacción de PCR se llevó a cabo empleando el kit: *Maxima Probe/ROX qPCR Master Mix (2X)* con las condiciones de reacción originales (Tabla 11): NO se registró un valor Ct en el equipo, pero se observaron fragmentos de amplificación inespecíficos en los geles de agarosa.
- ✓ Se emplearon las sondas específicas para cada virus, la reacción de PCR se llevó a cabo empleando el kit: *QuantiNova Probe RT-PCR Kit* de Qiagen® siguiendo las instrucciones del fabricante y las condiciones de reacción originales (Tabla 11): NO se registró una valor Ct en el equipo, pero observaron fragmentos de amplificación inespecíficos en los geles de agarosa.

Debido a estos resultados no se continuó con la estandarización de las reacciones, ni la amplificación de todas las muestras de controles y pacientes que se tenía planeado. Se sugiere probar otro set de primers y sondas que no generen fragmentos inespecíficos en la reacción y revisar la calidad de las muestras originales.

### **11.3.7 Control interno (GAPDH)**

Para asegurar que la reacción de PCR generaba un solo amplicón del tamaño esperado (114 pb), los productos obtenidos de tres muestras (paciente con tratamiento 1 y 2; control sano 1) se analizaron en geles de agarosa al 2%, lo que permitió observar los fragmentos amplificados y corroborar el tamaño. En el gel de electroforesis observamos seis bandas (PT1, PT2 y CS1) por debajo de 147 pb y arriba de 111 pb del marcador de peso molecular, que correspondió al peso esperado del fragmento (114 pb); con este resultado se pudo corroborar la especificidad de los primers y se prosiguió a realizar las PCR para todas las muestras de pacientes y controles restantes (Figura 13).



**Figura 13.** Electroforesis en agarosa al 2% de los productos de PCR en tiempo real para GAPDH de los pacientes con tratamiento 1 y 2 y el control sano 1 (PT1, PT2, CS1), se observa una banda entre 147 y 111 pb del marcador de peso molecular de ADN (rango bajo, marca BioTecMol®).

#### 11.4 ANÁLISIS COMPARATIVO DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE BACTERIAS Y VIRUS DE LA MICROBIOTA INTESTINAL EN CONTROLES SANOS Y PACIENTES CON LLA

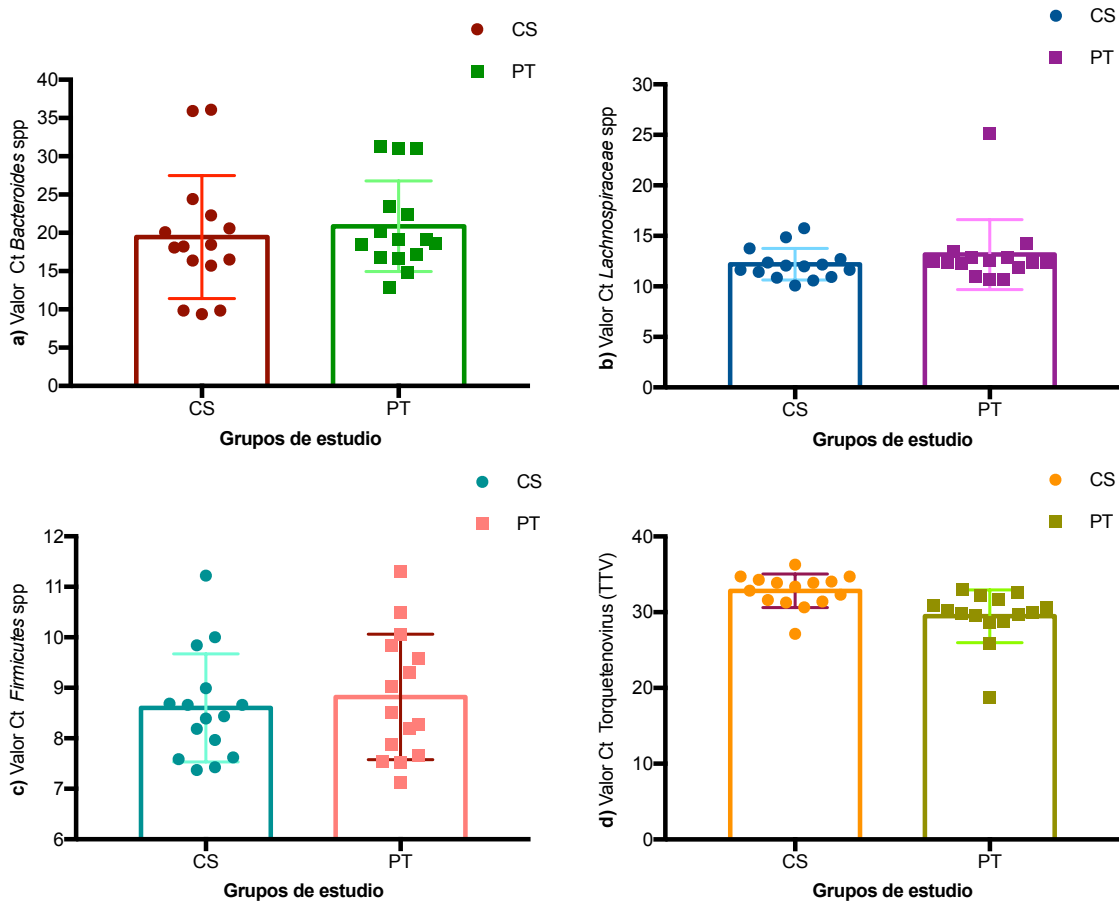
Una vez que se estandarizaron las condiciones de las reacciones y se probó la especificidad de los primers para la identificación de las bacterias y virus, se llevaron a cabo todas las reacciones de PCR en tiempo real para las 30 muestras: 15 controles sanos y 15 pacientes con LLA, que identificaron la expresión génica de *Bacteroides* spp, *Lachnospiraceae* spp, *Firmicutes* spp y Torquetenovirus en heces. Para cada una de las 30 muestras se efectuaron reacciones por duplicado por cada corrida; para asegurar la reproducibilidad de los experimentos se procuró que la diferencia del valor Ct entre los duplicados fuera de  $\pm 0.3$  (se ajustó el *threshold* a 0.05 para todas las reacciones). Se realizó el análisis matemático  $\Delta Ct$  y  $2^{\Delta\Delta Ct}$  que involucra comparar los datos de la expresión génica de las bacterias y virus (Ct) con la expresión génica (Ct) del control interno GAPDH. Los valores resultantes se analizaron con la prueba T de Student para determinar si existían diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos de estudio (controles y pacientes). A continuación se presentan los valores mínimos y máximos (Tabla 16) y los valores estadísticos: media, desviación estándar y valor *p* de los valores Ct,  $\Delta Ct$  y  $2^{\Delta\Delta Ct}$  (Tabla 17) de controles y pacientes por cada bacteria/virus estudiado (Gráficas 3, 4 y 5).

**Tabla 16.** Valores mínimos y máximos del Ct,  $\Delta\text{Ct}$  y  $2^{\Delta\Delta\text{Ct}}$  de: *Bacteroides* spp, *Lachnospiraceae* spp, *Firmicutes* spp y Torquetenovirus para cada grupo de estudio (controles sanos y pacientes con LLA) y el total de la muestra.

Variable	Controles sanos (n=15) Valor mínimo	Controles sanos (n=15) Valor máximo	Pacientes con LLA (n=15) Valor mínimo	Pacientes con LLA (n=15) Valor máximo	TOTAL (n=30) Valor mínimo	TOTAL (n=30) Valor máximo
<b><i>Bacteroides</i> spp</b>						
Valor Ct	9.38	36.09	12.82	31.26	9.38	36.09
$\Delta\text{Ct}$	0.01	377207.80	0.03	52136.28	0.01	377207.80
$2^{\Delta\Delta\text{Ct}}$	0.00	543.72	0.00	75.76	0.00	543.72
<b><i>Lachnospiraceae</i> spp</b>						
Valor Ct	10.10	15.77	10.69	25.18	10.10	25.18
$\Delta\text{Ct}$	253.35	1488058.69	1.82	878693.20	1.82	1488058.69
$2^{\Delta\Delta\text{Ct}}$	0.00	14.30	0.00	8.61	0.00	14.30
<b><i>Firmicutes</i> spp</b>						
Valor Ct	7.37	11.22	7.12	11.31	7.12	11.31
$\Delta\text{Ct}$	34998.37	12154607.7	47975.16	8046890.67	34998.37	12154607.7
$2^{\Delta\Delta\text{Ct}}$	0.03	9.35	0.04	6.56	0.03	9.35
<b>Torquetenovirus (TTV)</b>						
Valor Ct	27.16	36.28	18.69	33.04	18.69	36.28
$\Delta\text{Ct}$	0.00	1.68	0.01	163.71	0.00	163.71
$2^{\Delta\Delta\text{Ct}}$	0.01	27.18	0.21	2609.78	0.01	2609.78

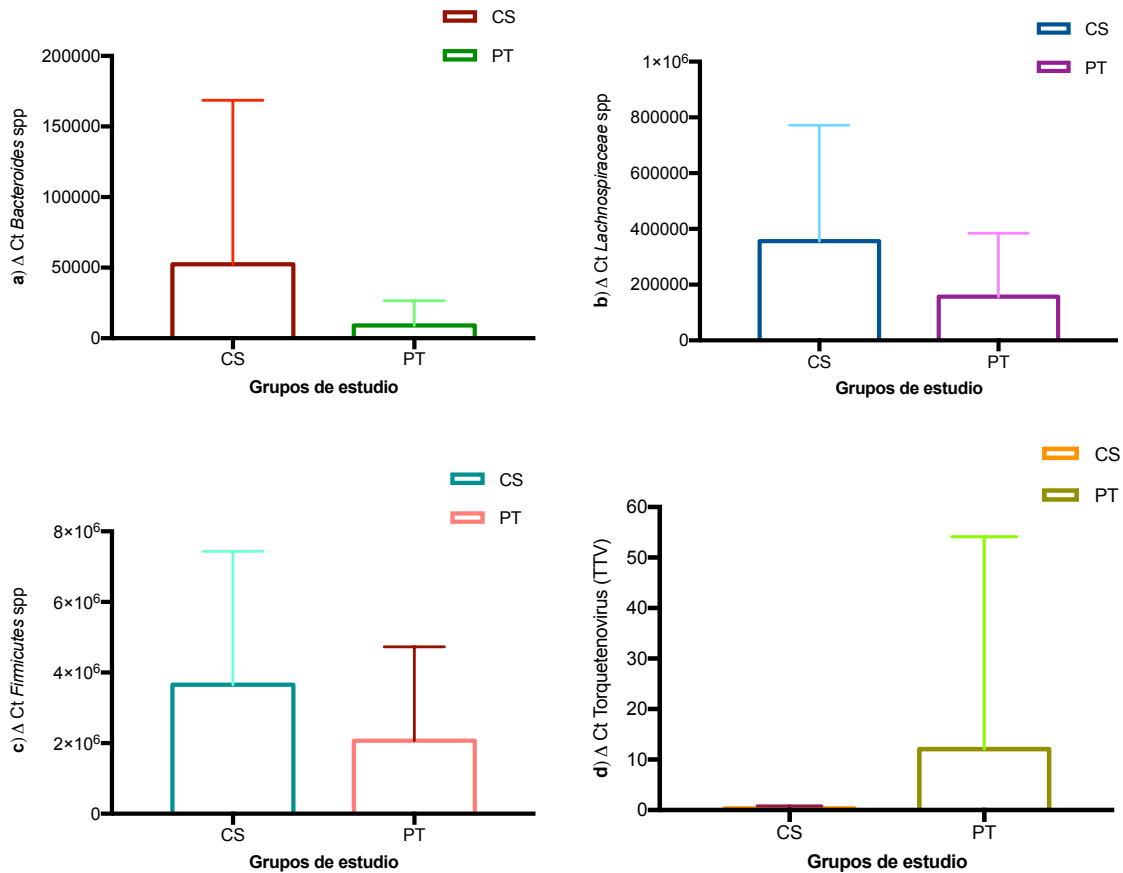
**Tabla 17.** Estadísticos de grupo y prueba T de Student de los valores Ct,  $\Delta\text{Ct}$  y  $2^{\Delta\Delta\text{Ct}}$  de: *Bacteroides* spp, *Lachnospiraceae* spp, *Firmicutes* spp y Torquetenovirus. Se presenta la media y la desviación estándar de cada variable cuantitativa para cada grupo de estudio (controles sanos y pacientes con LLA) y del total de los sujetos muestreados. Se indica el valor  $p$  de la prueba T de Student de cada variable.

Variable	Controles sanos (n=15) M $\pm$ DE	Pacientes con LLA (n=15) M $\pm$ DE	Total (n=30) M $\pm$ DE	Valor $p$
<b><i>Bacteroides</i> spp</b>				
Valor Ct	19.44 $\pm$ 8.03	20.85 $\pm$ 5.91	20.15 $\pm$ 6.97	0.589
$\Delta\text{Ct}$	52216.60 $\pm$ 116152.40	9098.35 $\pm$ 17500.12	30657.47 $\pm$ 84508.88	0.176
$2^{\Delta\Delta\text{Ct}}$	75.11 $\pm$ 166.43	13.21 $\pm$ 25.49	44.16 $\pm$ 121.15	0.175
<b><i>Lachnospiraceae</i> spp</b>				
Valor Ct	12.19 $\pm$ 1.56	13.15 $\pm$ 3.46	12.67 $\pm$ 2.68	0.335
$\Delta\text{Ct}$	356536.03 $\pm$ 415266.36	157031.98 $\pm$ 227548.25	256784.00 $\pm$ 344296.13	0.117
$2^{\Delta\Delta\text{Ct}}$	3.49 $\pm$ 3.99	1.50 $\pm$ 2.21	14.30 $\pm$ 2.45	0.122
<b><i>Firmicutes</i> spp</b>				
Valor Ct	8.60 $\pm$ 1.06	8.81 $\pm$ 1.24	8.70 $\pm$ 1.14	0.615
$\Delta\text{Ct}$	3658833.14 $\pm$ 3780251.54	2070261.23 $\pm$ 2657306.62	2864547.19 $\pm$ 3310635.05	0.194
$2^{\Delta\Delta\text{Ct}}$	2.86 $\pm$ 2.94	1.64 $\pm$ 2.13	2.25 $\pm$ 2.60	0.203
<b>Torquetenovirus (TTV)</b>				
Valor Ct	32.82 $\pm$ 2.20	29.47 $\pm$ 3.48	31.15 $\pm$ 3.33	<b>0.004</b>
$\Delta\text{Ct}$	0.28 $\pm$ 0.47	12.09 $\pm$ 42.00	6.19 $\pm$ 29.80	0.295
$2^{\Delta\Delta\text{Ct}}$	4.46 $\pm$ 7.59	192.16 $\pm$ 669.75	98.31 $\pm$ 475.07	0.296



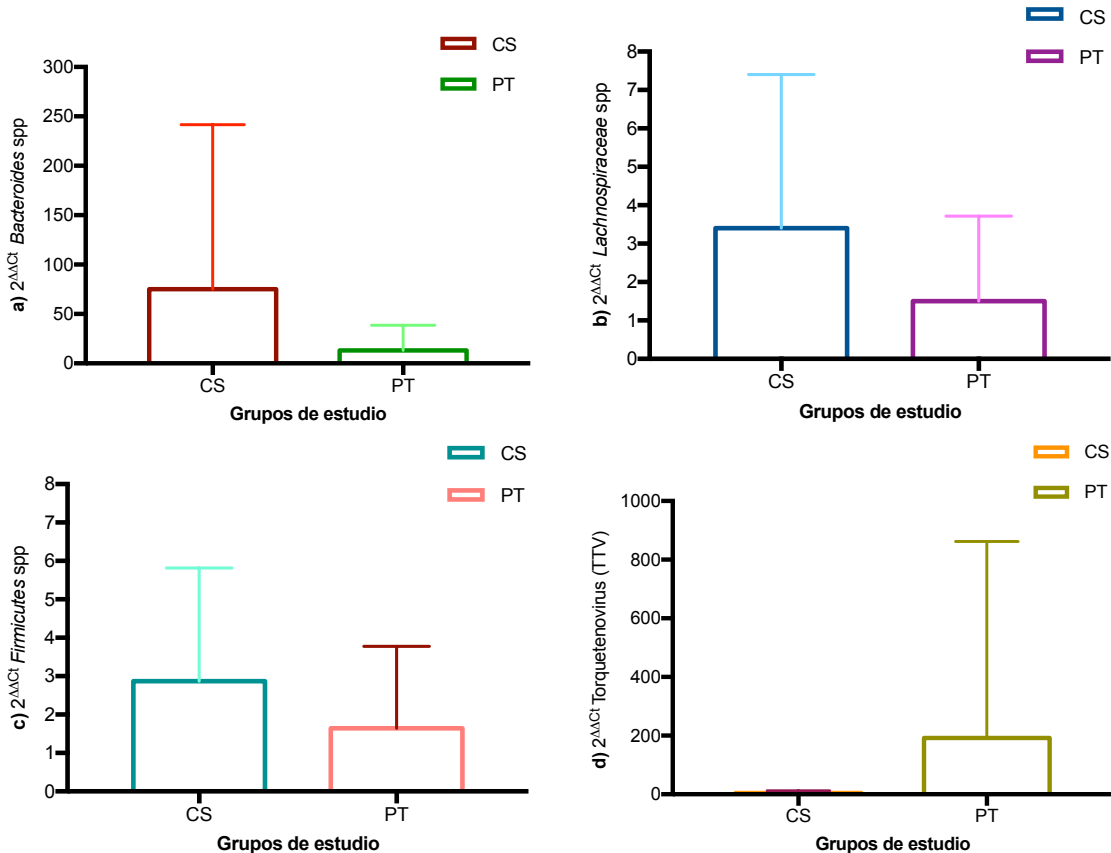
**Gráfica 3.** Gráficas de barras que muestran la media, desviación estándar y los valores individuales del valor Ct de: **a)** *Bacteroides* spp ( $p=0.589$ ), **b)** *Lachnospiraceae* spp ( $p=0.335$ ), **c)** *Firmicutes* spp ( $p=0.615$ ) y **d)** Torquetenovirus ( $p=0.004$ ); de los dos grupos de estudio (controles sanos: CS y pacientes con LLA: PT).

Al analizar los valores  $p$  de la prueba T de Student que se realizó para la variable valor Ct (Tabla 17), observamos que todos son mayores a 0.05 ( $p>0.05$ ), excepto para el valor Ct de Torquetenovirus ( $p=0.004<0.05$ ), con lo cual se puede concluir que para este virus si existen diferencias estadísticamente significativas en el valor Ct (expresión génica) entre los dos grupos de estudio (controles sanos y pacientes con LLA). En relación a la expresión génica de bacterias, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el valor Ct entre controles sanos y pacientes con LLA.



**Gráfica 4.** Gráficas de barras que muestran la media y desviación estándar del valor  $\Delta Ct$  de: **a)** *Bacteroides* spp ( $p=0.176$ ), **b)** *Lachnospiraceae* spp ( $p=0.117$ ), **c)** *Firmicutes* spp ( $p=0.194$ ) y **d)** Torquetenovirus ( $p=0.295$ ); de los dos grupos de estudio (controles sanos: CS y pacientes con LLA: PT).

Al analizar los valores  $p$  de la prueba T de Student que se realizó para la variable valor  $\Delta Ct$  (Tabla 17), observamos que todos son mayores a 0.05 ( $p>0.05$ ), con lo cual se puede concluir que no existen diferencias estadísticamente significativas en el valor  $\Delta Ct$  (expresión génica) entre los dos grupos de estudio (controles sanos y pacientes con LLA).



**Gráfica 5.** Gráficas de barras que muestran la media y desviación estándar del valor  $2^{\Delta\Delta Ct}$  de: **a)** *Bacteroides* spp ( $p=0.175$ ), **b)** *Lachnospiraceae* spp ( $p=0.122$ ), **c)** *Firmicutes* spp ( $p=0.203$ ) y **d)** Torquetenovirus ( $p=0.296$ ); de los dos grupos de estudio (controles sanos: CS y pacientes con LLA: PT).

Al analizar los valores  $p$  de la prueba T de Student que se realizó para la variable  $2^{\Delta\Delta Ct}$  (Tabla 17) observamos que todos son mayores a 0.05 ( $p > 0.05$ ), con lo cual se puede concluir que no existen diferencias estadísticamente significativas en el valor  $2^{\Delta\Delta Ct}$  (expresión génica) entre los dos grupos de estudio (controles sanos y pacientes con LLA).

### 11.5 CARACTERÍSTICAS DE LA MUESTRA

A todos los participantes del estudio se les solicitó que respondieran un cuestionario (ver Anexo 17.2) con preguntas específicas sobre aspectos demográficos, historia clínica, hábitos de alimentación, entre otras; esto permitió en primer lugar, comparar las diferencias entre estas variables (cualitativas y cuantitativas) entre los dos grupos de estudio y en segundo lugar analizar la correlación de las variables con los resultados experimentales (concentraciones de ácidos nucleicos y valores de la expresión génica de las bacterias y virus). A continuación, se presenta la información demográfica más relevante de la muestra (Tabla 18) y posteriormente se presenta el análisis estadístico y la correlación entre variables.

**Tabla 18.** Características demográficas de la muestra (controles sanos y pacientes con tratamiento).

	ID	Procedencia	Edad (años)	Talla (m)	Peso (kg)	Género (H/M)	Tiempo desde el Dx de LLA (años)	Tiempo con Tx para LLA (años)
Controles sanos (CS)	CS1	Aleatoria	6.00	1.15	25	H	N/A	N/A
	CS2	Aleatoria	2.75	0.87	11	H	N/A	N/A
	CS3	Aleatoria	2.75	0.88	11	M	N/A	N/A
	CS4	Aleatoria	2.00	0.85	10	M	N/A	N/A
	CS5	Aleatoria	14.00	1.63	50	M	N/A	N/A
	CS6	Aleatoria	10.50	1.27	35	M	N/A	N/A
	CS7	Aleatoria	4.00	1.02	19	M	N/A	N/A
	CS8	Aleatoria	1.08	0.7	11	M	N/A	N/A
	CS9	Aleatoria	12.00	1.6	65	H	N/A	N/A
	CS10	Aleatoria	9.00	1.2	33	H	N/A	N/A
	CS11	Aleatoria	5.00	1.2	26	H	N/A	N/A
	CS12	Hermano UNE ♦	5.00	1.1	19	H	N/A	N/A
	CS13	Aleatoria	6.00	1.17	22	H	N/A	N/A
	CS14	Aleatoria	3.00	0.97	17.5	H	N/A	N/A
	CS15	Aleatoria	12.00	1.52	58	M	N/A	N/A
Pacientes con tratamiento (PT)	PT1	UNE	13.92	1.5	42	H	1.00	1.00
	PT2	UNE	7.24	1.18	24.5	H	0.16	0.16
	PT3	UNE	5.00	1.16	20	M	4.00	4.00
	PT4	HIT	1.92	0.76	8.2	M	0.66	0.58
	PT5	HIT	5.00	0.99	18	M	1.24	1.00
	PT6	HIT	9.00	1.2	32	M	3.00	3.00
	PT7	HIT	5.00	1.4	17.4	H	2.00	2.00
	PT8	HIT	5.00	1.19	19.7	H	3.00	3.00
	PT9	HIT	14.00	1.54	53	M	1.66	1.66
	PT10	HIT	9.00	1.25	30.7	H	1.74	1.49
	PT11	HIT	9.00	1.22	31	M	0.41	0.41
	PT12	HIT	15.00	1.53	44.2	H	2.74	2.74
	PT13	HIT	8.00	1.31	34	M	0.50	0.50
	PT14	UNE	6.17	1.2	28.8	H	1.00	1.00
	PT15	UNE	5.00	1.11	20.5	M	2.00	2.00

♦ Hermano sano de un paciente con LLA que es beneficiario de Una Nueva Esperanza (UNE).

### 11.6 ANÁLISIS COMPARATIVO DE VARIABLES CUALITATIVAS DE CONTROLES SANOS Y PACIENTES CON LLA

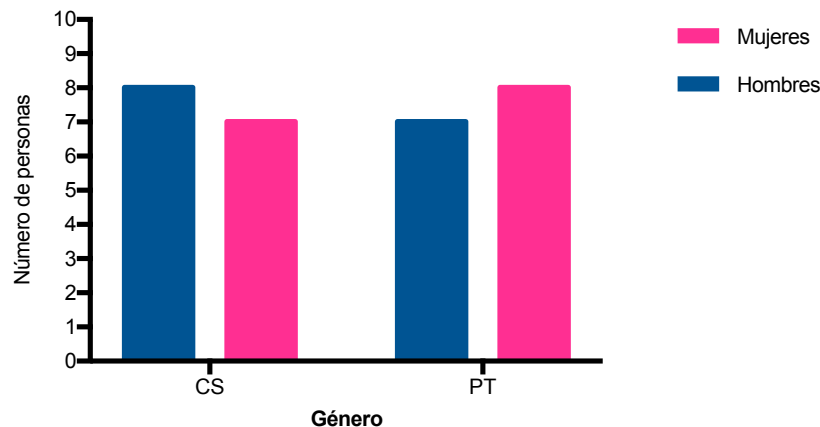
Con la información obtenida de los cuestionarios aplicados a los participantes se identificaron las siguientes variables cualitativas (ver Tabla 4): género, ingesta de medicamentos, antecedentes de cáncer, ingesta de probióticos, enfermedades virales, exposición al humo de tabaco, alergias y/o intolerancia a alimentos y/o medicamentos, enfermedades diarreicas, estreñimiento y asistencia a guarderías o estancias infantiles por un periodo prolongado; las cuales se analizaron con la prueba Chi cuadrada, para evaluar si existía asociación de las variables con la condición de estar sano o enfermo en los dos grupos de estudio.

### 11.6.1 Género

De las 30 muestras obtenidas, 15 fueron de hombres (8 controles sanos y 7 pacientes con LLA) y 15 muestras de mujeres (8 controles sanos y 7 pacientes con LLA). Se realizó el análisis de Chi cuadrado de Pearson y se obtuvo una  $p$  de 0.715, lo que indica que no hay asociación estadísticamente significativa entre la variable género y la ausencia o presencia de la enfermedad (Tabla 19, gráfica 6).

**Tabla 19.** Análisis de la variable cualitativa: *género*. Tabla cruzada y prueba de Chi cuadrado de Pearson. Se presenta el número y porcentaje de cada respuesta de la variable según la presencia o ausencia de enfermedad, así como el total de la respuesta, además se indica el valor  $p$  de la prueba de Chi cuadrado.

Variable cualitativa	Control sano n (%)	Paciente con LLA n (%)	Total n (%)	Valor $p$
<b>Género</b>				
Hombre	8 (53.33)	7 (46.66)	15 (50)	0.715
Mujer	7 (46.66)	8 (53.33)	15 (50)	
<b>Total de la muestra</b>	15 (50)	15 (50)	30 (100)	



**Gráfica 6.** Gráfica de barras que muestra el número de hombres y mujeres que formaron parte del estudio por cada uno de los grupos de estudio (controles sanos: CS y pacientes con LLA en tratamiento: PT).

### 11.6.2 Ingesta de medicamentos

De los 30 participantes en el estudio, 6 (40%) miembros del grupo de controles sanos estaban tomando algún medicamento, mientras que ningún miembro del grupo de pacientes con LLA estaba tomando otro medicamento además de su tratamiento de quimioterapia. Se realizó el análisis de Chi cuadrado de Pearson y se obtuvo una  $p$  de 0.006, lo que indica que hay una asociación estadísticamente significativa entre la variable ingesta de medicamentos y la ausencia o presencia de la enfermedad (Tabla 20).

**Tabla 20.** Análisis de la variable cualitativa: *ingesta de medicamentos*. Tabla cruzada y prueba de Chi cuadrado de Pearson. Se presenta el número y porcentaje de cada respuesta de la variable según la presencia o ausencia de enfermedad, así como el total de la respuesta, además se indica el valor  $p$  de la prueba de Chi cuadrado.

Variable cualitativa	Control sano n (%)	Paciente con LLA n (%)	Total n (%)	Valor $p$
<b>Otros medicamentos</b>				
SI	6 (40)	0 (0)	6 (20)	0.006
NO	9 (60)	15 (100)	24 (80)	
<b>Total de la muestra</b>	15 (50)	15 (50)	30 (100)	

Se les preguntó a los 6 participantes (controles sanos) que recibían tratamiento farmacológico, el medicamento, la dosis y el diagnóstico (Tabla 21).

**Tabla 21.** Lista de medicamentos, dosis y diagnóstico que los controles sanos (n SI=6) estaban recibiendo en el momento de la toma de muestra.

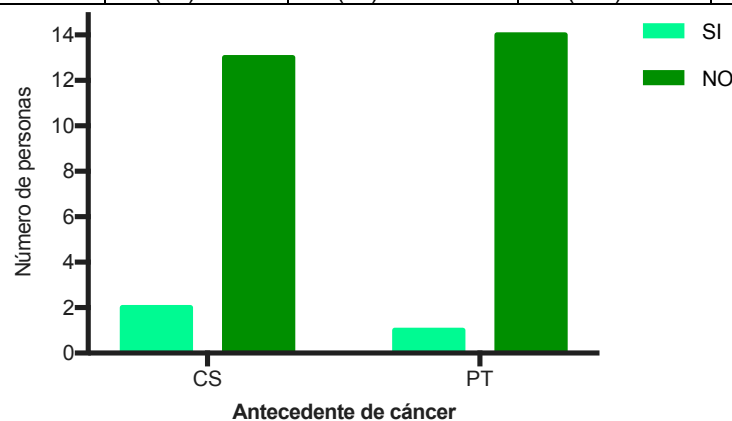
Medicamento	Dosis	Diagnóstico	#
<b>Dimegan-D</b> (Loratadina, Fenilefrina)	3 mL cada 12 horas	Infección en vías respiratorias	2
<b>Dalvear</b> (Dropropizina, Bromhexina)	3 ½ mL cada 12 horas	Infección en vías respiratorias	2
<b>Deflox</b> (Diclofenaco)	2 mL diarios	Infección en la garganta	1
<b>Vitaminas</b>	1 pastilla diaria	Aumentar defensas	1
<b>Bactrim</b> (Sulfametoxazol y Trimetoprima)	1 pastilla cada 8 horas	Gripa	1
<b>Atemperador</b> (Valproato de magnesio)	2.5 mL en la mañana y en la noche	Paroxismos en el cerebro	1

### 11.6.3 Antecedente de cáncer en la familia

De los 30 participantes del estudio, 3 respondieron que tenían algún antecedente de cáncer en familiares cercanos (2 controles sanos y 1 paciente con LLA), el resto de los participantes (27) mencionaron no tener antecedente de cáncer en algún familiar cercano. Se realizó el análisis de Chi cuadrado de Pearson y se obtuvo una  $p$  de 0.543, lo que indica que no hay asociación estadísticamente significativa entre la variable antecedente de cáncer y la ausencia o presencia de la enfermedad (Tabla 22, gráfica 7).

**Tabla 22.** Análisis de la variable cualitativa: *antecedente de cáncer*. Tabla cruzada y prueba de Chi cuadrado de Pearson. Se presenta el número y porcentaje de cada respuesta de la variable según la presencia o ausencia de enfermedad, así como el total de la respuesta, además se indica el valor  $p$  de la prueba de Chi cuadrado.

Variable cualitativa	Control sano n (%)	Paciente con LLA n (%)	Total n (%)	Valor $p$
<b>Antecedente de cáncer</b>				
SI	2 (13.33)	1 (6.66)	3 (10)	0.543
NO	13 (86.66)	14 (93.33)	27 (90)	
<b>Total de la muestra</b>	15 (50)	15 (50)	30 (100)	



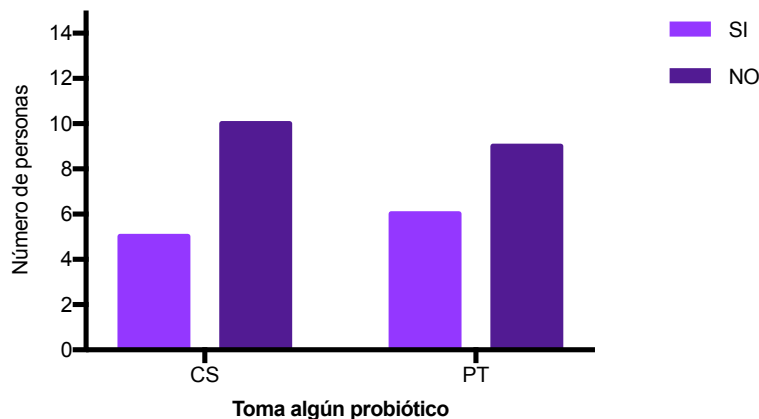
**Gráfica 7.** Gráfica de barras que muestra el número de participantes que respondieron sí tener o no un antecedente de cáncer en su familia, dividido por cada grupo de estudio (controles sanos: CS y pacientes con LLA en tratamiento: PT).

#### 11.6.4 Ingesta de probióticos

Los probióticos son alimentos con microorganismos vivos adicionados que permanecen activos en el intestino y tienen importantes efectos fisiológicos. Se les preguntó a los participantes del estudio si de forma regular estaban tomando algún probiótico, de los 30 participantes 11 reportaron que tomaban algún probiótico de forma regular (5 controles sanos y 6 pacientes con LLA en tratamiento) y 19 participantes reportaron que no tomaban probióticos de forma regular (10 controles sanos y 9 pacientes con LLA). Se realizó el análisis de Chi cuadrado de Pearson y se obtuvo una  $p$  de 0.705, lo que indica que no hay asociación estadísticamente significativa entre la variable ingesta de probióticos y la ausencia o presencia de la enfermedad (Tabla 23, gráfica 8).

**Tabla 23.** Análisis de la variable cualitativa: *ingesta de probióticos*. Tabla cruzada y prueba de Chi cuadrado de Pearson. Se presenta el número y porcentaje de cada respuesta de la variable según la presencia o ausencia de enfermedad, así como el total de la respuesta, además se indica el valor  $p$  de la prueba de Chi cuadrado.

Variable cualitativa	Control sano n (%)	Paciente con LLA n (%)	Total n (%)	Valor $p$
<b>Toma algún probiótico</b>				
SI	5 (33.33)	6 (40)	11 (36.66)	0.705
NO	10 (66.66)	9 (60)	19 (63.33)	
<b>Total de la muestra</b>	15 (50)	15 (50)	30 (100)	



**Gráfica 8.** Gráfica de barras que muestra el número de participantes que respondieron tomar regularmente algún probiótico y los que no lo hacen, dividido por cada grupo de estudio (controles sanos: CS y pacientes con LLA en tratamiento: PT).

Se les preguntó a los participantes del estudio que sí tomaban regularmente algún probiótico, cuál era este y con qué frecuencia los ingerían. El probiótico que se ingiere con mayor frecuencia es la bebida láctea fermentada marca Yakult® que contiene entre sus ingredientes a los *Lactobacillus casei* Shirota, los 11 participantes que reportaron tomar algún probiótico mencionaron que consumían esta bebida y solo un participante de los 11 tomaba además Sinuberase® (cápsulas que contienen *Lactobacillus acidophilus*) de forma regular (Tabla 24).

**Tabla 24.** Tipo de probióticos reportados que se consumen con frecuencia entre los participantes del estudio. Se muestra el número de participantes que los ingieren por cada grupo de estudio (control sano y paciente con LLA) y el total de la muestra (n=30).

Probiótico	Control sano n (%)	Paciente con LLA n (%)	Total n (%)
Yakult®	4 (13.33)	6 (20)	10 (33.33)
Yakult® y Sinuberase®	1 (3.33)	0 (0)	1 (3.33)
Ninguno	10 (33.33)	9 (30)	19 (63.33)
<b>Total</b>	15 (50)	15 (50)	30 (100)

En relación a la frecuencia con la que ingerían los probióticos, el mínimo reportado fue de cero probióticos a la semana y el máximo número reportado fueron 21 unidades de probióticos a la semana ( $M \pm DE = 1.29 \pm 3.944$ ). La tabla de frecuencias de toma de probióticos en una semana se presenta a continuación (Tabla 25).

**Tabla 25.** Frecuencia de consumo de probióticos durante una semana reportados por los participantes del estudio. Se muestra en la tabla el número y porcentaje de participantes que los ingieren por cada grupo de estudio (control sano y paciente con LLA) y el total de la muestra (n=30).

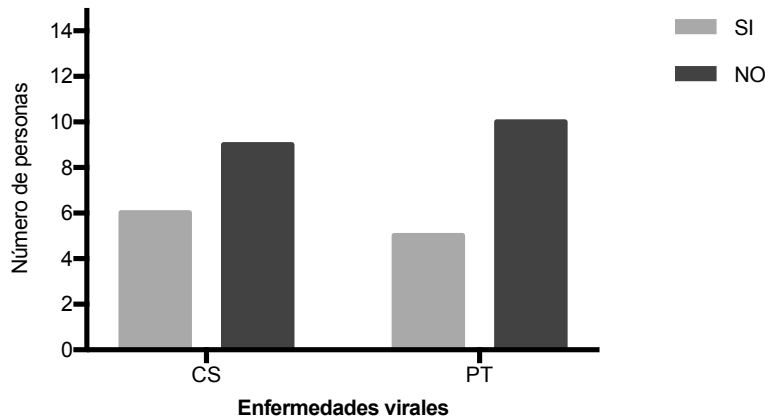
Probiótico (ingesta durante una semana)	Control sano n (%)	Paciente con LLA n (%)	Total n (%)
0	10 (33.33)	9 (30)	19 (63.33)
0.25	0	1 (3.33)	1 (3.33)
0.50	1 (3.33)	2 (6.66)	3 (10)
1.00	0	1 (3.33)	1 (3.33)
1.50	1 (3.33)	1 (3.33)	2 (6.66)
2.00	0	1 (3.33)	1 (3.33)
5.00	2 (6.66)	0	2 (6.66)
21.00	1 (3.33)	0	1 (3.33)
<b>Total</b>	15 (50)	15 (50)	30 (100)

### 11.6.5 Enfermedades virales

Se les preguntó a los participantes del estudio si habían padecido alguna enfermedad de origen viral o si la padecían en el momento de la toma de muestra; del total de los 30 participantes del estudio 11 reportaron haber padecido una enfermedad de origen viral (6 controles sanos y 5 pacientes con LLA) y 19 participantes no habían padecido alguna enfermedad viral (9 controles sanos y 10 pacientes con LLA). Se realizó el análisis de Chi cuadrado de Pearson y se obtuvo una  $p$  de 0.705, lo que indica que no hay asociación estadísticamente significativa entre la variable enfermedades virales y la ausencia o presencia de la enfermedad (Tabla 26, gráfica 9).

**Tabla 26.** Análisis de la variable cualitativa: *enfermedades virales*. Tabla cruzada y prueba de Chi cuadrado de Pearson. Se presenta el número y porcentaje de cada respuesta de la variable según la presencia o ausencia de enfermedad, así como el total de la respuesta, además se indica el valor  $p$  de la prueba de Chi cuadrado.

Variable cualitativa	Control sano n (%)	Paciente con LLA n (%)	Total n (%)	Valor $p$
<b>Enfermedades virales</b>				
SI	6 (40)	5 (33.33)	11 (36.66)	0.705
NO	9 (60)	10 (66.66)	19 (63.33)	
<b>Total de la muestra</b>	15 (50)	15 (50)	30 (100)	



**Gráfica 9.** Gráfica de barras que muestra el número de participantes que respondieron haber padecido alguna enfermedad viral o no haber padecido nunca una enfermedad viral, dividido por cada grupo de estudio (controles sanos: CS y pacientes con LLA en tratamiento: PT).

Dentro de las preguntas del cuestionario se les presentó a los participantes una lista de enfermedades e infecciones virales que son comunes en la edad pediátrica y en la población en general, con la finalidad de facilitar la historia clínica que se estaba realizando de cada control y paciente. El listado de enfermedades contenía las siguientes opciones: hepatitis (A / B / C), herpes simple (fuegos labiales por virus Herpes tipo 1), herpes genital (virus Herpes tipo 2), sarampión, paperas, varicela, rubéola, roséola o exantema súbito (virus Herpes 6 y 7), mononucleosis infecciosa (virus de Epstein-Barr/Citomegalovirus: CMV), megaloteritema o eritema infeccioso (Parvovirus B19), virus de inmunodeficiencia humana (VIH), virus de papiloma humano (VPH), dengue, zika, chikungunya, CRUP o laringotraqueobronquitis (virus de Parainfluenza), bronquiolitis (virus sincitial respiratorio: VSR), infección por Rotavirus, influenza, fiebre aftosa humana o exantema vírico de manos, pies y boca (virus de Coxsackie). Las enfermedades que fueron reportadas por los participantes se muestran en la tabla siguiente (Tabla 27).

**Tabla 27.** Tipos de enfermedades virales reportadas por los participantes del estudio (controles sanos y pacientes con LLA) y recuento de la frecuencia de la cada enfermedad (casos por cada enfermedad).

Enfermedad viral	Control sano (casos)	Paciente con LLA (casos)	Total
Varicela	3	4	7
Bronquiolitis	2	0	2
Hepatitis	0	1	1
Sarampión	0	1	1
Rubéola	1	0	1
Zika	0	1	1
CRUP	1	0	1
Rotavirus	1	0	1
Influenza	1	0	1

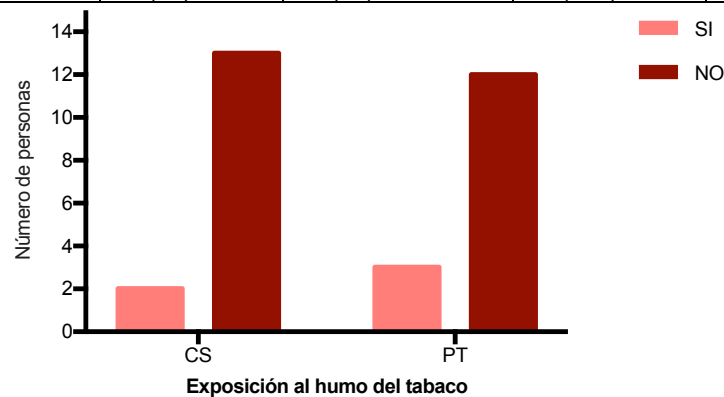
#### 11.6.6 Exposición al humo del tabaco

De los 30 participantes del estudio 5 reportaron que tuvieron o tienen exposición al humo del tabaco como fumadores pasivos (2 controles sanos y 3 pacientes con LLA), los otros 25 participantes no han estado en contacto con el humo del tabaco (13 controles sanos y 12 pacientes con LLA).

Se realizó el análisis de Chi cuadrado de Pearson y se obtuvo una  $p$  de 0.624, lo que indica que no hay asociación estadísticamente significativa entre la variable exposición al humo del tabaco y la ausencia o presencia de la enfermedad (Tabla 28, gráfica 10).

**Tabla 28.** Análisis de la variable cualitativa: *exposición al humo de tabaco*. Tabla cruzada y prueba de Chi cuadrado de Pearson. Se presenta el número y porcentaje de cada respuesta de la variable según la presencia o ausencia de enfermedad, así como el total de la respuesta, además se indica el valor  $p$  de la prueba de Chi cuadrado.

Variable cualitativa	Control sano n (%)	Paciente con LLA n (%)	Total n (%)	Valor $p$
<b>Exposición al humo de tabaco</b>				
SI	2 (13.33)	3 (20)	5 (16.66)	0.624
NO	13 (86.66)	12 (80)	25 (83.33)	
<b>Total de la muestra</b>	15 (50)	15 (50)	30 (100)	



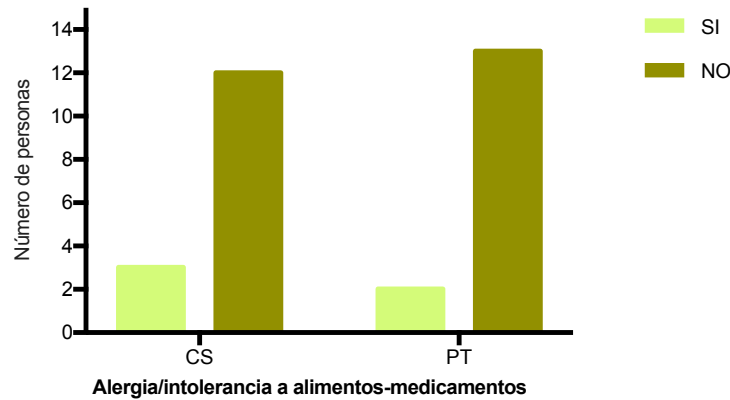
**Gráfica 10.** Gráfica de barras que muestra el número de participantes que respondieron tener o no haber tenido exposición frecuente al humo del tabaco, dividido por cada grupo de estudio (controles sanos: CS y pacientes con LLA en tratamiento: PT).

### 11.6.7 Alergia y/o intolerancia a alimentos y/o medicamentos

Se les preguntó a los participantes si presentaban alguna alergia y/o intolerancia a algún alimento y/o medicamento, de los 30 participantes 5 presentaban alguna alergia o intolerancia (3 controles sanos y 2 pacientes con LLA), el resto de los participantes no reportaron ninguna (25 participantes: 12 controles sanos y 13 pacientes con LLA). Se realizó el análisis de Chi cuadrado de Pearson y se obtuvo una  $p$  de 0.624, lo que indica que no hay asociación estadísticamente significativa entre la variable alergia y/o intolerancia a alimentos y/o medicamentos y la ausencia o presencia de la enfermedad (Tablas 29 y 30, gráfica 11).

**Tabla 29.** Análisis de la variable cualitativa: *alergia y/o intolerancia a alimentos y/o medicamentos*. Tabla cruzada y prueba de Chi cuadrado de Pearson. Se presenta el número y porcentaje de cada respuesta de la variable según la presencia o ausencia de enfermedad, así como el total de la respuesta, además se indica el valor  $p$  de la prueba de Chi cuadrado.

Variable cualitativa	Control sano n (%)	Paciente con LLA n (%)	Total n (%)	Valor $p$
<b>Alergia y/o intolerancia a alimentos y/o medicamentos</b>				
SI	3 (20)	2 (13.33)	5 (16.66)	0.624
NO	12 (80)	13 (86.66)	25 (83.33)	
<b>Total de la muestra</b>	15 (50)	15 (50)	30 (100)	



**Gráfica 11.** Gráfica de barras que muestra el número de participantes que respondieron sí tener alguna alergia y/o intolerancia a algún medicamento y/o alimento y los que no presentan ninguna alergia y/o intolerancia, dividido por cada grupo de estudio (controles sanos: CS y pacientes con LLA en tratamiento: PT).

**Tabla 30.** Recuento de alimentos y medicamentos a los que se presentan alergia o intolerancia reportados por los participantes del estudio (controles sanos y pacientes con LLA).

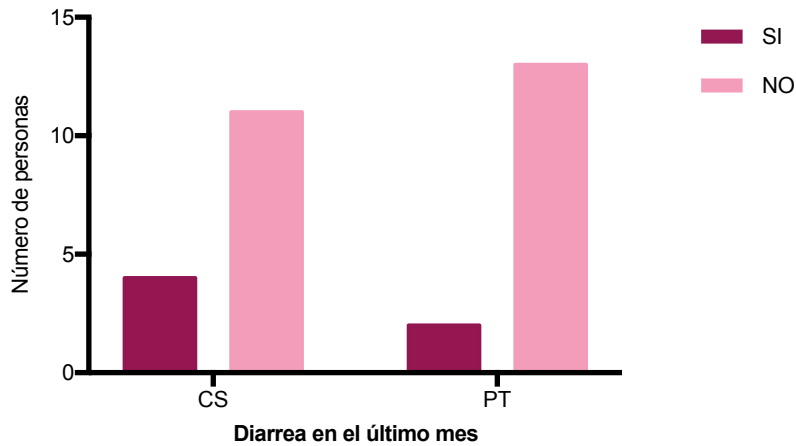
Alimento o medicamento	Control sano	Paciente con LLA	Recuento de frecuencia
Crema (alimento) -intolerancia	0	1	1
Leche (alimento) -intolerancia	1	0	1
Lactosa (alimento) -intolerancia	1	0	1
Sulfas (medicamento) -alergia	0	1	1
Penicilina (medicamento) -alergia	1	0	1
<b>TOTAL</b>	3/15	2/15	5/30

### 11.6.8 Enfermedades diarreicas en el último mes

Se les preguntó a los participantes del estudio si padecieron alguna enfermedad diarreica en el último mes antes o durante la toma de muestra de heces, de los 30 participantes 6 respondieron haber padecido diarrea en el último mes (4 controles sanos y 2 pacientes con LLA), los 24 participantes restantes (11 controles sanos y 13 pacientes con LLA) no padecieron diarrea un mes antes de la toma de muestra o durante la misma. Se realizó el análisis de Chi cuadrado de Pearson y se obtuvo una  $p$  de 0.361, lo que indica que no hay asociación estadísticamente significativa entre la variable enfermedades diarreicas en el último mes y la ausencia o presencia de la enfermedad (Tabla 31, gráfica 12).

**Tabla 31.** Análisis de la variable cualitativa: *diarrea en el último mes*. Tabla cruzada y prueba de Chi cuadrado de Pearson. Se presenta el número y porcentaje de cada respuesta de la variable según la presencia o ausencia de enfermedad, así como el total de la respuesta, además se indica el valor  $p$  de la prueba de Chi cuadrado.

Variable cualitativa	Control sano n (%)	Paciente con LLA n (%)	Total, n (%)	Valor $p$
<b>Diarrea en el último mes</b>				
SI	4 (26.66)	2 (13.33)	6 (20)	0.361
NO	11 (73.33)	13 (86.66)	24 (80)	
<b>Total de la muestra</b>	15 (50)	15 (50)	30 (100)	



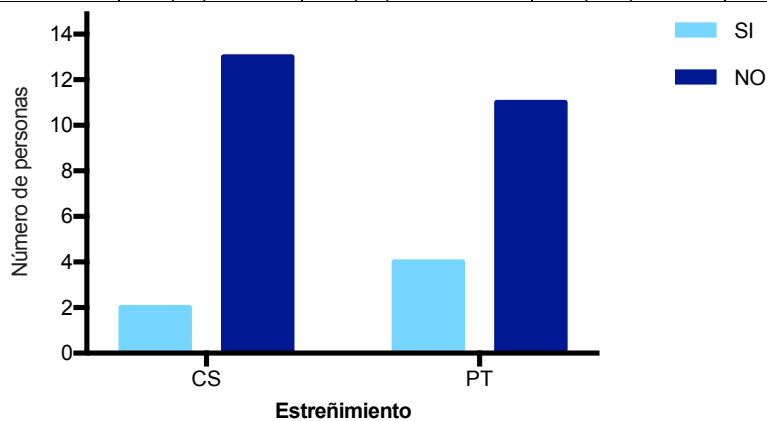
**Gráfica 12.** Gráfica de barras que muestra el número de participantes que respondieron sí haber padecido diarrea antes o durante la toma de muestra y los que no presentaron diarrea, dividido por cada grupo de estudio (controles sanos: CS y pacientes con LLA en tratamiento: PT).

### 11.6.9 Estreñimiento frecuente

Se les preguntó a los participantes del estudio si presentaban estreñimiento con frecuencia, de los 30 participantes 6 respondieron tener estreñimiento (2 controles sanos y 4 pacientes con LLA), los 24 participantes restantes (13 controles sanos y 11 pacientes con LLA) no presentaron este síntoma. Se realizó el análisis de Chi cuadrado de Pearson y se obtuvo una  $p$  de 0.361, lo que indica que no hay asociación estadísticamente significativa entre la variable estreñimiento frecuente y la ausencia o presencia de la enfermedad (Tabla 32, gráfica 13).

**Tabla 32.** Análisis de la variable cualitativa: *estreñimiento frecuente*. Tabla cruzada y prueba de Chi cuadrado de Pearson. Se presenta el número y porcentaje de cada respuesta de la variable según la presencia o ausencia de enfermedad, así como el total de la respuesta, además se indica el valor  $p$  de la prueba de Chi cuadrado.

Variable cualitativa	Control sano n (%)	Paciente con LLA n (%)	Total n (%)	Valor $p$
<b>Estreñimiento</b>				
SI	2 (13.33)	4 (26.66)	6 (20)	0.361
NO	13 (86.66)	11 (73.33)	24 (80)	
<b>Total de la muestra</b>	15 (50)	15 (50)	30 (100)	



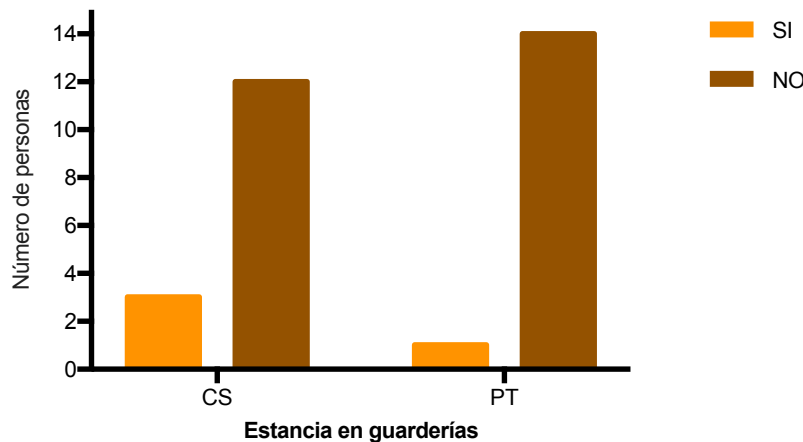
**Gráfica 13.** Gráfica de barras que muestra el número de participantes que respondieron tener estreñimiento frecuente y los que no presentan el síntoma, dividido por cada grupo de estudio (controles sanos: CS y pacientes con LLA en tratamiento: PT).

### 11.6.10 Asistencia a guarderías o estancias infantiles durante un periodo prolongado

Se les preguntó a los participantes del estudio si habían asistido a una guardería o estancia infantil durante un periodo prolongado, de los 30 participantes 4 respondieron haber asistido a alguna estancia o guardería (3 controles sanos y 1 paciente con LLA), los 26 participantes restantes respondieron que nunca habían asistido (12 controles sanos y 14 pacientes con LLA). Se realizó el análisis de Chi cuadrado de Pearson y se obtuvo una  $p$  de 0.283, lo que indica que no hay asociación estadísticamente significativa entre la variable asistencia a guarderías o estancias infantiles durante un tiempo prolongado y la ausencia o presencia de la enfermedad (Tabla 33, gráfica 14).

**Tabla 33.** Análisis de la variable cualitativa: *asistencia a guarderías o estancias infantiles durante un periodo prolongado*. Tabla cruzada y prueba de Chi cuadrado de Pearson. Se presenta el número y porcentaje de cada respuesta de la variable según la presencia o ausencia de enfermedad, así como el total de la respuesta, además se indica el valor  $p$  de la prueba de Chi cuadrado.

Variable cualitativa	Control sano n (%)	Paciente con LLA n (%)	Total n (%)	Valor $p$
<b>Estancia en guardería</b>				
SI	3 (20)	1 (6.66)	4 (13.33)	0.283
NO	12 (80)	14 (93.33)	26 (86.66)	
<b>Total de la muestra</b>	15 (50)	15 (50)	30 (100)	



**Gráfica 14.** Gráfica de barras que muestra el número de participantes que respondieron haber asistido a una guardería o estancia infantil durante un periodo prolongado y los que no, dividido por cada grupo de estudio (controles sanos: CS y pacientes con LLA en tratamiento: PT).

### 11.7 ANÁLISIS COMPARATIVO DE VARIABLES CUANTITATIVAS DE CONTROLES SANOS Y PACIENTES CON LLA

Con la información obtenida de los cuestionarios aplicados a los participantes se identificaron las siguientes variables cuantitativas (ver Tabla 4): edad, talla, peso, número de comidas al día, grupo de alimentos que se consumen durante una semana, litros de agua al día, número de evacuaciones en un día y para el caso de los pacientes con LLA: el tiempo transcurrido desde el diagnóstico y el tiempo con tratamiento, las cuales se analizaron estadísticamente (prueba T de Student), para analizar si existían diferencias entre los dos grupos de estudio.

### 11.7.1 Edad (años), talla (m) y peso (kg)

Una de las variables cuantitativas registrada en los cuestionarios fue la edad (años) de los controles y los pacientes, la media y desviación estándar de la edad de los controles sanos (n=15) fue  $6.338 \pm 4.139$  años y de los pacientes con LLA (n=15) fue  $7.882 \pm 3.861$  años. En relación al total de la muestra (n=30), la media y desviación estándar registrada fue  $7.110 \pm 4.010$  años. Se realizó la prueba T de Student y se obtuvo un valor  $p=0.300$ , lo que indica que no hay diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos de estudio. Otra variable cuantitativa que se registró en los cuestionarios fue la talla (m) de los participantes, la media y desviación estándar de la talla de los controles sanos (n=15) fue de  $1.142 \pm 0.278$  metros y de los pacientes con LLA (n=15) fue  $1.236 \pm 0.206$  metros. En relación al total de la muestra (n=30), la media y desviación estándar registrada fue de  $1.189 \pm 0.245$  metros. Se realizó la prueba T de Student y se obtuvo un valor  $p=0.303$ , lo que indica que no hay diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos de estudio. Se registró el peso de los participantes del estudio. La media y desviación estándar del peso (kg) de los controles sanos (n=15) fue  $27.500 \pm 17.597$  kg y de los pacientes con LLA (n=15) fue  $28.267 \pm 11.823$  kg. En relación al total de la muestra (n=30), la media y desviación estándar registrada fue  $27.883 \pm 14.735$  kg. Se realizó la prueba T de Student y se obtuvo un valor  $p=0.890$ , lo que indica que no hay diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos de estudio (Tabla 34).

**Tabla 34.** Estadísticos de grupo y prueba T de Student de las variables cuantitativas *edad, talla y peso*. Se presenta la media y la desviación estándar de cada variable cuantitativa según la ausencia o presencia de enfermedad (LLA), así como del total de los sujetos muestreados. Además, se indica el valor  $p$  de la prueba T de Student de cada variable.

Variable cuantitativa	Control sano (n=15) M $\pm$ DE	Paciente con LLA (n=15) M $\pm$ DE	Total (n=30) M $\pm$ DE	Valor $p$
Edad (años)	$6.338 \pm 4.139$	$7.882 \pm 3.861$	$7.110 \pm 4.010$	0.300
Talla (m)	$1.142 \pm 0.278$	$1.236 \pm 0.206$	$1.189 \pm 0.245$	0.303
Peso (kg)	$27.500 \pm 17.597$	$28.267 \pm 11.823$	$27.883 \pm 14.735$	0.890

### 11.7.2 Hábitos de alimentación

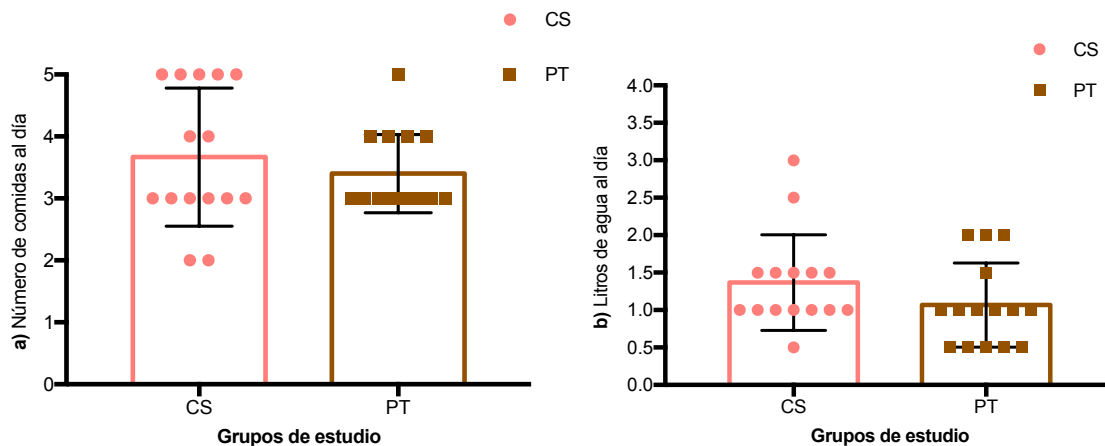
#### 11.7.2.1 Número de comidas y litros de agua al día

Se preguntó a los participantes información sobre sus hábitos de alimentación, en relación al número de comidas que realizaban en un día, la media y la desviación estándar del grupo de controles sanos (n=15) fue de  $3.67 \pm 1.112$  comidas en un día y de los pacientes con LLA (n=15) fue  $3.400 \pm 0.632$  comidas al día. En relación al total de la muestra (n=30), la media y desviación estándar registrada fue de  $3.533 \pm 0.899$  comidas al día. Se realizó la prueba T de Student y se obtuvo un valor  $p=0.428$ , lo que indica que no hay diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos de estudio (Tabla 35).

En relación a los litros de agua que tomaban en un día, la media y la desviación estándar del grupo de controles sanos (n=15) fue  $1.067 \pm 0.562$  litros de agua al día y de los pacientes con LLA (n=15)  $1.367 \pm 0.639$  litros de agua al día. En relación al total de la muestra (n=30), la media y desviación estándar registrada fue  $1.217 \pm 0.611$  litros de agua al día. Se realizó la prueba T de Student y se obtuvo un valor  $p=0.184$ , lo que indica que no hay diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos de estudio (Tabla 35, gráfica 15).

**Tabla 35.** Estadísticos de grupo y prueba T de Student de la variable cuantitativa *número de comidas y litros de agua al día*. Se presenta la media y la desviación estándar de cada variable cuantitativa según la ausencia o presencia de enfermedad (LLA), así como del total de los sujetos muestreados. Además, se indica el valor  $p$  de la prueba T de Student de cada variable.

Variable cuantitativa	Control sano (n=15) M $\pm$ DE	Paciente con LLA (n=15) M $\pm$ DE	Total (n=30) M $\pm$ DE	Valor $p$
Número de comidas al día	$3.67 \pm 1.112$	$3.400 \pm 0.632$	$3.533 \pm 0.899$	0.428
Litros de agua al día	$1.067 \pm 0.562$	$1.367 \pm 0.639$	$1.217 \pm 0.611$	0.184



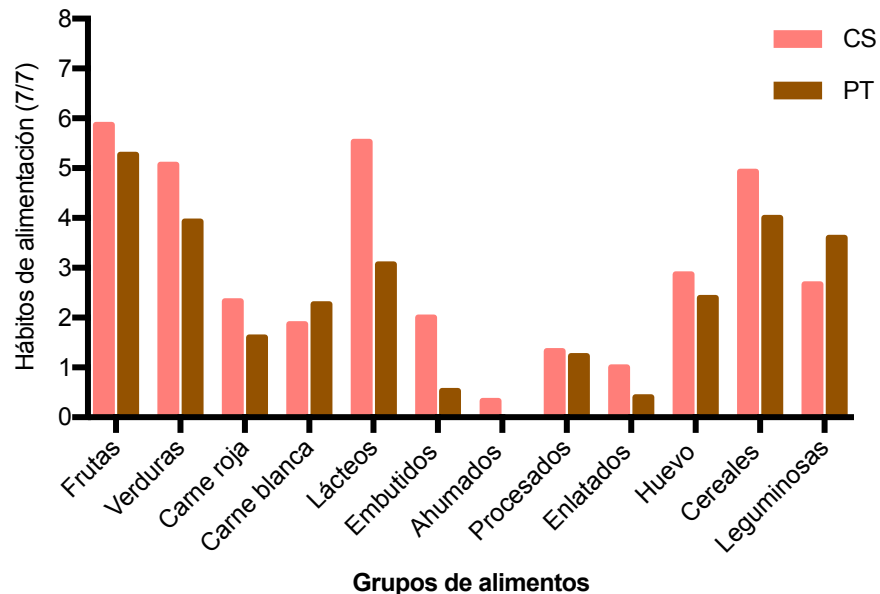
**Gráfica 15.** Gráficas de barras que muestran la media, la desviación estándar y los valores individuales de: a) número de comidas al día que realizan los participantes del estudio y b) litros de agua que toman al día; dividido por cada grupo (controles sanos: CS y pacientes con LLA en tratamiento: PT).

### 11.7.2.2 Grupos de alimentos consumidos durante una semana (7/7)

Se registró el recuento de los alimentos que se consumían durante una semana (frutas, verduras, carne roja, carne blanca, lácteos, embutidos, productos ahumados, productos procesados o en bolsa, productos enlatados, huevo, cereales y leguminosas), la media y la desviación estándar de cada uno de los grupos de alimentos, divididos por cada grupo de estudio (control sano y paciente con LLA) y el total de los dos grupos se muestran en la tabla siguiente (Tabla 36). Se realizó la prueba T de Student para cada uno de los grupos de alimentos que se consumen durante la semana y así analizar las diferencias entre variables. De resultados obtenidos en las pruebas se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las variables: ingesta semanal de embutidos ( $p=0.046$ ), ingesta semanal de productos ahumados ( $p=0.019$ ) y el consumo semanal de lácteos ( $p=0.008$ ) entre los dos grupos de estudio (Gráfica 16), el resto de las variables de alimentos no presentaron diferencias estadísticamente significativas (Tabla 36).

**Tabla 36.** Estadísticos de grupo y prueba T de Student de las variables cuantitativas *hábitos de alimentación por grupos de alimentos*. Se presenta la media y la desviación estándar de cada variable cuantitativa según la ausencia o presencia de enfermedad (LLA), así como del total de los sujetos muestreados. Además, se indica el valor *p* de la prueba T de Student de cada variable.

Variable cuantitativa	Control sano (n=15) M ± DE	Paciente con LLA (n=15) M ± DE	Total (n=30) M ± DE	Valor <i>p</i>
Frutas (7/7)	5.867 ± 2.030	5.267 ± 2.086	5.567 ± 2.045	0.431
Verdura (7/7)	5.067 ± 2.313	3.933 ± 2.576	4.500 ± 2.474	0.215
Carne roja (7/7)	2.333 ± 1.676	1.600 ± 1.183	1.967 ± 1.473	0.177
Carne blanca (7/7)	1.867 ± 1.641	2.267 ± 1.751	2.067 ± 1.680	0.524
Lácteos (7/7)	5.533 ± 2.356	3.067 ± 2.404	4.300 ± 2.654	<b>0.008</b>
Embutidos (7/7)	2.000 ± 2.420	0.533 ± 1.125	1.267 ± 1.998	<b>0.046</b>
Productos ahumados (7/7)	0.333 ± 0.488	0.000 ± 0.000	0.167 ± 0.379	<b>0.019</b>
Productos procesados (7/7)	1.333 ± 1.345	1.233 ± 1.293	1.283 ± 1.297	0.837
Productos enlatados (7/7)	1.000 ± 1.414	0.400 ± 0.507	0.700 ± 1.087	0.133
Huevo (7/7)	2.867 ± 2.166	2.400 ± 1.723	2.633 ± 1.938	0.519
Cereales (7/7)	4.933 ± 2.763	4.000 ± 2.645	4.467 ± 2.700	0.353
Leguminosas (7/7)	2.667 ± 2.497	3.600 ± 2.354	3.133 ± 2.431	0.301



**Gráfica 16.** Gráfica de barras que muestra la media del número de veces que se consumen (durante una semana: 7/7) los diferentes grupos de alimentos registrados, dividido por cada grupo de estudio (controles sanos: CS y pacientes con LLA en tratamiento: PT).

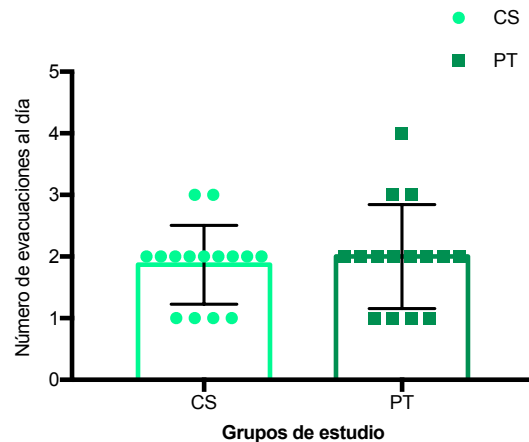
### 11.7.3 Número de evacuaciones al día

Se registró el número de evacuaciones al día de los participantes del estudio. La media y desviación estándar de los controles sanos (n=15) fue  $2.00 \pm 0.845$  evacuaciones en un día y de los pacientes con LLA (n=15) fue  $1.870 \pm 0.640$  evacuaciones en un día. En relación al total de la muestra (n=30), la media y desviación estándar registrada fue  $1.93 \pm 0.740$  evacuaciones en un día. Se realizó la prueba T de Student y se obtuvo un valor  $p=0.630$ , lo que indica que no hay diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos de estudio (Tabla 37, gráfica 17).

Al observar los datos del número de evacuaciones al día de los pacientes con LLA, vemos que son menores que el grupo de controles sanos, lo que coincide con la información proporcionada sobre el estreñimiento, pues los pacientes con LLA presentan este síntoma con mayor frecuencia (4/15 pacientes).

**Tabla 37.** Estadísticos de grupo y prueba T de Student de la variable cuantitativa *número de evacuaciones al día*. Se presenta la media y la desviación estándar de cada variable cuantitativa según la ausencia o presencia de enfermedad (LLA), así como del total de los sujetos muestreados. Además, se indica el valor *p* de la prueba T de Student de cada variable.

Variable cuantitativa	Control sano (n=15) M ± DE	Paciente con LLA (n=15) M ± DE	Total (n=30) M ± DE	Valor <i>p</i>
# de evacuaciones al día	2.00 ± 0.845	1.870 ± 0.640	1.93 ± 0.740	0.630



**Gráfica 17.** Gráfica de barras que muestra la media y la desviación estándar del número de evacuaciones al día que realizan los participantes del estudio dividido por cada grupo (controles sanos: CS y pacientes con LLA en tratamiento: PT).

#### 11.7.4 Tiempo desde el diagnóstico y tiempo con tratamiento de quimioterapia

Se les preguntó a los pacientes con LLA, cuánto tiempo había pasado desde que recibieron el diagnóstico confirmatorio y durante cuánto tiempo habían estado recibiendo tratamiento para su condición (Tabla 38). Según los resultados que se registraron, el 80% (12 pacientes) iniciaron su tratamiento en el momento que recibieron el diagnóstico, el 13% (2 pacientes) iniciaron el tratamiento tres meses después de recibir el diagnóstico y el 6% (1 paciente) recibió su tratamiento un mes después de su diagnóstico (Tabla 39).

**Tabla 38.** Estadísticos de grupo de las variables cuantitativas: *tiempo desde el diagnóstico* y *tiempo con tratamiento* se presenta el valor mínimo y máximo registrado; la media y la desviación estándar de cada variable cuantitativa.

Variable	Min	Max	M ± DE
Tiempo desde el Dx (años)	0.16	4.00	1.674 ± 1.123
Tiempo con Tx (años)	0.16	4.00	1.636 ± 1.137

**Tabla 39.** Diferencias entre el tiempo del diagnóstico y el tiempo en que los pacientes iniciaron el tratamiento.

Tiempo de Dx y Tx	n (%)
Mismo tiempo de Dx y Tx	12 (80)
Inicio de Tx un mes después de Dx	1 (6.66)
Inicio de Tx tres meses después de Dx	2 (13.33)
<b>Total</b>	<b>15 (100)</b>

## 11.8 CORRELACIÓN ESTADÍSTICA DE VARIABLES CUALITATIVAS Y CUANTITATIVAS

Se analizó la correlación de las variables cualitativas y cuantitativas (información de los cuestionarios) y los datos experimentales (expresión génica de virus y bacterias y concentraciones de ácidos nucleicos) empleando el modelo de correlación de Spearman para las variables cualitativas y el modelo de correlación de Pearson para las variables cuantitativas. Se reportan únicamente las variables cuya correlación fue estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) (Tablas 40 y 41).

**Tabla 40.** Correlaciones estadísticas de las variables cualitativas: valor  $p$  ( $p < 0.05$ ) y coeficiente Rho de Spearman ( $r$ ) de cada par de variables.

Variable cualitativa	Valor $p$ ( $p < 0.05$ )	Coeficiente Rho de Spearman
<b>Controles sanos (CS)</b>		
ADN total (ng/ $\mu$ L)( $\mu$ g/gr)/estancia en guardería	0.024	-0.579
ADN viral (ng/ $\mu$ L)( $\mu$ g/gr)/exposición al humo tabaco	0.036	0.545
ARN viral (ng/ $\mu$ L)( $\mu$ g/gr)/exposición al humo tabaco	0.021	0.590
ADN viral (ng/ $\mu$ L)( $\mu$ g/gr)/estancia en guardería	0.024	-0.579
ARN viral (ng/ $\mu$ L)( $\mu$ g/gr)/estancia en guardería	0.038	-0.540
Ct <i>Bacteroides</i> spp/antecedente de cáncer	0.036	-0.545
*2 <sup>ΔCt</sup> <i>Bacteroides</i> spp/enfermedades virales	0.028	-0.567
Ct <i>Firmicutes</i> spp/exposición al humo tabaco	0.036	-0.545
<b>Pacientes con tratamiento (PT)</b>		
ADN viral (ng/ $\mu$ L)( $\mu$ g/gr)/toma de probióticos	0.007	0.661
ARN viral (ng/ $\mu$ L)( $\mu$ g/gr)/toma de probióticos	0.012	0.630
Ct <i>Bacteroides</i> spp/género	0.031	0.557
*2 <sup>ΔCt</sup> Torquetenovirus/toma de probióticos	0.028	0.567

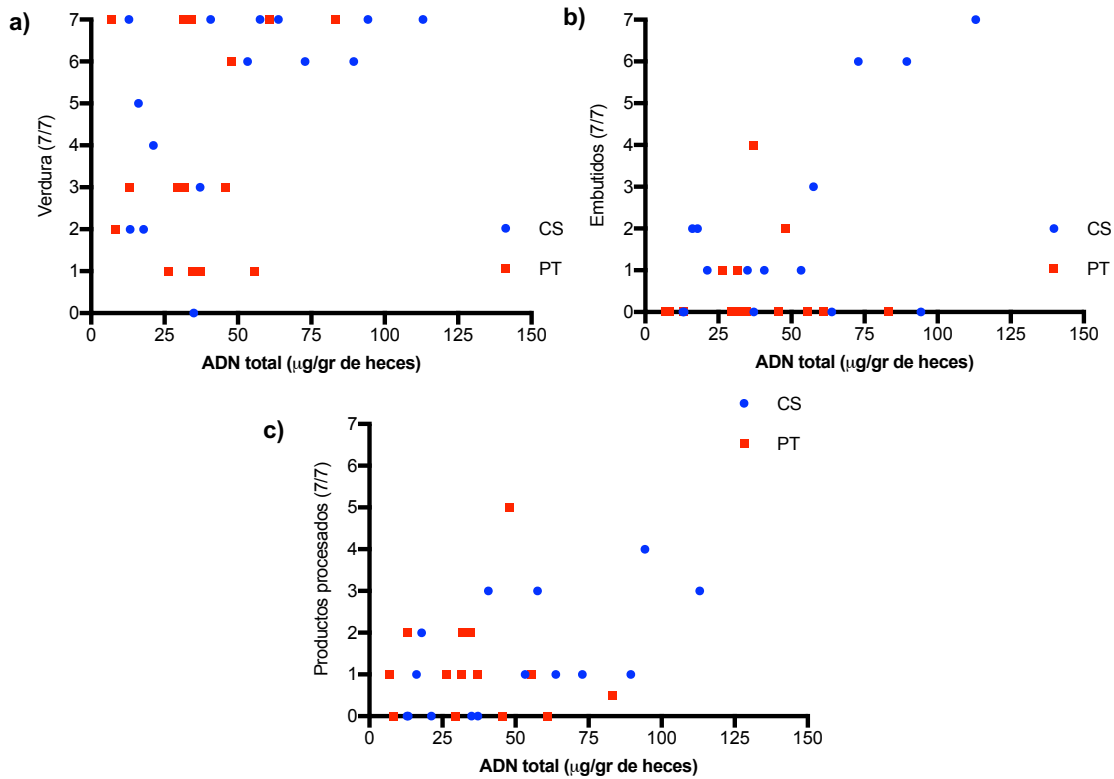
**Tabla 41.** Correlaciones estadísticas de las variables cuantitativas: valor  $p$  ( $p < 0.05$ ) y coeficiente de correlación de Pearson ( $r$ ) de cada par de variables.

Variable cuantitativa	Valor $p$ ( $p < 0.05$ )	Coeficiente de correlación de Pearson
<b>Controles sanos (CS): gráficas 18-20</b>		
ADN total (ng/ $\mu$ L)( $\mu$ g/gr)/verdura (7/7)	0.036	0.545
ADN total (ng/ $\mu$ L)( $\mu$ g/gr)/embutidos (7/7)	0.013	0.623
ADN total (ng/ $\mu$ L)( $\mu$ g/gr)/procesados (7/7)	0.020	0.591
ARN total (ng/ $\mu$ L)( $\mu$ g/gr)/embutidos (7/7)	0.010	0.643
ARN viral (ng/ $\mu$ L)( $\mu$ g/gr)/carne roja (7/7)	0.038	0.539
*2 <sup>ΔCt</sup> <i>Bacteroides</i> spp/procesados (7/7)	0.013	0.624
*2 <sup>ΔCt</sup> <i>Lachnospiraceae</i> spp/litros de agua/día	0.042	-0.531
*2 <sup>ΔCt</sup> <i>Firmicutes</i> spp/litros de agua/día	0.011	-0.636
<b>Pacientes con tratamiento (PT): gráficas 21-25</b>		
ARN total (ng/ $\mu$ L)( $\mu$ g/gr)/edad (años)	0.034	0.550
ARN total (ng/ $\mu$ L)( $\mu$ g/gr)/talla (metros)	0.024	0.579
ARN total (ng/ $\mu$ L)( $\mu$ g/gr)/peso (kg)	0.013	0.625
Ct <i>Bacteroides</i> spp/talla (metros)	0.044	-0.526
*2 <sup>ΔCt</sup> <i>Bacteroides</i> spp/lácteos (7/7)	0.046	-0.521
Ct <i>Lachnospiraceae</i> spp/talla (metros)	0.045	-0.523
*2 <sup>ΔCt</sup> <i>Lachnospiraceae</i> spp/peso (kg)	0.022	0.585
Ct <i>Firmicutes</i> spp/leguminosas (7/7)	0.031	0.556
*2 <sup>ΔCt</sup> <i>Firmicutes</i> spp/edad (años)	0.005	0.684
*2 <sup>ΔCt</sup> <i>Firmicutes</i> spp/talla (metros)	0.032	0.555
*2 <sup>ΔCt</sup> <i>Firmicutes</i> spp/peso (kg)	0.005	0.680
Ct Torquetenovirus/leguminosas (7/7)	0.037	-0.542
Ct Torquetenovirus/talla (metros)	0.035	0.547
*2 <sup>ΔCt</sup> Torquetenovirus/talla (metros)	0.011	-0.633

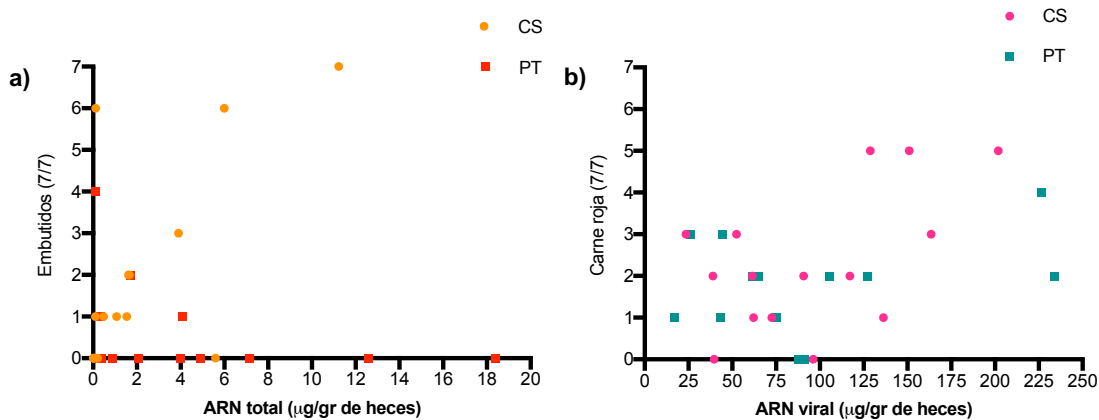
\* Correlación entre variables que también son estadísticamente significativas con el valor  $\Delta C_t$ .

### 11.8.1 Gráficas de dispersión de las variables cuantitativas con correlación estadísticamente significativa que se cumple para los controles sanos

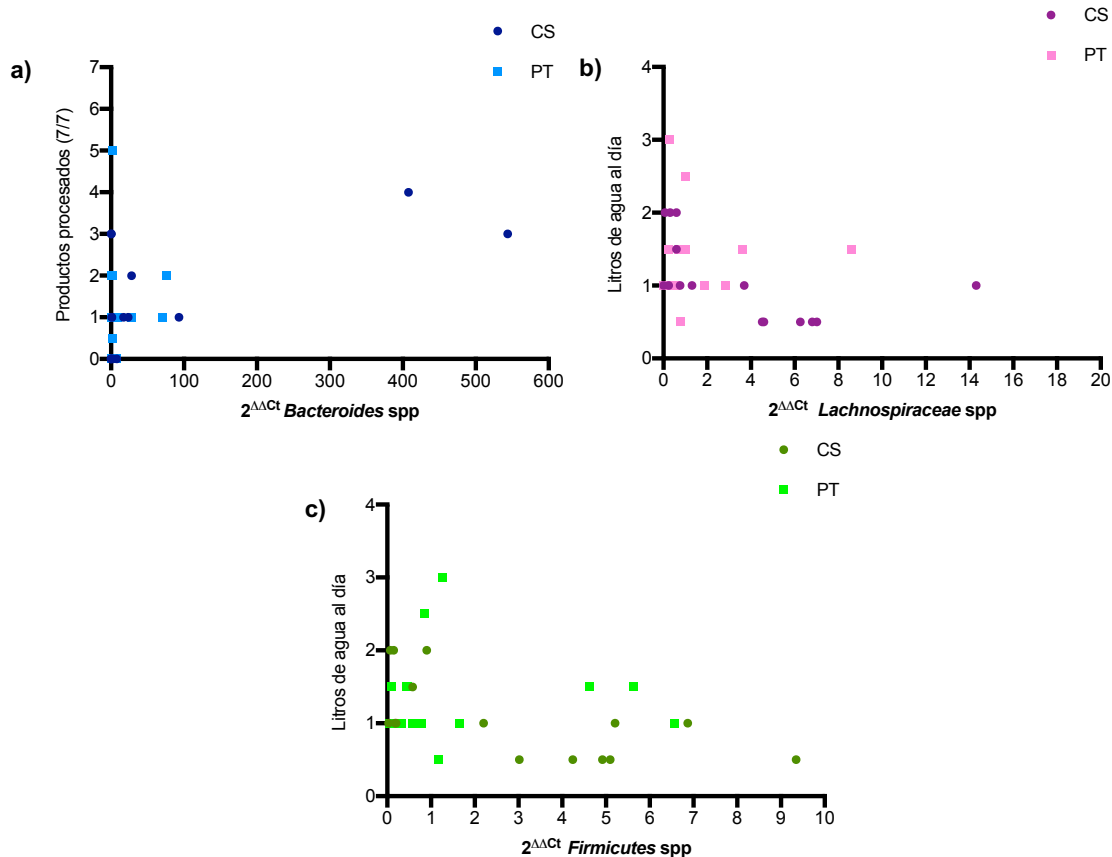
A continuación se presentan las gráficas de dispersión x-y (Gráficas 18–20) de las variables cuantitativas que tuvieron una correlación estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ), la cual se cumple únicamente para el grupo de controles sanos (Tabla 41); se graficaron también el grupo de pacientes con LLA para observar las diferencias entre grupos aunque no se cumple la correlación ( $p > 0.05$ ).



**Gráfica 18.** Gráficas de dispersión de las variables: **a)** ADN total ( $\mu\text{g/gr}$  de heces) y consumo de verdura (7/7);  $p=0.036$ , coeficiente de correlación de Pearson  $r=0.545$ . **b)** ADN total ( $\mu\text{g/gr}$  de heces) y consumo de embutidos (7/7);  $p=0.013$ , coeficiente de correlación de Pearson  $r=0.623$ . **c)** ADN total ( $\mu\text{g/gr}$  de heces) y consumo de productos procesados (7/7);  $p=0.020$ , coeficiente de correlación de Pearson  $r=0.591$ .



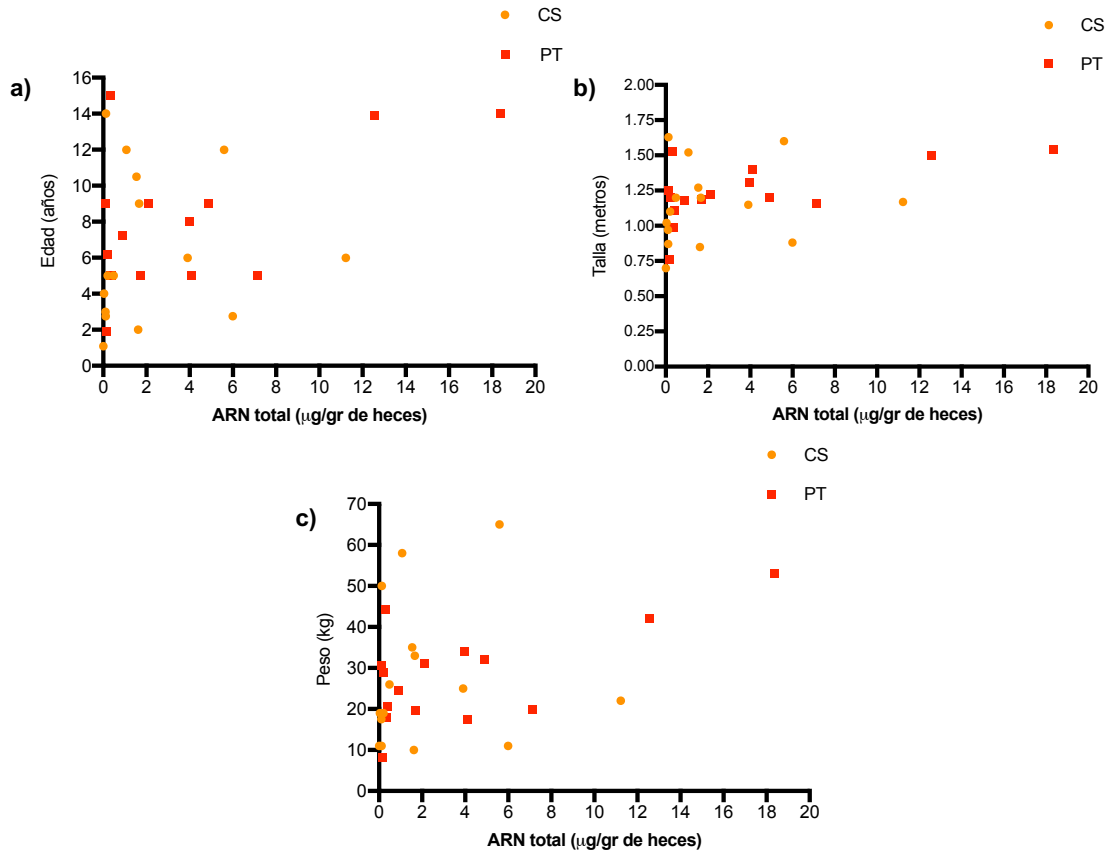
**Gráfica 19.** Gráficas de dispersión de las variables: **a)** ARN total ( $\mu\text{g/gr}$  de heces) y consumo de embutidos (7/7);  $p=0.010$ , coeficiente de correlación de Pearson  $r=0.643$ . **b)** ARN viral ( $\mu\text{g/gr}$  de heces) y consumo de carne roja (7/7);  $p=0.038$ , coeficiente de correlación de Pearson  $r=0.539$ .



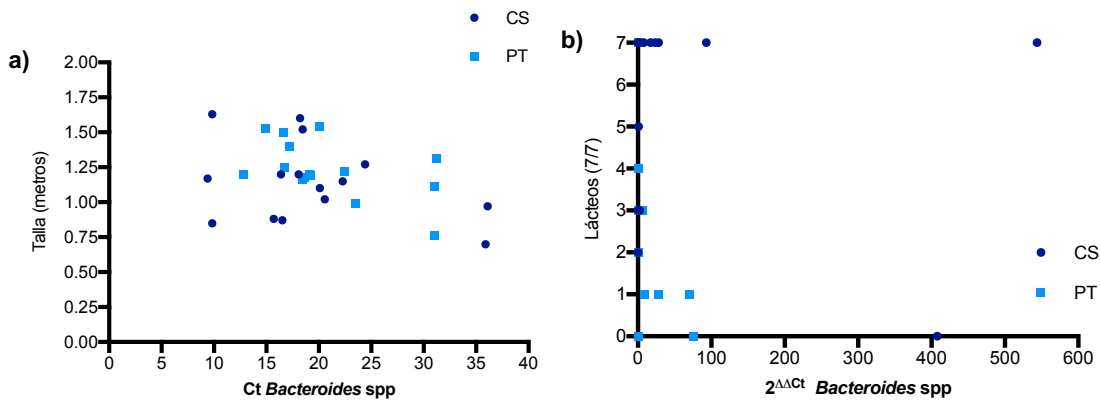
**Gráfica 20.** Gráficas de dispersión de las variables: **a)**  $2^{\Delta\Delta Ct}$  *Bacteroides* spp y consumo de productos procesados (7/7);  $p=0.013$ , coeficiente de correlación de Pearson  $r=0.624$ . **b)**  $2^{\Delta\Delta Ct}$  *Lachnospiraceae* spp y litros de agua en un día;  $p=0.042$ , coeficiente de correlación de Pearson  $r=-0.531$ . **c)**  $2^{\Delta\Delta Ct}$  *Firmicutes* spp y litros de agua en un día;  $p=0.011$ , coeficiente de correlación de Pearson  $r=-0.636$ .

### 11.8.2 Gráficas de dispersión de las variables cuantitativas con correlación estadísticamente significativa que se cumple para los pacientes con tratamiento

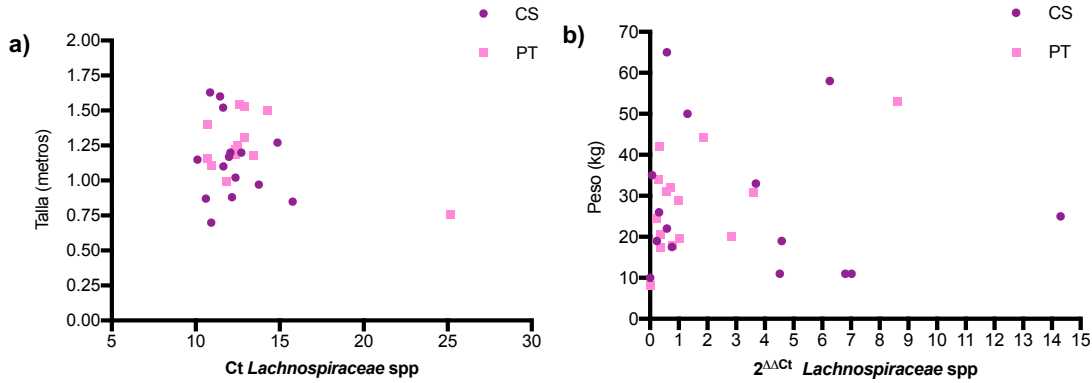
A continuación se presentan las gráficas de dispersión x-y (Gráficas 21-25) de las variables cuantitativas que tuvieron una correlación estadísticamente significativa ( $p<0.05$ ); la cual se cumple únicamente para el grupo de pacientes con LLA (Tabla 41); se graficaron también el grupo de los controles sanos para observar las diferencias entre grupos aunque no se cumple la correlación ( $p>0.05$ ).



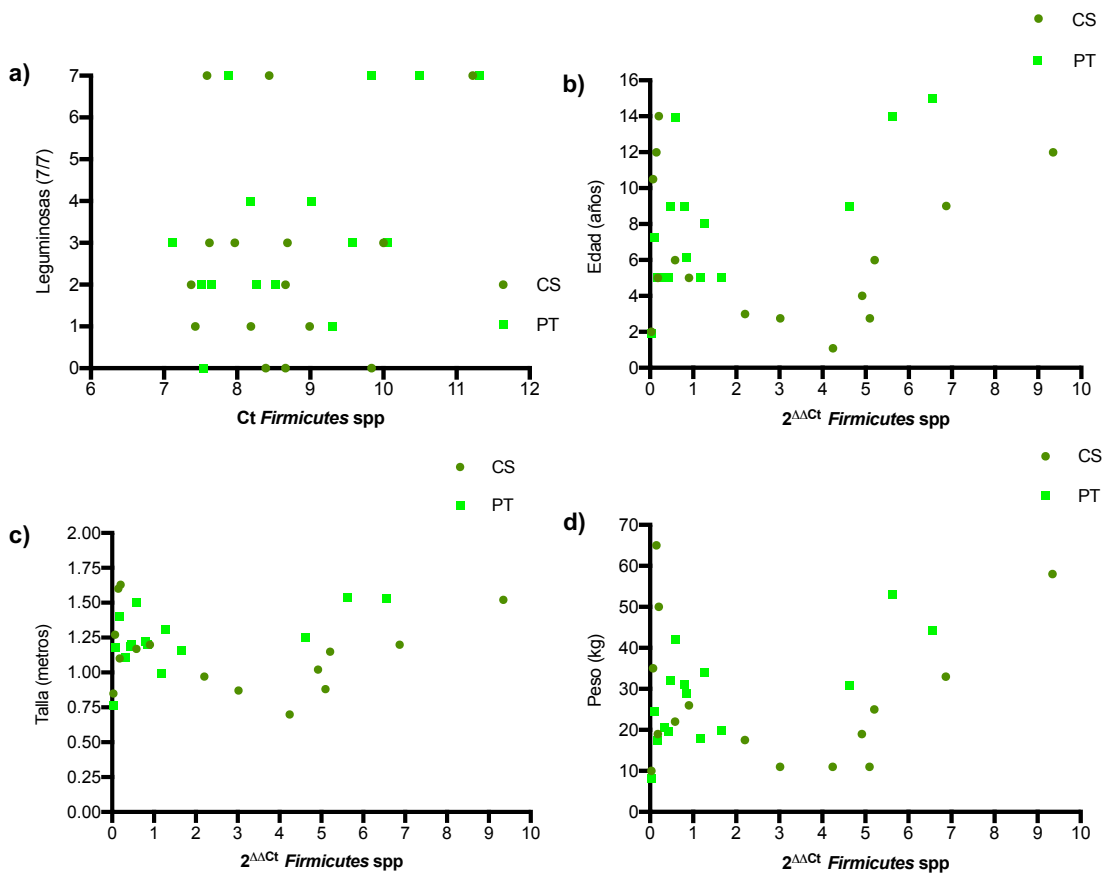
**Gráfica 21.** Gráficas de dispersión de las variables: **a)** ARN total (μg/gr de heces) y edad (años);  $p=0.034$ , coeficiente de correlación de Pearson  $r=0.550$ . **b)** ARN total (μg/gr de heces) y talla (metros);  $p=0.024$ , coeficiente de correlación de Pearson  $r=0.579$ . **c)** ARN total (μg/gr de heces) y peso (kg);  $p=0.013$ , coeficiente de correlación de Pearson  $r=0.625$ .



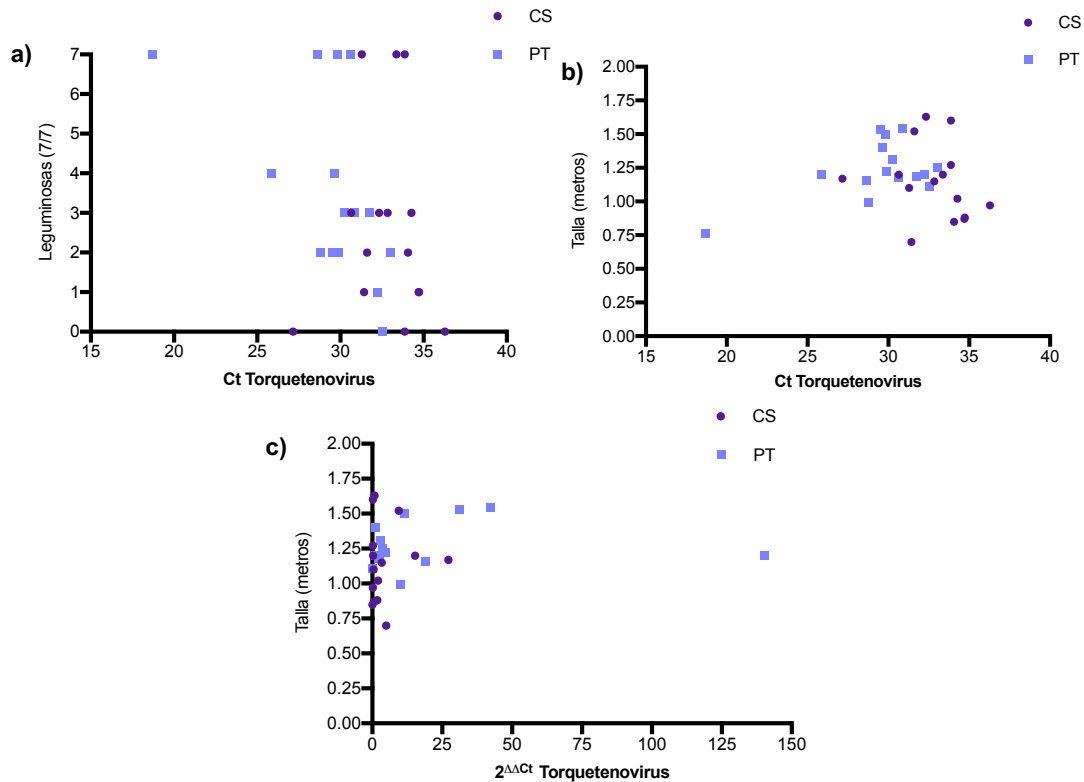
**Gráfica 22.** Gráfica de dispersión de las variables: **a)** Ct *Bacteroides* spp y talla (metros);  $p=0.044$ , coeficiente de correlación de Pearson  $r=-0.526$ . **b)**  $2^{\Delta\Delta Ct}$  *Bacteroides* spp y consumo de productos lácteos (7/7);  $p=0.046$ , coeficiente de correlación de Pearson  $r=-0.521$ .



**Gráfica 23.** Gráfica de dispersión de las variables: **a)** *Ct Lachnospiraceae* spp y talla (metros);  $p = 0.045$ , coeficiente de correlación de Pearson  $r = -0.523$ . **b)**  $2^{\Delta\Delta Ct}$  *Lachnospiraceae* spp y peso (kg);  $p = 0.022$ , coeficiente de correlación de Pearson  $r = 0.585$ .



**Gráfica 24.** Gráfica de dispersión de las variables: **a)** *Ct Firmicutes* spp y consumo de leguminosas (7/7);  $p = 0.031$ , coeficiente de correlación de Pearson  $r = 0.556$ . **b)**  $2^{\Delta\Delta Ct}$  *Firmicutes* spp y edad (años);  $p = 0.005$ , coeficiente de correlación de Pearson  $r = 0.684$ . **c)**  $2^{\Delta\Delta Ct}$  *Firmicutes* spp y talla (metros);  $p = 0.032$ , coeficiente de correlación de Pearson  $r = 0.555$ . **d)**  $2^{\Delta\Delta Ct}$  *Firmicutes* spp y peso (kg);  $p = 0.005$ , coeficiente de correlación de Pearson  $r = 0.680$ .



**Gráfica 25.** Gráficas de dispersión de las variables: **a)** Ct Torquetenovirus y consumo de leguminosas (7/7);  $p=0.037$ , coeficiente de correlación de Pearson  $r=-0.542$ . **b)** Ct Torquetenovirus y talla (metros);  $p=0.035$ , coeficiente de correlación de Pearson  $r=0.547$ . **c)**  $2^{\Delta\Delta Ct}$  Torquetenovirus y talla (metros);  $p=0.011$ , coeficiente de correlación de Pearson  $r=-0.633$ .

### 11.9 CORRELACIÓN ESTADÍSTICA DE LAS VARIABLES CUANTITATIVAS EXPERIMENTALES

Se realizó la correlación de las variables cuantitativas experimentales (expresión génica de virus y bacterias y concentraciones de ácidos nucleicos: ADN total, ARN total, ADN viral, ARN viral) empleando el modelo de correlación de Pearson para las variables cuantitativas. Se analizó la correlación de todas las variables entre sí, pero se reportan únicamente aquellas cuya correlación fue estadísticamente significativa ( $p<0.05$ ) (Tabla 42).

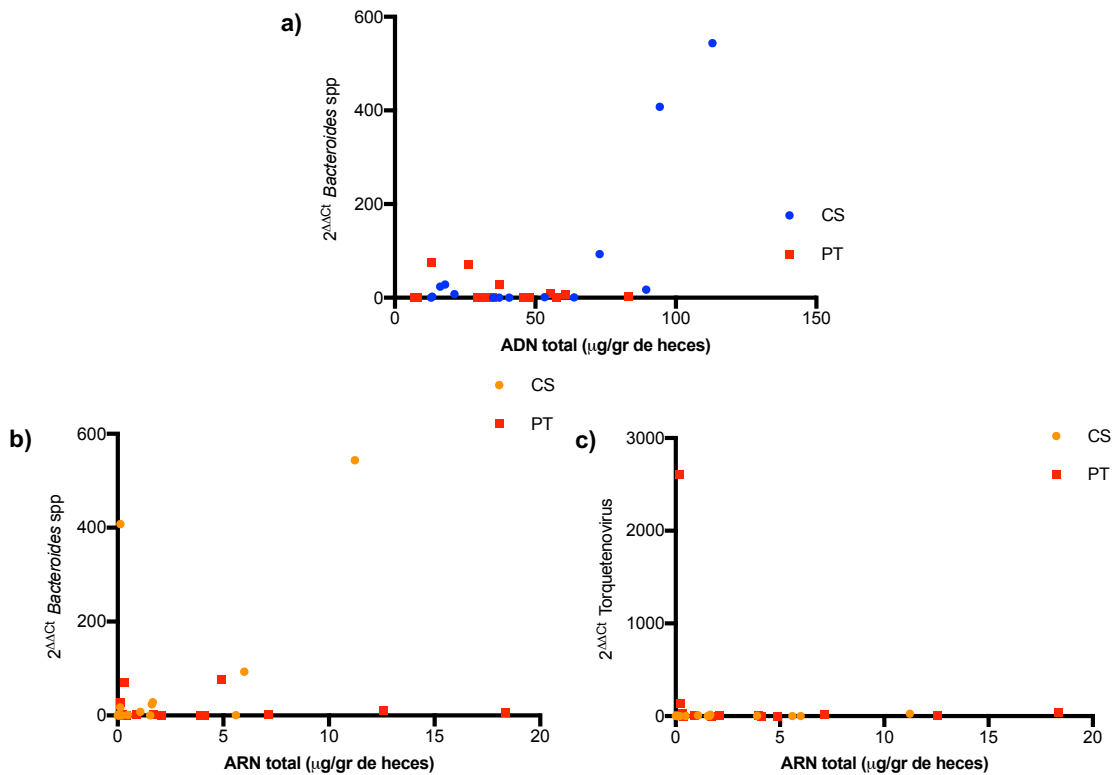
**Tabla 42.** Correlaciones estadísticas de las variables cuantitativas experimentales, valor  $p$  ( $p<0.05$ ) y coeficiente de correlación de Pearson ( $r$ ) de cada par de variables.

Variable cuantitativa experimental	Valor $p$ ( $p<0.05$ )	Coefficiente de correlación de Pearson
<b>Controles sanos (CS): gráficas 26 y 27, 29*</b>		
ADN total (ng/ $\mu$ L)( $\mu$ g/gr)/ $2^{\Delta\Delta Ct}$ <i>Bacteroides</i> spp	0.002	0.721
ARN total (ng/ $\mu$ L)( $\mu$ g/gr)/ $2^{\Delta\Delta Ct}$ <i>Bacteroides</i> spp	0.024	0.578
ARN total (ng/ $\mu$ L)( $\mu$ g/gr)/ $2^{\Delta\Delta Ct}$ Torquetenovirus	0.010	0.638
$2^{\Delta\Delta Ct}$ <i>Bacteroides</i> spp/ $2^{\Delta\Delta Ct}$ Torquetenovirus	0.016	0.607
$2^{\Delta\Delta Ct}$ <i>Lachnospiraceae</i> spp/ $2^{\Delta\Delta Ct}$ <i>Firmicutes</i> spp*	0.005	0.683
<b>Pacientes con tratamiento (PT): gráficas 28, 29*</b>		
ARN total (ng/ $\mu$ L)( $\mu$ g/gr)/ $2^{\Delta\Delta Ct}$ <i>Lachnospiraceae</i> spp	0.008	0.652
Ct <i>Lachnospiraceae</i> spp/Ct Torquetenovirus	0.000	-0.819
$2^{\Delta\Delta Ct}$ <i>Lachnospiraceae</i> spp/ $2^{\Delta\Delta Ct}$ <i>Firmicutes</i> spp*	0.002	0.738

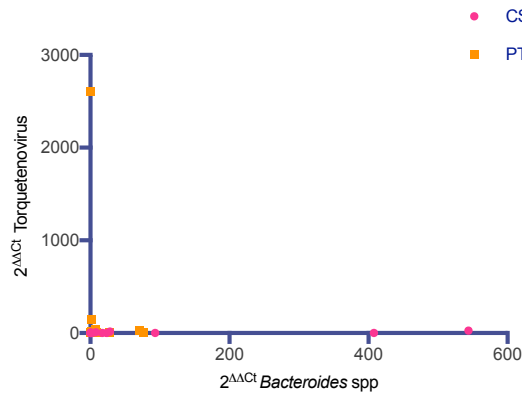
\* Par de variables cuantitativas experimentales que se correlacionan estadísticamente en el grupo de controles sanos y pacientes con tratamiento (se presenta solo una gráfica de dispersión por ambos grupos).

### 11.9.1 Gráficas de dispersión de las variables cuantitativas experimentales con correlación estadísticamente significativa que se cumple para los controles sanos

A continuación se presentan las gráficas de dispersión x-y (Gráficas 26 y 27) de las variables cuantitativas experimentales que tuvieron una correlación estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ); la cual se cumple únicamente para el grupo de controles sanos (Tabla 42); se graficaron también el grupo de pacientes con LLA para observar las diferencias entre grupos aunque no se cumple la correlación ( $p > 0.05$ ).



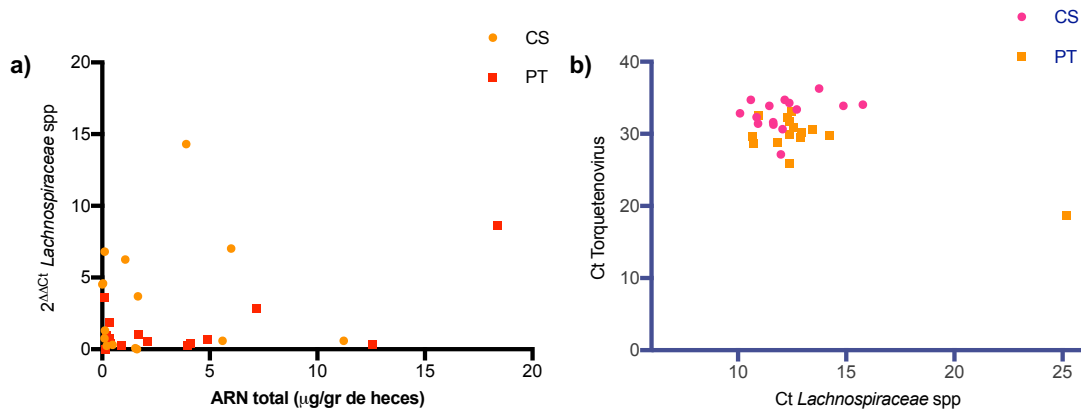
**Gráfica 26.** Gráficas de dispersión de las variables: **a)** ADN total ( $\mu\text{g/gr}$  de heces) y  $2^{\Delta\Delta Ct}$  Bacteroides spp;  $p=0.002$ , coeficiente de correlación de Pearson  $r=0.721$ . **b)** ARN total ( $\mu\text{g/gr}$  de heces) y  $2^{\Delta\Delta Ct}$  Bacteroides spp;  $p=0.024$ , coeficiente de correlación de Pearson  $r=0.578$ . **c)** ARN total ( $\mu\text{g/gr}$  de heces) y  $2^{\Delta\Delta Ct}$  Torquetenovirus;  $p=0.010$ , coeficiente de correlación de Pearson  $r=0.638$ .



**Gráfica 27.** Gráficas de dispersión de las variables  $2^{\Delta\Delta Ct}$  Bacteroides spp y  $2^{\Delta\Delta Ct}$  Torquetenovirus;  $p=0.016$ , coeficiente de correlación de Pearson  $r=0.607$ .

### 11.9.2 Gráficas de dispersión de las variables cuantitativas experimentales con correlación estadísticamente significativa que se cumple para los pacientes con tratamiento

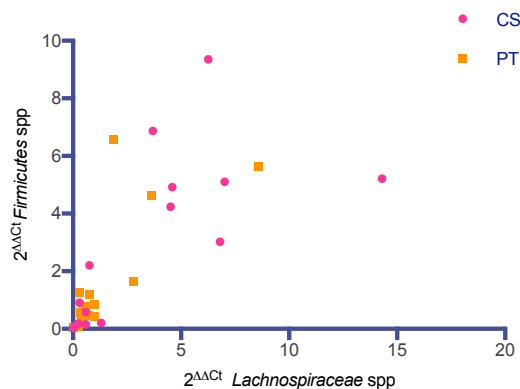
A continuación se presentan las gráficas de dispersión x-y (Gráfica 28) de las variables cuantitativas experimentales que tuvieron una correlación estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ); la cual se cumple únicamente para el grupo de pacientes con tratamiento (Tabla 42); se graficaron también el grupo de controles sanos para observar las diferencias entre grupos aunque no se cumple la correlación ( $p > 0.05$ ).



**Gráfica 28.** Gráficas de dispersión de las variables **a)** ARN total ( $\mu\text{g/gr}$  de heces) y  $2^{\Delta\Delta\text{Ct}}$  *Lachnospiraceae* spp;  $p=0.008$ , coeficiente de correlación de Pearson  $r=0.652$ . **b)** Ct *Lachnospiraceae* spp y Ct Torquetenovirus;  $p=0.000$  coeficiente de correlación de Pearson  $r=-0.819$ .

### 11.9.3 Gráficas de dispersión de las variables cuantitativas experimentales con correlación estadísticamente significativa que se cumple para ambos grupos de estudio

A continuación se presentan la gráfica de dispersión x-y (Gráfica 29) de las variables cuantitativas experimentales que tuvieron una correlación estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ); la cual se cumple para ambos grupos de estudio (Tabla 42).



**Gráfica 29.** Gráficas de dispersión de las variables  $2^{\Delta\Delta\text{Ct}}$  *Lachnospiraceae* spp y  $2^{\Delta\Delta\text{Ct}}$  *Firmicutes* spp; controles sanos:  $p=0.005$  coeficiente de correlación de Pearson  $r=0.683$ , pacientes:  $p=0.002$  coeficiente de correlación de Pearson  $r=0.738$ .

## 12. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Uno de los objetivos del presente trabajo fue identificar mediante una revisión en la literatura los virus que ya se han reportado como miembros constantes del viroma intestinal. Se han realizado estudios de secuenciación masiva que ya han identificado a algunas de las familias de virus que son los miembros principales del viroma, entre los que destacan los bacteriófagos (Minot *et al.*, 2013), sin embargo, aún no se han hecho los estudios que detallen las características de los virus, no se conoce el genoma completo y no se han logrado aislar ni cultivar. Por las razones que se mencionaron anteriormente resultó complicado seleccionar alguna especie de virus en particular perteneciente a alguna de las familias para identificarlo por PCR en tiempo real. El estudio del viroma intestinal aún tiene mucho por delante, sin embargo, el caso de las bacterias es diferente, pues ya existen muchas investigaciones sobre los géneros más abundantes de la microbiota intestinal y como se modifican en función de diversas patologías, como en la LLA pediátrica; así que fue menos laborioso elegir cuáles se estudiarían y las secuencias de primers para su identificación por PCR en tiempo real.

Para este estudio se recolectaron 30 muestras de heces, 15 controles sanos y 15 pacientes con LLA, en función de los recursos del laboratorio y de los investigadores, el tiempo disponible y los métodos de extracción de ácidos nucleicos que se eligieron (número de columnas de los kits); a partir de estas muestras se obtuvieron los ácidos nucleicos, se cuantificaron y se hicieron las reacciones de RT-PCR. En relación a las características de la muestra, el 50% fueron hombres y el 50% mujeres de un total de 30 participantes; de los 15 participantes del grupo de pacientes 7 fueron hombres (46%) y 8 mujeres (53%); aunque se sabe que los hombres tienen una ligera mayor probabilidad de padecer LLA, esto no se reflejó en esta muestra posiblemente por el tamaño de la misma. Todos los pacientes con LLA fueron beneficiarios de UNE, 5 muestras se recolectaron en las instalaciones de UNE y 10 muestras se recolectaron en el HIT (Tabla 18); la media de la edad del total de la muestra (n=30) fueron 7.110 años, de los controles sanos 6.338 años y de los pacientes 7.882 años (Tabla 34).

Los grupos de estudio presentaron concentraciones de ácidos nucleicos similares (ADN y ARN total y viral), en el análisis estadístico no se encontraron diferencias significativas entre ellos. Al observar la media de las concentraciones (Tabla 15) se nota que la concentración de ADN total y ARN viral tiende a ser mayor en los controles sanos; y el ARN total y ADN viral tiende a ser mayor en los pacientes con LLA. Se han realizado estudios en patologías como la obesidad (en un modelo murino) en los que se encontró que las concentraciones de ácidos nucleicos virales (ADN y ARN) en heces son mayores en individuos obesos que en los de peso normal (Yadav *et al.*, 2016), a partir de esta observación se generó una de las hipótesis que se plantearon en un inicio, pues se esperaban encontrar diferencias en las concentraciones de ácidos nucleicos virales en heces entre ambos grupos de estudio, sin embargo, al observar los resultados, no se puede hacer alguna inferencia pues no hubieron diferencias estadísticamente significativas entre controles y pacientes.

En los resultados se observa que las concentraciones de ácidos nucleicos (total y viral), se correlacionan con algunas variables ( $p < 0.05$ ). En los controles sanos se observó una correlación positiva ( $p = 0.036$ ,  $r = 0.539$ ) entre el consumo de carne roja (7/7) y la concentración de ADN viral; cabe mencionar que el consumo de carne roja es mayor en los controles sanos en comparación con los pacientes con LLA, mientras que estos últimos consumen más carne blanca que los controles sanos (Tabla 36). Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la media del consumo de productos embutidos ( $p = 0.046$ ) y ahumados ( $p = 0.019$ ), siendo el grupo de controles sanos los que ingieren en mayor abundancia este tipo de alimentos (Tabla 36). Se ha observado que el consumo de dietas ricas en sustancias promotoras de cáncer como carne roja procesada, promueve la adquisición y propagación de virus eucariontes potencialmente oportunistas, en algunos tipos de cáncer como el colorectal (Nakatsu *et al.*, 2018). Podemos inferir que la concentración de ADN viral podría aumentar, cuando se aumenta el consumo de carne roja y algunos productos como los embutidos y ahumados, como lo observamos en los controles sanos. Es importante mencionar que el grupo de pacientes con LLA tiene una dieta con ciertas restricciones en estos productos, especialmente los beneficiarios UNE, quienes reciben educación nutricional para coadyuvar al tratamiento contra la LLA, por lo que el consumo disminuye drásticamente. Otras correlaciones que se encontraron fueron entre la concentración de ADN total y el consumo de verdura ( $p = 0.036$ ,  $r = 0.545$ ), embutidos ( $p = 0.013$ ,  $r = 0.623$ ) y procesados ( $p = 0.020$ ,  $r = 0.591$ ), así como el ARN total y consumo de embutidos ( $p = 0.010$ ,  $r = 0.643$ ); estas correlaciones fueron estadísticamente significativas en el grupo de controles sanos (Tabla 41); en el grupo de pacientes con tratamiento, se observó la correlación estadísticamente significativa entre las variables ARN total y edad ( $p = 0.034$ ,  $r = 0.550$ ), talla ( $p = 0.024$ ,  $r = 0.579$ ) y peso ( $p = 0.013$ ,  $r = 0.625$ ) (Tabla 41).

En relación a la expresión génica de *Bacteroides* spp, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos de estudio, sin embargo, al observar la media de los valores Ct vemos que tienden a ser menores en los controles sanos, lo que indica que la expresión génica tiende a ser mayor que en el grupo de pacientes con LLA; esto se corresponde con los resultados de la media de los valores  $2^{\Delta\Delta Ct}$  que tienden a ser mayor en los controles sanos que en los pacientes con LLA (Tabla 17). Esta misma observación se cumple para *Lachnospiraceae* spp y *Firmicutes* spp, por lo que podemos inferir que para esta muestra ( $n = 30$ ) la expresión génica de bacterias tiende a ser mayor en los controles sanos que en los pacientes con LLA, aunque no podemos extrapolar estos resultados a la población, pues los resultados no fueron estadísticamente significativos.

Se ha observado que la dieta de las personas tiene un gran peso para establecer los componentes que predominan en la microbiota. El enterotipo (patrón de abundancia de bacterias) en el que predomina *Bacteroides* spp está asociado con el consumo de una dieta rica en proteína y grasas animales (Shahid y Irfan, 2018). En general, se ha encontrado que *Bacteroides* spp no sigue un patrón de colonización en los niños en relación a la edad, siendo abundante en cualquier etapa de la infancia, a diferencia de lo que se ha observado en otros géneros como *Bifidobacterium* spp que aumenta en el intestino cuando disminuyen los niveles de oxígeno. *Bacteroides* spp está adaptado a la dieta de los niños basada en leche, siendo un género bacteriano capaz de utilizar los oligosacáridos de leche; cuando cambia la alimentación se provee de sustratos diferentes que pueden cambiar la composición de la microbiota (Korpela y Vos, 2018). En esta investigación se encontró que la expresión génica de *Bacteroides* spp ( $2^{\Delta\Delta Ct}$ ) está correlacionada positivamente ( $p=0.013$ ,  $r=0.624$ ) con el consumo de productos procesados en los controles sanos, y se correlaciona negativamente ( $p=0.046$ ,  $r=-0.521$ ) con el consumo de lácteos en los pacientes con tratamiento (Tabla 41); también en el grupo de controles sanos, la expresión génica de *Bacteroides* spp ( $2^{\Delta\Delta Ct}$ ) se correlaciona positivamente con las concentraciones de ADN ( $p=0.002$ ,  $r=0.721$ ) y ARN total ( $p=0.024$ ,  $r=0.578$ ) (Tabla 42).

Existe evidencia de que la quimioterapia que reciben los niños con LLA compromete su estado general de salud y puede dañar las células sanas del revestimiento del sistema digestivo, por lo que son comunes algunos disturbios gastrointestinales como diarrea, vómito o constipación (Rajagopala *et al.*, 2016). En la muestra de este estudio, el 26% (4/15) de los pacientes reportaron presentar estreñimiento con frecuencia, contra el 16% (2/15) de los controles sanos; no se encontró una asociación estadísticamente significativa entre las variables (Tabla 32), siendo el estreñimiento la alteración gastrointestinal más frecuente en los pacientes de esta investigación; solo el 13% de los pacientes (2/15) reportaron haber padecido diarrea en el último mes (lo cual se puede deber a la etapa de tratamiento en la que se encontraban) y el 26% (4/11) de los controles sanos reportaron haber padecido diarrea en el último mes previo a la toma de muestra (Tabla 31). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el número de evacuaciones al día entre ambos grupos, siendo 2 evacuaciones al día la media de los controles sanos y 1.87 evacuaciones al día la media de los pacientes (Tabla 37), con lo que podemos inferir que en el momento de la toma de muestra el estado gastrointestinal de los pacientes era similar al de los controles sanos.

En estudios realizados en la microbiota intestinal de niños con LLA se ha encontrado que la familia *Lachnospiraceae* (*Lachnospira*, *Roseburia*, *Ruminococcus*, *Butyrivibrio*, entre otros géneros), que son bacterias productoras de butirato, el cual juega un papel importante como fuente de energía en células epiteliales y el mantenimiento del homeostasis del colon, se encuentra disminuida en los pacientes con LLA, incrementando así el riesgo de desarrollar mucositis por quimioterapia y otras complicaciones (Rajagopala *et al.*, 2016). En este estudio se observó que en comparación con los controles sanos, la expresión génica de la familia *Lachnospiraceae spp* en los pacientes tiende a ser menor (al comparar la media aritmética), lo que corresponde a lo reportado en los estudios sobre LLA y bacterias productoras de ácido butírico, aunque no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos en la media del valor  $2^{\Delta\Delta Ct}$ .

Se han realizado estudios en pacientes adultos con leucemia mieloide aguda (LMA) para conocer la variabilidad longitudinal de la microbiota intestinal, pues se ha observado que los pacientes que presentan mayor variabilidad en algunas bacterias de la microbiota tienen resultados clínicos más adversos, ofreciendo así la posibilidad de usar los géneros bacterianos más estables como una alternativa terapéutica para disminuir la depleción bacteriana. *Pseudobutyrvibrio* es uno de los géneros bacterianos que se encuentra en abundancia en las heces de los individuos con un microbioma más estable, lo que también demuestra su importancia en la integridad del microbioma (Galloway-peña *et al.*, 2017). El par de primers seleccionados en este estudio para identificar a la familia *Lachnospiraceae spp* incluye a *Pseudobutyrvibrio*, bacteria que también produce ácido butírico, la cual se encontró en mayor abundancia en los controles sanos que en los pacientes con LLA (tendencia a una mayor expresión génica del grupo *Lachnospiraceae spp*). Este hallazgo puede ser un indicio de su factor protector en la integridad de la microbiota, pero no podemos inferir si la aparente menor expresión en nuestra muestra de pacientes se debe a la condición de padecer LLA o se generó desde antes de desarrollar el cáncer y sea un factor predisponente a la enfermedad, pues no se logró tener muestras de pacientes primo diagnosticados con los que se pudiera hacer dicha comparación. La familia *Lachnospiraceae spp*, como uno de los miembros principales de la microbiota, juega un papel importante en mantener la homeostasis del ambiente intestinal. Estas bacterias están asociadas a un efecto protector contra las infecciones por *C. difficile* y obesidad. Se sabe que estas bacterias colonizan el intestino aumentando desde los primeros días hasta los dos años de vida en los infantes (Sagheddu, Patrone, Miragoli, y Puglisi, 2016). En esta investigación se encontró que la variable peso se correlaciona positivamente ( $p=0.022$ ,  $r=0.585$ ) con la expresión genómica de *Lachnospiraceae spp* en los pacientes con tratamiento (Tabla 41), lo cual se podría deber a que el aumento del peso representa un aumento en la composición (abundancia y variedad) de la microbiota intestinal.

El cáncer, entendido como un grupo de enfermedades complejas, es el resultado de interacciones de diversos factores genéticos y ambientales, sin embargo, se puede desarrollar en los individuos sin la existencia de estos factores de riesgo, lo que sugiere que existen otros factores que pueden influenciar en el proceso de carcinogénesis. En los últimos años, en los que se ha asociado el rol de la microbiota al cáncer, se han encontrado bacterias intestinales que exhiben una potente actividad contra el desarrollo de alguna malignidad en un rango amplio de tipos de cáncer sólidos y leucemia. Zhou y su grupo de investigadores en 2017 estudiaron la materia fecal de individuos sanos e inspeccionaron el efecto que tenían en células cancerígenas, también identificaron a las bacterias con efecto anti-malignidad, las bacterias que más predominaron pertenecen al grupo de Actinobacterias, pero también a los filos *Proteobacteria* y *Firmicutes* (Zhou, Zhao, Liu, Chen, y Li, 2017).

En esta investigación se observó que el grupo de controles sanos tiende a mostrar una mayor expresión génica de *Firmicutes* spp que los pacientes con LLA (no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos, pero observamos diferencias en la media de los valores  $2^{\Delta\Delta Ct}$ ), podemos inferir que el efecto protector que este filo bacteriano tiene sobre los individuos se encuentra reducido en estos pacientes, sin embargo, no podemos asegurar si desde antes de la enfermedad estaban aparentemente reducidos o es el efecto sistémico de la enfermedad y el tratamiento lo que generó esta disminución (Tabla 17).

En años recientes ha aumentado el interés en conocer la composición microbiana del intestino, relacionando sus cambios con patologías como la obesidad. Ciertos filos y clases de bacterias han sido asociados con el aumento de la transferencia de calorías de la dieta al hospedero y cambios en su metabolismo. Algunos microorganismos de la microbiota intestinal pueden fermentar polisacáridos de la dieta y ácidos grasos de cadena corta, lo que permite extraer las calorías de polisacáridos que no podemos digerir. Algunos estudios han reportado que la obesidad se asocia a una mayor abundancia de *Firmicutes* spp y a la disminución de *Bacteroides* spp (posee menos genes que codifican para enzimas relacionadas con el metabolismo de lípidos y carbohidratos) (Million, Lagier, Yahav, y Paul, 2013). En este estudio se encontró que la expresión génica de *Firmicutes* spp se correlaciona negativamente ( $p=0.011$ ,  $r=-0.636$ ) con los litros de agua que los controles sanos toman en el día, es decir, a mayor número de litros de agua tomados en el día, la expresión de *Firmicutes* spp es menor; mientras que en los pacientes con tratamiento se encontró que la expresión génica de *Firmicutes* spp se correlaciona positivamente ( $p=0.005$ ,  $r=0.680$ ) con el peso (kg); es decir, al aumentar el peso, aumenta la expresión génica de esta bacteria (Tabla 41). Estos hallazgos dan un indicio sobre el papel que tiene *Firmicutes* spp en el peso y el rol de algunos hábitos de alimentación/cuidado personal, como lo es el tomar agua, en la composición de la microbiota, especialmente el filo *Firmicutes* y el papel que se ha observado en el desarrollo de obesidad.

También se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las medias del número de productos ahumados ( $p=0.019$ ), embutidos ( $p=0.046$ ) y lácteos ( $p=0.008$ ), que consumen en una semana (7/7) los controles sanos y los pacientes con LLA; en los otros grupos de alimentos (verdura, fruta, carne roja, carne blanca, productos procesados, enlatados, huevo, cereales y leguminosas) no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las medias de ambos grupos (Tabla 36 y gráfica 16). En relación al número de comidas al día y los litros de agua que se consumen en un día tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos (Tabla 35, gráfica 15); lo cual nos habla de una similitud en los hábitos de alimentación entre controles y pacientes. Se encontraron otras correlaciones estadísticamente significativas entre las variables expresión génica de *Firmicutes* spp y edad ( $p=0.005$ ,  $r=0.684$ ) y expresión génica de *Firmicutes* spp y talla ( $p=0.032$ ,  $r=0.555$ ) en el grupo de los pacientes con tratamiento (Tabla 41).

Mientras que la microbiota bacteriana está relativamente bien estudiada y caracterizada, el viroma intestinal apenas empieza a ser dilucidado. En este estudio, por razones metodológicas, únicamente se logró estudiar la expresión génica de Torquetenovirus, como miembro del viroma intestinal. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p=0.012$ ) en el valor Ct, entre controles sanos y pacientes con LLA, la medias del Ct demuestran que este es mayor en los controles sanos ( $32.82 \pm 2.20$ ) que en los pacientes ( $29.47 \pm 3.48$ ), lo que refleja una mayor expresión génica de Torquetenovirus en pacientes. La media de los valores  $2^{\Delta\Delta Ct}$  (Tabla 17), muestra que la expresión génica de TTV en los controles sanos tiende a ser menor que los pacientes con LLA, aunque no se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre estas medias.

En los últimos años se ha investigado el papel de las infecciones virales en el desarrollo de LLA infantil, sin embargo, no se ha logrado identificar un agente viral es específico; se tienen como candidatos diferentes virus como Adenovirus, Herpesvirus, Poliomavirus y Parvovirus B19, pero solo en Adenovirus se han visto diferencias en el ADN viral cuando se compararon pacientes con LLA y controles. Con frecuencia se ha detectado Torquetenovirus en muestras de personas, siendo frecuente en suero de individuos sanos, además se ha detectado TTV en el suero de mujeres embarazadas cuyos hijos después desarrollaron leucemia y otros estudios sugieren su transmisión durante el embarazo . En el estudio que Bogdanovic *et al.* realizaron en 2016, investigaron la presencia de TTV en sueros de niños que después desarrollaron LLA, en este no se encontraron secuencias de TTV, concluyendo que la infección primaria de TTV se adquiere post-natal (Bogdanovic *et al.*, 2016). Otros estudios sugieren que al nacer los niños presentan abundancia de bacteriófagos (la mayoría adquiridos al nacer), mientras que los virus eucariontes de ARN y ADN se adquieren posteriormente (Korpela y Vos, 2018); posiblemente TTV tenga alguna intervención en el desarrollo de LLA, sin embargo, no se ha logrado concluir de forma clara el papel en la leucemogénesis y si esta se da durante el embarazo o después del nacimiento.

En este estudio encontramos diferencias estadísticamente significativas ( $p=0.004$ ) en la expresión génica de TTV (valor Ct), entre controles y pacientes (Tabla 17), con este hallazgo no podemos esclarecer el papel que tiene en el desarrollo de la LLA, sin embargo, este es un indicio del comportamiento de este virus en este tipo de leucemia pediátrica.

Una de las preguntas que se les hizo a los participantes, fue si habían asistido o asisten a una guardería o estancia infantil, los resultados muestran que el 20% (3/15) de los controles sanos y solo el 6% (1/15) de los pacientes habían asistido a guarderías. Al analizar las concentraciones individuales de ADN y ARN viral (datos no mostrados) observamos que son esos tres individuos sanos (CS2, CS3, CS5) los que presentaron las concentraciones de ácidos nucleicos virales (ADN, ARN) más elevadas en el grupo de controles sanos, además dos de ellos (CS2, CS3) cursaban con un cuadro de bronquiolitis (Tabla 27) en el momento de recolección de la muestra y el CS5 reportó haber padecido una enfermedad viral. A partir de estas observaciones se podría inferir que la estancia en guarderías es un factor que puede predisponer al aumento de concentración de ácidos nucleicos virales, quizá por el contacto directo con otros niños que comparten un viroma diferente pues se involucra una población pediátrica con otras características de vida como forma de parto, alimentación con leche materna, etc. que influyen en la composición del viroma (Lim *et al.*, 2015) y pueden predisponer a otros niños para el desarrollo de enfermedades virales. También se observó que Torquetenovirus está correlacionado negativamente ( $p=0.011$ ,  $r=-0.633$ ) con la talla y correlacionado positivamente ( $p=0.028$ ,  $r=0.567$ ) con la ingesta de probióticos en los pacientes con tratamiento (Tabla 41).

La etiología de la leucemia linfoblástica aguda aún no se conoce en su totalidad, se ha considerado su origen perinatal y la exposición de los padres a factores de riesgo de tipo ambiental antes de la concepción y durante el embarazo. En relación al consumo de tabaco, se ha ligado al desarrollo de leucemia aguda en adultos y se ha relacionado con un efecto carcinogénico potencial en fumadores pasivos especialmente por los químicos tóxicos o carcinogénicos que contienen los cigarrillos como benceno, formaldehído, aminas aromáticas, nitrosaminas entre otros. También se ha relacionado el consumo de tabaco con afectaciones en la movilidad, morfología, concentración y aumento de estrés oxidativo de los espermatozoides. Estos hallazgos indican que la población pediátrica podría estar en riesgo si los consideramos como fumadores pasivos o hijos de fumadores, pues estas condiciones podrían causar daño al ADN y mutaciones pre y post-natales; sin embargo, los resultados de los estudios aún son inconsistentes, pues no se ha encontrado una relación directa entre la exposición al humo del tabaco y el desarrollo de LLA (Liu, Zhang, Mchale, y Hammond, 2011). En esta investigación no se encontró una asociación estadísticamente significativa entre la exposición al humo de tabaco entre controles y pacientes; solo el 13% (2/15) de los controles reportaron exposición frecuente al humo del tabaco y el 20% (3/15) de los pacientes con LLA.

Se encontró que las variables ADN y ARN viral se correlacionan positivamente con la exposición al humo del tabaco en el grupo de controles sanos ( $p=0.036$  y  $0.021$ ;  $r=0.545$  y  $0.590$ ) (Tabla 40).

En la actualidad se han asociado un gran número de enfermedades y desordenes gastrointestinales al desbalance de la microbiota intestinal, también se ha observado como el uso de probióticos puede mejorar estas patologías restaurando el balance microbiano, por ejemplo en la diarrea infecciosa junto con terapia de rehidratación, diarrea asociada al uso de antibióticos para prevenir este efecto secundario, enfermedad inflamatoria del intestino, síndrome de intestino irritable, infecciones por *H. pylori* que causa gastritis crónica y úlceras pépticas e intolerancia a la lactosa (Delgado y Blanco-m, 2017).

De los 30 participantes del estudio, el 36% (11/30) de la muestra reportó ingerir algún probiótico con frecuencia, el 33% (5/15) de controles sanos y el 40% (6/15) de pacientes con LLA, no se encontró una asociación estadísticamente significativa entre el consumo de probióticos en ambos grupos de estudio (Tabla 23 y gráfica 8). El probiótico que se ingiere con mayor frecuencia en ambos grupos es la bebida láctea fermentada marca Yakult® (Tabla 24) que contiene entre sus ingredientes a los *Lactobacillus casei* Shirota. En general, observamos que el consumo de probióticos no tiene gran relevancia entre la población estudiada, la mayoría reportó consumirlos “de vez en cuando” y se puede notar como esta tendencia responde más a las características organolépticas de la bebida Yakult® que por el conocimiento verdadero del efecto que tienen los probióticos en la salud intestinal de toda la población; solo un control sano reportó el consumo de otro tipo de probiótico (Sinuberase®) (Tabla 25) que estaba siendo administrado junto con otro tratamiento farmacológico, lo cual habla de la intervención médica para que estos productos se consuman cuando hay un padecimiento que afecta la salud gastrointestinal.

El objetivo principal del uso de probióticos en la dieta es el efecto positivo que tienen en la salud, lo cual se puede lograr por mecanismos diferentes como la modulación de la respuesta inmunológica, la mejora del estado nutricional del hospedero o aquellos que se derivan de los cambios en la microbiota. En este estudio se investigó la intolerancia y/o alergias a alimentos y/o medicamentos que padecían los participantes del estudio; el 16% de la muestra (5/30) reportó padecer alguna alergia y/o intolerancia, de estos tres fueron controles sanos y dos pacientes con LLA; no se encontró una asociación estadísticamente significativa en la presencia de alergia y/o intolerancia a alimentos y/o medicamentos entre ambos grupos de estudio (Tabla 29, gráfica 11). Tres de los cinco individuos reportaron ser intolerantes a la leche y sus derivados como la crema y dos de cinco individuos reportaron ser alérgicos a medicamentos (sulfas y penicilina) (Tabla 30).

Una gran cantidad de la población mundial muestra niveles bajos de la enzima  $\beta$ -galactosidasa (lactasa) en la mucosa del intestino delgado, estos individuos sufren intolerancia cuando la leche o sus derivados con lactosa están presentes en la dieta. Existe buena evidencia científica que los síntomas de la intolerancia pueden mejorar con el consumo de yogurt y productos fermentados que contienen bacterias ácido-lácticas, que mejoran la tolerancia y digestión de la lactosa (Delgado y Blanco-m, 2017). Uno de los beneficios que se pueden promover entre la población es el consumo de probióticos para mejorar la tolerancia a la lactosa, siendo este un problema de salud que va en aumento y por otro lado aumentar el consumo de otros productos probióticos entre la población con LLA que mejore la salud gastro-intestinal, alivie la intolerancia a ciertos alimentos y los proteja de patologías gastrointestinales a los que son susceptibles por su condición.

Como ya se mencionó anteriormente, en este estudio se observó que la expresión genómica de la familia *Lachnospiraceae spp* tiende a ser menor en los pacientes con LLA, lo cual concuerda con lo reportado en la literatura. Algunos efectos benéficos de los probióticos que ya se han observado en la población pediátrica, se ven reflejados en la actividad metabólica de la microbiota, uno de los más relevantes es en el aumento de las bacterias productoras de butirato. Un estudio reciente muestra que niños alérgicos a ciertos alimentos como la leche de vaca, que fueron suplementados con una fórmula rica en *L. rhamnosus* aumenta la población bacteriana productora de butirato en las heces (Canani *et al.*, 2016). Este antecedente muestra el beneficio que se podría obtener aumentando el consumo de probióticos en los pacientes con LLA que presentan una reducción en la población bacteriana de la familia *Lachnospiraceae spp*. En otro estudio realizado por Ferrario y su grupo de investigación, se observó un aumento en la producción de butirato después de la ingesta de *L. paracasei* y sugieren que medir las concentraciones de butirato en heces puede ser un marcador importante para identificar los sujetos que se pueden beneficiar del tratamiento con probióticos (Ferrario *et al.*, 2014). Se ha demostrado que consumir bacterias ácido-lácticas junto con otros factores de la dieta como fibra y vegetales, están relacionados inversamente a la incidencia de cáncer colorectal en humanos. El aumento de las bacterias ácido lácticas se puede dar a través del consumo de probióticos. La modulación de la microbiota intestinal con pre y probióticos puede impactar positivamente en la comunicación cruzada entre el sistema inmune y la microbiota (Coleman y Nunes, 2016).

### 13. CONCLUSIONES

Este estudio permitió adquirir una visión general sobre el estado y la dinámica de la microbiota y el viroma intestinal, en población pediátrica con LLA al compararla con controles sanos. Las conclusiones puntuales de esta investigación son:

-No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las concentraciones de ácidos nucleicos (ADN y ARN total y viral), entre controles sanos y pacientes con LLA.

-Unos de los hallazgos más importantes fueron las diferencias en la expresión génica de bacterias y virus. Se encontró de forma general (al analizar la media de los valores  $2^{\Delta\Delta Ct}$ ) que la expresión génica de los grupos bacterianos: *Bacteroides* spp, *Firmicutes* spp y *Lachnospiraceae* spp tiende a ser mayor en los controles sanos que en los pacientes con LLA. La expresión génica de TTV tiende a ser mayor en el grupo de pacientes con LLA que en los controles sanos, lo cual nos da un indicio del rol que juega este virus en la leucemia, como ya algunos autores lo han mencionado antes.

-De la información recolectada en los cuestionarios, se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) en los hábitos de alimentación (productos ahumados, embutidos y lácteos) entre los controles sanos y los pacientes con LLA.

-Una observación importante fue que la estancia en guarderías puede ser un factor que predispone el aumento de infecciones virales, así como el aumento en las concentraciones de ácidos nucleicos virales en heces, como se observó en tres participantes del grupo de controles sanos.

-El estado gastrointestinal entre ambos grupos es muy similar, lo cual se observa en el reporte de los padecimientos como diarrea, estreñimiento y número de evacuaciones al día.

-El consumo de probióticos no se realiza por los beneficios de estos, sino por sus características organolépticas, como la bebida Yakult, la cual se reportó como el probiótico que más se ingiere entre ambos grupos, el conocimiento de las características de los probióticos es escueto entre los participantes de la muestra analizada.

-La intolerancia a la leche y sus derivados fue la reportada con más frecuencia; la muestra estudiada desconoce el beneficio que el consumo de ciertos productos fermentados podrían tener en el alivio y mejora de los síntomas.

#### 14. PERSPECTIVAS

-Incluir en los cuestionarios el tipo de leucemia linfoblástica aguda (LLA) que padecen los pacientes y la etapa del tratamiento en la que se encuentran, siendo esta información muy valiosa para poder relacionarla con las otras variables.

-Identificación de otros géneros bacterianos como *Akkermansia spp* cuya presencia en la microbiota intestinal se ha relacionado con un aumento en la estabilidad de la composición de la misma a lo largo del tiempo y como bacteria productora de butirato es importante en mantener la salud del epitelio intestinal.

-Preguntar en los cuestionarios el tipo de parto que tuvieron las madres de los controles y pacientes (parto natural o cesárea) para correlacionar este dato con los cambios en la composición viral.

-Aumentar el número de muestras (>15) de cada uno de los grupos de estudio, controles sanos y pacientes con LLA, agregando un tercer grupo de estudio: pacientes con LLA recién diagnosticados. Incluir en la muestra de controles sanos niños provenientes de Tlaxcala.

-Realizar la secuenciación masiva de controles sanos y pacientes con tratamiento, para identificar los agentes virales que se encuentran con mayor frecuencia en la población pediátrica (Puebla) con LLA y población pediátrica sana.

-Realizar una encuesta sobre el conocimiento de los pro y prebióticos, sus efectos en la salud y el consumo de los mismos, para evaluar su impacto en la salud de la población en general.

-Como estudio de seguimiento de los pacientes con LLA que tuvieron una mayor expresión de TTV se podría analizar el suero de las madres para identificar la expresión de este virus y rastrear su origen pre-natal.

-Cuantificar la concentración de butirato y sus productos en heces como factor pronóstico del uso de probióticos en pacientes con LLA y mejorar la población de bacterias productoras de butirato.

-Analizar con otro set de primers y/o sondas los virus que no se lograron identificar en esta investigación (fago de *Bacteroides* B40-8, *Enterovirus* y *Parechovirus*).

-Buscar otros virus importantes en la salud gastrointestinal, modulación de la microbiota y con antecedentes de influencia en el desarrollo de LLA pediátrica como Astrovirus en suero y heces de pacientes con LLA, Parvovirus B19 en suero de las madres de pacientes con LLA, algún fago de la familia *Caudovirus* (B124-4), Adenovirus o Rotavirus.

## **15. LINEAMIENTOS BIOÉTICOS**

Esta investigación se desarrolló siguiendo los estatutos éticos establecidos en la “Declaración Universal sobre el Genoma y Derechos Humanos” del 11 de noviembre de 1997; la propuesta de Protocolo ético: “Modelo para la recolección de Muestras de ADN del comité Norte Americano del Proyecto de Diversidad del Genoma Humano”; la Declaración Universal sobre Bioética y Derechos Humanos del 19 de octubre de 2005 y la Declaración Internacional sobre los Datos Genéticos Humanos del 16 de octubre de 2003. Previo a la toma de muestra, se explicó a los participantes y padres o tutores de estos, el procedimiento que se realizaría con sus muestras, los riesgos o implicaciones y la finalidad del estudio. Las muestras únicamente fueron recolectadas una sola vez, previo a la quimioterapia o bien durante la quimioterapia, según fue el caso. Los procedimientos se llevaron a cabo de acuerdo con las reglas y normas establecidas en la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud, Consejo de Organizaciones Internacionales de las Ciencias Médicas (CIOMS) y la NOM-012 (29–31).

### **15.1 Procedimiento y personas responsables de comunicar a los participantes los resultados del estudio**

Una vez terminado el estudio los investigadores se comprometieron a realizar un informe a cada uno de los participantes del estudio que hayan solicitado recibir su notificación; en el informe se les dará a conocer los resultados obtenidos por las muestras tomadas y su relevancia. En el caso de los participantes que eligieron participar solamente en este estudio y no autorizaron resguardar las extracciones del material genético en el laboratorio del CIO, estas se desecharon de manera adecuada, según las normas de manejo de RPBI y se le notificó al participante cuando se realizó este procedimiento.

### **15.2 Planes para la divulgación de los resultados**

Los resultados obtenidos en el proyecto de investigación fueron empleados para finalizar un proyecto de tesis de maestría. La búsqueda en la literatura de los virus más frecuentes reportados en el viroma intestinal servirá en un futuro para escribir un artículo de revisión; por otro lado, se complementará esta investigación con experimentos que se realicen en el CIO para publicar un artículo basado en una investigación original.

### **15.3 Carta de consentimiento informado**

Se aplicó el consentimiento informado a los padres o tutores de los niños que donaron la muestra de materia fecal, previamente se les informó en qué consistía la investigación, los posibles riesgos o efectos secundarios del procedimiento y el objetivo del estudio. Se firmaron los documentos en presencia de dos testigos que dieron fe que se recibió de manera adecuada la información y fue comprendida por el adulto encargado del niño. También se obtuvo el asentimiento informado de los pacientes y controles que participaron en el estudio (en el caso de los niños menores de 12 años).

Puebla, Pue. A \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ del 201\_\_

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPACIÓN EN EL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN:

*“Análisis comparativo de virus y bacterias intestinales en niños con leucemia linfoblástica aguda y niños sanos”*

Registrado ante el Comité de Investigación del CIO con el número \_\_\_\_\_

Sede donde se realizará el estudio: Una Nueva Esperanza.

A usted se le está invitando a participar en este estudio de investigación médica. Antes de decidir si participa o no, debe conocer y comprender cada uno de los siguientes apartados. Este proceso se conoce como consentimiento informado. Siéntase con absoluta libertad para preguntar sobre cualquier aspecto que le ayude a aclarar sus dudas al respecto. Una vez que haya comprendido el estudio y si usted desea participar, entonces se le pedirá que firme esta forma de consentimiento, de la cual se le entregará una copia firmada y fechada. Su participación consistirá en donar una muestra de materia fecal del paciente o control sano que tiene a su cuidado, además de proporcionar datos generales relevantes para la investigación al contestar un cuestionario que se le aplicará antes de recolectar la muestra.

Nombre del participante	
Edad	
Padece enfermedad: si, no, ¿Cuál?	
Etapas de tratamiento (si aplica)	
¿Desea ser contactado en un futuro para conocer los resultados de la investigación?	
Dirección de correo electrónico	
Teléfono celular	

JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

Actualmente no hay muchos estudios que establezcan con claridad la relación de la microbiota intestinal con el desarrollo de cáncer. Es importante comprender los factores que están involucrados en el inicio y evolución de la LLA; con el fin de aumentar la esperanza de vida, disminuir la incidencia y reducir el gasto que se genera en el sistema de salud.

OBJETIVO DEL ESTUDIO

A usted se le está invitando a participar en un estudio de investigación que tiene como objetivo identificar agentes virales y bacterianos gastrointestinales que pudieran expresarse diferencialmente en pacientes pediátricos con leucemia linfoblástica aguda (LLA) en comparación con niños sanos.

## BENEFICIOS DEL ESTUDIO

Por medio de la presente investigación se espera conseguir mejorar el pronóstico general de pacientes pediátricos con LLA, realizando un análisis del estado de la microbiota intestinal de los pacientes al compararlo con controles sanos. Este estudio permitirá que en un futuro otros pacientes puedan beneficiarse del conocimiento obtenido en esta investigación.

## PROCEDIMIENTOS DEL ESTUDIO

Se me ha explicado que su participación consistirá en: donar una muestra de materia fecal, la cual será recolectada por la mañana en un frasco estéril que le será proporcionado previamente. Se le otorgará una hoja instructiva y un diagrama de flujo con las indicaciones para una toma de muestra de heces y deberá contestar un cuestionario con información necesaria para la investigación.

## RIESGOS ASOCIADOS CON EL ESTUDIO

Esta investigación no involucra ningún riesgo para la salud. El contenido genético extraído de las muestras de materia fecal del paciente podría ser almacenado en el laboratorio del CIO (si así lo autoriza el participante) para realizar estudios posteriores, ya sea del mismo investigador o de otro que forme parte de la institución.

## ACLARACIONES

- Su decisión de participar en el estudio es completamente voluntaria.
- No habrá ninguna consecuencia desfavorable para usted, en caso de no aceptar la invitación.
- Si decide participar en el estudio puede retirarse en el momento que lo desee, -aun cuando el investigador responsable no se lo solicite-, pudiendo informar o no, las razones de su decisión, la cual será respetada en su integridad.
- No tendrá que hacer gasto alguno durante el estudio.
- No recibirá pago por su participación.
- En el transcurso del estudio usted podrá solicitar información actualizada sobre el mismo, al investigador responsable.
- La información obtenida en este estudio, utilizada para la identificación de cada paciente, será mantenida con estricta confidencialidad por el grupo de investigadores.
- Si considera que no hay dudas ni preguntas acerca de su participación, puede, si así lo desea, firmar la carta de consentimiento informado que forma parte de este documento.



---

Esta parte debe ser completada por el Investigador (o su representante):

He explicado al Sr(a). \_\_\_\_\_ la naturaleza y los propósitos de la investigación; le he explicado acerca de los riesgos y beneficios que implica su participación. He contestado a las preguntas en la medida de lo posible y he preguntado si tiene alguna duda. Acepto que he leído y conozco la normatividad correspondiente para realizar investigación con seres humanos y me apego a ella. Una vez concluida la sesión de preguntas y respuestas, se procedió a firmar el presente documento.

---

Nombre y firma del investigador

Fecha

En caso de dudas o aclaraciones relacionadas con el estudio podrá dirigirse a:

- Investigador responsable: Dra. Ma. del Rocío Baños-Lara. Tel. (222) 230 47 41
- Colaborador: Q.F.B Mariana Salmorán Pacheco. Tel. (044) 22 21 401 402

En caso de dudas o aclaraciones sobre sus derechos como participante podrá dirigirse a: Comisión Nacional de Bioética: Calzada Arenal No. 134, Tlalpan, Arenal Tepepan, 14610 Ciudad de México, D.F. Teléfono: 01 55 5487 2760.

#### 15.4 Carta de asentimiento informado para la participación en el estudio

Fecha: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Título del proyecto:

*“Análisis comparativo de virus y bacterias intestinales en niños con leucemia linfoblástica aguda y niños sanos”*

Hola mi nombre es \_\_\_\_\_ y trabajo en el Centro de Investigación Oncológica de Una Nueva Esperanza. Actualmente el centro está realizando un estudio para conocer algunas características importantes de tu intestino y de pacientes con tu misma enfermedad (leucemia linfoblástica aguda) y para ello queremos pedirte que nos apoyes. Tu participación en el estudio consistiría en que te pediremos una muestra de materia fecal, esta la podrás tomar con ayuda de tus papás o la persona que está a cargo de tu cuidado, de preferencia toma la de la mañana y evita que se mezcle con tu orina. Tu participación en el estudio es voluntaria, es decir, aun cuando tus papá o mamá hayan dicho que puedes participar, si tú no quieres hacerlo puedes decir que no. Es tu decisión si participas o no en el estudio. También es importante que sepas que si en un momento dado ya no quieres continuar en el estudio, no habrá ningún problema, o si no quieres responder a alguna pregunta en particular, tampoco habrá problema. Toda la información que nos proporcionen y las mediciones que realicemos nos ayudarán a determinar el estado de los microorganismos en tu intestino y buscar la forma de mejorar los resultados de tu tratamiento, además de poder ampliar los resultados y ayudar a otros que sufren esta enfermedad. Esta información será confidencial. Esto quiere decir que no diremos a nadie tus respuestas, solo lo sabrán tu cuidador y las personas que forman parte del equipo de este estudio.

Si aceptas participar, te pido que por favor pongas una marca (✓) en el cuadro de abajo que dice “Sí quiero participar” y escribe tu nombre. Si no quieres participar, no pongas ninguna marca (✓), ni escribas tu nombre.

Sí quiero participar      Nombre: \_\_\_\_\_

Nombre y firma de la persona que obtiene el asentimiento:

\_\_\_\_\_

Observaciones: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

**15.5 Carta de revocación de participación en el estudio**

Puebla, Pue. A \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ del 201\_\_

Investigación:

*“Análisis comparativo de virus y bacterias intestinales en niños con leucemia linfoblástica aguda y niños sanos”*

Investigadores principales: Dra. Ma. del Rocío Baños-Lara/ Q.F.B Mariana Salmorán Pacheco.

Sede donde se realizará el estudio: Una Nueva Esperanza.

Nombre del participante: \_\_\_\_\_

Por este conducto deseo informar mi decisión de retirarme de esta investigación por las siguientes razones: (Este apartado es opcional y puede dejarse en blanco si así lo desea el donante)

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_.

Si el donante lo desea, podrá solicitar que le sea entregada toda la información que se haya recabado sobre él, con motivo de su participación en el presente estudio.

\_\_\_\_\_  
Firma del donante

\_\_\_\_\_  
Nombre y firma del testigo 1

\_\_\_\_\_  
Nombre y firma del testigo 2

c.c.p El donante.

## 15.6 Carta de compromiso del investigador

Puebla, Pue. A 12 de enero del 2018

Investigación:

*“Análisis comparativo de virus y bacterias intestinales en niños con leucemia linfoblástica aguda y niños sanos”*

Investigadores principales: Dra. Ma. del Rocío Baños-Lara/ Q.F.B Mariana Salmorán Pacheco.

Sede donde se realizará el estudio: Una Nueva Esperanza.

A QUIEN CORRESPONDA

**P R E S E N T E**

En nuestra calidad de representante del proyecto de investigación: **“Análisis comparativo de virus y bacterias intestinales en niños con leucemia linfoblástica aguda y niños sanos”** mediante el presente documento me comprometo a asumir el compromiso de respetar y hacer respetar las normas éticas de la investigación en seres humanos, en unión con los valores y principios éticos universalmente proclamados. De igual forma me proclamo en la obligatoriedad de garantizar que el procedimiento del consentimiento informado se lleve a cabo de tal forma que promueva la autonomía del participante, resguardar sus datos confidenciales y a hacer uso de su información únicamente con fines científicos del proyecto de investigación. Finalmente me comprometo a reportar cualquier desviación del proyecto o efectos adversos al comité de bioética, así mismo, de los resultados que se consigan se los haré llegar mediante un reporte final por escrito.

**ATENTAMENTE**



**Q.F.B Mariana Salmorán Pacheco**

Estudiante de posgrados UPAEP

Centro de Investigación Oncológica Una Nueva Esperanza-UPAEP

marianaiq\_1416@hotmail.com. Tel. (044) 22 21 401 402

## 16. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abeles, S. R., Ly, M., Santiago-Rodriguez, T. M., y Pride, D. T. (2015). Effects of long term antibiotic therapy on human oral and fecal viromes. *PLoS ONE*, *10*(8), 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134941>
2. Basted, A. C., Logan, A. C., y Selhub, E. M. (2013). Intestinal microbiota, probiotics and mental health: from Metchnikoff to modern advances: Part II—contemporary contextual research. *Gut Pathogens*, *5*(3), 1–14.
3. Bogdanovic, G., Pou, C., Barrientos-Somarribas, M., Bjerkner, A., Honkaniemi, E., Allander, T., ... Gustafsson, B. (2016). Virome characterisation from Guthrie cards in children who later developed acute lymphoblastic leukaemia. *British Journal of Cancer*, (August), 1–7. <https://doi.org/10.1038/bjc.2016.261>
4. Budynek, P., Dąbrowska, K., Skaradziński, G., y Górski, A. (2010). Bacteriophages and cancer. *Archives of Microbiology*, *192*(5), 315–320. <https://doi.org/10.1007/s00203-010-0559-7>
5. Canani, R. B., Sangwan, N., Stefka, A. T., Nocerino, R., Paparo, L., Aitoro, R., ... Nagler, C. R. (2016). *Lactobacillus rhamnosus* GG-supplemented formula expands butyrate-producing bacterial strains in food allergic infants. *The ISME Journal*, *10*, 742–750. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.151>
6. Carding, S. R., Davis, N., y Hoyles, L. (2017). Review article: the human intestinal virome in health and disease. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, *46*(9), 800–815. <https://doi.org/10.1111/apt.14280>
7. Cario, E. (2013). Microbiota and innate immunity in intestinal inflammation and neoplasia. *Current Opinion in Gastroenterology*, *29*(1), 85–91. <https://doi.org/10.1097/MOG.0b013e32835a670e>
8. Coleman, O. I., y Nunes, T. (2016). Role of the Microbiota in Colorectal Cancer: Updates on Microbial Associations and Therapeutic Implications. *BioResearch Open Access*, *5*(1), 279–288. <https://doi.org/10.1089/biores.2016.0028>
9. Columpsi, P., Sacchi, P., Zuccaro, V., Cima, S., Sarda, C., Mariani, M., ... Bruno, R. (2016). Beyond the Gut Bacterial Microbiota: The Gut Virome. *Journal of Medical Virology*, (February), 1–6. <https://doi.org/10.1002/jmv>
10. Dalmaso, M., Hill, C., y Ross, R. P. (2014). Exploiting gut bacteriophages for human health. *Trends in Microbiology*, *22*(7), 399–405.
11. De Vlaminc, I., Khush, K. K., Strehl, C., Kohli, B., Luikart, H., Neff, N. F., ... Quake, S. R. (2013). Temporal response of the human virome to immunosuppression and antiviral therapy. *Cell*, *155*(5), 1178–1187. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.10.034>
12. Delgado, S., y Blanco-M, A. (2017). Probiotics, gut microbiota, and their influence on host health and disease. *Mol.Nutr.Food Res* *61*(1), 1-15. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201600240>

13. Delwart, E. (2013). A Roadmap to the Human Virome. *PLoS Pathogens*, 9(2), 1–4. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003146>
14. Ferrario, C., Taverniti, V., Milani, C., Fiore, W., Laureati, M., Noni, I. De, ... Guglielmetti, S. (2014). Modulation of Fecal *Clostridiales* Bacteria and Butyrate by Probiotic Intervention with *Lactobacillus paracasei* DG Varies among Healthy Adults. *The Journal of Nutrition*, 144, 1787–1796. <https://doi.org/10.3945/jn.114.197723>.of
15. Focosi, D., Antonelli, G., Pistello, M., y Maggi, F. (2016). Torquetenovirus: the human virome from bench to bedside. *Clinical Microbiology and Infection*, 22, 589–593. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.cmi.2016.04.007> 1
16. Galloway-peña, J. R., Smith, D. P., Sahasrabhojane, P., Wadsworth, W. D., Fellman, B. M., Ajami, N. J., ... Shelburne, S. A. (2017). Characterization of oral and gut microbiome temporal variability in hospitalized cancer patients. *Genome Medicine*, 9(21), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s13073-017-0409-1>
17. Girones, R. (2018). Genomic structure of phage B40-8 of *Bacteroides fragilis*. *Microbiology*, 145, 1661–1670.
18. Guo, L., Hua, X., Zhang, W., Yang, S., Shen, Q., Hu, H., ... Cui, L. (2017). Viral metagenomics analysis of feces from coronary heart disease patients reveals the genetic diversity of the *Microviridae*. *Virologica Sinica*, 32(2), 130–138. <https://doi.org/10.1007/s12250-016-3896-0>
19. Guo, X., Xia, X., Tang, R., Zhou, J., Zhao, H., y Wang, K. (2008). Development of a real-time PCR method for *Firmicutes* and *Bacteroidetes* in faeces and its application to quantify intestinal population of obese and lean pigs. *Letters in Applied Microbiology*, 47, 367–373. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2008.02408.x>
20. Hall, A. B., Tolonen, A. C., y Xavier, R. J. (2017). Human genetic variation and the gut microbiome in disease. *Nature Reviews Genetics*, 1-10. <https://doi.org/10.1038/nrg.2017.63>
21. Handley, S. A. (2016). The virome: a missing component of biological interaction networks in health and disease. *Genome Medicine*, 8(1), 32.
22. Haramoto, E., Kitajima, M., Katayama, H., y Ohgaki, S. (2010). Real-time PCR detection of adenoviruses, polyomaviruses, and torque teno viruses in river water in Japan. *Water Research*, 44, 1747–1752. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.11.043>
23. Holmes, E., Li, J. V., Marchesi, J. R., y Nicholson, J. K. (2012). Minireview Gut Microbiota Composition and Activity in Relation to Host Metabolic Phenotype and Disease Risk. *Cell Metabolism*, 16, 559–564. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2012.10.007>
24. Jaime Pérez, J., y Gómez Almaguer, D. (2009). *Hematología, la sangre y sus enfermedades*. México: Mc Graw Hill.
25. Kassinen, A., Malinen, E., Krogus, L., Palva, A., y Rinttila, T. (2004). Development of an extensive set of 16S rDNA-targeted primers for quantification of pathogenic and indigenous

- bacteria in faecal samples by real-time PCR. *Journal of Applied Microbiology*, 97, 1166–1177. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02409.x>
26. Kawior, I., Katz, M., Cappelletti, A., Ackermann, M., Álvarez, M., y Anger, V. (2014). Microbiota Intestinal-Huésped: ¿ Nexo Salud–Enfermedad ? *Actualización en nutrición*, 15(2), 24–32.
  27. Korpela, K., y Vos, W. M. De. (2018). Early life colonization of the human gut: microbes matter everywhere. *ScienceDirect, Current Opinion in Microbiology*, 44, 70–78.
  28. Kramná, L., Kolářová, K., Oikarinen, S., Pursiheimo, J. P., Ilonen, J., Simell, O., ... Cinek, O. (2015). Gut virome sequencing in children with early islet autoimmunity. *Diabetes Care*, 38(5), 930–933. <https://doi.org/10.2337/dc14-2490>
  29. Lassaletta Atienza, A. (2010). Leucemia Linfoblástica. *Pediatría Integral*, 6, 380–389.
  30. Lecuit, M., y Eloit, M. (2013). The human virome: New tools and concepts. *Trends in Microbiology*, 21(10), 510–515.
  31. Lim, E. S., Zhou, Y., Zhao, G., Bauer, I. K., Droit, L., Ndao, I. M., ... Holtz, L. R. (2015). Early life dynamics of the human gut virome and bacterial microbiome in infants. *Nature Medicine*, 21(10), 1228–1234. <https://doi.org/10.1038/nm.3950>
  32. Liu, R., Zhang, L., Mchale, C. M., y Hammond, S. K. (2011). Review Article Paternal Smoking and Risk of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: Systematic Review and Meta-Analysis. *Journal of Oncology*, 2011, 1-16. <https://doi.org/10.1155/2011/854584>
  33. Ly, M., Jones, M. B., Abeles, S. R., Santiago-Rodriguez, T. M., Gao, J., Chan, I. C., ... Pride, D. T. (2016). Transmission of viruses via our microbiomes. *Microbiome*, 4(1), 64. <https://doi.org/10.1186/s40168-016-0212-z>
  34. Million, M., Lagier, J., Yahav, D., y Paul, M. (2013). Gut bacterial microbiota and obesity. *Clin Microbiol Infect*, 19, 305-313. [10.1111/1469-0691.12172](https://doi.org/10.1111/1469-0691.12172)
  35. Minot, S., Bryson, A., Chehoud, C., Wu, G. D., Lewis, J. D., y Bushman, F. D. (2013). Rapid evolution of the human gut virome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(30), 12450–12455. <https://doi.org/10.1073/pnas.1300833110>
  36. Minot, S., Sinha, R., Chen, J., Li, H., Keilbaugh, S. a, Wu, G. D., ... Bushman, F. D. (2011). The human gut virome: Inter-individual variation and dynamic response to diet. *Genome*, 1616–1625. <https://doi.org/10.1101/gr.122705.111>
  37. Nakatsu, G., Zhou, H., Ka, W., Wu, K., Wong, S. H., Coker, O. O., ... Yu, J. (2018). Alterations in Enteric Virome Are Associated With Colorectal Cancer and Survival Outcomes. *Gastroenterology*, (June), 1–13.
  38. Navarro, F., y Muniesa, M. (2017). Phages in the human body. *Frontiers in Microbiology*, 8(566), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00566>
  39. Noordhoek, G. T., Weel, J. F. L., Poelstra, E., Hooghiemstra, M., y Brandenburg, A. H. (2008). Clinical validation of a new real-time PCR assay for detection of enteroviruses and

- parechoviruses, and implications for diagnostic procedures. *Journal of Clinical Virology*, 41(2008), 75–80. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2007.09.011>
40. Obeso Fernández, G., Carretero López, F., y Pérez Corral, A. M. (2014). *Manual CTO de Medicina y Cirugía: Hematología* (1ª edición).
  41. Quesada-Gómez, C. (2010). Infecciones en humanos por bacterias anaerobias del género *Bacteroides*: actualización en aspectos taxonómicos, bioquímicos, inmunológicos, patogénicos y clínicos. *Rev Biomed*, 21(2), 89–96.
  42. Rajagopala, S. V., Yooseph, S., Harkins, D. M., Moncera, K. J., Zabokrtsky, K. B., Torralba, M. G., ... Nelson, K. E. (2016). Gastrointestinal microbial populations can distinguish pediatric and adolescent Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL) at the time of disease diagnosis. *BMC Genomics*, 17(635), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2965-y>
  43. Richards, A. L., Burns, M. B., Alazizi, A., Barreiro, L. B., Pique-Regi, R., Blekhman, R., y Luca, F. (2016). Genetic and Transcriptional Analysis of Human Host Response to Healthy Gut Microbiota. *mSystems*, 1(4), 1–16. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00067-16>. Editor
  44. Ruíz Arguelles, G. J. (2003). *Fundamentos de Hematología* (3ª edición) México: Panamericana.
  45. Sagheddu, V., Patrone, V., Miragoli, F., y Puglisi, E. (2016). Infant Early Gut Colonization by *Lachnospiraceae*: High Frequency of *Ruminococcus gnavus*. *Frontiers in Pediatrics*, 4(57), 7–12. <https://doi.org/10.3389/fped.2016.00057>
  46. Seurinck, S., Defoirdt, T., Verstraete, W., y Siciliano, S. D. (2005). Detection and quantification of the human-specific HF183 *Bacteroides* 16S rRNA genetic marker with real-time PCR for assessment of human faecal pollution in freshwater. *Environmental Microbiology*, 7(2) 249–259. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2004.00702.x>
  47. Shahid, S. U., y Irfan, U. (2018). The gut microbiota and its potential role in obesity. 13, 589–603.
  48. Torres Ramos, G., Anticona Huaynate, C., Gálvez Calla, L. H., y Florián, S. (2006). Bacterias orales en pacientes con leucemia linfocítica aguda. *Odontología Sanmarquina*, 9(2), 16–19.
  49. Vemulapalli, R., Gulani, J., y Santrich, C. (2009). A real-time TaqMan® RT-PCR assay with an internal amplification control for rapid detection of transmissible gastroenteritis virus in swine fecal samples. *Journal of Virological Methods*, 162, 231–235. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2009.08.016>
  50. Wang, Y., Xue, J., Zhou, X., You, M., Du, Q., Yang, X., ... Xu, X. (2014). Oral microbiota distinguishes acute lymphoblastic leukemia pediatric hosts from healthy populations. *PLoS ONE*, 9(7), 3–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102116>
  51. Wylie, K. M., Weinstock, G. M., y Storch, G. A. (2012). Emerging view of the human virome. *Translational Research*, 160(4), 283–290. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2012.03.006>

52. Xu, L., Wu, X., Li, Y., y He, D. (2017). The expression pattern of Bcl11a , Mdm2 and Pten genes in B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Asia-Pac J Clin Oncol* (March), 1–5. <https://doi.org/10.1111/ajco.12690>
53. Yadav, H., Jain, S., Nagpal, R., y Marotta, F. (2016). Increased fecal viral content associated with obesity in mice. *World Journal of Diabetes*, 7(15), 316. <https://doi.org/10.4239/wjd.v7.i15.316>
54. Zhou, Y., Zhao, D., Liu, H., Chen, H., y Li, J. (2017). Cancer killers in the human gut microbiota: diverse phylogeny and broad spectra. *Oncotarget*, 1-18.
55. Zhang, T., Breitbart, M., Lee, W. H., Run, J. Q., Wei, C. L., Soh, S. W. L., ... Ruan, Y. (2006). RNA viral community in human feces: Prevalence of plant pathogenic viruses. *PLoS Biology*, 4(1), 0108–0118.

## 17. ANEXOS

### 17.1 Aprobación del comité de bioética



Puebla, Pue., a 25 de mayo de 2018.

**Mariana Salmorán Pacheco**  
Investigador Principal

P R E S E N T E

Estimada Mtra. Salmorán Pacheco:

Sirva la presente para notificare que el Comité de Ética en Investigación del Departamento de Ciencias de la Salud UPAEP (CONBIOETICA21CEI00620131021), ha revisado el Protocolo del Estudio:

*“Análisis comparativo de virus y bacterias intestinales en niños con leucemia linfoblástica aguda (LLA) y niños sanos”*

Y después de su revisión emite el siguiente

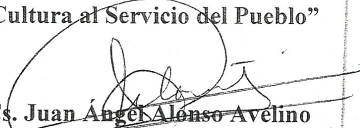
## DICTAMEN

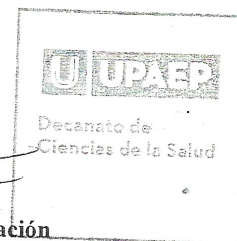
### “APROBADO”

Exhortamos a la Mtra. Mariana Salmorán Pacheco, investigador principal, a continuar con el buen desempeño en su actividad de investigación basada en las buenas prácticas clínicas.

Se extiende la presente a solicitud de la interesada.

**ATENTAMENTE**  
“La Cultura al Servicio del Pueblo”

  
**M. Cs. Juan Ángel Alonso Avelino**  
Presidente del Comité de Ética en Investigación  
Departamento de Ciencias de la Salud  
UPAEP



Ccp. Departamento de Investigación UPAEP.  
Ccp. Archivo.

## 17.2 Instrumento de recolección de información e instructivos de aplicación.

### CUESTIONARIO

Lea cuidadosamente las preguntas y responda la información que se le solicita, en caso de tener alguna duda preguntar a la persona que le está aplicando el cuestionario.

#### Datos personales

Nombre del paciente: \_\_\_\_\_.

Edad: \_\_\_\_\_. Talla: \_\_\_\_\_ m. Peso: \_\_\_\_\_ kg. Género:  Hombre  Mujer

Lugar de residencia: \_\_\_\_\_.

Domicilio: \_\_\_\_\_.

Teléfono del paciente o familiar cercano: \_\_\_\_\_.

#### Historial clínico

1. Diagnóstico: \_\_\_\_\_.

2. Tiempo transcurrido desde el diagnóstico: \_\_\_\_\_.

3. ¿Durante cuánto tiempo ha recibido quimioterapia? \_\_\_\_\_.

4. ¿Está tomando algún otro medicamento?  SI  NO

En caso de haber respondido afirmativamente la pregunta anterior, ¿Qué medicamento (s) está tomando?

Medicamento: \_\_\_\_\_ Dosis: \_\_\_\_\_

Medicamento: \_\_\_\_\_ Dosis: \_\_\_\_\_

Medicamento: \_\_\_\_\_ Dosis: \_\_\_\_\_

5. ¿En la familia del paciente tiene algún antecedente de cáncer?  SI  NO

6. ¿El paciente toma actualmente algún probiótico\*?  SI  NO

\* Los alimentos probióticos son alimentos con microorganismos vivos adicionados que permanecen activos en el intestino y ejercen importantes efectos fisiológicos (ver imágenes representativas).



En caso de haber respondido afirmativamente la pregunta anterior, ¿Qué probiótico(s) está tomando y con qué frecuencia los toma?

Probiótico: \_\_\_\_\_ Frecuencia: \_\_\_\_\_

7. El paciente ha padecido o padece alguna enfermedad de tipo **viral**?

- |   |   |
|---|---|
| <input type="checkbox"/> Hepatitis (A / B / C).   | <input type="checkbox"/> Virus de Inmunodeficiencia humana (VIH).   |
| <input type="checkbox"/> Herpes simple (fuegos labiales) – Virus Herpes tipo 1.                   | <input type="checkbox"/> Virus de papiloma humano (VPH).  |
| <input type="checkbox"/> Herpes genital – Virus Herpes tipo 2.                                    | <input type="checkbox"/> Dengue.  |
| <input type="checkbox"/> Sarampión.   | <input type="checkbox"/> Zika.  |
| <input type="checkbox"/> Paperas.   | <input type="checkbox"/> Chikungunya.   |
| <input type="checkbox"/> Varicela.  | <input type="checkbox"/> CRUP o laringotraqueobronquitis – Virus de Parainfluenza.                          |
| <input type="checkbox"/> Rubéola.   | <input type="checkbox"/> Bronquiolitis – Virus sincitial respiratorio (VSR).                                |
| <input type="checkbox"/> Roséola o exantema súbito – Herpes 6 y 7.                                | <input type="checkbox"/> Infección por Rotavirus.   |
| <input type="checkbox"/> Mononucleosis infecciosa – Virus de Epstein-Barr / Citomegalovirus (CMV) | <input type="checkbox"/> Influenza.   |
| <input type="checkbox"/> Megaloeritema o eritema infeccioso – Parvovirus B19.                     | <input type="checkbox"/> Fiebre aftosa humana o exantema vírico de manos, pies y boca – Virus de Coxsackie. |

8. El paciente ha tenido o tiene algún tipo de exposición frecuente a humo de tabaco.  SI  NO

9. ¿El paciente presenta algún tipo de alergia, atopia o intolerancia a los alimentos/medicamento?  SI  NO

En caso de haber respondido afirmativamente la pregunta anterior, ¿A que alimento/medicamento presenta alergia/intolerancia?

10. Hábitos de alimentación:

- ✓ Número de comidas al día \_\_\_\_\_.
- ✓ Fruta (7/7): \_\_\_\_\_.
- ✓ Verdura (7/7): \_\_\_\_\_.
- ✓ Carne roja (7/7): \_\_\_\_\_.
- ✓ Carne blanca (7/7): \_\_\_\_\_.
- ✓ Lácteos (7/7): \_\_\_\_\_.
- ✓ Embutidos (7/7): \_\_\_\_\_.
- ✓ Productos ahumados (7/7): \_\_\_\_\_.
- ✓ Productos procesados o en bolsa (7/7): \_\_\_\_\_.
- ✓ Productos enlatados (7/7): \_\_\_\_\_.
- ✓ Huevo (7/7): \_\_\_\_\_.
- ✓ Litros de agua al día: \_\_\_\_\_.
- ✓ Cereales (7/7): \_\_\_\_\_.
- ✓ Leguminosas (7/7): \_\_\_\_\_.

11. ¿Qué vacunas que se le han aplicado al paciente/control?

Vacunas:

---



---

12. ¿Ha padecido enfermedades diarreicas en el último mes?  SI  NO

13. ¿Presenta estreñimiento con frecuencia?  SI  NO

14. Número de evacuaciones al día: \_\_\_\_\_.

15. ¿El paciente/control ha asistido a alguna guardería o estancia infantil durante un periodo prolongado?

SI  NO

### 17.3 Herramientas e instructivos de aplicación

#### INSTRUCCIONES PARA RECOLECTAR LAS HECES FECALES \*

1. Lávese las manos con agua y jabón antes de iniciar la recolección de la muestra de heces (materia fecal).

2. Escriba el nombre completo del donador de la muestra, la fecha y hora de recolección en la etiqueta que se le proporcionó. Use letra de molde legible y coloque la etiqueta en el exterior del frasco recolector.



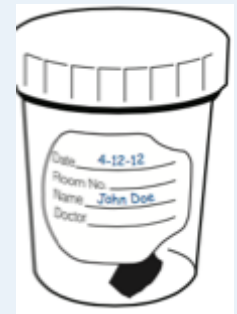
3. Complete la información que se le solicita (cuestionario y hoja de consentimiento informado). Use letra de molde legible y/o responda a las preguntas del encuestador.

4. Para recoger una muestra de heces, antes de usar al baño, levante la tapa del inodoro y coloque una envoltura de plástico (que puede ser sustituida por papel de cera) sobre la taza del inodoro. Asegúrelo con cinta adhesiva para evitar que la muestra caiga en el inodoro.

5. Haga una depresión en el plástico o papel de cera para ayudar a la recolección de la muestra.

6. El paciente deberá evacuar de manera cotidiana sobre la envoltura de plástico (evitar orinar sobre la materia fecal).

7. Use una cuchara de plástico o abate lenguas para transferir una porción de la muestra de heces (aproximadamente el tamaño de una cuchara o una nuez) al recipiente para recolectar la muestra.



8. Cerrar el frasco recolector de la muestra verificando que la tapa esté bien colocada. Asegúrese de que el nombre completo del donador, la fecha y hora de recolección de la muestra se hayan escrito en el exterior del recipiente para recolectar la muestra (etiqueta proporcionada).

9. Coloque el recipiente para recolectar la muestra en la bolsa con cremallera de plástico y ciérrela.

10. Deseche el resto de las heces en el inodoro. Deseche la envoltura de plástico sucia colocándola en una bolsa desechable (de papel o plástico). Cierre la bolsa con seguridad y colóquela en la basura.

11. Limpie las superficies contaminadas con desinfectante apropiado.

12. Lávese bien las manos con agua y jabón.

\*Ver diagrama anexo.

### 17.3.1 Diagrama de flujo para recolectar las heces fecales



## **17.4 Preparación de soluciones y reactivos**

### **17.4.1 Agarosa al 2% (geles de electroforesis)**

Se pesan 2 gramos de agarosa (IBI SCIENTIFIC. Lote #12B3005) (para preparar 100 mL de solución), se diluyen en buffer TBE nuevo y estéril; la mezcla se calienta en el microondas hasta que la agarosa esté completamente solubilizada en buffer TBE, agregar el colorante elegido (bromuro de etidio o Midori Green) y dejar solidificar en la cámara de electroforesis.

### **17.4.2 Agua DEPC (agua libre de nucleasas)**

Agregar 1 mL de dietil pirocarbonato (DEPC) (SIGMA. Lote #BCBR0814V) a 1000 mL de agua bidestilada que esté estéril. Se incuba dos horas a temperatura ambiente en campana de flujo laminar, se agita ocasionalmente y pasado el tiempo se esteriliza. Almacenar a temperatura ambiente hasta por 12 meses o hacer alícuotas y congelar.

### **17.4.3 Buffer TBE de corrida (10x)**

Para preparar 1 L de buffer 10x se pesan: 121.1 g de TRIS base (concentración final 1M), 61.8 g ácido bórico (concentración final 1M), 7.4 g de EDTA (concentración final 0.02 M). Se disuelven todos componentes en agua libre de nucleasas. Almacenar hasta 6 meses a temperatura ambiente.

### **17.4.4 Colorante Orange-D (electroforesis en geles de agarosa)**

Se prepara en las siguientes proporciones: 0.25% de colorante Orange-D, 30% de glicerol y se afora al volumen deseado con agua libre de nucleasas (DEPC).

### **17.4.5 Solución de etanol al 70%**

Para preparar 1 L de etanol al 70%, se miden 700 mL de etanol al 100% (Etanol puro, SIGMA-ALDRICH. Lote #SHBJ3851) y se agregan 300 mL de agua DEPC estéril o libre de nucleasas.

## 17.5 Hoja de cesión de derechos de la tesis a la UPAEP

Puebla, Pue. Septiembre de 2018

**Asunto:** Carta de sesión de derechos

Director Académico

Comité de Investigación

Maestrías en Ciencias de la Salud y Maestría en Nutrición Clínica UPAEP

### **PRESENTE**

Autorizo a la Universidad Popular Autónoma del Estado de Puebla A.C., los derechos no exclusivos del trabajo de investigación de mi tesis de grado de maestría, titulado:

*“Análisis comparativo de virus y bacterias intestinales en niños con leucemia linfoblástica aguda y niños sanos”*

Para que sea publicado, en los siguientes casos:

1. Que sea mi decisión en conjunto con la de mis asesores no publicarlo.
2. Que ni mis asesores ni yo, lo hayamos publicado a un año de haberse presentado la tesis.

En caso de que UPAEP decida por cualquier medio publicar parcial o totalmente mi investigación, mi autoría y la de mis coasesores debe respetarse. En decidir publicarlo, deberé expresarse y colocarse la adscripción posgrado UPAEP. Así mismo declaro que acepto la responsabilidad sobre el contenido y la originalidad del trabajo a publicar, por lo que eximo a la UPAEP ante cualquier reclamo de terceros.

### **ATENTAMENTE**



**Dra. Ma. del Rocío Baños-Lara**

Profesor/Investigador: posgrados UPAEP/CIO-UNE

Centro de Investigación Oncológica

Una Nueva Esperanza-UPAEP



**Q.F.B Mariana Salmorán Pacheco**

Estudiante de posgrados UPAEP

Centro de Investigación Oncológica

Una Nueva Esperanza-UPAEP

**MASS. Rosaura Rosas González**

Director académico

Maestría en Ciencias de la Salud y Maestría en Nutrición Clínica

En representación del comité de investigación.

## 17.6 Hoja de autorización de la tesis firmada por todos los directores de la tesis

### CARTA COMPROMISO DE ASESOR PRINCIPAL DE TESIS

Puebla, Pue. Diciembre de 2016

H. Comité Académico del Posgrado

**PRESENTE**

Por medio de la presente hago llegar a ustedes la postulación del C Mariana Salmorán Pacheco, que en caso de ser aceptado en el programa académico:

Maestría en Ciencias de la Salud X

Maestría en Nutrición Clínica \_\_\_

Maestría en Administración de Instituciones de Servicios de Salud \_\_\_

Desarrollará su trabajo de tesis bajo mi asesoría, supervisión y dirección; el tema de investigación propuesto es:

*“Análisis comparativo de virus y bacterias intestinales en niños con leucemia linfoblástica aguda y niños sanos”*

Me comprometo a dar seguimiento permanente a las actividades del estudiante derivadas de esta propuesta, y manifiesto contar con la infraestructura requerida para lograr los objetivos propuestos en el tiempo programado, en caso de que el postulante sea admitido y el comité tutorial apruebe el proyecto de tesis. También me comprometo a revisar y autorizar los seminarios de Investigación semestrales que el estudiante presentará, así como atender las recomendaciones que el comité académico emita; manifiesto que conozco el plan de estudios y acordaré con el estudiante las asignaturas optativas que deberá cursar, de tal forma que fortalezca el proyecto de investigación y su formación profesional, en los tiempos más pertinentes para ello. Así como favorecer todas las acciones pertinentes para que obtenga el grado en un plazo máximo a 6 meses posteriores a la terminación de los créditos académicos.

**ATENTAMENTE**



**Dra. Ma. del Rocío Baños-Lara**

Profesor/Investigador: posgrados UPAEP/CIO-UNE

Centro de Investigación Oncológica

Una Nueva Esperanza-UPAEP