

Investigación Traslacional en Microbioma (InTraMic): un área de interés común y creciente en el IMTIB, Hospital Italiano e Instituto Universitario

Carlos A. Vaccaro, Walter Pavicic, Adrián Gadano, Marcelo Risk, Marcelo Figari, Susana Llesuy, Tamara Piñero, Julieta Trinks, Valeria Burgos, Flavia Mazzini, Jorge Alberbide, Ana Basquiera, Marcela Bolontrade, María Isabel Giménez, Federico Jauk y Julieta Argüero

RESUMEN

Se estima que aproximadamente 100 trillones de microorganismos (incluidos bacterias, virus y hongos) residen en el intestino humano adulto y que el total del material genético del microbioma es 100 veces superior al del genoma humano. Esta comunidad, conocida como microbioma se adquiere al momento del nacimiento a través de la flora comensal de la piel, vagina y heces de la madre y se mantiene relativamente estable a partir de los dos años desempeñando un papel crítico tanto en el estado de salud como en la enfermedad. El desarrollo de nuevas tecnologías, como los secuenciadores de próxima generación (NGS), permiten actualmente realizar un estudio mucho más preciso de ella que en décadas pasadas cuando se limitaba a su cultivo. Si bien esto ha llevado a un crecimiento exponencial en las publicaciones, los datos sobre las poblaciones Latinoamérica son casi inexistentes.

La investigación traslacional en microbioma (InTraMic) es una de las líneas que se desarrollan en el Instituto de Medicina Traslacional e Ingeniería Biomédica (IMTIB). Esta se inició en 2018 con la línea de cáncer colorrectal (CCR) en una colaboración con el *Colorectal Cancer Research Group* del *Leeds Institute of Medical Research* en el proyecto *Large bowel microbiome disease network: Creation of a proof of principle exemplar in colorectal cancer across three continents*. A fines de 2019 se cumplió el objetivo de comprobar la factibilidad de la recolección, envío y análisis de muestras de MBF en 5 continentes, incluyendo muestras provenientes de la Argentina, Chile, India y Vietnam. Luego de haber participado de capacitaciones en Inglaterra, se ha cumplido con el objetivo de la etapa piloto, logrando efectivizar la recolección, envío y análisis metagenómico a partir de la secuenciación de la región V4 del ARNr 16S. En 2019, la línea de enfermedad de hígado graso no alcohólico se sumó a la InTraMic iniciando una caracterización piloto en el marco de una colaboración con el laboratorio Novartis. Los resultados de ese estudio, así como el de cáncer colorrectal, están siendo enviados a publicación. En 2020, con la incorporación de la línea de trasplante alógeno de células progenitoras hematopoyéticas, fue presentado un proyecto para un subsidio del CONICET que ha superado la primera etapa de evaluación. En el presente artículo se brinda una actualización sobre la caracterización taxonómica de microbioma y se describen las líneas de investigación en curso.

Palabras clave: microbioma humano, comunidad microbiana, estructura comunitaria microbiana, ARN ribosomal 16S, taxonomía, cáncer colorrectal, enfermedad de hígado graso no alcohólico.

TRANSLATIONAL RESEARCH IN MICROBIOME (INTRAMIC): AN AREA OF COMMON AND GROWING INTEREST AT IMTIB, HOSPITAL ITALIANO AND INSTITUTO UNIVERSITARIO

ABSTRACT

It is estimated that approximately 100 trillion microorganisms (including bacteria, viruses, and fungi) reside in the adult human intestine, and that the total genetic material of the microbiome is 100 times greater than that of the human genome. This community, known as the microbiome, is acquired at birth through the commensal flora of the mother's skin, vagina, and feces and remains relatively stable after two years, playing a critical role in both the state of health and in disease. The development of new technologies, such as next-generation sequencers (NGS), currently allow for a much more precise study of it than in past decades when it was limited to cultivation. Although this has led to exponential growth in publications, data on Latin American populations is almost non-existent.

Translational research in microbiome (InTraMic) is one of the lines developed at the Instituto de Medicina Traslacional e Ingeniería Biomédica (IMTIB). This started in 2018 with the Colorectal Cancer Line (CRC) in a collaboration with the Colorectal Cancer Research Group of the Leeds Institute of Medical Research in the project "Large bowel microbiome disease network: Creation of a proof of principle exemplar in colorectal cancer across three continents". At the end of 2019, the objective of verifying the feasibility of collecting, sending and analyzing MBF samples on 5 continents, including samples from Argentina, Chile, India and Vietnam, was met. After having participated in training in England, the objective of the pilot stage has been met, achieving the collection, delivery and metagenomic analysis from the sequencing of the V4 region of the 16S rRNA. In 2019, the non-alcoholic fatty liver disease line joined InTraMic, initiating a pilot characterization in the framework of a collaboration with the Novartis laboratory. The results of that study, as well as that of colorectal cancer, are being published. In 2020, with the incorporation of the allogeneic hematopoietic stem cell transplantation line, a project was presented for a grant from the CONICET that has passed the first stage of evaluation.

This article provides an update on the taxonomic characterization of the microbiome and describes the lines of ongoing research.

Key words: human microbiome, microbial community, microbial community structure, 16S ribosomal RNA, taxonomy, colorectal cancer, non-alcoholic fatty liver disease.

Rev. Hosp. Ital. B.Aires 2020; 40(1): 17-24.

INTRODUCCIÓN

La caracterización del microbioma intestinal (MBI) en diferentes estados de salud es una línea de investigación en crecimiento exponencial dado su potencial impacto en la prevención y el tratamiento de enfermedades altamente prevalentes. Las tecnologías disponibles en el siglo XXI permiten realizar un análisis mucho más preciso e informativo que en la era cuando los estudios se basaban en los cultivos. La caracterización actualmente se basa en técnicas multiómicas (metagenómica, transcriptómica, metabolómica), que demandan un abordaje multidisciplinario con especialistas en biología molecular y bioinformáticos. La investigación traslacional en microbioma (InTraMic) es una de las líneas que se desarrollan en el Instituto de Medicina Traslacional e Ingeniería Biomédica (IMTIB). Esta línea se inició en el año 2018, a partir de una colaboración con la Universidad de Leeds (Reino Unido) en el marco de un estudio piloto internacional sobre cáncer colorrectal. En el año 2019, con el apoyo de la Beca Novartis *Next Generation Scientist Program*, comenzaron los estudios sobre la enfermedad de hígado graso no alcohólico. Ese mismo año se presentó un proyecto institucional a la convocatoria de proyectos de unidades ejecutoras (PUE 2019) del CONICET, en el cual se incorporó la línea de trasplante de médula ósea. En el marco de la InTraMic, además, se realizan reuniones periódicas abiertas a todo el personal de salud en las que se intercambian conocimientos y se evalúan nuevas propuestas.

En el presente artículo se brinda una actualización sobre la caracterización taxonómica de microbioma y se describen las líneas de investigación en curso.

Estado del arte

Joshua Lederberg, Premio Nobel de Fisiología y Medicina en 1958, fue quien introdujo el concepto de microbioma al demostrar que las bacterias comensales mantienen un intenso intercambio genético entre ellas y con las células del huésped. Hoy se estima que aproximadamente 100 trillones de microorganismos (incluidos bacterias, virus y hongos) residen en el intestino humano adulto y que el total del material genético del microbioma es 100 veces superior al del genoma humano¹.

La adquisición a temprana edad de un MBI diverso y equilibrado se considera crítica para el normal desarrollo del ser humano. El MBI original se adquiere al momento del nacimiento a través de la flora comensal de la piel, vagina y heces de la madre y varía principalmente durante los dos primeros años, luego se mantiene relativamente estable con unas 100 especies microbianas diferentes, principalmente representadas por bacterias. Existe una marcada diferencia entre los individuos y entre las diferentes regiones del mundo. Esta biodiversidad es un parámetro que debe ser distinguido en al menos dos niveles: la diversidad local o diversidad alfa (que representa la riqueza de especies de

una comunidad a la que consideramos como homogénea) y la diversidad entre áreas o diversidad beta (que mide las diferencias en la composición bacteriana de una o más muestras). En un estudio inicial publicado en *Nature* en 2011, Arumugam y col.² introducen el concepto de “enterotipo” sobre la base de un mapeo metagenómico sobre 1511 genomas de individuos sanos de Europa, Japón y Estados Unidos caracterizando tres grupos: el enterotipo 1 (predominio de *Bacteroides*), enterotipo 2 (predominio de *Prevotella*) y enterotipo 3 (predominio de *Ruminococcus*). Si bien estos enterotipos no están tan claramente delimitados, como por ejemplo los grupos sanguíneos, caracterizan en forma bastante estable a los individuos e incluso se pueden restaurar después de su perturbación. Los enterotipos han sido determinados a nivel de país, a nivel intracontinental y también a nivel intercontinental³. Fisiológicamente, el MBI no solo constituye una barrera defensiva natural contra la infección, sino también participa en numerosos procesos protectores, estructurales y metabólicos del epitelio intestinal que, a su vez, impactan en los estados de salud y enfermedad⁵. Por ejemplo, el MBI participa en la fermentación de carbohidratos (a través de la producción de CO₂, H₂, CH₄), ácidos grasos de cadena corta (p. ej., butirato, propionato y acetato) y en la fermentación proteolítica (p. ej., compuestos fenólicos, aminas, amoníaco, compuestos de N-nitroso e indoles). Estos procesos pueden afectar la expresión génica, diferenciación y proliferación de células epiteliales⁴. Uno de los primeros focos de interés en el estudio del MBI han sido, lógicamente, ciertas enfermedades gastrointestinales como el cáncer colorrectal (CCR) o la colitis ulcerosa. En los últimos años, este interés no solo se ha profundizado, sino se ha ampliado a múltiples escenarios clínicos que incluyen enfermedades metabólicas (p. ej., enfermedad de hígado graso no alcohólico)⁵ e inmunológicas (p. ej., trasplante alogénico de células progenitoras hematopoyéticas [Alo-TCPH]⁶). A pesar de la fuerte asociación entre el MBI y diversas enfermedades, la relación de causalidad no está claramente demostrada en la mayoría de los casos. Sin embargo, se han descrito numerosos mecanismos por los cuales la disbiosis podría ser primariamente causal en al menos alguna.

A diferencia de la dificultad que implica la manipulación genética, el MBI puede modificarse a través de intervenciones relativamente simples y de bajo costo, como el cambio alimentario y el uso de prebióticos y probióticos. Esto permite esbozar alternativas de fácil implementación que pueden mejorar la prevención primaria, secundaria y terciaria de diversas enfermedades. Se fundamenta, por ejemplo, en las nuevas evidencias que no solo muestran la relación entre el MBI y la respuesta a fármacos (p. ej., inmunoterapia basada en PD-L1), sino también en la posibilidad de ser utilizado como agente terapéutico *per se*⁷. La profundización del estudio del MBI se ha visto po-

tenciada por nuevas tecnologías que permiten su caracterización a través de diferentes formas incluyendo la metagenómica (estudio de los genes), la transcriptómica (estudio del ARNm expresado) y la metabolómica (estudio de los metabolitos). De ellas, la metagenómica es la de más fácil implementación y sobre ella se basa la mayoría de las publicaciones. La gran mayoría de los estudios se realizan sobre muestras de materia fecal, las que no necesariamente representan al MBI asociado a la mucosa intestinal que crece sobre una matriz de exopolisacáridos y adheridos formando los “biofilms”⁸. De hecho, la proporción de anaerobios/aerobios en estas películas biológicas es menor que en la luz intestinal. Sin embargo, debido a la factibilidad de obtención de muestras, el análisis del MBI a través del estudio de muestras de heces (determinación del microbioma fecal, en adelante “MBF”) es prácticamente la única modalidad de estudio implementada. A su vez, de todas las metodologías de estudio posibles, la más difundida es la caracterización taxonómica basada en la secuenciación de ARN ribosomal 16S (ARNr 16S). El ARNr 16S es el componente de la subunidad menor (30S) de los ribosomas procariotas; el gen que lo codifica (ARNr 16S) se utiliza para la reconstrucción de filogenias ya que su secuencia está altamente conservada entre las distintas especies de bacterias. El estudio específico de la región hipervariable V4 de dicho gen permite identificar y clasificar las bacterias a nivel de filo⁹, pudiéndose establecer con precisión la composición y el grado de diversidad del MBI. Otro pilar de la caracterización del MBI es el procesamiento bioinformático para el análisis de comunidades microbianas luego de la secuenciación de amplicones de un gen marcador como el ARNr 16S. El QIIME (*Quantitative Insights Into Microbial Ecology*) es un flujo bioinformático diseñado para este fin que realiza un control de calidad de las secuencias ingresadas, las agrupa filogenéticamente –por ejemplo, 97% para el nivel de especie– en OTU (unidades taxonómicas operativas) o a través de las variantes genéticas y las registra taxonómicamente al buscarlas en bases de datos de secuencias de referencia. El resultado principal de QIIME es una tabla de características en la que se describe la abundancia de cada OTU o variantes de secuencia en cada muestra⁹.

En resumen, los desarrollos tecnológicos y bioinformáticos actuales permiten explorar la asociación entre el MBI y diferentes estados de salud abriendo la posibilidad de encontrar no solo nuevos marcadores pronósticos y predictivos sino, además, nuevas modalidades terapéuticas de relativo bajo costo y fácil implementación.

Alcance de conocimiento e interrogantes actuales

El creciente interés científico por el MBI se ve reflejado en los más de 26 500 artículos indexados en Medline en los últimos 5 años (solo en 2019 fueron 7987 artículos), los que representan el 60% del total de publicaciones desde

1968. Entre las iniciativas internacionales se destaca el Proyecto Microbioma Humano cuyo objetivo es catalogar los microorganismos que conviven con el ser humano. El análisis inicial se centró en cinco sitios del cuerpo: piel, nariz, boca, intestino y vagina de individuos sanos. En 2013, su primera etapa terminó con más de 14 terabytes de datos de 300 individuos. La segunda fase se estableció en 2014 centrándose en tres condiciones diferentes: embarazo y nacimiento prematuro, enfermedad inflamatoria intestinal y diabetes tipo 2. A la evidencia derivada de este proyecto se le sumó otra gran cantidad generada en otras enfermedades que ha expandido rápidamente el conocimiento sobre el MBI. Asimismo, además de la caracterización de los enterotipos, el impacto sobre el MBI de diferentes factores, incluidos edad, modo de nacimiento (cesárea o parto vaginal), uso prematuro de antibióticos, dieta y la constitución genética del individuo, ha sido motivo de numerosas publicaciones en los últimos años³. Sin embargo, dado que la caracterización se efectuó básicamente en Europa y América del Norte, una de las mayores y más importantes brechas de conocimiento está en relación con los aspectos que pueden variar entre las diferentes poblaciones alrededor del mundo, lo que justifica la realización de estudios locales como el propuesto en esta presentación.

El impacto de la geografía no solo ha sido uno de los aspectos menos explorados en esta área: los estudios realizados solo incluyeron un número limitado de países (entre uno y doce). En uno de esos estudios se demostró que la latitud se correlaciona positiva y negativamente con la abundancia de Firmicutes y Bacteroidetes, respectivamente. El único estudio que incluyó muestras de referencia argentina (limitado a 10 casos) fue publicado por Mobeen y cols. en 2018³. Utilizando datos públicos de amplicones de ARN 16S, de 15 países de 4 continentes (Asia, África, América y Europa) determinaron la variación composicional y diversidad (alfa y beta) presente en MBI encontrando marcadas diferencias: los géneros *Bifidobacterium* y *Bacteroides* fueron identificados como los principales taxos de enterotipos en las poblaciones de Asia y Occidente (americana y europea), respectivamente, mientras la población africana se distribuyó entre *Prevotella* y *Bacteroides*. Las muestras de España y la Argentina, Estados Unidos, Egipto y Malasia se agruparon en el Enterotipo III.

A continuación, se describe la problemática en las enfermedades que son incluidas en el presente proyecto.

Cáncer colorrectal: el CCR es la cuarta causa más común de muerte por cáncer en el mundo. Si bien tradicionalmente su incidencia ha sido mayor en los países occidentales y desarrollados, en las últimas décadas ha habido un aumento generalizado y especialmente marcado en personas más jóvenes¹⁰. Cada vez hay más evidencia de una asociación entre el desarrollo de CCR y un microbioma

fecal alterado (disbiótico), con el potencial de desarrollar nuevos marcadores de cribado, pronósticos o terapéuticos. Si bien la causalidad de esta asociación requiere mayor evidencia, hay demostrados mecanismos potencialmente causativos que incluyen las genotoxinas, las alteraciones del metabolismo, la modulación de las defensas del huésped e inflamación y la inducción del estrés oxidativo. Entre las genotoxinas se destacan la FadA del *F. nucleatum* (activa la vía de señalización Wnt/ β -catenina), las adhesinas de la *E. coli* (se adhiere e invade el epitelio intestinal) y la BFT del *B. fragilis*, (activa la vía de señalización Wnt/ β -catenina y el factor NF-B). La *colibactin* es otra genotoxina que induce la formación de ROS (del inglés, *Reactive Oxygen Species*) y el daño del ADN. El metabolismo derivado del microbioma puede afectar la carcinogénesis colorrectal a través de la generación de ácidos biliares secundarios, la activación de procarcinogénicos, el metabolismo hormonal o modificación de vías de inflamación. Otro mecanismo es la modulación de las defensas e inflamación. Las interacciones del huésped y el MBI implican receptores de inmunidad innata (p. ej., *Toll Like Receptors* y *Nod Like Receptors*) implicados en la activación de las vías de señalización de MAPK, NF- κ B o PI3K/AKT²⁰ y la expresión de citocinas (p. ej., TNF- α , IL-6, IL-8)¹¹.

Un área específicamente estudiada en el CCR es la del estroma y microambiente. Los diversos tipos de CCR que surgen en respuesta a distintas vías de señalización determinan distintos microambientes tumorales. Entre las poblaciones celulares estromales relevantes en la progresión carcinogénica están los fibroblastos asociados a tumor (TAF), pericitos y células madre mesenquimales (MSC). El papel del microambiente del tumor en relación con la composición del MBI está poco explorado en la literatura, con una evidencia incipiente de una estrecha interacción entre las MSC y el MBI¹². Por otro lado, el *estrés oxidativo* parecería ser un proceso central en la vinculación del MBI y la carcinogénesis: estudios *in vitro* e *in vivo* demuestran que algunas especies de Enterococci, especialmente *E. faecalis*, generan radicales hidroxilo que son mutágenos poderosos que pueden causar roturas de ADN e inestabilidad genómica. El uso de inhibidores de ROS y NOS puede prevenir este efecto, apoyando el papel del estrés oxidativo inducido por bacterias en la carcinogénesis¹³.

El impacto de la variación geográfica también está especialmente marcado en el CCR, cuya incidencia se encuentra probadamente asociada a los hábitos y exposiciones que difieren de forma amplia entre las regiones. Prácticamente, toda la caracterización del MBI y el CCR se ha realizado en países desarrollados; la evidencia en el resto del mundo es muy limitada y está basada en pequeños estudios piloto. A esto se le suma la evidencia de que el MBI asociado a CCR puede incluso diferir entre distintas cohortes occidentales¹⁴. En un estudio que comparó el MBI de sujetos de países occidentales de América y Europa y no occidentales (Corea

del Sur y Japón) se encontró que el país de origen se asoció a una mayor variación ($R^2 = 0,22$) que el índice de masa corporal o el sexo ($R^2 = 0,04$ y $0,05$, respectivamente)¹⁵. En este escenario cobra importancia la realización de investigaciones en la Argentina utilizando la misma metodología de los centros de referencia, que permita no solo caracterizar el MBI local sino validar los resultados y sumarlos a las colaboraciones internacionales.

Enfermedad de hígado graso no alcohólico: es la principal causa de enfermedad hepática crónica en el mundo y se encuentra asociada a la obesidad, la resistencia a la insulina, la diabetes mellitus tipo 2, la hipertensión arterial, la dislipidemia y el síndrome metabólico¹⁶. La enfermedad por hígado graso no alcohólico comprende un espectro de patologías de evolución prolongada que van desde la esteatosis simple hasta la esteatohepatitis no alcohólica con riesgo de fibrosis hepática progresiva, cirrosis y carcinoma hepatocelular.

La evolución de la enfermedad es muy heterogénea, con pacientes que desarrollan fibrosis en menor tiempo que otros sin ningún factor predictivo claro. El desafío actual reside en distinguir a los pacientes con esteatosis simple de aquellos con esteatohepatitis no alcohólica ya que esta última incrementa las probabilidades de progresión de la enfermedad hepática. Dado que la progresión de la fibrosis es el factor pronóstico más importante asociado con la morbimortalidad, la biopsia hepática es el método de referencia (*gold standard*) para el diagnóstico y pronóstico de esta patología. Sin embargo, este procedimiento no solo es costoso e invasivo: por sus propios riesgos no puede emplearse como una herramienta de monitorización periódica de la progresión de la enfermedad. Si bien existen índices serológicos que se utilizan en la práctica clínica para determinar qué pacientes tienen fibrosis avanzada, estos no permiten distinguir esteatosis simple de esteatohepatitis no alcohólica¹⁷. Por lo tanto, la identificación de nuevos marcadores no invasivos fiables y costo-eficaces es un campo de gran interés actual. En este escenario, el MBI ha sido señalado en numerosos estudios recientes como un nuevo factor de utilidad clínica. Estaría implicado en la génesis de la enfermedad por hígado graso no alcohólico por múltiples mecanismos que también favorecerán la progresión a su forma más agresiva esteatohepatitis no alcohólica⁸. Los pacientes enfermos por enfermedad por hígado graso no alcohólico presentan un aumento de la permeabilidad intestinal con la consiguiente translocación bacteriana y pasaje de productos bacterianos a la circulación portal. Una vez en el hígado, estos desencadenan cascadas proinflamatorias (p. ej., producción de IL-6 y TNF- α) vía interacción con receptores simil-Toll presentes en células de Kupffer, células estrelladas y hepatocitos. La disbiosis intestinal, caracterizada por un aumento de los Bacteroidetes (especialmente de especies del género *Prevotella*) y Proteobacterias (específicamente

del género *Escherichia*) junto con una disminución de los Firmicutes, ha sido ampliamente asociada a la progresión a la EHNA¹⁹. Esta alteración derivaría en un aumento en la producción de etanol endógeno, el cual desencadenaría procesos inflamatorios y fibrosis hepática. Además, existen otras moléculas derivadas de esta disbiosis intestinal que se encuentran aumentadas en la enfermedad por hígado graso no alcohólico como los ácidos grasos de cadena corta, que estimulan resistencia a la insulina y el depósito hepático de lípidos, y los ácidos biliares, que afectan el metabolismo hepático y la inmunidad¹⁸.

Si bien varios estudios realizados en otros países han sugerido ciertos mediadores derivados del MBI como marcadores potenciales de progresión de la enfermedad por hígado graso no alcohólico¹⁹⁻²³, la incidencia creciente de esta en países latinoamericanos sumada a la variabilidad interétnica de la composición del MBI^{24,25} subraya la necesidad de llevar a cabo estudios locales que se planteen el mismo interrogante.

Trasplante alogénico de células progenitoras hematopoyéticas (TCH): es una terapia inmunológica prolongada que implica el cambio del sistema inmunitario del receptor por el de un donante y requiere el uso de fármacos (p. ej., antibióticos), radiación y agentes quimioterapéuticos que potencialmente pueden alterar la homeostasis inmunitaria intestinal y el MBI. A su vez, el desarrollo de varias complicaciones posteriores a TCH, como la infección y la recaída de la enfermedad, se ha asociado con disbiosis del MBI⁶. El cambio en la diversidad del MBI postrasplante puede predecir complicaciones serias como en la enfermedad de injerto contra hésped aguda, la cual es causa de morbilidad y de mortalidad.

Particularmente, la composición del MBI al momento del injerto de neutrófilos fue un predictor independiente de la aparición de enfermedad de injerto contra hésped aguda. La presencia de alteración del MBI se asoció a cambios inflamatorios (niveles de IL-1 β , IL-16, IL-17A y TNF- α) y un desequilibrio en la relación células T reguladoras (Treg) y células T productoras de IL-17 (Th17) constituyendo un mecanismo fisiopatogénico para el desarrollo de esta complicación. Por el contrario, una abundancia de anaerobios obligados como *Ruminococcaceae* podrían favorecer una rápida reconstitución de células B y NK, mientras que la abundancia de especies de *Blautia* se asoció a una robusta reconstitución de células T invariantes asociadas a la mucosa, las cuales podrían tener un efector T regulador, reduciendo el riesgo de enfermedad de injerto contra hésped y de mortalidad²⁵.

Algunos pacientes que ingresan al trasplante presentan disbiosis y baja diversidad de la microbiota antes de iniciar el régimen condicionante, relacionadas con tratamientos de quimioterapia previos. Por lo tanto, conocer con antelación el estado del MBI a través de su estudio podría

llegar a tener un impacto en la recuperación postrasplante de los pacientes. Por otro lado, los cambios en el MBI a lo largo del período pretrasplante y postrasplante pueden deberse a la intensidad del régimen condicionante y al uso de antibióticos de amplio espectro. El daño del MBI tiene una relación directa con el grado de severidad de la enfermedad de injerto contra hésped que el paciente pudiera desarrollar. Específicamente, se ha descrito que el uso de fármacos con alta actividad antibiótica contra los anaerobios obligados, como piperacilina/tazobactam y los carbapenémicos, se traduce en una mayor alteración de la microbiota, mayor daño en la barrera intestinal y un cuadro más severo de enfermedad de injerto contra hésped comparado con el uso de antibióticos de espectro reducido como el aztreonam²⁶. Además, en pacientes con enfermedad de injerto contra hésped las células de Paneth se encuentran dañadas, lo que deriva en una menor producción de alfa-defensinas lo que podría llegar a contribuir a la disbiosis, permitiendo la expansión de bacterias patógenas, la activación del sistema inmunitario innato y la consiguiente activación de células T alorreactivas. Otras complicaciones que pueden ocurrir en el TCH son las infecciones sistémicas, como las virales, también asociadas a la baja diversidad del MBI en el momento del injerto. Existen estudios que han asociado la colonización gastrointestinal de bacterias comensales y la producción de butirato con una mayor protección contra las infecciones virales del tracto respiratorio inferior pos-TCH lo que sugiere que la presencia de este metabolito derivado de bacterias intestinales podría potencialmente favorecer el desarrollo de la inmunidad antiviral sistémica. Del mismo modo, la colonización intestinal de las proteobacterias se asoció con una baja supervivencia y más complicaciones respiratorias. A pesar de que existen estos antecedentes y que varios estudios han relacionado la disbiosis intestinal con los resultados del trasplante, pocos estudios evaluaron el cambio en el MBF en diferentes momentos del TCH²⁷; además no existen datos de la Argentina en este contexto clínico. Conocer las variaciones del MBI a lo largo de la evolución del paciente pre-TCH y post-TCH puede derivar en mejoras en la prevención y tratamiento de las complicaciones más frecuentes, apuntando a una mayor sobrevida y éxito del injerto.

La InTraMic en el año 2020

Como ya se mencionó, la InTraMic fue iniciada en 2018 con la línea de CCR junto a una colaboración con el *Colorectal Cancer Research Group* del *Leeds Institute of Medical Research* en el proyecto “Large bowel microbiome disease network: Creation of a proof of principle exemplar in colorectal cancer across three continents”. A fines de 2019 se cumplió el objetivo de comprobar la factibilidad de la recolección, envío y análisis de muestras de MBF en 5 continentes, incluyendo muestras provenientes de la Argentina, Chile, India y Vietnam. En

este estudio se utilizaron tarjetas de detección de sangre oculta en materia fecal (SOM) para la recolección de 120 muestras. Tal estrategia se basó en resultados previos del grupo que habían demostrado una buena concordancia entre el ADN microbiano aislado de muestras de heces frescas y muestras conservadas en dichas tarjetas hasta 3 años. Luego de haber participado de capacitaciones en Inglaterra, tanto investigadores de nuestro grupo como de otros centros participantes han cumplido con el objetivo de la etapa piloto, logrando efectivizar la recolección y el envío de muestras de forma exitosa de 10 pacientes con CCR y 10 voluntarios sanos de cada país. Además, se generaron muestras control replicadas de 5 voluntarios sanos del Reino Unido para evaluar el efecto del transporte y el almacenamiento en el extranjero. Las repeticiones de extracción se realizaron hasta 9 meses después en un subconjunto de muestras para evaluar el efecto de la conservación de las muestras a temperatura ambiente. El análisis metagenómico fue realizado a partir de la secuenciación de la región V4 del ARNr 16S²⁸.

En 2019, la línea de enfermedad de hígado graso no alcohólico se sumó a la InTraMic iniciando una caracterización piloto en el marco de una colaboración con el laboratorio Novartis. Los resultados de ese estudio, así como el de cáncer colorrectal, están siendo enviados a publicación. Finalmente, creemos importante mencionar que la actividad de investigación se complementa con actividades educativas a través de Jornadas multidisciplinarias realizadas en forma anual. El común interés de investigadores traslacionales y clínicos con experiencia en diferentes escenarios clínicos ha llevado al IMTIB a considerar a la InTraMic como línea prioritaria.

Proyección de la InTraMic

La InTraMic constituye una línea de investigación propicia para que investigadores clínicos y traslacionales estrechen sus vínculos y potencien sus conocimientos. En este escenario, el IMTIB es el marco ideal para las iniciativas comunes que requieren recursos humanos y tecnológicos potenciados por el gran caudal de pacientes del HIBA y la posibilidad de interactuar con destacados investigadores de otras unidades ejecutoras con las cuales se han establecido convenios. Si bien las líneas en curso actuales son relativamente pocas, existen otras propuestas (fragilidad en ancianos, efectos de la edad) que se ven facilitadas por la plataforma tecnológica y el muestreo de casos comunes que se está creando. Asimismo, la InTraMic constituye un área propicia para desarrollo de maestría, doctorados y posdoctorados. De hecho, ya hay dos en curso y 4 propuestas en el Proyecto de Unidades Ejecutoras que ya ha superado la primera ronda de selección del CONICET. Todo interesado en sumarse a esta iniciativa es bienvenido.

Resumen de la propuesta presentada en la convocatoria de Proyecto de Unidades Ejecutoras

Sobre la base de un análisis de áreas de vacancia en investigación y transferencia de conocimiento en la Argentina y de la potencialidad de nuestro Instituto, el presente proyecto propone analizar la taxonomía del MBI para caracterizar e identificar potenciales biomarcadores que sean aplicables en diferentes contextos clínicos y transferibles al sistema de salud de nuestro país (fig. 1). Los objetivos específicos incluyen caracterizar el MBI de pacientes con patologías oncológica (cáncer colorrectal [CCR]), metabólica (enfermedad de hígado graso no alcohólico, e

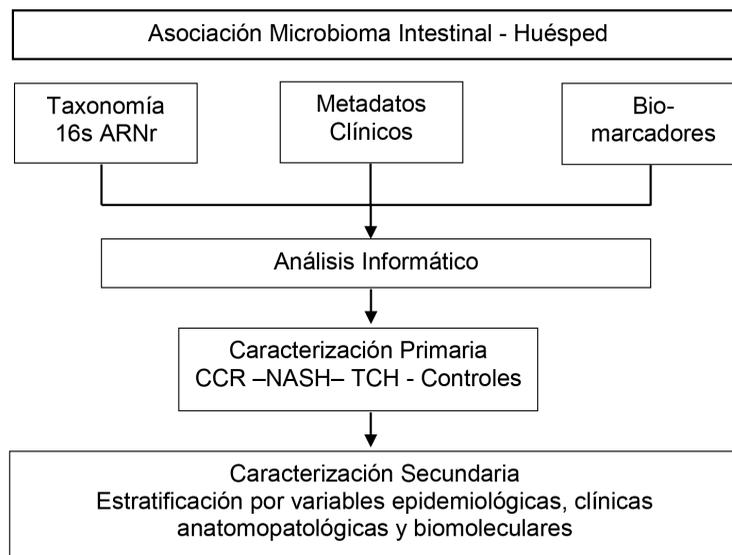


Figura 1. Etapas y actividades contempladas en el abordaje multidisciplinario del estudio del microbioma.

inmunológica (trasplante alogénico de células progenitoras hematopoyéticas [TCH]) y compararlos con un grupo control común a todas las líneas. Además, se explorarán diferencias entre los grupos de las 3 patologías y en cada una de ellas se buscarán asociaciones con factores pronósticos y predictivos de comprobada validez clínica. Parte de las muestras serán almacenadas en un biobanco bajo los estándares de la *Joint Commission International* y el *College of American Pathologists* para una futura caracterización multiómica. A fin de sumar información a la poca disponible actualmente en la literatura, se efectuará la caracterización del microambiente tumoral (estroma y estrés oxidativo) en muestras de mucosa peritumoral obtenida de piezas anatomopatológicas de los pacientes con CCR. Se trabajará en forma interdisciplinaria para integrar datos epidemiológicos, clínico-patológicos y moleculares a través de un análisis informático capaz de generar información con utilidad clínica. Los datos clínicos asociados se obtendrán en forma prospectiva y resguardados en las historias clínicas electrónicas bajo los estándares de HIMSS Analytics. El análisis taxonómico se basará en el estudio de la región V4 del gen que codifica para el ARNr 16S, cumplimentando los requerimientos del protocolo OPTIMISTIC (protocolo internacional del cual los investigadores del IMTIB forman parte) a fin de poder validarlos e integrarlos a sus resultados. En el CCR,

se analizarán adicionalmente muestras de tumor y mucosa normal adyacente para el análisis patológico-molecular de biomarcadores (p. ej., mutación K-ras, expresión inmunohistoquímica de genes reparadores, inestabilidad de microsátelites mediante la técnica de reacción en cadena de polimerasa (PCR). En este tejido también se caracterizará el microambiente a través del estudio de la fracción estromal activada (TAF, pericitos, etc.) y el estado de estrés oxidativo (determinación de especies activas del oxígeno y actividad de la enzima antioxidante glutatión transferasa mediante determinaciones espectrofotométricas). El análisis informático se realizará a partir de programas validados y el desarrollo de algoritmos propios que permitan interpretar los resultados en un contexto clínico que facilite la transferencia de los resultados a la práctica asistencial. La información publicada se cederá al repositorio institucional Trovare, cuyo objetivo es la difusión libre de la producción académico-científica de los miembros del Hospital Italiano de Buenos Aires (HIBA), el Instituto Universitario Hospital Italiano de Buenos Aires (IUHIBA) y el IMTIB. La relevancia de este proyecto para el IMTIB está dada por la creación de una plataforma que permita la integración de recursos humanos, científicos y tecnológicos en beneficio de la investigación en un área de creciente interés científico a nivel mundial.

Conflictos de interés: los autores declaran no tener conflictos de interés.

REFERENCIAS

- Dethlefsen L, McFall-Ngai M, Relman DA. An ecological and evolutionary perspective on human-microbe mutualism and disease. *Nature*. 2007; 449:811-8.
- Arumugam M, Raes J, Pelletier E, et al. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*. 2011; 473:174-80.
- Mobeen F, Sharma V, Prakash T. Enterotype Variations of the Healthy Human Gut Microbiome in Different Geographical Regions. *Bioinformation*. 2018; 14:560-73.
- Boleij A, Tjalsma H. Gut bacteria in health and disease: a survey on the interface between intestinal microbiology and colorectal cancer. *Biol Rev Camb Philos Soc*. 2012; 87:701-30.
- Tilg H, Kaser A. Gut microbiome, obesity, and metabolic dysfunction. *J Clin Invest*. 2011; 121:2126-32.
- Schwabkey ZI, Jenq RR. Microbiome Anomalies in Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation. *Annu Rev Med*. 2020; 71:137-48.
- Yaghoubi A, Khazaei M, Avan A, et al. The bacterial instrument as a promising therapy for colon cancer. *Int J Colorectal Dis*. 2020; 35:595-606.
- Sekirov I, Russell SL, Antunes LCM, et al. Gut Microbiota in Health and Disease. *Physiol Rev*. 2010; 90:859-904.
- Yang B, Wang Y, Qian P-Y. Sensitivity and correlation of hypervariable regions in 16S rRNA genes in phylogenetic analysis. *BMC Bioinformatics*. 2016; 17:135.
- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018; 68:394-424.
- Wu S, Rhee K-J, Albesiano E, et al. A human colonic commensal promotes colon tumorigenesis via activation of T helper type 17 T cell responses. *Nat Med*. 2009; 15:1016-22.
- Karin M, Greten FR. NF- κ B: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nat Rev Immunol*. 2005; 5:749-59.
- Ocansey DKW, Wang L, Wang J, et al. Mesenchymal stem cell-gut microbiota interaction in the repair of inflammatory bowel disease: an enhanced therapeutic effect. *Clin Transl Med*. 2019; 8:31.
- Arthur JC, Pérez-Chanona E, Mühlbauer M, et al. Intestinal inflammation targets cancer-inducing activity of the microbiota. *Science*. 2012; 338:120-3.
- Loke MF, Chua EG, Gan HM, et al. Metabolomics and 16S rRNA sequencing of human colorectal cancers and adjacent mucosa. *PLoS One*. 2018; 13.
- Dai Z, Coker OO, Nakatsu G, et al. Multi-cohort analysis of colorectal cancer metagenome identified altered bacteria across populations and universal bacterial markers. *Microbiome*. 2018; 6:70.
- Escobar JS, Klotz B, Valdés BE, et al. The gut microbiota of Colombians differs from that of Americans, Europeans and Asians. *BMC Microbiol*. 2014; 14:311.
- Younossi ZM. Non-alcoholic fatty liver disease -A global public health perspective. *J Hepatol*. 2019; 70:531-44.

19. Sumida Y. Limitations of liver biopsy and non-invasive diagnostic tests for the diagnosis of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *World J Gastroenterol.* 2014; 20:475.
20. Sharpton SR, Yong GJM, Terrault NA, et al. Gut Microbial Metabolism and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Hepato Comm.* 2019; 3:29-43.
21. Zhu L, Baker SS, Gill C, et al. Characterization of gut microbiomes in nonalcoholic steatohepatitis (NASH) patients: A connection between endogenous alcohol and NASH. *Hepatology.* 2013; 57:601-9.
22. Aragonès G, González-García S, Aguilar C, et al. Gut Microbiota-Derived Mediators as Potential Markers in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Biomed Res Int.* 2019; 2019:8507583
23. Wong VW-S, Adams LA, de Lédinghen V, et al. Noninvasive biomarkers in NAFLD and NASH - current progress and future promise. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2018; 15:461-78.
24. Pirola CJ, Sookoian S. Multiomics biomarkers for the prediction of nonalcoholic fatty liver disease severity. *World J Gastroenterol.* 2018; 24:1601-15.
25. Brooks AW, Priya S, Blekhman R, et al. Gut microbiota diversity across ethnicities in the United States. *PLOS Biol.* 2018; 4:16-20.
26. Pinto Marques Souza de Oliveira C, Pinchemel Cotrim H, Arrese M. Nonalcoholic Fatty Liver Disease Risk Factors in Latin American Populations: Current Scenario and Perspectives. *Clin Liver Dis (Hoboken).* 2019; 13(2):39–42.
27. Han L, Zhao K, Li Y, et al. A gut microbiota score predicting acute graft-versus-host disease following myeloablative allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Am J Transplant.* 2019; 4:56-9.
28. Peled JU, Gomes ALC, Devlin SM, et al. Microbiota as Predictor of Mortality in Allogeneic Hematopoietic-Cell Transplantation. *N Engl J Med.* 2020; 382:822-34.