

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL
(ETSIAMN)



Análisis multiómico del impacto del tratamiento beta-lactámico en la microbiota intestinal de pacientes hospitalizados

TRABAJO FIN DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

Autora: **Celia Gómez Sánchez**

Curso académico: 2019-2020

TUTOR: Dr. Carles Úbeda Morant
CO-TUTOR: Dr. Santiago Vilanova Navarro

Valencia, 3 de julio de 2020



Resumen

Análisis multiómico del impacto del tratamiento beta-lactámico en la microbiota intestinal de pacientes hospitalizados

Autora: **Celia Gómez Sánchez**

Tutor: **Dr. Carles Úbeda Morant**

Co-tutor: **Dr. Santiago Vilanova Navarro**

Valencia, julio de 2020

La microbiota intestinal tiene un efecto fundamental en la salud del individuo. Alteraciones en la microbiota como las que producen los antibióticos pueden producir efectos adversos en la salud, incluyendo el desarrollo de infecciones. En los últimos años se han realizado diversos estudios sobre el efecto del tratamiento antibiótico en la composición de la microbiota (esto es, taxones). Sin embargo, existen pocos estudios que hayan analizado el efecto del tratamiento antibiótico desde un punto de vista multiómico (es decir, taxones, genes codificados, proteínas expresadas y metabolitos producidos). Dicha información es muy relevante para conocer el verdadero impacto que tienen los antibióticos en la microbiota y su posible efecto en la salud del individuo.

El objetivo de este trabajo es, por tanto, analizar mediante una aproximación multiómica el efecto que tienen los antibióticos en la microbiota intestinal. Más concretamente, analizaremos mediante técnicas de secuenciación masiva, proteómica y metabolómica el impacto en la microbiota de dos beta-lactámicos que se utilizan frecuentemente en pacientes hospitalizados (meropenem y piperacilina-tazobactámico). Para ello realizaremos análisis bioestadísticos en datos ómicos obtenidos de muestras fecales de pacientes hospitalizados con leucemia aguda.

Palabras clave:

Microbiota; beta-lactámicos; meropenem; piperacilina-tazobactámico; secuenciación masiva; proteómica; metabolómica; antibióticos; pacientes hospitalizados

Summary

Multiomic analysis of the impact of beta-lactam treatment in the gut microbiota of hospitalized patients

Author: **Celia Gómez Sánchez**

Supervisor: **Dr. Carles Úbeda Morant**

Co-supervisor: **Dr. Santiago Vilanova Navarro**

Valencia, July 2020

Gut microbiota has a crucial effect on individual's health. Microbiota alterations such as the ones produced by antibiotics can result in negative effects in health, including the development of infections. During the past years, several studies that have been performed focused in the effect of the antibiotic treatment on microbiota composition (i.e. taxa). However, only few studies have addressed the effect of antibiotic treatment from a multiomic perspective (i.e. taxa, coded genes, expressed proteins and produced metabolites). Such information is key to understand the true impact that antibiotics have on the microbiota as well as their potential effect in the individual's health.

Thus, the purpose of this work is to analyze the effect that antibiotics have on gut microbiota using a multiomic approach. In particular, we will focus on the impact of two antibiotics commonly used in hospitalized patients (i.e. meropenem and piperacillin-tazobactam), by using techniques of shotgun sequencing, proteomics and metabolomics. For this purpose, we will perform biostatistical analysis of omic data obtained from faecal samples of hospitalized patients that suffer from acute leukemia.

Keywords:

Microbiota; beta-lactams; meropenem; piperacillin-tazobactam; shotgun sequencing; proteomics; metabolomics; antibiotics; hospitalized patients

Agradecimientos

En primer lugar, me gustaría agradecerles a mis padres, y al resto de mi familia, por apoyarme siempre, especialmente en los momentos más duros de este proceso.

Asimismo, quisiera agradecer a mi tutor, Carles Úbeda Morant, por guiarme a lo largo de este trabajo. La ayuda de Carles ha sido vital para poder llevar a cabo este trabajo, pues me ha aportado el punto de vista necesario para comprender los conceptos más complicados, así como por las sucesivas tutorías y correcciones para asegurar que este trabajo quede lo mejor posible. También me gustaría agradecerle que me haya escogido como alumna en prácticas, ya que he podido aprender mucho del trabajo de laboratorio gracias a él.

Finalmente, me gustaría agradecerles a Alejandra Flor Duro y Anna Quirant Pellín por su dedicación y su apoyo, necesarios para seguir adelante en el proceso de realización de este trabajo.

Índice

1. Introducción	1
1.1. Microbiota y microbioma	1
1.2. Métodos de análisis del microbioma	2
1.3. Funciones de la microbiota	2
1.4. Los antibióticos beta-lactámicos y su efecto en la microbiota	3
1.4.1. Efectos en la composición de la microbiota	3
a) Penicilinas	5
b) Cefalosporinas	6
c) Carbapenémicos	6
1.4.2. Efectos del meropenem y la piperacilina-tazobactámico	7
a) Meropenem	7
b) Piperacilina-tazobactámico	8
1.4.3. Efectos en el resistoma	8
1.4.4. Efectos en la colonización por patógenos	9
1.4.5. Efectos en la salud del individuo	10
1.5. Tratamientos para restaurar la microbiota	10
2. Objetivos	10
3. Métodos	11
3.1. Recogida de muestras	11
3.2. Tratamiento de los pacientes	11
3.3. Definición de los grupos de muestras analizados	11
3.4. Secuenciación y procesamiento de las secuencias	12
3.5. Análisis de la composición de la microbiota	12
3.6. Análisis metabolómico	13
3.7. Análisis metagenómico	13
3.8. Análisis metaproteómico	13
3.9. Tratamiento de datos	13
3.10. Análisis estadístico	14
4. Resultados y discusión de los resultados	15
4.1. Análisis de la composición de la microbiota	15
4.2. Análisis metabolómico	24
4.3. Análisis metagenómico y metaproteómico	28
5. Conclusiones	30
6. Limitaciones del estudio	31
7. Referencias bibliográficas	31
Anexo I. Glosario de términos estadísticos	40

Índice de figuras

Figura 4.1. Estudio de las diferencias en la microbiota a nivel global antes del tratamiento con beta-lactámicos	16
Figura 4.2. Estudio de las diferencias en la microbiota a nivel global tras el tratamiento con beta-lactámicos	17
Figura 4.3. Análisis de la riqueza y la diversidad microbiana	17
Figura 4.4. Abundancia relativa de los filos bacterianos presentes en la microbiota de los pacientes	18
Figura 4.5. Comparación de la abundancia relativa del filo Proteobacteria en los diferentes grupos de muestras	19
Figura 4.6. Abundancia relativa de los géneros más prevalentes en la microbiota de los pacientes	20
Figura 4.7. Abundancia relativa de los géneros bacterianos reducidos de forma significativa tras el tratamiento con beta-lactámicos en general (A-E) y piperacilina-tazobactámico (F-H).	21
Figura 4.8. Abundancia relativa de las especies significativamente alteradas tras el tratamiento con beta-lactámicos	23
Figura 4.9. Estudio de las diferencias en los datos metabolómicos a nivel global tras el tratamiento con beta-lactámicos	24
Figura 4.10. Abundancia relativa de los metabolitos significativamente alterados tras el tratamiento con beta-lactámicos (A-D) y piperacilina-tazobactámico (E, F)	25
Figura 4.11. Heatmap de la correlación entre los géneros bacterianos más abundantes y los metabolitos significativamente disminuidos por el tratamiento con beta-lactámicos	27
Figura 4.12. KOs a nivel de proteína, cuyo cambio tras el tratamiento con beta-lactámicos es significativo	28
Figura 4.13. Diagrama de cambio en los niveles de los KOs significativamente alterados por el tratamiento beta-lactámico	29

Índice de tablas

Tabla 1.1. Efecto de los antibióticos beta-lactámicos sobre diferentes géneros y especies bacterianas	3
Tabla 1.2. Efecto de los antibióticos beta-lactámicos sobre familias, clases y filos bacterianos .	4
Tabla 4.1. Descripción de los pacientes analizados y de las condiciones del estudio	15
Tabla 4.2. Tendencia de los géneros pertenecientes al filo Proteobacteria a aumentar o disminuir tras el tratamiento con beta-lactámicos y en el grupo control	22
Tabla 4.3. Comparación de la tendencia de las OTUs a aumentar o disminuir tras el tratamiento con beta-lactámicos	22
Tabla 4.4. Especies correspondientes a las OTUs disminuidas significativamente tras la administración de beta-lactámicos	23

Listado de abreviaturas

AEMPS: Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios
ALL: leucemia linfoide aguda (acute lymphoid leukemia, por sus siglas en inglés)
AML: leucemia mieloide aguda (acute myeloid leukemia, por sus siglas en inglés)
ARG: gen de resistencia a los antibióticos (antibiotic resistance genes, por sus siglas en inglés)
ATP: adenosín trifosfato
beta: beta-lactámicos
C: carbono
CEIC: comité ético de investigación clínica
DHP-I: dehidropeptidasa renal I
EICH: enfermedad injerto contra huésped
ESBL: beta-lactamasa de espectro extendido (extended-spectrum beta-lactamases, por sus siglas en inglés)
F: femenino
FC: grado de cambio (fold-change, por sus siglas en inglés)
FMT: trasplante de microbiota fecal (faecal microbiota transplant, por sus siglas en inglés)
IGC: Integrated Genome Reference Catalog
INRAE: Institut National de Recherche pour l’Agriculture, l’Alimentation et l’Environnement
KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
KO: KEGG ortólogo (gen ortólogo buscado en la base de datos KEGG)
KPC: carbapenemasa de *Klebsiella pneumoniae*
LC-MS/MS: cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem
log: logaritmo
M: masculino
MDR: multirresistente a antibióticos (multi-drug resistant, por sus siglas en inglés)
mero: meropenem
NCBI: National Center for Biotechnology Information
OTU: unidad taxonómica operativa (operational taxonomic unit, por sus siglas en inglés)
p: p-valor
PAM: péptido anti-microbiano
PBP: proteína de unión a la penicilina (penicillin-binding proteins, por sus siglas en inglés)
PCoA: análisis de coordenadas principales (principal coordinates analysis, por sus siglas en inglés)
ptz: piperacilina-tazobactámico
RC: resistencia a la colonización
RDP: Ribosomal Database Project
RMN: resonancia magnética nuclear
RNA: ácido ribonucleico
rRNA: RNA ribosómico
SCFA: ácidos grasos de cadena corta (short-chain fatty acids, por sus siglas en inglés)
TSS: escalado por suma total (total sum-scaling, por sus siglas en inglés)
VRE: enterococo resistente a la vancomicina (vancomycin-resistant enterococcus, por sus siglas en inglés)

1. Introducción

1.1. Microbiota y microbioma

La microbiota es el conjunto de microorganismos que viven en una relación simbiótica con nuestro cuerpo (Ferrer *et al.*, 2017). En concreto, en el intestino grueso humano hay más de 100 billones de microorganismos, que corresponden a más de 1000 especies, la mayoría de las cuales puede sobrevivir en condiciones anaeróbicas (Iizumi *et al.*, 2017). El microbioma se define como el conjunto de dichos microorganismos y los genes que codifican.

La microbiota intestinal está formada principalmente por dos filos: Firmicutes y Bacteroidetes, que comprenden la mayoría de las bacterias presentes. Además, de forma minoritaria, hay presentes otros filos como Verrucomicrobia, Proteobacteria, Fusobacteria y Actinobacteria, entre otros (Eckburg *et al.*, 2005), además de algunas especies de arqueas, hongos, protozoos y virus, como la arquea *Methanobrevibacter smithii* (Bäckhed *et al.*, 2005). La composición de la microbiota está influenciada por la dieta, el género, la ubicación geográfica y el origen étnico. Es adquirida por los bebés al nacer, bien a partir de la microbiota vaginal de la madre, bien de la piel del personal del hospital (si el parto es por cesárea), siendo la composición inicial muy diferente en cada caso (Iizumi *et al.*, 2017). Con el tiempo, los bebés adquieren una microbiota secundaria a partir de las personas cercanas y el ambiente, que se va desarrollando hasta obtener una composición similar a la de un adulto, dominada por Bacteroidetes y Firmicutes (Gasparrini *et al.*, 2016).

Se considera que la diversidad en la microbiota es deseable para la estabilidad del ecosistema bacteriano, ya que confiere resiliencia (es decir, capacidad de recuperar un estado de equilibrio después de una perturbación) a través de un amplio repertorio de respuestas al estrés (Bäckhed *et al.*, 2005); así como resistencia (capacidad para mantenerse estable frente a un estrés). De hecho, la diversidad en especies microbianas intestinales se toma como una medida de la salud de la microbiota (Bäckhed *et al.*, 2012). Una disminución de la diversidad, pues, se ha asociado a patologías del huésped (Gasparrini *et al.*, 2016). Si bien es cierto que existe una gran variabilidad entre las especies bacterianas que comprenden la microbiota del huésped, muchos de sus genes comparten funciones, lo que resulta en una alta redundancia funcional entre los microbiomas (Bäckhed *et al.*, 2012). Estos genes actúan, por ejemplo, en la digestión de azúcares complejos, en la síntesis de aminoácidos, o la desintoxicación de xenobióticos (Pilmis *et al.*, 2020). Esta redundancia funcional en la comunidad microbiana asegura que normalmente los procesos clave no se vean afectados por tales cambios en la diversidad (Bäckhed *et al.*, 2005).

1.2. Métodos de análisis del microbioma

La metagenómica es el estudio de las comunidades microbianas mediante la secuenciación directa de sus genomas, sin necesidad de cultivar las bacterias. Esto es sumamente ventajoso para el análisis de la microbiota, ya que muchos de los microorganismos no son cultivables (o desconocemos las condiciones necesarias para su cultivo), de modo que el cultivo bacteriano solo puede representar de manera muy pobre la diversidad en la microbiota (Hayashi *et al.*, 2002). Es por ello que, hasta hace poco, la mayoría de los estudios sobre el efecto de los antibióticos en la microbiota se realizaban estudiando la composición taxonómica de la misma mediante la secuenciación del gen 16S rRNA. Sin embargo, esta se centra únicamente en los taxones presentes en una muestra, y no en las funciones codificadas colectivamente por la microbiota (Gasparrini *et al.*, 2019). Por tanto, cada vez se utiliza más la secuenciación masiva de los genomas microbianos, ya que puede abarcar todo el contenido genómico de una muestra. La secuenciación masiva permite estudiar tanto la composición taxonómica de una muestra como las funciones potenciales de las comunidades microbianas presentes. Por otro lado, se han utilizado otras técnicas ómicas (i.e. metabolómica y proteómica) que permiten identificar las proteínas

expresadas por los genes de la microbiota, así como los metabolitos derivados de la expresión de estas proteínas. Todas estas técnicas posibilitan hoy en día estudiar en más profundidad los cambios producidos en la microbiota en un ambiente determinado (Quince *et al.*, 2017).

1.3. Funciones de la microbiota

El papel de la microbiota intestinal en la salud humana es crucial, ya que influye entre otras en la nutrición, el metabolismo, la regulación de la respuesta del sistema inmune, la estimulación de la angiogénesis intestinal (Stappenbeck *et al.*, 2002), la homeostasis epitelial intestinal (Rakoff-Nahoum *et al.*, 2004) y la resistencia a la colonización por patógenos (Dethlefsen *et al.*, 2008).

La resistencia a la colonización (RC) es la capacidad que tiene la microbiota intestinal de impedir la entrada de bacterias exógenas, incluyendo patógenas. La RC se puede dar por diversos mecanismos, como la competencia entre la microbiota y los patógenos por la utilización de nutrientes. Por ejemplo, *Escherichia coli* y *Citrobacter rodentium* pueden competir por el metabolismo de los monosacáridos (Pilmis *et al.*, 2020). Otra forma de RC que ejerce la microbiota intestinal es la estimulación del sistema inmune del huésped contra las bacterias exógenas. Así, la microbiota Gram negativa, mediante elementos bacterianos como el lipopolisacárido, la taurina (Pilmis *et al.*, 2020) o la flagelina (Arias y Murray, 2012), inducen la formación de péptidos antimicrobianos (PAM) a través de la estimulación las células epiteliales y células Paneth intestinales. Para ello, activan los receptores de tipo Toll-like, produciendo RegIII γ , una lectina de tipo C que mata las bacterias Gram positivas (Mukherjee *et al.*, 2014), así como angiogenina-4, una ribonucleasa bactericida frente a Gram positivas y negativas (Hooper *et al.*, 2016). Asimismo, la microbiota intestinal también ejerce RC mediante la producción de bacteriocinas, péptidos bactericidas de espectro estrecho (normalmente) que afectan generalmente a aquellas bacterias que ocupan el mismo nicho (Eijsink *et al.*, 2002). Además, la microbiota mantiene la barrera epitelial, lo que impide a patógenos acceder al epitelio intestinal (Pilmis *et al.*, 2020). Por otro lado, influye en el metabolismo de ácidos biliares, aumentando los ácidos biliares secundarios que inhiben ciertos patógenos (Sorg y Sonenshein, 2008). Es el caso de *Clostridium scindens*, que participa en la conversión de ácidos biliares primarios a secundarios, ejerciendo RC contra *Clostridium difficile* (Woerther *et al.*, 2018).

En cuanto al papel de la microbiota intestinal en la nutrición, ésta sintetiza vitaminas involucradas en varios aspectos del metabolismo microbiano y del huésped, especialmente vitaminas del grupo B (B3, B5, B6, B12), vitamina K, biotina, y tetrahidrofolato. Por otra parte, también produce los ácidos grasos de cadena corta (SCFA), productos finales de la fermentación microbiana de los macronutrientes. Éstos, además de actuar como una fuente de energía para el huésped, regulan su sistema inmune. Por ejemplo, el butirato promueve la integridad de la barrera epitelial intestinal, lo que a su vez ayuda a limitar la exposición del sistema inmunitario de la mucosa a la microbiota luminal, previniendo así respuestas inflamatorias aberrantes (Kau *et al.*, 2011). También ejerce, en general, funciones antifúngicas (Nguyen *et al.*, 2011) y antibacterianas (Sun y O’Riordan, 2013) contra patógenos, además de favorecer la diferenciación y la proliferación de las células T-reguladoras (Sartor y Wu, 2017). La producción de otro SCFA, acetato, por *Bifidobacterium* promueve la reducción de la inflamación intestinal, así como previene la infección por el enteropatógeno *Escherichia coli* (0157: H7) (Fukuda *et al.*, 2011).

El hecho de que la microbiota participe en tantos procesos ha llevado a considerarla prácticamente un órgano más, necesario para el correcto funcionamiento del organismo (Bäckhed *et al.*, 2005). Por tanto, no es extraño que alteraciones o disrupciones de la misma (causadas por un estrés fuerte, como la terapia con antibióticos) hayan sido relacionadas con diversas enfermedades como infecciones, enfermedades autoinmunes, alérgicas, obesidad y aterosclerosis (Becattini *et al.*, 2016; Palleja *et al.*, 2018).

1.4. Los antibióticos beta-lactámicos y su efecto en la microbiota

Los antibióticos son sustancias químicas que matan a las bacterias (bactericidas) o inhiben su crecimiento (bacteriostáticos). Es por ello que la terapia con antibióticos de amplio espectro diezma la microbiota (afecta a la mayoría de las bacterias), provocando un estado de disbiosis en la misma; esto es, un desequilibrio en la composición taxonómica de la microbiota, que puede afectar negativamente a la salud. La disbiosis puede mantenerse a largo plazo, provocando el desarrollo y agravamiento de enfermedades. Una de las características de la disbiosis producida es la pérdida de diversidad de la microbiota, lo cual reduce la RC por patógenos. Además, el tratamiento antibiótico aumenta la probabilidad de desarrollar resistencia contra los antimicrobianos en las bacterias presentes en la microbiota (Ferrer *et al.*, 2017). La disrupción de la microbiota y la selección de bacterias resistentes puede ser muy diferente, no solo en función del antibiótico administrado, sino de otros factores como su espectro de actividad, la ruta de administración, la dosis, la duración del tratamiento (Iizumi *et al.*, 2017; Benabbou *et al.*, 2019), los mecanismos de resistencia y degradación de cada bacteria contra el antibiótico y su farmacocinética (Ferrer *et al.*, 2017).

Los antibióticos beta-lactámicos son antibióticos semisintéticos, generados a partir de las penicilinas naturales (producidas por hongos del género *Penicillium*) y que contienen un anillo beta-lactámico (Ferrer *et al.*, 2017). Actúan mediante la inhibición de la formación de la pared celular (al impedir el entrecruzamiento del peptidoglicano), lo cual tiene un efecto bactericida (Zhanell *et al.*, 2007). Para ello, se unen a unas proteínas, las penicillin-binding proteins (PBPs), muchas de las cuales son enzimas que sintetizan la pared celular (Sauvage *et al.*, 2008). Dentro de esta clase de antibióticos podemos encontrar diferentes tipos: penicilinas semisintéticas, cefalosporinas y carbapenémicos. Cada uno tiene un espectro de actividad más amplio que el anterior.

1.4.1. Efectos en la composición de la microbiota

Parece claro que el tratamiento con antibióticos da lugar a una disminución tanto cualitativa (diversidad de especies) como cuantitativa (densidad bacteriana) de la microbiota intestinal total. Los filos más afectados por todos los antibióticos en general son Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes y Proteobacteria (Ferrer *et al.*, 2017), ya que son los mayoritarios, disminuyendo en general la presencia de bacterias protectoras de la salud intestinal (p.e. *Bifidobacterium*, *Lactobacillaceae*). Por el contrario, suele aumentar la riqueza en ciertas especies consideradas patógenos oportunistas, mayoritariamente de la familia *Enterobacteriaceae* (*Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*) (Gibson *et al.*, 2016) y los géneros *Clostridium* y *Enterococcus* (Ubeda *et al.*, 2010; Benabbou *et al.*, 2019). Estos patógenos normalmente están en baja cantidad en el intestino, pero la eliminación de la microbiota deja un nicho vacío, que aprovechan para ocuparlo y crecer excesivamente (Ubeda *et al.*, 2010). También se ha observado un aumento significativo de *M. smithii*, probablemente debido a que las arqueas son intrínsecamente resistentes a los antibióticos (Ravi *et al.*, 2019). Los efectos de los diferentes tipos de beta-lactámicos sobre la composición de la microbiota se resumen en las Tablas 1.1 y 1.2.

Tabla 1.1. Efecto de los antibióticos beta-lactámicos sobre diferentes géneros y especies bacterianas.

Tipo de beta-lactámico	Nombre del antibiótico	Bacterias que incrementa	Bacterias que disminuye	Nivel taxonómico
Penicilinas	Amoxicilina-clavulánico	<i>Pseudomonas</i>	<i>Fusobacterium</i>	Género
		<i>Clostridium difficile</i>	<i>Clostridium</i>	Especie y género
			<i>Lactobacillus</i>	Género
			<i>Bifidobacterium</i>	Género
			<i>Bacteroides</i>	Género
	Ampicilina	<i>Klebsiella</i>		Género

		<i>Enterobacter</i>		Género	
		<i>Enterococcus faecium</i>		Especie	
	Piperacilina-tazobactámico		<i>Bacillus fragilis</i>	<i>Bifidobacterium</i>	Especie y género
			VRE*	<i>Lactobacillus</i>	Género
			<i>Enterobacter</i> resistentes	<i>Lactobacillus</i>	Género
			<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Clostridium</i>	Especie y género
				<i>Enterococcus</i>	Género
				<i>Blautia</i>	Género
		<i>Faecalibacterium</i>	Género		
Cefalosporinas	Cefotetano	VRE*		Género	
	Cefoxitina	VRE*		Género	
		<i>Clostridium difficile</i>			
	Ceftriaxona		<i>Enterococcus faecium</i>		Especie
			<i>Clostridium difficile</i>		Especie
	Cefotaxima	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Escherichia coli</i>	Especie	
	Ceftiofur	<i>Escherichia coli</i>		Especie	
	Cefepima		<i>Clostridium</i>	<i>Bifidobacterium</i>	Género
		<i>Clostridium difficile</i>		Especie	
		<i>Bacteroides</i>		Género	
Carbapenémicos	Ertapenem	<i>Enterococcus</i>		Género	
	Imipenem	<i>Enterococcus</i>	<i>Streptococcus</i>	Género	
	Lenapenem		<i>Streptococcus</i>	Género	
			<i>Veillonella</i>	Género	
	Meropenem		<i>Enterococcus</i>	<i>Streptococcus</i>	Género
			<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Anaerobios en general	Especie
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>		Especie		

*VRE: *Enterococo resistente a vancomicina*

Tabla 1.2. Efecto de los antibióticos beta-lactámicos sobre familias, clases y filos bacterianos.

Tipo de beta-lactámico	Nombre del antibiótico	Bacterias que incrementa	Bacterias que disminuye	Nivel taxonómico	
Penicilinas	Amoxicilina-clavulánico	Proteobacteria		Filo	
		<i>Enterobacteriaceae</i>		Familia	
		<i>Lachnospiraceae</i>		Familia	
	Piperacilina-tazobactámico			<i>Enterobacteriaceae</i>	Familia
				Bacteroidetes	Filo
				Negativicutes	Clase
			Fusobacteria	Filo	
Cefalosporinas	Ceftriaxona	<i>Enterobacteriaceae</i> resistentes	<i>Enterobacteriaceae</i>	Familia	
		Cocos aerobios	Anaerobios		
			Verrucomicrobia	Filo	
	Cefoperazona	Firmicutes	Bacteroidetes	Filo	
	Cefepima		<i>Enterobacteriaceae</i>	Familia	

Carbapenémicos	Ertapenem		<i>Enterobacteriaceae</i>	Familia
	Imipenem		<i>Enterobacteriaceae</i>	Familia
			Anaerobios	
	Meropenem		<i>Enterobacteriaceae</i>	Familia
			Anaerobios	

Las alteraciones en la microbiota se pueden mantener a lo largo del tiempo. En general, si la duración del tratamiento es a corto plazo, la microbiota vuelve a su estado original en unas pocas semanas tras la finalización del tratamiento antibiótico (Dethlefsen *et al.*, 2008; Woerther *et al.*, 2018). Sin embargo, un tratamiento a largo plazo ha sido relacionado con una disbiosis permanente (Pilmis *et al.*, 2020). La explicación a ello parece ser la resiliencia comunitaria, es decir, la capacidad de adaptación de la microbiota frente a un agente o ambiente perturbador, y su capacidad de retornar al estado inicial cuando finaliza esa perturbación; el hecho de que la perturbación no se mantenga durante mucho tiempo probablemente permite que la microbiota se adapte y vuelva a su estado inicial de forma más eficaz que si la perturbación es más duradera (MacPherson *et al.*, 2018). Un factor muy importante en el efecto que tiene el tratamiento antibiótico en la microbiota es la composición inicial de la misma. Cada individuo tiene una composición microbiana única, que responde de una manera diferente. Por ejemplo, ciertas especies de *Bacteroides* producen beta-lactamasas que protegen a las otras bacterias comensales de los beta-lactámicos (Woerther *et al.*, 2018). Otro factor que parece ser de gran importancia es la ruta de excreción del beta-lactámico, ya que aquellos excretados por vía renal tienen un impacto mucho menor en la microbiota que los excretados por vía biliar, pues la biodisponibilidad intestinal de estos es mayor, y tienen más contacto con la microbiota (Rice *et al.*, 2004).

Los tratamientos con un cóctel de antibióticos provocan una disrupción de la microbiota mucho mayor que la que provoca un antibiótico solo, porque afectan a más bacterias. Por ejemplo, se ha visto que el cóctel estreptomycin (aminoglucósido), colistina (polimixina) y ampicilina (beta-lactámico) produce una eliminación casi completa de la microbiota, reduciendo drásticamente los niveles de Bacteroidetes y Firmicutes y aumentando los de Proteobacteria y Actinobacteria (Candon *et al.*, 2015). Otro ejemplo es la combinación de ampicilina, sulbactam y cefazolina (beta-lactámicos), que afecta negativamente a los géneros *Faecalibacterium*, *Bifidobacterium* y *Blautia* (Ferrer *et al.*, 2017), muy importantes para la salud intestinal. Finalmente, el cóctel de meropenem, gentamicina y vancomicina da lugar a una reducción en las especies productoras de SCFA, en especial las productoras de butirato (Palleja *et al.*, 2018).

En cuanto a los efectos concretos de los principales beta-lactámicos, estos se detallan a continuación. Cabe destacar que todos los estudios que se indican se han realizado utilizando la técnica de secuenciación 16s rRNA o la técnica de cultivo bacteriano. Sin embargo, no existen estudios que combinen varias de las técnicas ómicas disponibles (i.e. metagenómica, metabolómica y proteómica), objetivo principal de este TFG.

a) Penicilinas

Las penicilinas fueron los primeros beta-lactámicos obtenidos. El hecho de que tengan un espectro menos amplio que las cefalosporinas y los carbapenémicos da lugar a que las alteraciones que provocan en la microbiota sean menos graves (MacPherson *et al.*, 2018). Dos de los beta-lactámicos más utilizados son la ampicilina y la amoxicilina. Se ha reportado que la amoxicilina suele provocar alteraciones significativas de larga duración en la microbiota (Kau *et al.*, 2011; Pilmis *et al.*, 2020). Disminuye las fusobacterias (*Fusobacterium*) (Ferrer *et al.*, 2017), y aumenta la cantidad de *Proteobacterias* (Iizumi *et al.*, 2017), en concreto de enterobacterias resistentes a la amoxicilina. Asimismo, promueve la colonización por *Pseudomonas*, *Candida albicans* y *Clostridium difficile* (patógenos oportunistas). La amoxicilina se suele usar junto con ácido clavulánico (inhibidor de beta-lactamasas) para superar ciertas resistencias; este tratamiento también provoca un aumento de las familias *Enterobacteriaceae* (especies con resistencia) y

Lachnospiraceae, así como a la disminución de clostridios, lactobacilos, bifidobacterias y bacteroides (Sullivan *et al.*, 2001; Palleja *et al.*, 2018). La ampicilina, por su parte, elimina parte de la microbiota y promueve la colonización intestinal por patógenos multirresistentes como *Klebsiella* y cepas de *Enterobacter* resistentes a ampicilina (Sullivan *et al.*, 2001), así como *Enterococcus faecium* resistente a ampicilina y a otros beta-lactámicos, lo que se ha relacionado con el hecho de que la absorción de la ampicilina es incompleta, y se va excretando a lo largo del tiempo (Benabbou *et al.*, 2019). Finalmente, el clavulanato de ticarcilina se ha asociado con una disminución significativa de la riqueza microbiana (Gibson *et al.*, 2016).

b) Cefalosporinas

Las cefalosporinas son beta-lactámicos semisintéticos derivados de la cefalosporina C (producida por el hongo *Cephalosporium acremonium*), cuyo espectro de actividad es más amplio que el de las penicilinas debido a que son más estables frente a beta-lactamasas (Kong *et al.*, 2010). Las cefalosporinas de primera generación son activas contra cocos Gram positivos y cocos anaerobios (excepto *Bacteroides fragilis*). Un ejemplo es la cefalozina, que se utiliza frecuentemente para la profilaxis quirúrgica; su excreción renal se ha relacionado con un bajo impacto en la microbiota intestinal (Rice *et al.*, 2004). Las cefalosporinas de segunda generación son activas frente a Gram negativos y *Klebsiella*, y además frente a anaerobios en el caso de las cefamicinas. Las cefamicinas (cuyo uso se había abandonado en favor de las cefalosporinas de espectro extendido) están reconsiderándose como opciones de tratamiento efectivo, ya que son resistentes a muchas beta-lactamasas de clase A de Ambler, especialmente beta-lactamasas de espectro extendido (ESBL). Se ha visto que la cefoxitina y el cefotetano promueven la colonización por el *E. faecium* vancomicina resistente (VRE) (Uttley *et al.*, 1998), un patógeno oportunista que frecuentemente causa infecciones en pacientes hospitalizados (Woerther *et al.*, 2018). También se ha visto que la cefoxitina aumenta el riesgo de infección por *C. difficile*. El cefotetano promueve la colonización intestinal murina por *E. faecium* debido a su actividad anti-enterocócica intrínseca deficiente y a que se concentra en el tracto gastrointestinal (Rice *et al.*, 2009). Las cefalosporinas de tercera generación tienen una mayor cobertura contra bacterias Gram negativas que las de segunda generación. Por ejemplo, la ceftriaxona afecta a *Verrucomicrobia* (Ferrer *et al.*, 2017) y promueve la colonización por *E. faecium* al igual que el cefotetano (Rice *et al.*, 2009). También ha sido relacionada con una supresión significativa de microorganismos anaerobios y de enterobacterias, un aumento de cocos aerobios y un crecimiento excesivo de *C. difficile*, *C. albicans* y enterobacterias resistentes (Foster *et al.*, 2019). Por otra parte, la cefotaxima disminuye significativamente la riqueza de especies microbianas, en concreto de *E. coli*, promoviendo un enriquecimiento en los genes de resistencia asociados a *Enterobacter cloacae* (Gibson *et al.*, 2016). La cefoperazona reduce la cantidad de Bacteroidetes y aumenta la de Firmicutes (Ubeda *et al.*, 2010). Asimismo, es interesante el ceftiofur, utilizado frecuentemente para tratar enfermedades en el ganado vacuno, ya que en estos animales da lugar a un aumento de los niveles de *E. coli* en el microbioma y las heces, así como a la selección de *E. coli* resistentes a antibióticos, que podrían transmitirse a los humanos en la cadena alimentaria (Foster *et al.*, 2019). Se ha reportado que el tratamiento combinado de ceftolozona-tazobactámico o de ceftazidima-avibactam tiene un impacto alto en la microbiota y la RC (Woerther *et al.*, 2018). Finalmente, las cefalosporinas de cuarta generación son más resistentes a la hidrólisis por beta-lactamasas de *Enterobacter*. La cefepima provoca una disminución en enterobacterias y bifidobacterias, así como un aumento en clostridios (con un crecimiento excesivo de *C. difficile*) y *Bacteroides* (Sullivan *et al.*, 2001). Es utilizada con frecuencia en pacientes inmunodeprimidos. Puesto que no se concentra significativamente en la bilis humana (excreción renal), su efecto sobre las bacterias anaerobias no es demasiado grave (Rice *et al.*, 2004).

c) Carbapenémicos

Los carbapenémicos son los que tienen el espectro de actividad más amplio de todos los beta-lactámicos (Baughman, 2009), gracias a su estructura: presentan una cadena lateral 6-hidroxietyl en la que el carbono 5 y el 6 (C5 y C6) están en posición trans, lo que les confiere estabilidad

frente a una gran variedad de beta-lactamasas. Además, en el anillo pentamérico presentan una sustitución del sulfuro por un carbono en la posición 1 (C1), y un enlace insaturado entre C2 y C3 (Jorgensen *et al.*, 2018; Zhanel *et al.*, 2018). El ertapenem se ha relacionado con alteraciones significativas en la composición del microbioma y en el resistoma (Pilmis *et al.*, 2020). En concreto, reduce los recuentos fecales de *Enterobacteriaceae* y anaerobios, aumentando los de enterococos y levaduras. La elevada disbiosis de la microbiota intestinal y la alteración de la RC pueden deberse a que se excreta parcialmente por la bilis (por lo que contacta más con la microbiota) (Woerther *et al.*, 2018). El imipenem, a pesar de tener un amplio espectro y una potente actividad anti-anaeróbica, parece tener un efecto entre leve y moderado sobre la RC y el riesgo de adquisición de patógenos multirresistentes. Esto probablemente se debe a su baja excreción biliar y biodisponibilidad intestinal. Sin embargo, sí reduce la abundancia en las heces de *Enterobacteriaceae*, estreptococos y bacterias anaerobias, aumentando la presencia de enterococos (Woerther *et al.*, 2018). Suele utilizarse en co-terapia con un inhibidor de beta-lactamasas, el relebactam, para aumentar la eficacia ante organismos resistentes a carbapenémicos (*Enterobacteriaceae* productores de ESBLs o KPCs como *Klebsiella pneumoniae*; y como *Pseudomonas aeruginosa*) (Zhanel *et al.* 2018). Además, siempre tiene que utilizarse junto con un inhibidor de DHP-I (dehidropeptidasa renal I, enzima localizada en el túbulo renal de mamíferos) como cilastatina, para evitar ser destruido (Zhanel *et al.*, 2007; Jorgensen *et al.*, 2018). El lenapenem disminuye los cocos aeróbicos G+, como *Streptococcus* o *Veillonella* (Sullivan *et al.*, 2001).

1.4.2. Efectos del meropenem y la piperacilina-tazobactámico

El meropenem y la piperacilina-tazobactámico son dos de los antibióticos beta-lactámicos más utilizados en el hospital de La Fe (Djukovic *et al.*, 2020), cuyos pacientes se han analizado en este estudio; por tanto, conocer los efectos que tienen sobre la microbiota es crucial para entender los resultados del mismo.

a) Meropenem

El meropenem es un carbapenémico que presenta un grupo metilo en el C1; este le confiere resistencia frente a la DHP-I, lo que hace innecesario el uso de un inhibidor de la misma. El meropenem tiene también una cadena lateral en el C2 de dimetilcarbamoilpirrolidinetio básico, que mejora su actividad contra bacterias Gram negativas (Jorgensen *et al.*, 2018; Zhanel *et al.*, 2018). Meropenem-vaborbactam se ha utilizado para tratar infecciones complicadas del tracto urinario (como pielonefritis aguda) y para tratar pacientes con neumonía nosocomial (Zhanel *et al.*, 2018) así como infecciones renales (Jorgensen *et al.*, 2018). Se ha visto que el meropenem disminuye la abundancia en las heces de *Enterobacteriaceae*, estreptococos y anaerobios, aumentando significativamente la cantidad de enterococos (Sullivan *et al.*, 2001). Esta modificación es transitoria y se revierte a las 2 semanas. En general, el tratamiento con meropenem se ha asociado a una pérdida de riqueza en especies microbianas. Morjaria *et al.* (2019) mostró que el uso de meropenem suprimía la práctica totalidad de la microbiota anaerobia obligada en pacientes que habían recibido un trasplante de células hematopoyéticas. Por su parte, Gibson *et al.* (2016) indicó que un paciente llegó a perder el 25% de las especies microbianas tras ser tratado con este antibiótico, mientras que la microbiota de los pacientes se enriquecía en *Staphylococcus epidermidis* o *K. pneumoniae* y en genes de resistencia a los antibióticos (ARGs) relacionados con ellos. Además, sus resultados indicaban que el tratamiento con meropenem incrementa la abundancia relativa de los ARG para fluoroquinolonas, macrólidos, tetracilinas, trimetoprima, y a otros beta-lactámicos. Esto es un efecto colateral en el resistoma: tras un tratamiento con antibióticos, hay un enriquecimiento en genes de resistencia intrínseca (tienen una función directa contra el tratamiento antibiótico), así como adquirida (genes contra antibióticos distintos a los del tratamiento). El meropenem se puede utilizar junto a un inhibidor de beta-lactamasas, el vaborbactam, ya que este presenta actividad frente a beta-lactamasas de clase A (ESBLs, KPCs) y de clase C (AmpC, una beta-lactamasa de espectro extendido), aunque

no es activo contra las clases B ni D. Así, se ha conseguido restaurar la actividad de este carbapenémico frente a varios genotipos de *Enterobacteriaceae* productoras de carbapenemasas (CPE) y *P. aeruginosa* (Pfaller *et al.*, 2018). Se ha visto que es altamente eficaz contra la mayoría de *Enterobacteriaceae* resistentes a carbapenémicos (especialmente contra productoras de KPC) (Stappenbeck *et al.*, 2002). La KPC es la carbapenemasa más común mundialmente, codificada por *K. pneumoniae* en el gen *BlaKPC* (que suele ir acompañado por otros genes que confieren resistencia a múltiples clases de antibióticos). Es una enzima de clase A capaz de hidrolizar todos los antibióticos beta-lactámicos disponibles actualmente (Jorgensen *et al.*, 2018), por tanto, que el vaborbactam la inhiba es muy importante para el tratamiento de los pacientes.

b) Piperacilina-tazobactámico

La piperacilina es una penicilina que pertenece a la clase de las ureidopenicilinas. Este beta-lactámico de amplio espectro suele utilizarse junto con tazobactámico (inhibidor de beta-lactamasas), para ampliar su actividad frente a patógenos Gram positivos y Gram negativos (Sullivan *et al.*, 2001), así como frente a *P. aeruginosa*. El tratamiento con piperacilina-tazobactámico ha sido asociado a una reducción de bifidobacterias, eubacterias, lactobacilos, clostridios, enterobacterias y enterococos. Asimismo, se ha indicado que genera un aumento notable en los recuentos de *Enterobacteriaceae* y *Bacillus fragilis* resistentes a los medicamentos. Por otra parte, se ha asociado a la colonización por patógenos nosocomiales como VRE, *Candida* y *Enterobacter* resistentes (productoras de beta-lactamasas) (Sullivan *et al.*, 2001; Woerther *et al.*, 2018). Esto puede deberse a la elevada capacidad de la piperacilina-tazobactámico para suprimir la microbiota anaerobia obligada (*Clostridia*, *Negativicutes* Bacteroidetes, Fusobacteria) encargada de ejercer RC. En un estudio, tras este tratamiento antibiótico se suprimieron más del 99% de las especies en pacientes que habían recibido un trasplante de células madre hematopoyéticas (Morjaria *et al.*, 2019). De hecho, la piperacilina-tazobactámico se ha asociado con un aumento de la mortalidad asociada a la enfermedad de injerto contra huésped (EICH) en estos pacientes, precisamente debido a la disrupción de la microbiota que causa (Shono *et al.*, 2016). Esto concuerda con los resultados de Pettigrew *et al.*, (2019), en los que la piperacilina-tazobactámico causó una grave disrupción de la microbiota en pacientes de UCI; en concreto, se asoció a una microbiota con muy baja abundancia de bacterias consideradas protectoras (*Faecalibacterium*, *Blautia* y *Lactobacillus*) y a la dominancia de *Enterococcus* (o de otros patógenos como *Enterobacteriaceae*), así como a un aumento en el riesgo de sufrir colonización por *P. aeruginosa* resistente a los carbapenémicos. Sin embargo, en otro estudio (Ravi *et al.*, 2019), la piperacilina-tazobactámico no se asoció significativamente a cambios en la microbiota. A su vez se han registrado resultados contradictorios, como que la piperacilina-tazobactámico inhibe la colonización por VRE si la exposición al tratamiento es baja, pero la promueve si es de larga duración (Rice *et al.*, 2004). Esto sugiere que la farmacocinética es clave en el impacto en la microbiota intestinal, por lo que es posible adaptar los regímenes de antibióticos para preservarla (Ravi *et al.*, 2019).

1.4.3. Efectos en el resistoma

El resistoma se define como el conjunto de todos los genes de resistencia a antimicrobianos (ARG) presentes en un microbioma dado. Aparece muy temprano en la vida, siendo detectable en bebés desde los 2 meses posteriores al nacimiento (Becattini *et al.*, 2016). Al exponer las comunidades microbianas a los antibióticos, éstas cambian su composición y evolucionan, optimizando y diseminando ARG. La microbiota intestinal funciona por tanto como un reservorio de ARG y propaga las resistencias a antimicrobianos, lo cual puede conllevar un problema serio para la salud humana (Palleja *et al.*, 2018). En concreto, la familia *Enterobacteriaceae* suele actuar como huésped y transferente de ARG (Pfaller *et al.*, 2018). Si bien el efecto sobre la composición de microbiota intestinal parece revertirse, ya que esta se recupera, la alteración del resistoma parece ser duradera, llegando a encontrar ARG durante meses o años tras la finalización de la terapia con antibióticos (Gasparrini *et al.*, 2016). Además, cuanto más temprano sea el

tratamiento antibiótico, mayor es el efecto que tiene sobre la microbiota y el resistoma. El uso exacerbado de los antibióticos ha favorecido la selección de bacterias resistentes y su diseminación, inutilizando gran parte de los antibióticos disponibles (Rice *et al.*, 2012). La adquisición de resistencia en las bacterias ocurre por la presión selectiva que ejercen los antibióticos, que da lugar, por un lado, a la selección de mutaciones aparecidas en el ADN que les confieren tolerancia ante los antimicrobianos (Becattini *et al.*, 2016), y, por otro lado, a la alteración de la microbiota intestinal anaerobia (responsable de ejercer RC) y, por tanto, al crecimiento y diseminación de bacterias multirresistentes a antibióticos (MDR) (Woerther *et al.*, 2018). La transmisión de los ARG ocurre por transferencia horizontal entre las bacterias (conjugación, transducción y transformación), pudiendo adquirirlos patógenos que amenazan nuestra salud (Becattini *et al.*, 2016). Estas transferencias son de plásmidos que contienen ARG, o de elementos cromosómicos móviles (Rice *et al.*, 2012; Gasparrini *et al.*, 2019). Además, los antibióticos también pueden promover la transferencia horizontal de ARG influyendo en las interacciones entre fagos y bacterias. Es el caso del meropenem y la vancomicina, que influyen en la composición de los virus (como sifovirus, herpes, poxvirus y papilomavirus, entre otros) (Ferrer *et al.*, 2017). Muchos de los ARG encontrados se asocian a cepas patógenas implicadas en infecciones nosocomiales, como *E. coli*, *E. cloacae* y *K. pneumoniae*. Además, algunos de estos confieren resistencia a múltiples antibióticos (tanto de una clase como de varias), o se seleccionan conjuntamente con otros genes de resistencia. Por ejemplo, los genes seleccionados por el tratamiento con piperacilina también confieren resistencia a otros antibióticos beta-lactámicos como amoxicilina y ampicilina (Gibson *et al.*, 2016).

1.4.4. Efectos en la colonización por patógenos

La pérdida de diversidad en la microbiota inducida por la terapia con antibióticos conduce generalmente a un aumento de la abundancia relativa de patógenos, mayoritariamente de *E. faecium*, *E. coli* y *C. albicans*, aunque también de otros como *K. pneumoniae*, los cuales son inherentemente resistentes a los antibióticos o poseen genes de resistencia a los antimicrobianos (Ravi *et al.*, 2019). Un claro ejemplo de ello es el estudio de Ubeda *et al.* (2010), donde observaron que, mientras que los ratones que no recibieron antibióticos eran resistentes a la colonización con VRE, los ratones tratados sufrieron una grave colonización que llegó a alcanzar frecuencias en las que VRE representaba el 95% de la microbiota total del íleon y ciego; resultados que se reprodujeron en los pacientes hospitalizados tratados con antibióticos. La explicación a esto puede ser que los antibióticos eliminan ciertas poblaciones bacterianas que suprimen la colonización de VRE, permitiendo por tanto su expansión. Estos resultados concuerdan con los resultados de Arias y Murray (2012), que indican que la exposición a ciertos antibióticos de amplio espectro, como cefalosporinas o piperacilina-tazobactámico, elimina las bacterias Gram negativas y positivas excepto *E. faecium*, facilitando la colonización de VRE. En concreto, observaron que el tratamiento con antibióticos de amplio espectro regulaba negativamente la expresión intestinal de RegIIIy (PAM que elimina bacterias Gram positivas), lo cual refuerza la hipótesis de que la microbiota intestinal protege frente a la colonización por patógenos oportunistas como VRE. Otros estudios han demostrado que el tratamiento con antibióticos que presentan actividad contra la microbiota anaerobia autóctona (que ejerce RC intestinal) promueve la colonización y/o el crecimiento excesivo de patógenos como *Enterobacteriaceae* MDR (*K. pneumoniae* productora de ESBLs, VRE) (Bhalla *et al.*, 2003; Huyen *et al.*, 2003). Así, antibióticos con una actividad elevada frente a la microbiota anaerobia como la clindamicina promueven la colonización intestinal en ratones y pacientes por *Enterobacteriaceae* resistentes, al contrario que los antibióticos con una baja actividad anti-anaeróbica como la cefepima. Hay que destacar que algunos antibióticos como piperacilina-tazobactámico, ceftriaxona y ceftazidima presentan a la vez actividad anti-anaeróbica y actividad frente a *Enterobacteriaceae* MDR, por lo que pueden inhibir la colonización por estos patógenos. Sin embargo, este efecto se pierde si los patógenos ya estaban bien establecidos en el intestino, si la dosis de inóculo (patógeno) es muy elevada, o si la cepa es particularmente resistente (Huyen *et al.*, 2003).

1.4.5. Efectos en la salud del individuo

Los efectos de las perturbaciones en la microbiota son duraderos y pueden tener múltiples consecuencias (Becattini *et al.*, 2016), especialmente si la disrupción de la misma es temprana. Esto se debe a que el periodo de adquisición de la microbiota coincide con el del desarrollo del sistema inmune (Gasparrini *et al.*, 2016; Gasparrini *et al.*, 2019). Puesto que ambos se influyen mutuamente, la disrupción de la microbiota en este periodo puede generar respuestas inmunes inapropiadas en el huésped. Así, el uso de antibióticos en la vida temprana se ha asociado con el desarrollo de alergias, asma, diabetes y obesidad (Iizumi *et al.*, 2017). Además, el tratamiento con antibióticos disminuye el grosor de la capa mucosa y la expresión de PAMs, predisponiendo a la infección (Becattini *et al.*, 2016). En cuanto a la diabetes, se ha demostrado en ratones que existe una relación entre ésta y la toma de antibióticos, aumentando su incidencia y reduciéndose el tiempo de su aparición en los ratones que recibían un cóctel de antibióticos de amplio espectro (estreptomycin, colistina y ampicilina) así como un único antibiótico (vancomicina) (Candon *et al.*, 2015). Por otra parte, existen numerosos estudios que correlacionan el uso de antibióticos con el aumento de peso y un mayor riesgo de padecer obesidad. De hecho, la penicilina se ha utilizado tradicionalmente en animales sanos jóvenes para promover su aumento de peso. La causa puede ser que la alteración del microbioma afecta a las rutas metabólicas, ya que el tratamiento con dosis bajas de penicilina aumenta los niveles de masa grasa y ácidos grasos de cadena corta (Iizumi *et al.*, 2017). Esto ha sido investigado mediante experimentos de trasplante de microbiota fecal (FMT) en ratones libres de gérmenes. Se ha visto que la microbiota intestinal de ratones con obesidad inducida por la dieta provoca un mayor aumento de la adiposidad en los ratones receptores del trasplante, en comparación al provocado por la microbiota de un donante que ha recibido una dieta saludable (Kau *et al.*, 2011).

1.5. Tratamientos para restaurar la microbiota

Las posibles estrategias para eliminar los efectos adversos de los antibióticos en la microbiota incluyen evitar el uso innecesario de los mismos y usar antibióticos más específicos y de espectro estrecho, así como el reemplazo de microorganismos mediante el trasplante de microbiota fecal (FMT) (Becattini *et al.*, 2016). Otra opción es el uso de prebióticos y probióticos (nutrientes y microorganismos vivos, respectivamente, que pueden generar cambios en la composición de la microbiota) (Delzenne *et al.*, 2011; Pilmis *et al.*, 2020). Por ejemplo, se ha utilizado un consorcio de bacterias comensales como probióticos para tratar infecciones por VRE. Este consorcio contenía una bacteria, *Blautia producta*, productora de un lantibiótico (un tipo de PAM que inhibe el crecimiento de VRE). El consorcio podía colonizar el intestino e inhibir el crecimiento de VRE pese a que este ya hubiera establecido una densidad de colonización elevada (Kim *et al.*, 2019). Por otro lado, se pueden restaurar las respuestas inmunes apropiadas mediante la administración de ligandos bacterianos (Becattini *et al.*, 2016) (eliminados tras el tratamiento antibiótico). Por ejemplo, se puede estimular los receptores epiteliales Toll-like de la mucosa para inducir el sistema inmune innato, disminuido tras la administración de antibióticos al ser eliminada la microbiota inductora. De esta manera se ha conseguido reducir la colonización e infección por patógenos MDR (Arias y Murray, 2012).

2. Objetivos

El objetivo principal de este estudio es analizar el efecto del tratamiento con antibióticos beta-lactámicos sobre la microbiota intestinal de pacientes con leucemia aguda. Para ello, se compara la microbiota inicial pre-tratamiento con la microbiota post-tratamiento. Por otro lado, como control, se analizan pares de muestras en las que no se recibió ningún tratamiento beta-lactámico. A su vez, para una comprensión más detallada del efecto de los beta-lactámicos sobre la microbiota intestinal, se realiza un análisis tanto de composición (i.e. 16S rRNA) como metabólico y proteómico, lo que nos permite conocer qué funciones bacterianas y metabolitos derivados de las mismas están siendo afectadas por el tratamiento antibiótico.

3. Métodos

Este trabajo contiene un glosario (anexo I, página 40) donde se han recogido algunos términos estadísticos, con el propósito de mejorar la comprensión del análisis estadístico llevado a cabo en este estudio.

3.1. Recogida de muestras

La obtención de muestras se hizo de acuerdo a lo indicado por Djukovic *et al.* (2020). Se recogieron muestras fecales de pacientes con leucemia aguda ingresados en el Departamento de Hematología del hospital La Fe (Valencia, España), que dieron su consentimiento informado a participar en el estudio. El estudio se realizó conforme a la Declaración de Helsinki, y el protocolo fue aprobado el 1 de julio de 2013 por el comité ético de investigación clínica (CEIC) de la Dirección General de Salud Pública y el Centro Superior de Investigación en Salud Pública. Las muestras fueron recogidas cada semana entre noviembre de 2013 y abril de 2015 (18 meses). Se obtuvieron un total de 802 muestras, pertenecientes a 133 pacientes (de media, unas 6 muestras por paciente). La mediana del número de veces que estos pacientes habían sido ingresados es de 3, la de la duración de la hospitalización es de 26 días, y la del tiempo total de seguimiento realizado a los pacientes es de 70 días. En cada hospitalización se recogieron al menos un par de muestras por paciente en un intervalo de una semana entre la recogida de la primera y la de la segunda. Tras aplicar los criterios de exclusión (descritos más abajo), únicamente se incluyeron 122 pares de muestras, 203 muestras en total (se ha de tener en cuenta que una misma muestra puede formar parte de dos pares de muestras obtenidos de manera consecutiva) pertenecientes a 31 pacientes distintos.

3.2. Tratamiento de los pacientes

Los pacientes con leucemia aguda fueron ingresados para recibir bien un tratamiento con quimioterapia, bien un trasplante. Además, los que padecían infecciones recibieron antibióticos para tratarlas. Los antibióticos más frecuentemente suministrados en el hospital de La Fe son ciprofloxacina, meropenem, piperacilina-tazobactámico, ampicilina y vancomicina. Todos los antibióticos fueron suministrados vía intravenosa excepto la ciprofloxacina que fue administrada vía oral. El meropenem y la piperacilina-tazobactámico, como se ha descrito en la introducción de este trabajo, son antibióticos beta-lactámicos que afectan a la microbiota intestinal. Por el contrario, la ampicilina (aminoglicósido) y la vancomicina (glicopéptido) no se considera que afecten a la microbiota, debido a que su excreción biliar es muy baja; por tanto, al administrarse por vía intravenosa, la mayor parte del antibiótico es excretado por vía renal, no alcanzando a la microbiota en cantidades suficientes para alterarla. Asimismo, todos los pacientes recibieron ciprofloxacina como tratamiento profiláctico inmediatamente tras su llegada al hospital. Su efecto no se tiene en cuenta en este estudio, ya que es común a todos los pacientes. Además, al ser administrado inmediatamente tras el ingreso en el hospital, no se pudieron obtener muestras antes de la administración de la ciprofloxacina, por lo que no se pudo analizar su posible efecto en la composición de la microbiota. Por tanto, este estudio se ha centrado en la alteración de la microbiota causada por el tratamiento con los dos beta-lactámicos descritos arriba (i.e. meropenem y piperacilina-tazobactámico).

3.3. Definición de los grupos de muestras analizados

El estudio realizado se ha centrado en analizar cambios en la microbiota en pares de muestras obtenidas consecutivamente en un mismo paciente en un mismo ingreso hospitalario. Los pares de muestras se dividieron en dos grupos. Por una parte, el grupo “no beta” o grupo control estaba formado por pares de muestras obtenidas de pacientes que no recibieron antibióticos beta-lactámicos durante la toma de muestras, ni la semana anterior a la toma de las muestras. Por otra

parte, se creó un grupo con muestras de pacientes tratados con beta-lactámicos (grupo “beta”), a los que se les administró uno de los antibióticos beta-lactámicos (meropenem –grupo “mero”- o piperacilina-tazobactámico –grupo “ptz”-). En este caso, la primera muestra del par fue obtenida previamente a la administración del antibiótico, mientras que la segunda muestra del par se obtuvo tras el inicio del tratamiento. Cabe destacar que, en todos los casos, la segunda muestra se obtuvo mientras el tratamiento con el antibiótico aún estaba en curso. En algunas ocasiones se analizó más de un par de muestras de un mismo paciente; cada par de muestras se incluyó en el grupo correspondiente, teniendo en cuenta los criterios descritos. Hay que destacar que se excluyeron del grupo beta aquellos pacientes a los que se les había suministrado algún antibiótico beta-lactámico la semana anterior a la toma de la primera muestra; esto se hizo para evitar que el efecto de este antibiótico influyese en los resultados obtenidos, pues podría enmascarar el efecto de los beta-lactámicos administrados entre el par de muestras analizado. Asimismo, se aseguró que los pacientes no hubiesen recibido ningún antibiótico antes de su llegada al hospital, para evitar también este sesgo que influyese en los resultados. Por último, las muestras analizadas provienen de un estudio previo de Djukovic *et al.* (2020) en las que únicamente se incluyeron muestras de pacientes que habían sido colonizados por enterobacterias multirresistentes. Por tanto, teniendo en cuenta todos los criterios de inclusión y exclusión, finalmente se analizaron 122 pares de muestras pertenecientes a 31 pacientes diferentes. A su vez, el grupo beta se divide en dos subgrupos que también se estudiaron: el grupo mero (pacientes que recibieron meropenem entre la primera y la segunda toma de muestra) y el grupo ptz (pacientes que recibieron piperacilina-tazobactámico entre la primera y la segunda toma de muestra). Con ello se busca estudiar el efecto en la microbiota de cada beta-lactámico individualmente, además de a nivel global.

3.4. Secuenciación y procesamiento de las secuencias

Las muestras fecales se secuencian de acuerdo a lo indicado por Djukovic *et al.* (2018). La región V3-V4 del gen 16S rRNA se amplificó y secuenció utilizando la plataforma MiSeq (Illumina). Las secuencias se procesaron con el software Mothur (Schloss *et al.*, 2009). Cada muestra se analizó identificando las OTUs (unidades taxonómicas operativas, por sus siglas en inglés). El estudio de OTUs es un método para caracterizar las comunidades microbianas a partir de datos de secuenciación del gen 16S rRNA. Este método agrupa las secuencias de ADN en OTUs, en base a una matriz de distancias (Chen *et al.*, 2013); es decir, agrupa las secuencias en función de cuánto se parecen entre sí. Para ello no se requiere información taxonómica previa, al contrario de lo que ocurre con los métodos basados en taxonomía. Estos agrupan las secuencias en función de cuánto se parecen a las secuencias presentes en bases de datos, lo cual dificulta clasificar secuencias nuevas (bacterias no registradas en la base de datos, o que no están bien caracterizadas, no son procesadas y por tanto no se tienen en cuenta en el análisis, perdiéndose información). En el estudio de Djukovic *et al.* (2018), las secuencias con una similitud (basada en la matriz de distancias) de más del 97% se agruparon en la misma OTU. Después, cada secuencia se clasificó taxonómicamente utilizando la base de datos Ribosomal Database Project (RDP) y el clasificador RDP, que utiliza un algoritmo bayesiano (Wang *et al.*, 2007). Muchas de las secuencias se pudieron clasificar hasta nivel de género. Todas aquellas secuencias que no se pudieron clasificar para un nivel taxonómico concreto aparecen como el nivel taxonómico anterior más “no clasificados”. Con estos datos, se genera una tabla de abundancia de OTUs y tablas de abundancia de taxones a los distintos niveles (filó, clase, orden, familia y género).

3.5. Análisis de la composición de la microbiota

Con el fin de analizar la composición de la microbiota intestinal, esta se estudia a nivel de filó (nivel más general de clasificación de bacterias) y a nivel de género. Para ello, se parte de la tabla de abundancia de taxones, generada a partir de los datos de secuenciación del gen de 16S rRNA, y la clasificación realizada con la base de datos RDP y el clasificador RDP (explicado en el apartado anterior). Además, se realizó también un análisis al nivel de OTUs (similar al nivel taxonómico de especie). Posteriormente, para designar las especies a las que pertenecen estas

OTUs, se realiza un alineamiento de las secuencias contra la base de datos de referencia del gen 16S rRNA bacteriano mediante la herramienta megaBLAST (NCBI). Para asignar la especie, se tuvo en cuenta que se pareciera en más de un 99% a exclusivamente una de las especies de la base de datos. Con ello se buscaba asegurar que la OTU era la misma secuencia que la mostrada en la base de datos. La única excepción fue *Kineothrix stercoris*, que se designó con un 98% de identidad; esto se debe a que los cinco primeros resultados del alineamiento pertenecen a esta especie, con un 98% de identidad, y con un score más elevado que el resto de especies indicadas (cuya identidad además es menor del 98%). La baja identidad puede deberse a que es una bacteria recientemente descubierta (Haas y Blanchard, 2017) y aún no está bien caracterizada.

3.6. Análisis metabólico

El análisis metabólico fue realizado por el servicio de Metatoul (INRAE), que realizó la identificación de los metabolitos mediante la técnica de resonancia magnética nuclear (RMN), y que devolvió la abundancia relativa de los metabolitos identificados.

3.7. Análisis metagenómico

El análisis metagenómico de identificación de los genes fue realizado con ayuda del servicio bioinformático de FISABIO-Salud Pública. La secuenciación se llevó a cabo usando la plataforma Illumina, obteniendo secuencias de 150 bp PE (paired-end). Estas secuencias se recortaron y filtraron por calidad desde su extremo 3' usando el software PrinSeq v.0.20.4 (Schmieder y Edwards, 2011). Posteriormente, las secuencias se ensamblaron en contigs usando MEGAHIT v.1.1.4 (Li *et al.*, 2015). Los ORFs se detectaron usando Prodigal v.2.6.3 (Hyatt *et al.*, 2010) y se anotaron usando HMMER v.3.2.1 (Finn *et al.*, 2011), con un e-valor $hmmsearch = 1e-3$, usando la base de datos KEGG (marzo de 2016) (Ogata *et al.*, 1999).

3.8. Análisis metaproteómico

El análisis proteómico se realizó de acuerdo a los métodos indicados por Rechenberger *et al.* (2019), por el grupo del Dr. Bernhard Kuster. Las proteínas fueron previamente identificadas en dicho estudio; su secuencia se obtuvo mediante la técnica de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS), y su identificación se realizó comparando las secuencias contra cuatro bases de datos diferentes: SWISS-PROT para bacterias, SWISS-PROT para humanos, IGC (the Integrated Genome Reference Catalog) y una base de datos de secuencias metagenómicas específica para cada muestra (generada a partir de los datos del experimento, ver apartado anterior). La anotación funcional se llevó a cabo utilizando el análisis para metaproteoma de Unipept (Gurdeep Singh *et al.*, 2019). No obstante, en el estudio de Rechenberger *et al.* (2019) las funciones génicas se clasificaron mediante términos GO, mientras que, en nuestro caso, las proteínas fueron categorizadas de acuerdo a la clasificación KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) (Ogata *et al.*, 1999) utilizando Unipept también.

3.9. Tratamiento de los datos

Todas las tablas de datos originales han sido normalizadas. La normalización de los datos es de tipo Total Sum Scaling (TSS); este tipo de normalización divide los counts de una OTU o taxón entre el total de counts, obteniendo su abundancia relativa (Badri *et al.*, 2018). Ello permite eliminar el sesgo técnico (diferente profundidad de secuenciación en las diferentes librerías), generando una homogeneización de la varianza de las variables, lo cual es óptimo para aplicar análisis de tipo multivariable (Ramette, 2007).

3.10. Análisis estadístico

Las diferencias en la microbiota a nivel global, entre los diferentes grupos de muestras, se visualizaron mediante un PCoA (Principal Coordinates Analysis). Este se obtiene a partir de una matriz de disimilitud entre las muestras, generada mediante el método de Bray Curtis usando el paquete de R Vegan. La significación del PCoA se midió usando el test PERMANOVA (también con el paquete de R Vegan) en base al método descrito por Anderson (2001). PERMANOVA proporciona un p valor, de tal forma que, si este es significativo, los grupos de muestras que se están comparando en el PCoA se consideran significativamente diferentes respecto a las variables que se estén analizando (ej. OTUs, metabolitos...). Asimismo, se calculó la riqueza (entendida como el número de secuencias –para un cierto nivel taxonómico- diferentes que hay presentes en la muestra) así como el índice de diversidad alfa (Shannon) usando el paquete de R Vegan. Las diferencias en la riqueza y en el índice de diversidad alfa entre los grupos de muestras se calcularon usando la función de R wilcox.test, que emplea la prueba de rangos con signo de Wilcoxon (Woolson, 2007). El test de Wilcoxon es un test no paramétrico (es decir, que no supone que los datos se ajustan a una distribución estadística concreta), recomendable en ecología debido a la gran variabilidad existente entre las muestras (Anderson, 2001). Además, permite realizar un análisis pareado, lo cual es necesario para comparar las muestras que están relacionadas entre sí (Wilcoxon, 1992); en este estudio, son las muestras pre- y post-tratamiento.

Por otra parte, para identificar diferencias taxonómicas específicas entre grupos de muestras se utilizó Ancom2 (o ANCOMII). Este test estadístico tiene en cuenta las limitaciones composicionales para reducir el ratio de falsos descubrimientos (False Discovery Rate), al tiempo que mantiene una elevada robustez estadística. Su uso está recomendado para el estudio del microbioma, ya que los datos en este tipo de análisis suelen presentar un exceso de ceros que impide su correcto análisis estadístico por otros métodos (Kaul *et al.*, 2017). Al igual que el test Wilcoxon, es un test que permite analizar muestras pareadas. En este estudio, Ancom2 se aplicó a diferentes niveles taxonómicos del microbioma (filo, género y OTUs), así como a funciones génicas (expresión proteica), para estudiar las diferencias de composición microbiana y proteica entre los grupos de muestras. Tras emplear el test Ancom2, se utilizó un segundo test (False Discovery Rate) con el fin de descartar falsos positivos debido a las múltiples hipótesis testadas (ej. múltiples bacterias analizadas); este test ha sido descrito por Benjamini y Hochberg (1995). Se estableció un umbral de 0,6 y 5 para los test Ancom2 y Wilcoxon; esto es, solo se tuvieron en cuenta para su análisis las bacterias presentes en al menos el 60% de las muestras, con una abundancia de al menos cinco veces el mínimo detectado. Su utilización se debe a la elevada variabilidad existente entre los pacientes, que implica que hay presentes muchas bacterias poco prevalentes, cuyas diferencias entre muestras no son significativas o puede que ni siquiera detectables (debido a su baja abundancia). Por tanto, teniendo en cuenta únicamente las bacterias más prevalentes y abundantes se reduce el número de hipótesis a testar y se facilita capacidad de detección de verdaderos positivos en el segundo test aplicado (False Discovery Rate). En el caso del análisis metabólico, sin embargo, este filtro no supone una diferencia en los resultados, debido a que los metabolitos están mucho más conservados entre los individuos que la composición de la microbiota; es decir, que la variabilidad metabólica entre pacientes es mucho menor que la de composición microbiana.

En cuanto al análisis estadístico realizado para detectar diferencias de composición metabólica entre los pares de muestras, se empleó el test de Wilcoxon, ya que fue el test sugerido por los expertos de Metatoul para este tipo de datos. Además, para detectar asociaciones significativas entre los metabolitos y la microbiota presentes en las heces de los pacientes, se realizó un análisis de correlación Spearman (un tipo de correlación no paramétrica) entre los metabolitos y las bacterias a nivel de género. Para evitar introducir sesgos en el análisis, la correlación se hizo de todos los metabolitos y todos los géneros; no se eligió qué metabolitos o géneros interesa estudiar, ya que se estaría forzando una relación que podría no ser real. Este análisis aporta por tanto un p valor ajustado para cada posible correlación. Posteriormente, se escogieron los resultados de las correlaciones de aquellos metabolitos de interés: significativamente alterados por el tratamiento

antibiótico y de aquellos géneros bacterianos más abundantes (que comprenden, entre otros, las bacterias alteradas significativamente por el tratamiento antibiótico). A partir de estos resultados se realizó un heatmap (o mapa de calor), con el fin de facilitar la interpretación de los datos a nivel visual. Además, para evaluar la magnitud del cambio producido entre la abundancia relativa tras el tratamiento con beta-lactámicos respecto a la abundancia relativa antes del tratamiento, se utilizó el \log_2FC (FC: fold change, por sus siglas en inglés); es el logaritmo en base 2 del cambio entre las abundancias relativas medias de una determinada variable (bacteria, metabolito).

Finalmente, el resultado de los test de contraste de hipótesis se considera significativo cuando el p-valor es menor de 0,05. Adicionalmente, se aplica una doble confirmación, de forma que también se calcula el p-valor ajustado (False Discovery Rate). Así, cuando se analizaron los grupos no beta y beta, aquellos resultados cuyo p-valor ajustado no es significativo ($p > 0,05$) no se tienen en cuenta para el estudio, pese a que su p-valor sí sea significativo ($p < 0,05$). En el caso de los grupos mero y ptz, puesto que el análisis supone una confirmación del resultado obtenido con el grupo beta, pero dividiendo dicho grupo en los pares de muestras que recibieron piperacilina-tazobactámico o meropenem, tan solo se tuvo en cuenta el p-valor sin ajustar.

4. Resultados y discusión de los resultados

4.1. Análisis de la composición de la microbiota

Este estudio se realizó a partir de muestras de heces tomadas de pacientes con leucemia aguda. En total, se incluyeron 122 pares de muestras (203 muestras en total) pertenecientes a 31 pacientes. Los pacientes se dividieron en dos grupos principales: grupo no beta (pacientes que no recibieron beta-lactámicos) y grupo beta (pacientes que sí recibieron beta-lactámicos); este último, a su vez, se dividió en dos subgrupos: mero (pacientes que recibieron meropenem) y ptz (pacientes que recibieron piperacilina-tazobactámico). Con el fin de evaluar cómo afectaban estos antibióticos a la microbiota, se recogieron muestras antes y después del inicio del tratamiento; cada par de muestras (pre-tratamiento y post-tratamiento) se clasificó en un grupo u otro en función del tratamiento recibido durante la toma de muestras. Aquellos pares de muestras donde se habían recibido beta-lactámicos la semana anterior fueron excluidos del estudio. Es importante señalar que, en algunas ocasiones, se analizaron varios pares de muestras de un mismo paciente; cada par se incluyó en el grupo correspondiente. Tanto las características de los pacientes como el número de pares de muestras que se incluyen en cada grupo están reflejadas en la Tabla 4.1.

Tabla 4.1. Descripción de los pacientes analizados y de las condiciones del estudio.

Grupo	Pares de muestras	Nº de pacientes	Media de edad	Sexo	Diagnóstico	Motivo de hospitalización
No beta (control)	80	22	53	64% M* 36% F*	86% AML* 14% ALL*	64% quimioterapia 23% trasplante 5% infección 9% EICH*
Beta	42	20	51	40% M* 60% F*	90% AML* 10% ALL*	65% quimioterapia 25% trasplante 10% infección
Mero	14	7	47	29% M* 71% F*	86% AML* 14% ALL*	14% quimioterapia 71% trasplante 14% infección
Ptz	24	11	53	45% M* 55% F*	91% AML* 9% ALL*	91% quimioterapia 9% infección

*M: masculino; F: femenino; AML: Leucemia mieloide aguda; ALL: Leucemia linfóide aguda; EICH: Enfermedad injerto contra huésped

Aunque el objetivo del estudio es comparar la microbiota pre-tratamiento con la post-tratamiento, para detectar cambios en la microbiota producidos por los beta-lactámicos, en primer lugar nos planteamos descartar que los distintos grupos de pares de muestras pudieran ya presentar una microbiota inicial diferente. Para evaluar esto, comparamos la microbiota de la primera muestra de cada par de los distintos grupos. Con este fin, se realizó un análisis estadístico (aplicando un PCoA, para ver diferencias generales, así como el test Ancom2, para estudiar diferencias a nivel particular de los diferentes taxones bacterianos). Se realizaron dos comparaciones: el grupo control frente al grupo tratado con beta-lactámicos, por un lado; y el grupo control frente a los grupos tratados con piperacilina-tazobactámico y meropenem, por otro (en este caso se comparan tres grupos de muestras diferentes entre sí). Los resultados indican que no existen diferencias significativas a nivel global (Figura 4.1), ni diferencias significativas en ninguno de los niveles taxonómicos analizados entre las muestras pre-tratamiento pertenecientes a grupos diferentes. Por tanto, la microbiota inicial de cada grupo es similar y no se parte de un sesgo previo que pueda dar lugar a resultados no debidos al tratamiento antibiótico, derivando en conclusiones erróneas.

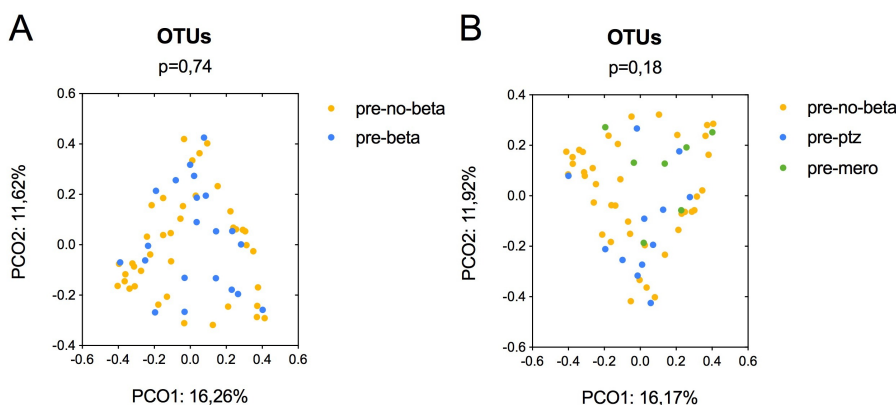


Figura 4.1. Estudio de las diferencias en la microbiota a nivel global antes del tratamiento con beta-lactámicos. Se generó un PCoA de las muestras pre-tratamiento a partir de una matriz de disimilitud obtenida por el método Bray Curtis. No se detectaron diferencias significativas entre los grupos ($p > 0,05$), por lo que no se parte de una microbiota diferente. A) PCoA del grupo control vs el grupo beta. B) PCoA del grupo control vs los subgrupos mero y ptz. Los colores representan los diferentes grupos estudiados (grupo no beta en amarillo, grupo beta en azul; grupos ptz y mero en azul y verde, respectivamente). Cada punto es una muestra.

Una vez comprobado que no existen diferencias iniciales entre los grupos de muestras, se procedió a estudiar las alteraciones en la microbiota causadas por el tratamiento antibiótico con beta-lactámicos. Primeramente, estudiamos si los antibióticos beta-lactámicos producían diferencias a nivel global en la microbiota. Para ello, se realizó un PCoA entre las muestras pre- y post-tratamiento, a partir de una matriz de disimilitud calculada mediante el método de Bray Curtis (Figura 4.2). Además, se aplicó el test PERMANOVA para estudiar si existían diferencias significativas entre ambos grupos de muestras. Como se aprecia en la Figura 4.2, a nivel global, no se detectaron diferencias significativas entre las muestras obtenidas antes y después del tratamiento (pre-beta, post-beta). A su vez, como era de esperar, no se observaron diferencias entre la primera muestra (pre-no-beta) y segunda muestra (post-no-beta) obtenidas de cada par de muestras en el grupo control. Aunque no se detectaron diferencias significativas a nivel general en la microbiota tras la administración de beta-lactámicos utilizando la distancia Bray-Curtis y el análisis PCoA, decidimos estudiar si existían diferencias significativas a nivel global en la diversidad y la riqueza de la microbiota en las muestras post-tratamiento con respecto a las muestras pre-tratamiento (Figura 4.3). La riqueza se mide con el nº de OTUs diferentes que hay en una muestra, mientras que la diversidad se mide con el índice de diversidad alfa Shannon, que tiene en cuenta el número de OTUs y la abundancia relativa de las mismas. Para el grupo tratado con beta-lactámicos, no se pudieron apreciar diferencias claras en la riqueza, aunque parece que esta tendía a disminuir. Sin embargo, se pudo observar que si existían diferencias a nivel global

en la diversidad microbiana; esta se ve disminuida tras el tratamiento con antibióticos. En cuanto al grupo control, no se observaron diferencias significativas a nivel de riqueza ni de diversidad, aunque de nuevo se detectó una tendencia a la disminución del número de OTUs en la segunda muestra obtenida del par de muestras analizado.

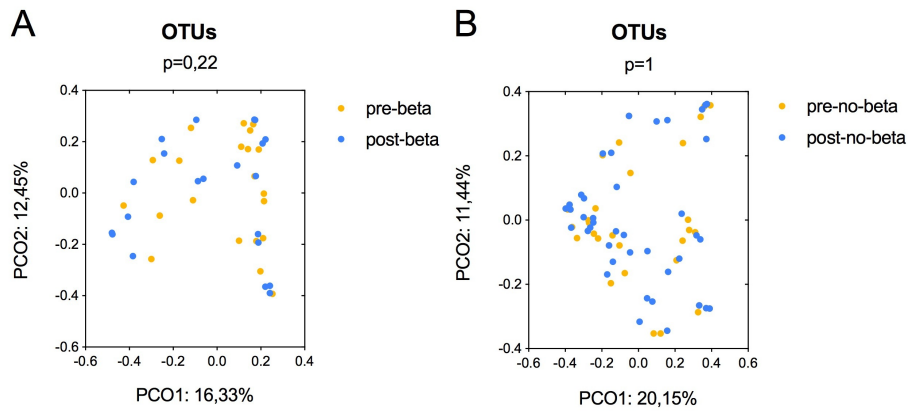


Figura 4.2. Estudio de las diferencias en la microbiota a nivel global tras el tratamiento con beta-lactámicos. Se generó un PCoA de las muestras pre- y post-tratamiento a partir de una matriz de disimilitud obtenida por el método Bray Curtis. No se detectaron diferencias significativas en ningún grupo ($p > 0,05$). A) PCoA del grupo de pacientes tratados con beta-lactámicos. B) PCoA del grupo control. Los colores representan los diferentes tiempos de cada par de muestras (pre en amarillo, post en azul). Cada punto es una muestra.

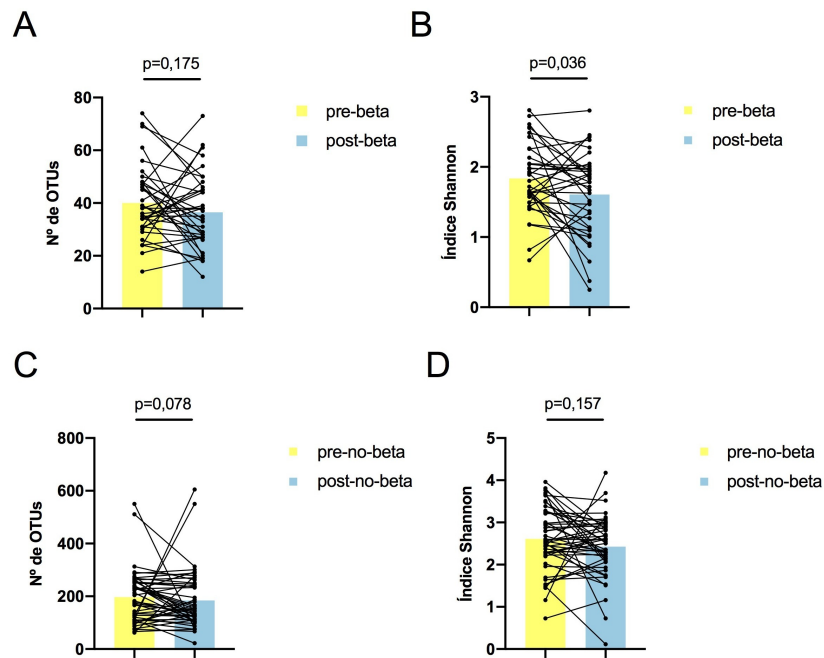


Figura 4.3. Análisis de la riqueza y la diversidad microbiana. A) Riqueza de las muestras del grupo tratado con beta-lactámicos. B) Diversidad de las muestras del grupo tratado con beta-lactámicos. C) Riqueza de las muestras del grupo control. D) Diversidad de las muestras del grupo control. Los colores representan las medias para cada tiempo (pre en amarillo, post en azul). Cada punto es una muestra. Las muestras pertenecientes al mismo par están unidas por líneas. Los p-valores obtenidos con la prueba Wilcoxon se indican para cada una de las comparaciones realizadas.

La disminución de la diversidad se ha asociado a patologías en el huésped, ya que genera un desequilibrio en la microbiota (Gasparrini *et al.*, 2016). Esto concuerda con los resultados obtenidos por otros grupos, que indican que el tratamiento con antibióticos que presentan

actividad contra microorganismos anaerobios, como son la piperacilina-tazobactámico y el meropenem, afectan a la microbiota intestinal disminuyendo su diversidad (Hayakawa *et al.*, 2011). Por ejemplo, el estudio de Rajagopala *et al.* (2016) observó que, en una cohorte de pacientes con ALL, la diversidad alfa se reducía significativamente tras el tratamiento con antibióticos que presentaban actividad anti-anaeróbica. Otros estudios, como el de Galloway-Peña *et al.* (2017) y el de Panda *et al.* (2014) muestran esta misma reducción significativa de la microbiota intestinal a causa del tratamiento con carbapenémicos (como el meropenem) o beta-lactámicos en general, respectivamente. Por el contrario, otros estudios no encontraron una relación significativa entre el tratamiento con antibióticos beta-lactámicos y la disminución de la diversidad alfa (Hakim *et al.*, 2018), sino que esta reducción se atribuyó a la quimioterapia en sí, que afecta negativamente a la microbiota. Sin embargo, en el estudio de Hakim *et al.* (2018) todos los pacientes recibieron antibióticos, por lo que no se puede asegurar que el efecto de los mismos no se esté viendo enmascarado por la quimioterapia. Tampoco se encontró una relación directa en el estudio de Bai *et al.* (2017), donde atribuyeron la disrupción de la microbiota, y la consiguiente pérdida de diversidad alfa, únicamente al estado que provoca la ALL en el organismo; no obstante, sí observaron una pérdida de diversidad en la microbiota de intestinal de niños sanos causada por el tratamiento con antibióticos. Por otra parte, si bien es cierto que el tratamiento con quimioterapia o la leucemia pueden estar afectando a la microbiota, en nuestro estudio estos factores afectan por igual a los dos grupos analizados (beta y no beta): los pacientes de ambos grupos reciben quimioterapia y están diagnosticados con AML o ALL (Tabla 4.1). Por tanto, la única diferencia importante entre ellos es si reciben o no tratamiento con beta-lactámicos, lo cual nos lleva a pensar que los efectos observados en la microbiota intestinal se deben, en efecto, al tratamiento con estos antibióticos. Además, el hecho de que el análisis de la microbiota de ambos grupos antes del tratamiento con beta-lactámicos revelase que esta no era significativamente diferente entre sí (Figura 4.1), ni tampoco a nivel de diversidad o riqueza bacteriana ($p > 0,05$), indica que la alteración de la microbiota se está evaluando únicamente en base a la administración, o no, de antibióticos beta-lactámicos; es decir, no se tiene un sesgo previo que pueda conducir a conclusiones equivocadas.

Puesto que a nivel global la diversidad microbiana se reduce de forma significativa tras el tratamiento con beta-lactámicos, se decidió evaluar en mayor profundidad las alteraciones producidas por el tratamiento beta-lactámico en grupos bacterianos concretos. Para ello, se estudiaron los cambios en la abundancia relativa en diferentes niveles taxonómicos. En primer lugar, se estudió la composición de la microbiota a nivel de filo. Como se puede observar, los resultados coinciden con la literatura relativa a este tema (Eckburg *et al.*, 2005), pues los filos habitualmente más abundantes en la microbiota humana (Bacteroidetes, Firmicutes, Proteobacteria y Actinobacteria) aparecen reflejados en la microbiota de los pacientes analizados (Figura 4.4). En conjunto, estos resultados reflejan un aumento de la relación Bacteroidetes/Firmicutes (ya que hay más proporción de Bacteroidetes que de Firmicutes en la microbiota), lo cual concuerda con los resultados de Panda *et al.* (2014) observados en pacientes tratados con beta-lactámicos. Por otra parte, la proporción de Proteobacteria en los pacientes es más elevada de lo normal, ya que este filo suele ser minoritario; esto indica que en general la microbiota de los pacientes se halla en estado de disbiosis (Shin *et al.*, 2015).

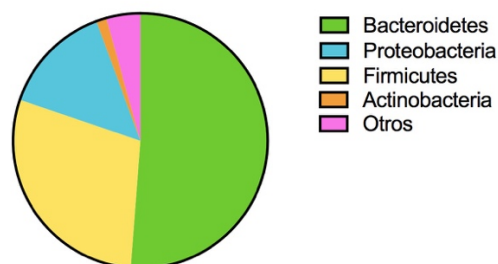


Figura 4.4. Abundancia relativa de los filos bacterianos presentes en la microbiota de los pacientes. Los datos reflejan la media de la abundancia relativa de cada filo obtenida de todas las muestras de pacientes. Los colores diferencian cada filo.

Posteriormente, aplicamos el test Ancom2 para conocer si, tras el tratamiento con beta-lactámicos, se detectan diferencias significativas en algún filo. Curiosamente, se detectó una reducción significativa en la abundancia relativa del filo Proteobacteria tras el tratamiento con antibióticos beta-lactámicos (Figura 4.5); la abundancia relativa media disminuye a aproximadamente la mitad. Por el contrario, en el grupo control no se apreciaron diferencias significativas en los niveles del filo Proteobacteria. Puesto que el tratamiento con el conjunto de beta-lactámicos tiene un efecto significativo en los niveles de Proteobacteria, se decidió analizar cuál es el antibiótico que ejerce mayor influencia en el cambio producido. Este, como puede observarse en la Figura 4.5, es la piperacilina-tazobactámico, ya que tras su administración se redujeron significativamente los niveles de Proteobacteria. En cambio, el meropenem tiene un impacto menor en la microbiota, pues, aunque sí muestra una tendencia a la reducción de este filo, no es significativa. Esta disminución indica que los antibióticos beta-lactámicos actuaron contra miembros del filo, lo cual concuerda con la literatura acerca de este tema (Jenq *et al.*, 2015; Bhalodi *et al.*, 2019).

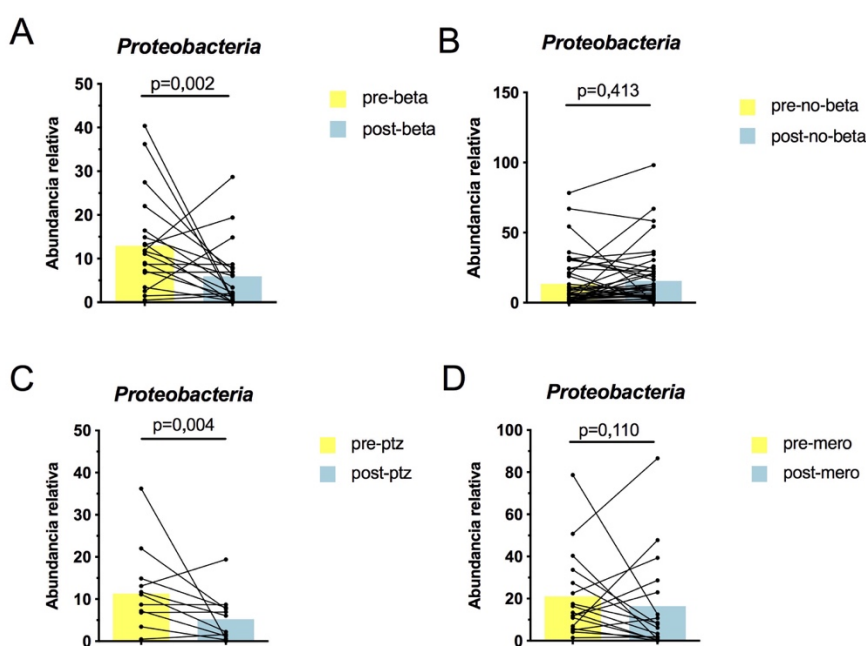


Figura 4.5. Comparación de la abundancia relativa del filo Proteobacteria en los diferentes grupos de muestras. Tanto la reducción a nivel global de Proteobacteria, debido al tratamiento con beta-lactámicos, como la causada por piperacilina-tazobactámico son significativas ($p < 0,05$). A) Abundancia relativa de Proteobacteria en los pacientes tratados con beta-lactámicos. B) Abundancia relativa de Proteobacteria en el grupo control. C) Abundancia relativa de Proteobacteria en los pacientes tratados únicamente con piperacilina-tazobactámico. D) Abundancia relativa de Proteobacteria en los pacientes tratados únicamente con meropenem. Los colores representan las medias para cada tiempo (pre en amarillo, post en azul). Cada punto es una muestra. Las muestras pertenecientes al mismo par están unidas por líneas. Los p-valores obtenidos con la prueba Ancom se indican para cada una de las comparaciones realizadas.

Una vez realizado el análisis a nivel de filo, se procedió a estudiar los efectos en la microbiota a nivel de género (el nivel taxonómico más avanzado que podemos alcanzar para la mayoría de secuencias utilizando la secuenciación masiva del 16s rRNA). De esta manera, se podría conocer en mayor profundidad cómo están afectando los antibióticos a la microbiota. Análogamente a lo realizado para los filios, primero se estudió qué géneros eran los más abundantes a nivel global en la microbiota (Figura 4.6). Los resultados confirmaron los obtenidos para la abundancia relativa de filios: se puede apreciar que los géneros más abundantes pertenecen al filo Bacteroidetes (el más prevalente), seguidos de los relativos al filo Firmicutes (el segundo más abundante) y Proteobacteria (el tercero más abundante). El único filo que no aparece representado a nivel de

género es Actinobacteria. Esto coincide con lo referido por otros estudios a este respecto (Weir *et al.*, 2013; Rajopala *et al.*, 2016). En especial, se sabe que Bacteroides es uno de los géneros más abundantes en la microbiota intestinal, al igual que varios de los géneros pertenecientes al cluster XIVa de *Clostridium* (Lloyd-Price *et al.*, 2016), definido por Collins *et al.* (1994). Diversos estudios han demostrado que este grupo es uno de los más prevalentes en el intestino humano (Hong *et al.*, 2011) así como en las heces (Harmsen *et al.*, 2002). Dentro de este cluster, se encuentran diversos miembros de la familia *Lachnospiraceae*.

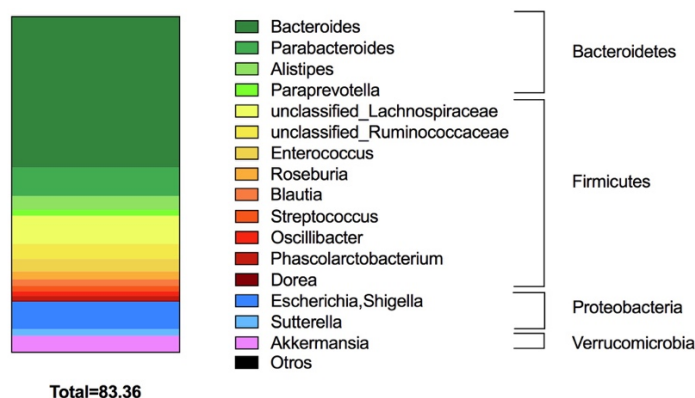


Figura 4.6. Abundancia relativa de los géneros más prevalentes en la microbiota de los pacientes. Los géneros están agrupados en función al filo al que pertenecen. Se han tenido en cuenta todas las muestras de pacientes, independientemente del grupo al que pertenecen. La gráfica muestra la abundancia relativa media de cada uno de los géneros representados. Se ha tomado como más abundantes todos aquellos géneros con una abundancia relativa superior a 1%. La única excepción fue el género Dorea, que se añadió porque está significativamente alterado tras la administración de antibióticos, tal y como se detalla en la Figura 4.7. Los colores representan los filos, de forma que todos los géneros pertenecientes al mismo filo están dentro de la misma gama de color (verde; amarillo-rojo; azul; rosa).

Más adelante, se analizó si alguno de estos géneros sufrió un cambio significativo tras el tratamiento con beta-lactámicos. Para ello, de nuevo se aplicó el análisis estadístico Ancom2 a las muestras (Figura 4.7). De esta manera, mientras que para el grupo control no se observó ninguna diferencia significativa, sí se pudo apreciar que los beta-lactámicos reducen de forma significativa varios géneros bacterianos, que estaban presentes entre los más abundantes: *Dorea*, *Blautia* y *Roseburia* (todos de la familia *Lachnospiraceae*), así como géneros que no pudieron ser clasificados pertenecientes a las familias *Lachnospiraceae* y *Ruminococcaceae*. La familia *Lachnospiraceae* está formada por bacterias anaerobias Gram positivas, y es muy abundante en el intestino humano adulto; sin embargo, se pierde rápidamente tras el tratamiento con antibióticos (David *et al.*, 2014). Una reducción de la abundancia de esta familia se ha relacionado con un impacto negativo en la salud, ya que contribuye a la homeostasis intestinal del huésped (Lopetuso *et al.*, 2013).

Después de comprobar que el tratamiento con beta-lactámicos produce una reducción en la abundancia relativa de varios géneros, se procedió a estudiar el efecto de los antibióticos por separado (Figura 4.7). El tratamiento con meropenem no causó alteraciones notables en la microbiota, ya que ningún género aparecía significativamente alterado para esta condición. Por su parte, la piperacilina-tazobactámico sí genera un cambio apreciable en algunos de los géneros indicados para los beta-lactámicos en su conjunto: *Dorea*, *Blautia* y un género no clasificado de la familia *Ruminococcaceae*. Estos tres géneros se reducen de forma significativa tras el tratamiento, en todos los casos disminuyendo su abundancia relativa media a aproximadamente la mitad. Estos resultados concuerdan con los de Rajopala *et al.* (2016), quienes observaron que los pacientes con ALL (tratados con quimioterapia y antibióticos) sufrieron una reducción de todos los géneros indicados arriba a excepción de *Dorea*. De forma similar, Galloway-Peña *et al.* (2017) muestra que los pacientes diagnosticados con AML sufren una reducción significativa del

género *Blautia* tras el tratamiento con piperacilina-tazobactámico o con carbapenémicos (como el meropenem). Por otra parte, el estudio de Panda *et al.* (2016), aunque no se realizó en pacientes con leucemia, muestra que el tratamiento con piperacilina-tazobactámico provoca una disminución de los niveles de todos los microorganismos indicados en nuestro estudio. El hecho de que estos géneros, que son muy abundantes en el intestino humano sano, sufran una reducción significativa de su abundancia relativa tras el tratamiento con beta-lactámicos, indica que este tratamiento está afectando negativamente a la salud de la microbiota intestinal. Ello, a su vez, estaría dañando la salud del huésped, pues *Blautia* y *Roseburia* se consideran géneros protectores de la misma, debido a sus propiedades anti-inflamatorias y a que aumentan la cantidad de células T-reguladoras del sistema inmune (Atarashi *et al.*, 2013; Jenq *et al.*, 2015).

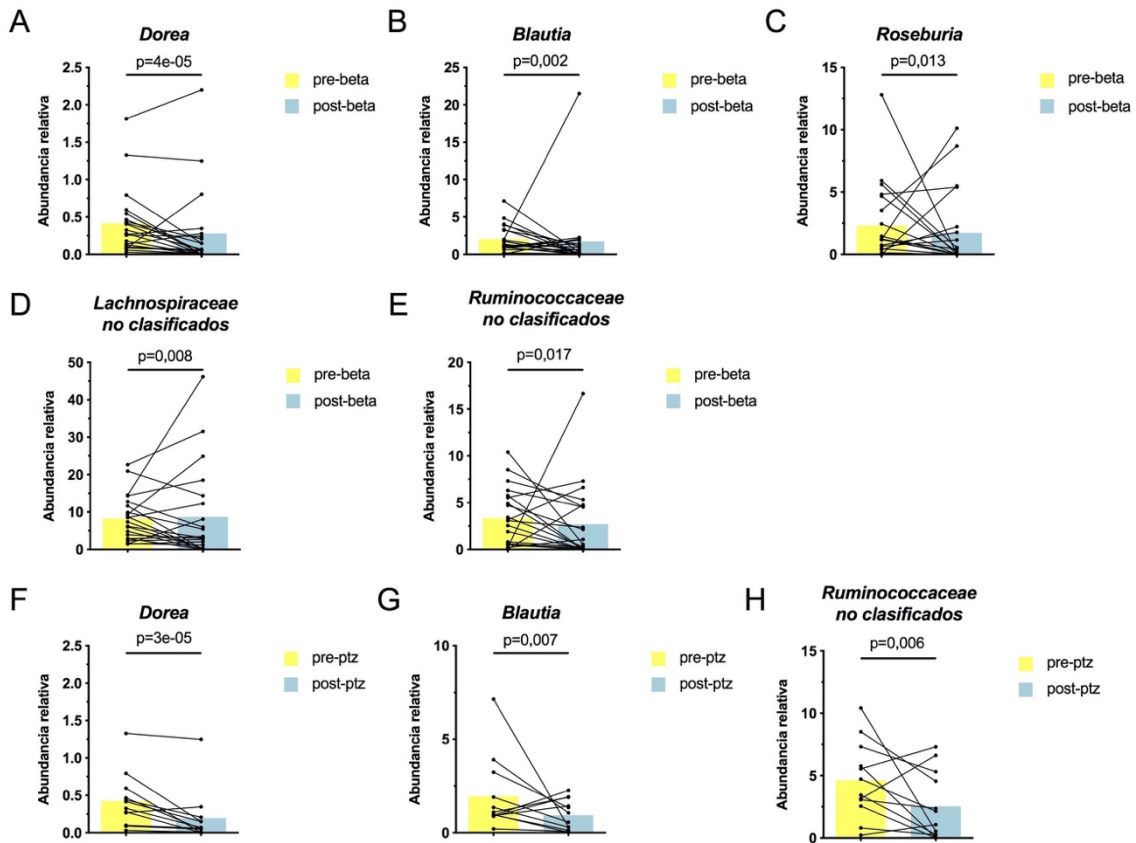


Figura 4.7. Abundancia relativa de los géneros bacterianos reducidos de forma significativa tras el tratamiento con beta-lactámicos en general (A-E) y piperacilina-tazobactámico (F-H). Los colores representan las medias para cada condición (pre-tratamiento en amarillo, post-tratamiento en azul). Cada punto es una muestra. Las muestras pertenecientes al mismo par están unidas por líneas. Los p-valores obtenidos con la prueba Ancom se indican para cada una de las comparaciones realizadas.

Es interesante indicar que los géneros significativamente disminuidos para los tratamientos antibióticos pertenecen al filo Firmicutes; no hay ningún género perteneciente a Proteobacteria cuyo cambio sea significativo, a pesar de que este es el filo que disminuyó significativamente tras la administración de beta-lactámicos. Por ello, se decidió estudiar si existía algún género de Proteobacteria que hubiera pasado el filtro de prevalencia (ver métodos) que se aplica para decidir si una bacteria es o no analizada por el test Ancom2. Este filtro de prevalencia se utiliza para no incluir en el análisis bacterias poco prevalentes que nos vayan a dificultar obtener un p-valor ajustado significativo. En general, se observó que casi ningún género de Proteobacteria supera el umbral, y los que sí que lo superan no sufren un cambio significativo. Sin embargo, para el grupo beta se observó una tendencia general a disminuir (tanto a nivel de beta-lactámicos en conjunto como a nivel de cada antibiótico por individual), lo cual concuerda con los resultados obtenidos a nivel de filo. Además, se pudo observar que en el grupo control, los géneros pertenecientes a

Proteobacteria muestran en general una tendencia a aumentar su abundancia relativa (aunque no de manera significativa). Esto, a su vez, refuerza los resultados que indican que el tratamiento con beta-lactámicos reduce la abundancia de Proteobacteria, pues en su ausencia (grupo control), esta se ve incrementada. Las tendencias de cada grupo a cambiar su abundancia relativa tras el tratamiento pueden observarse en la Tabla 4.2; estas se calculan con el log₂FC.

Tabla 4.2. Tendencia de los géneros pertenecientes al filo Proteobacteria a aumentar o disminuir tras el tratamiento con beta-lactámicos y en el grupo control.

Grupo	Género alterado	Log ₂ FC *	Tendencia
No beta (control)	<i>Enterobacteriaceae</i> no clasificados	0,20	Aumenta
	<i>Escherichia/Shigella</i>	0,35	Aumenta
	<i>Desulfovibrionaceae</i> no clasificados	-0,42	Disminuye
Beta	<i>Escherichia/Shigella</i>	-3,35	Disminuye
	<i>Desulfovibrio</i>	-0,24	Disminuye
	<i>Desulfovibrionaceae</i> no clasificados	-0,94	Disminuye
	<i>Sutterella</i>	-0,19	Disminuye
Ptz	<i>Escherichia/Shigella</i>	-2,19	Disminuye
	<i>Desulfovibrio</i>	-2,23	Disminuye
	<i>Desulfovibrionaceae</i> no clasificados	-0,88	Disminuye
	<i>Parasutterella</i>	-1,37	Disminuye
Mero	<i>Escherichia/Shigella</i>	-4,19	Disminuye
	<i>Desulfovibrionaceae</i> no clasificados	-1,02	Disminuye
	<i>Sutterella</i>	0,25	Aumenta

* La tendencia de cambio en la abundancia relativa de cada género se evalúa calculando el log₂FC. Un log₂FC negativo indica que la abundancia relativa media post-tratamiento disminuye con respecto a la abundancia relativa media pre-tratamiento, y viceversa, si el log₂FC es positivo, implica un aumento en la abundancia relativa media tras el tratamiento.

Conocidos los géneros que están alterados significativamente por el tratamiento con beta-lactámicos, se estudiaron cambios en la microbiota al nivel de OTUs. Los resultados del análisis estadístico demostraron que hay cuatro OTUs que presentan una abundancia relativa significativamente disminuida tras el tratamiento con los beta-lactámicos: Otu000025, Otu000032, Otu000047 y Otu000078 (Ancom2, p < 0,048; Tabla 4.3). Sin embargo, cuando se analizaron los dos antibióticos por separado, ninguno de ellos disminuyó significativamente las abundancias de estas OTUs (Tabla 4.3). Así pues, se estudió la tendencia a disminuir o aumentar de las OTUs para cada antibiótico por separado, con el fin de conocer si siguen la misma tendencia que los beta-lactámicos en su conjunto. Como se puede observar en la Tabla 4.3, no todas las OTUs siguen la misma tendencia; únicamente la Otu000078 sigue la tendencia general para ambos beta-lactámicos. La Otu000032 y la Otu000047 siguen la tendencia global solamente para el tratamiento con meropenem, mientras que la Otu000025 la sigue para el tratamiento con piperacilina-tazobactámico.

Tabla 4.3. Comparación de la tendencia de las OTUs a aumentar o disminuir tras el tratamiento con beta-lactámicos.

OTU	Incremento en beta	Incremento en ptz	Misma tendencia que beta *	Incremento en mero	Misma tendencia que beta
Otu000025	-0,5	-0,1	Sí	+0,3	No
Otu000032	+0,2	-0,6	No	+2,2	Sí
Otu000047	-0,8	+0,02	No	-6,41	Sí
Otu000078	-0,3	-0,05	Sí	-0,5	Sí

*Se indica si el cambio producido por ptz (piperacilina/tazobactámico) o mero (meropenem) sigue la misma tendencia que cuando se analizan el efecto de los beta-lactámicos en conjunto.

Una vez se conocen las OTUs significativamente alteradas, se realizó un BLAST de sus secuencias para saber a qué especies pertenecen. Con ello se busca comprobar si las OTUs coinciden con los géneros significativamente alterados por el tratamiento con beta-lactámicos. Asimismo, se quería descubrir las especies alteradas para profundizar en el conocimiento de la microbiota afectada por los antibióticos, así como para clasificar los géneros que no han sido identificados en el análisis de géneros alterados. Para ello, se realizó un BLAST contra la base de datos de secuencias del gen 16S rRNA bacteriano de referencia (NCBI). El resultado se indica en la Tabla 4.4. Como era de esperar, las OTUs coinciden con algunos géneros bacterianos significativamente alterados (*Blautia* y *Roseburia*). Además, se consiguió identificar un género adicional perteneciente a la familia *Lachnospiraceae*: *Kineothrix*. Estos resultados coinciden con los de Kaysen *et al.* (2017) quien indicó que las OTUs reducidas tras el trasplante alogénico de células madre a pacientes con leucemia pertenecían a los géneros *Blautia* y *Roseburia*, entre otros. *Blautia luti* es una de las especies más detectadas en las heces humanas (Touyama *et al.*, 2015). Por su parte, *Roseburia* se encuentra entre los microorganismos más abundantes del intestino grueso (Hatzioanou *et al.*, 2013); este género está compuesto por cinco especies, entre ellas *Roseburia faecis* (Tamanai-Shacoori *et al.*, 2017), disminuida significativamente en nuestro estudio. Tras averiguar a qué especies pertenecen las OTUs significativamente reducidas por el tratamiento con beta-lactámicos, se representaron los datos de su abundancia relativa (Figura 4.8).

Tabla 4.4. Especies correspondientes a las OTUs disminuidas significativamente tras la administración de beta-lactámicos.

OTU	Especie*
Otu000025	<i>Roseburia faecis</i>
Otu000032	<i>Blautia caecimuris</i>
Otu000047	<i>Kineothrix stercoris</i>
Otu000078	<i>Blautia luti</i>

*Las especies se obtuvieron realizando un BLAST de las secuencias nucleotídicas de los OTUs, provenientes de la secuenciación de la región V3-V4 del gen 16S rRNA, contra la base de datos de secuencias del gen 16S rRNA de referencia. Se escogieron especies cuya identidad fuese de más del 99%, a excepción de *Kineothrix* (ver métodos). Todas las especies pertenecen a los géneros significativamente disminuidos por el tratamiento con beta-lactámicos.

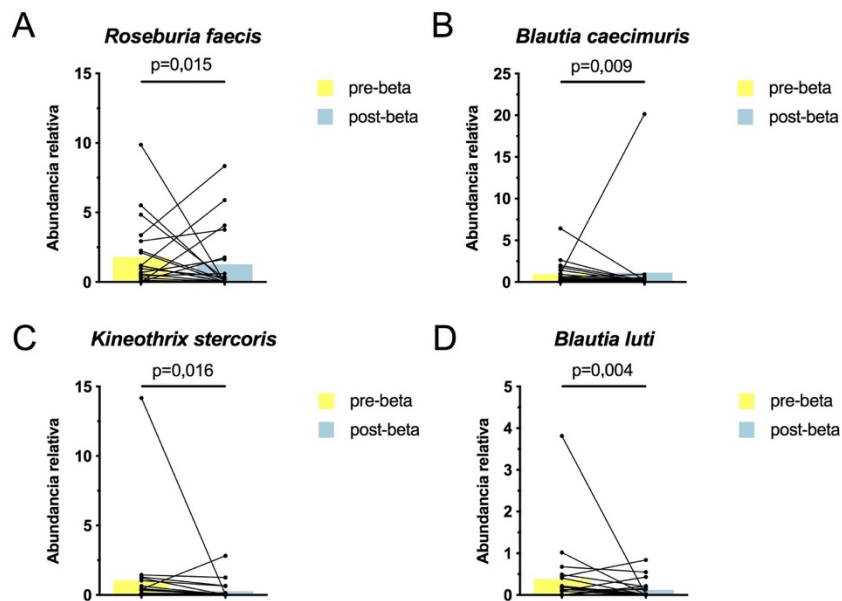


Figura 4.8. Abundancia relativa de las especies significativamente alteradas tras el tratamiento con beta-lactámicos. Estas especies se obtienen tras el alineamiento de las secuencias de OTUs contra la base de datos de 16S rRNA de referencia, utilizando la herramienta BLAST. Se puede observar que todas las especies sufren una disminución de

su abundancia relativa, lo cual concuerda con la reducción de los niveles de géneros bacterianos que se ha visto en los análisis anteriores. Los colores representan las medias para cada condición (pre-tratamiento en amarillo, post-tratamiento en azul). Los puntos representan la abundancia relativa en cada muestra. Las muestras pertenecientes al mismo par están unidas por líneas. Los p-valores obtenidos con la prueba Ancom se indican para cada una de las comparaciones realizadas.

4.2. Análisis metabolómico

Tras analizar la abundancia de los taxones bacterianos, se realizó un estudio con datos de metabolómica. El objetivo era comprobar el efecto del tratamiento antibiótico en metabolitos derivados de la actividad de la microbiota. Asimismo, se intentó relacionar los datos genómicos (16S rRNA) con los datos metabolómicos, para conocer si alguna de las bacterias alteradas por el tratamiento antibiótico era la causa de la alteración de algún metabolito. Así, análogamente a lo realizado para las OTUs en el estudio de la composición microbiana, se comprobó que no existían diferencias a nivel global entre las muestras pre-tratamiento (test PERMANOVA, $p > 0,05$). Por tanto, no se parte de un sesgo que pueda llevar a conclusiones equivocadas sobre el efecto de los antibióticos beta-lactámicos en el metaboloma. Después, se estudiaron las diferencias a nivel global en el perfil metabólico de las muestras post-tratamiento respecto de las muestras pre-tratamiento, con el fin de saber si el tratamiento antibiótico había provocado cambios significativos en este perfil. Se estudió el grupo tratado con beta-lactámicos y el grupo control. Para ello, se generó un PCoA aplicando el método de BrayCurtis a la matriz de disimilitud generada para las muestras pre- y post-tratamiento (Figura 4.9). Se puede observar que, a diferencia de lo que ocurre para el grupo control, las muestras que han recibido el tratamiento con antibióticos beta-lactámicos presentan diferencias significativas a nivel global de los metabolitos presentes.

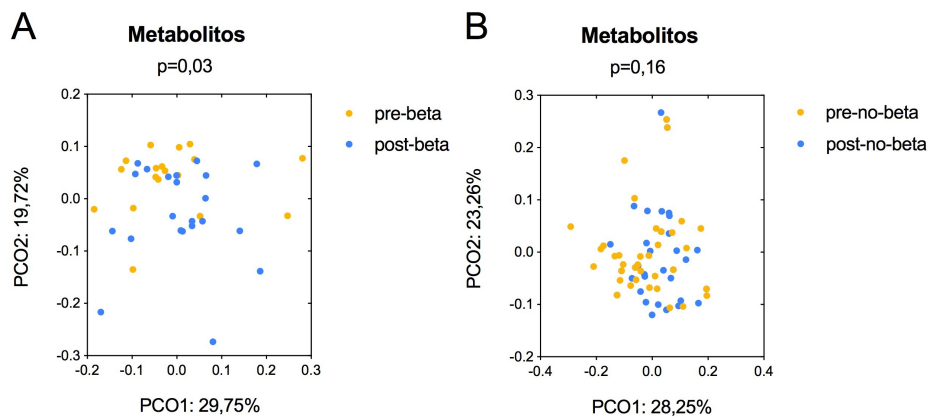


Figura 4.9. Estudio de las diferencias en los datos metabolómicos a nivel global tras el tratamiento con beta-lactámicos. Se generó un PCoA de las muestras pre- y post-tratamiento a partir de una matriz de disimilitud obtenida por el método Bray Curtis. Las diferencias para el grupo tratado con beta-lactámicos son significativas ($p < 0,05$), al contrario que para el grupo control. A) PCoA del grupo de pacientes que recibió tratamiento con beta-lactámicos. B) PCoA del grupo control. Los colores representan los diferentes tiempos en los pares de muestras tomadas (pre en amarillo, post en azul). Cada punto es una muestra.

El hecho de que existan diferencias significativas a nivel global en los metabolitos presentes en el intestino de los pacientes sugiere que la abundancia de algunos de ellos debe modificarse tras el tratamiento. Por tanto, se realizó un análisis de la abundancia relativa de cada uno de los metabolitos identificados (Figura 4.10). Los resultados obtenidos indican que hay cuatro metabolitos significativamente alterados tras el tratamiento con beta-lactámicos (test Wilcoxon, $p < 0,05$): ácido propiónico y ácido isovalérico (ácidos grasos de cadena corta; SCFAs por sus

siglas en inglés), ácido succínico (ácido orgánico) e isoleucina (aminoácido). Todos ellos sufren una reducción de sus niveles a excepción del ácido succínico, que aumenta tras el tratamiento. Después de conocer el efecto a nivel global del tratamiento con beta-lactámicos, se estudia a mayor profundidad cada antibiótico, con el fin de averiguar si provocan el mismo resultado que el tratamiento conjunto. Se realizó un análisis estadístico de las muestras tratadas con piperacilina-tazobactámico (Figura 4.10); este indica que hay dos SCFAs cuya abundancia se ve alterada por el tratamiento antibiótico: ácido isovalérico y ácido acético, los cuales sufren una reducción significativa de sus niveles tras el tratamiento. Hay que destacar que el ácido acético (que también es un SCFA), si bien no presenta una reducción significativa para el tratamiento con beta-lactámicos ($p = 0,07$), sí tiene una tendencia global a disminuir ($\log_2FC = -0,36$). De igual manera, el ácido succínico, el propiónico y la isoleucina mantienen para el grupo ptz la misma tendencia que para el grupo beta: el primero aumenta tras el tratamiento con piperacilina-tazobactámico ($\log_2FC = 0,96$) y los otros dos disminuyen ($\log_2FC = -0,37$ y $\log_2FC = -0,27$ respectivamente). Por su parte, el tratamiento con meropenem no aportó resultados significativos. Sin embargo, es importante añadir que los metabolitos indicados en la Figura 4.10 siguen la misma tendencia global a disminuir o aumentar tras el tratamiento con meropenem (ácido propiónico, $\log_2FC = -0,73$; ácido isovalérico, $\log_2FC = -0,24$). Por el contrario, el ácido acético incrementa su abundancia relativa tras el tratamiento con meropenem ($\log_2FC = 0,08$), lo cual podría explicar por qué este metabolito no es significativo para el tratamiento con beta-lactámicos en conjunto (la piperacilina-tazobactámico provoca su disminución, al contrario que el meropenem).

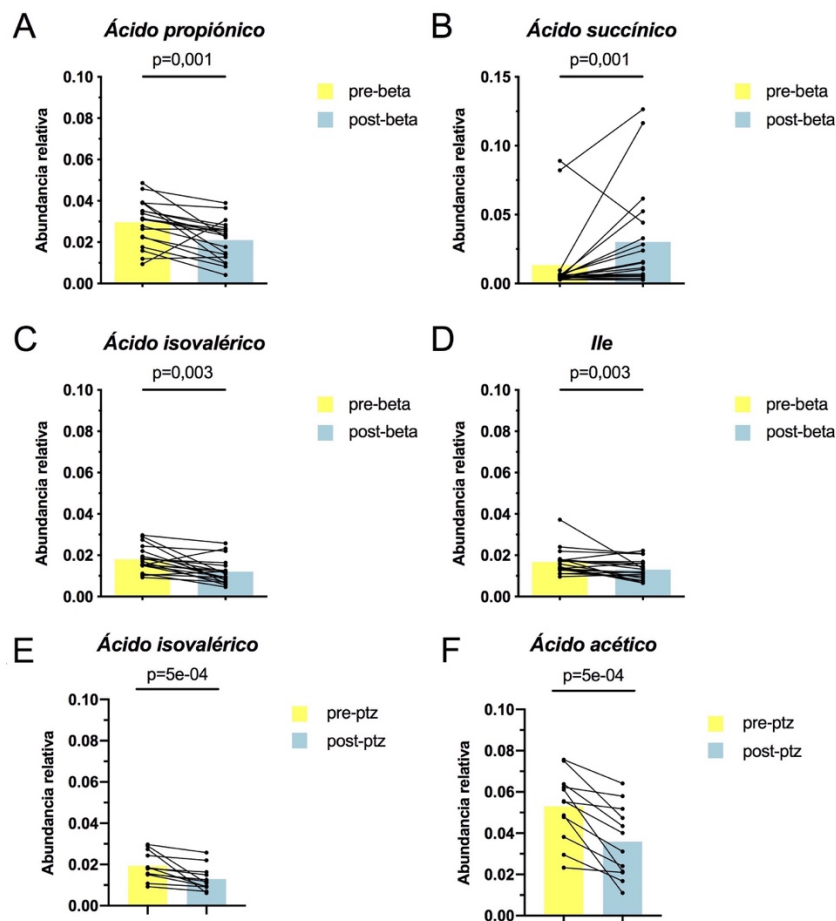


Figura 4.10. Abundancia relativa de los metabolitos significativamente alterados tras el tratamiento con beta-lactámicos (A-D) y piperacilina-tazobactámico (E, F). El único metabolito en el que coinciden ambos grupos es el ácido isovalérico; sin embargo, el resto de metabolitos siguen la misma tendencia para ambos grupos, aunque no sea significativa. Como el meropenem no aportó resultados significativos, no se muestra en la gráfica. Los colores representan las medias para cada condición (pre-tratamiento en amarillo, post-

tratamiento en azul). Los puntos representan la abundancia relativa en cada muestra. Las muestras pertenecientes al mismo par están unidas por líneas. Los p-valores obtenidos con la prueba Wilcoxon se indican para cada una de las comparaciones realizadas.

*Ile: isoleucina

Una vez comprobado que el tratamiento con antibióticos beta-lactámicos afecta a metabolitos derivados de la actividad bacteriana, se realizó una correlación entre todos los metabolitos y géneros bacterianos. El objetivo era estudiar si existía alguna relación entre la alteración bacteriana y la alteración en la producción de metabolitos. En cuanto al resultado de la correlación, se escogieron los resultados de correlación entre los géneros más abundantes (indicados en la Figura 4.6) y los metabolitos cuya abundancia cambiaba con el tratamiento antibiótico (indicados en la Figura 4.10). Las correlaciones significativas obtenidas se muestran en un heatmap (Figura 4.11). En rojo se muestran correlaciones positivas y en azul correlaciones negativas, lo que nos permite ver fácilmente qué bacterias correlacionan con qué metabolitos. Como se puede observar en la gráfica, existe una correlación positiva entre *Dorea* y la producción de isovalérico, acético e isoleucina; por tanto, es lógico que la disminución de este género, causada por el tratamiento beta-lactámico, provoque a su vez una disminución en los niveles de estos metabolitos, pues disminuye su producción. Lo mismo ocurre para el resto de géneros significativamente reducidos: *Blautia*, *Roseburia* (que además es la única que se correlaciona positivamente con el ácido propiónico) y *Lachnospiraceae* y *Ruminococcaceae* no clasificados. Todos ellos correlacionan positivamente con los ácidos grasos de cadena corta y el aminoácido isoleucina, lo cual es coherente con la disminución patente de ambos (géneros y metabolitos) tras el tratamiento con antibióticos beta-lactámicos. El coeficiente de correlación Spearman de *Dorea*, *Blautia* y *Roseburia*, para todos los SCFAs, adoptó valores entre 0,3 y 0,44, con un $p < 1e-05$. Por otra parte, el ácido succínico mantiene una correlación negativa con los géneros bacterianos de interés; esto explica que sea el único metabolito cuyos niveles aumentan significativamente tras el tratamiento antibiótico. En este caso, el coeficiente de correlación Spearman de *Dorea*, *Blautia* y *Roseburia* adoptó valores entre -0,2 y -0,25, con un $p < 0,007$. Se puede apreciar que los géneros disminuidos significativamente por el tratamiento con beta-lactámicos son los mismos que mantienen correlaciones significativas con la abundancia relativa de los metabolitos. En cambio, el resto de géneros que son abundantes en la microbiota, pero que no se reducen significativamente con el tratamiento, no presentan correlaciones importantes; la única excepción es *Oscillibacter*. Esto sugiere que, efectivamente, los beta-lactámicos afectan a ciertos géneros de la microbiota y consecuentemente a los metabolitos que estos géneros producen.

Los SCFAs (como el acético, propiónico e isovalérico) son ácidos débiles de entre dos y cinco carbonos, producidos por la microbiota del colon a partir de la fermentación de polisacáridos complejos (Canani *et al.*, 2011). La reducción de SCFAs es crucial, ya que estos ácidos son muy importantes para la salud del huésped: aportan energía a los colonocitos o células del colon (Hamer *et al.*, 2008); tienen propiedades antiinflamatorias (Atarashi *et al.*, 2013); modulan el sistema inmune promoviendo la proliferación y diferenciación de las células T-reguladoras (Furusawa *et al.*, 2013); y, finalmente, promueven la integridad de la barrera intestinal (Peng *et al.*, 2009). Los microorganismos productores de SCFAs son bacterias anaerobias Gram positivas, que habitan en el colon (Canani *et al.*, 2011); entre otros, se distinguen *Blautia* spp. y *Roseburia* spp. Por ejemplo, *R. inulinivorans* y *B. obeum* producen propionato (Louis y Flint, 2017). Es por ello que varios estudios han relacionado la disrupción de la microbiota por el tratamiento con antibióticos beta-lactámicos y la pérdida de estos géneros con una disminución de la abundancia de SCFAs en colon (Hayakawa *et al.*, 2011; Tamanai-Shacoori *et al.*, 2017). Esto se corresponde con los resultados de nuestro estudio, donde vemos que la reducción de *Blautia* y *Roseburia* se correlaciona con una disminución significativa de los niveles de acetato, propionato e isovalerato ($p < 1e-05$). También observamos esta correlación con el género *Dorea*; aunque este no es un género muy abundante en la microbiota colónica, otros estudios lo han relacionado también con la producción de SCFAs (Piper *et al.*, 2017).

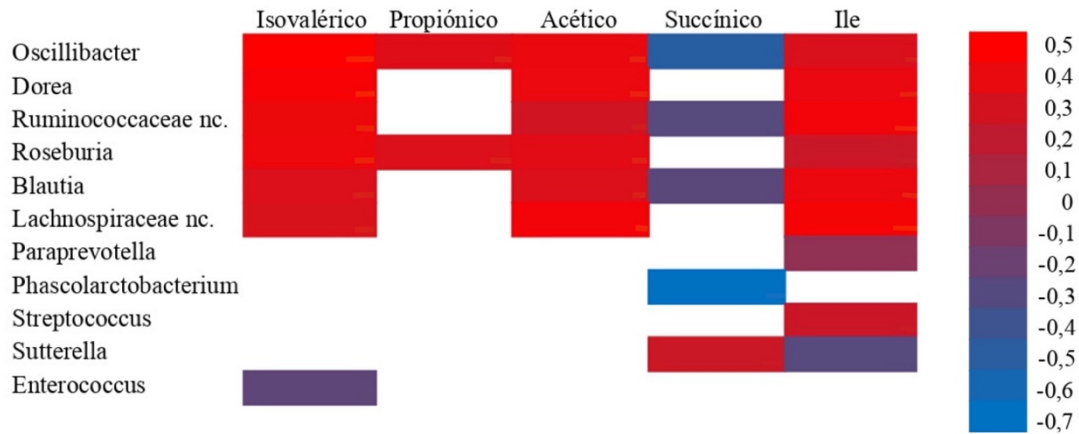


Figura 4.11. Heatmap de la correlación entre los géneros bacterianos más abundantes y los metabolitos significativamente disminuidos por el tratamiento con beta-lactámicos. La escala de color está indicada a la derecha del gráfico. Se observa una correlación positiva entre los géneros disminuidos significativamente y todos los metabolitos, a excepción del ácido succínico. Éste presenta una correlación negativa con los géneros de interés, lo cual explica que sea el único metabolito que aumenta tras el tratamiento con beta-lactámicos.

Por otra parte, la depleción de Firmicutes como *Blautia* y *Roseburia*, y la consiguiente reducción en SCFAs, se ha relacionado con el desarrollo de EICH en pacientes y la colonización intestinal por patógenos, lo cual, a su vez, provoca una mayor mortalidad entre estos pacientes. Esto es interesante ya que, en nuestro estudio, los pacientes desarrollaron infecciones que hubo que tratar con antibióticos; además, algunos de los pacientes que reciben un trasplante de células madre desarrollan EICH, lo cual pone en grave riesgo su vida. Ello hace suponer que la recuperación de la microbiota intestinal, así como la administración de SCFAs, mejora la supervivencia de los pacientes. Un ejemplo es el estudio de Fukuda *et al.* (2011), donde se mostró que el acetato prevenía la colonización por *E. coli* O157:H7, mediante transportadores de carbohidratos. Otro ejemplo de la protección del acetato frente a la colonización por enterobacterias es el estudio de Sorbara *et al.* (2019), donde observan que la producción de acetato impide la colonización por patógenos de la familia *Enterobacteriaceae*, debido a la acidificación del lumen colónico (el acetato disminuye el pH). Esto mismo fue observado por Jacobson *et al.* (2018) en relación al propionato. En nuestro estudio tanto el acetato como el propionato fueron significativamente reducidos por la piperacilina-tazobactámico o los beta-lactámicos en general –respectivamente–, lo cual podría explicar por qué estos pacientes desarrollan infecciones. En cuanto al desarrollo de EICH, Jenq *et al.* (2015) demostró que la presencia de *Blautia* en el intestino promueve una menor mortalidad frente al desarrollo de EICH, probablemente debido a sus propiedades antiinflamatorias. Nosotros hemos identificado que el tratamiento con beta-lactámicos reduce los niveles de *Blautia*. Será interesante por tanto estudiar si los pacientes donde se redujeron los niveles de *Blautia* fueron los que desarrollaron EICH. Por otro lado, en este estudio el único metabolito que sufrió un incremento significativo tras el tratamiento con beta-lactámicos fue el succinato. Este ácido orgánico es producido por la microbiota, y se ha asociado con multitud de procesos en el huésped, como la regulación de la gluconeogénesis intestinal (De Vadder *et al.*, 2016) o la regulación de la inflamación intestinal (Connors *et al.*, 2019). El succinato es producido sobre todo por bacterias del filo Bacteroidetes, así como por algunas del filo Firmicutes, bien como producto final de la fermentación, bien como metabolito intermediario en la producción de propionato. Por ejemplo, es producido por miembros de la familia *Prevotellaceae* (como el género *Paraprevotella*, uno de los más abundantes en la microbiota de los pacientes de este estudio) o de la clase Negativicutes (como el género *Phascolarctobacterium*, también entre los más abundantes) (Louis *et al.*, 2014; Kovatcheva-Datchary *et al.*, 2015). La explicación de por qué este ácido se encuentra significativamente incrementado tras el tratamiento con beta-lactámicos puede radicar en el hecho de que las bacterias que lo producen no solo son de las más abundantes en la microbiota, sino que además no se ven afectadas por el tratamiento con beta-lactámicos. Es

posible por tanto que la reducción de bacterias que compiten por los mismos nutrientes permita a las productoras de succinato presentar una mayor actividad y por tanto una mayor producción de succinato. Alternativamente, es posible que alguna de las bacterias que consumen succinato haya sido eliminada por el tratamiento beta-lactámico y por ello el succinato aumente.

4.3. Análisis metagenómico y metaproteómico

Finalmente, se realizó un estudio con los datos obtenidos por metagenómica y metaproteómica. El objeto del mismo es relacionar la alteración en los genes codificados con la alteración en la expresión proteica, de manera que se pueda saber qué funciones génicas se ven afectadas tras el tratamiento con los antibióticos beta-lactámicos. Dicho análisis se realizó tras identificar los genes codificados por bacterias de la microbiota y proteínas expresadas, tal y como se describe en material y métodos. Posteriormente se asignó una función bacteriana a cada gen o proteína mediante la base de datos KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes). En total se detectaron 6498 genes ortólogos (KOs) en el set de datos metagenómico y 550 genes ortólogos expresados en el set de datos metaproteómico. Posteriormente, se aplicó un análisis estadístico a ambos sets de datos (metagenómica y metaproteómica). Principalmente se detectaron cambios significativos a nivel proteico, pero no a nivel metagenómico (test Ancom, $p < 0,05$). En la Figura 4.12 se muestran los KOs a nivel proteico detectados.

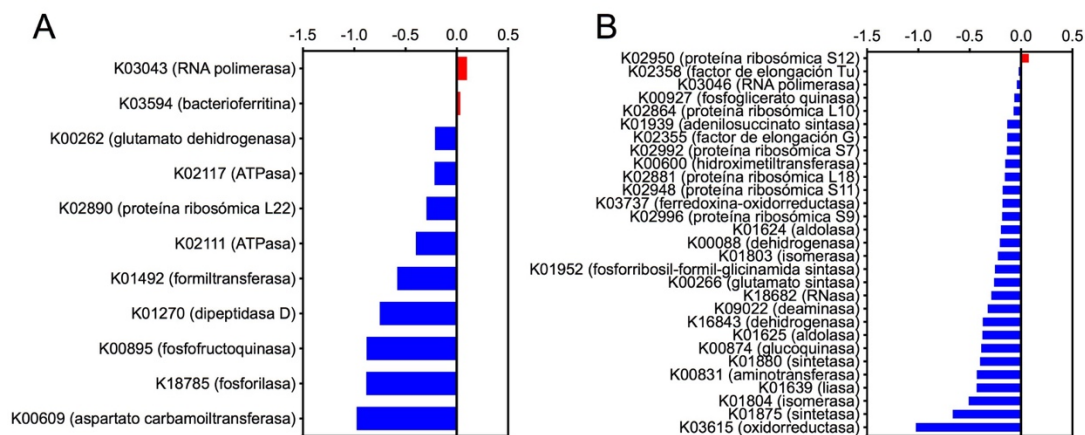


Figura 4.12. KOs a nivel de proteína, cuyo cambio tras el tratamiento con beta-lactámicos es significativo ($p < 0,05$). La magnitud de cambio se mide con el \log_2FC . A) Proteínas cuya tendencia a cambiar es igual que la de sus genes correspondientes en el set de metagenómica. B) Proteínas cuya tendencia a cambiar es diferente de la de sus genes correspondientes en el set de metagenómica. Los colores simbolizan si los niveles de cada proteína aumentan (rojo) o disminuyen (azul), y la longitud de las barras indica en qué proporción (\log_2FC).

A pesar de que a nivel metagenómico no se detectaron diferencias significativas, decidimos analizar si la tendencia detectada a nivel proteico (disminución/aumento) también se observaba a nivel genético. En la Figura 4.12A se muestran aquellos KEGG Orthologs (KOs) que seguían la misma tendencia a nivel proteico y genético, lo que sugiere que el antibiótico produce una disminución del número de genes que codifican para ese KO y consecuentemente se reducen las proteínas derivadas de dichos genes. En la Figura 4.12B se muestran aquellos KOs que no presentan la misma tendencia a nivel proteico o genético. En este caso es posible que el tratamiento beta-lactámico afecte directamente a la expresión proteica por parte de la bacteria.

En el caso de las proteínas cuyo cambio seguía la misma tendencia que la de sus genes correspondientes (Figura 4.12A), se puede apreciar que el tratamiento con antibióticos beta-lactámicos redujo la expresión proteica relacionada con el metabolismo de producción de energía (glicólisis/gluconeogénesis) y compuestos estructurales (metabolismo del nitrógeno; metabolismo de aminoácidos; metabolismo de nucleótidos): K03594, K00262, K02117, K02111,

K01492, K01270, K00895, K18785 y K00609. También se redujeron los niveles de KOs relacionados con el procesamiento de la información genética: K03043 y K02890. En concreto, las proteínas disminuidas fueron enzimas (RNA polimerasa, glutamato dehidrogenasa, formiltransferasa, dipeptidasa D, fosfofructoquinasa, fosforilasa y aspartato carbamoiltransferasa, ATPasas). Como se puede apreciar en la figura 4.13, tanto ptz como meropenem produjeron cambios similares en la expresión de estos KOs a nivel proteico.

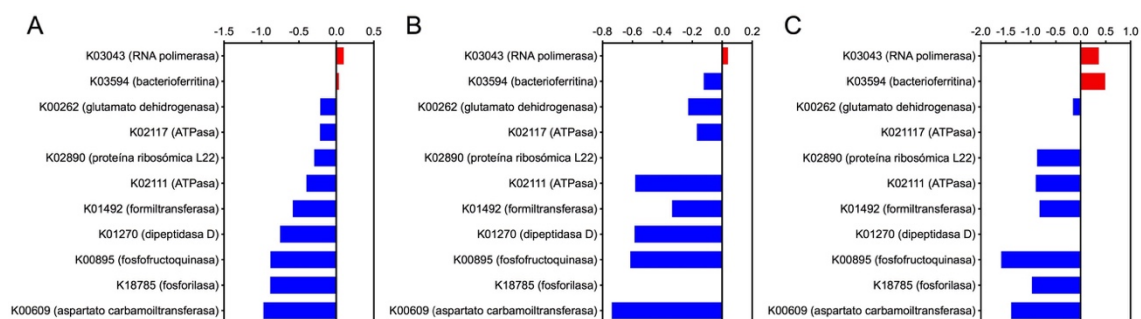


Figura 4.13. Diagrama de cambio en los niveles de los KOs significativamente alterados por el tratamiento beta-lactámico. Se muestran aquellos KOs cuya alteración a nivel de metaproteómica es significativa, y además su tendencia a aumentar o disminuir coincide con los datos de metagenómica. A) Proteínas del grupo beta. B) Proteínas del grupo ptz. C) Proteínas del grupo mero. Las funciones génicas están indicadas al lado de cada KEGG. A nivel global, el tratamiento con antibióticos beta-lactámicos parece reducir la expresión génica relacionada con el metabolismo energético y de producción de compuestos estructurales, así como el procesamiento de la información genética.

Estos resultados concuerdan con los de Sorbara *et al.* (2020), que indicaban que una gran proporción de los KOs identificados en todos los miembros de la familia *Lachnospiraceae* (disminuida tras el tratamiento beta-lactámico) compartían las rutas de metabolismo del nitrógeno y glicólisis/gluconeogénesis; además, aproximadamente el 30% de los genes que compartían todos los miembros de esta familia se relacionaron con el procesamiento de la información genética. Asimismo, identificaron algunos miembros de la familia *Lachnospiraceae* que contribuían al metabolismo del almidón, sacarosa, fructosa y manosa. En nuestro caso, esto último se atribuyó a la enzima pfp (fosfofructoquinasa dependiente de difosfato, K00895), así como a mp2 (beta-1,4-manooligosacárido/beta-1,4-manosil-N-acetilglucosamina fosforilasa, K18785), ambas disminuidas tras el tratamiento antibiótico. Por otro lado, en nuestro estudio tan solo se encontraron dos funciones aumentadas significativamente tras el tratamiento con beta-lactámicos. Una de ellas fue la bacterioferritina (K03594). Esta proteína, que suele estar codificada por bacterias del filo Proteobacteria, participa en la adquisición y el almacenamiento de hierro, ya que es capaz de unirlo a su núcleo (Vashist *et al.*, 2010). Además, puede actuar como un factor de virulencia, permitiendo que las bacterias sobrevivan en el huésped. Así pues, el aumento significativo de los niveles de esta proteína podría estar relacionado con la presencia de bacterias patógenas o resistentes al tratamiento antibiótico del filo Proteobacteria, cuyo rápido crecimiento y metabolismo depende de la adquisición de hierro del ambiente intestinal. Ello quizá podría explicar por qué el meropenem, el cual no causó una disminución significativa en el filo Proteobacteria (varios de cuyos miembros son patógenos o patógenos oportunistas), presenta un aumento pronunciado de bacterioferritina; por el contrario, la piperacilina-tazobactámico, el cual sí generó una reducción significativa del filo Proteobacteria, muestra una reducción en los niveles de esta proteína.

Cabe destacar que el tratamiento con beta-lactámicos también produjo una inhibición de la síntesis de algunas KOs a nivel proteico sin afectar de la misma manera a la abundancia de dichos KOs a nivel génico (Fig. 4.13 B y C). Este resultado es sorprendente ya que el mecanismo de acción de los beta-lactámicos no es a través de la inhibición de la síntesis proteica, sino a través de la inhibición de la síntesis de la pared celular. Es posible que la disminución de la síntesis de diversas proteínas se deba a la alteración que produce el beta-lactámico en la bacteria, ya que

induce la respuesta SOS (Miller *et al.*, 2004). Esta respuesta disminuye de manera transitoria la división celular, lo que permite la supervivencia de la bacteria. Es curioso que varias de las proteínas más afectadas correspondan a aquellas que forman parte de los ribosomas. Es posible que en esas condiciones de estrés y parada de la división celular se disminuya en general la síntesis proteica, y por tanto no sea necesario un número tan elevado de ribosomas.

Por último, se ha de comentar que a lo largo de este estudio se han observado diferencias entre los resultados del tratamiento con piperacilina-tazobactámico y meropenem. En general, parece que la piperacilina-tazobactámico es la única que generó cambios pronunciados en la microbiota, pues sus resultados son los únicos significativos. En cambio, el meropenem, pese a mostrar una tendencia similar a la de la piperacilina-tazobactámico, no provocó alteraciones estadísticamente significativas. Esto, a priori, parece carecer de sentido ya que el meropenem, en tanto que carbapenémico, tiene un espectro de acción antimicrobiana más amplio que el de la piperacilina-tazobactámico (Jorgensen *et al.*, 2018); además, varios estudios han demostrado que este afecta negativamente a la microbiota anaerobia (Sullivan *et al.*, 2001; Gibson *et al.*, 2016). La razón detrás de esta falta de resultados significativos podría ser el bajo número de pares de muestras de pacientes que han recibido meropenem (N = 7), que además es menor que el de la piperacilina-tazobactámico (N=11); esto disminuye la potencia estadística. Ello explicaría por qué, para varios de los análisis realizados (filo, metabolitos), los resultados del tratamiento con meropenem muestran la misma tendencia que los de la piperacilina-tazobactámico pese a no ser significativos. De hecho, este puede ser también el caso de la piperacilina-tazobactámico, pues en algunos de los análisis tampoco presentaba resultados significativos pese a seguir la tendencia que los beta-lactámicos en general. No obstante, el meropenem no siempre se comporta igual que el ptz, por lo que tampoco se puede asegurar que ambos antibióticos estén afectando por igual a la microbiota intestinal. Es más, otra explicación para la falta de resultados significativos podría estar relacionada con la farmacocinética de ambos antibióticos, ya que la excreción biliar de la piperacilina es mayor que la del meropenem. En concreto, la piperacilina puede llegar a excretarse en un 10-20% en las heces (Starlin, 2005); sin embargo, el meropenem solo se excreta en un 2% (AEMPS). Esta diferencia podría explicar el menor efecto que parece tener el meropenem sobre la microbiota intestinal, ya que la estaría alcanzando una menor concentración intestinal que la piperacilina.

5. Conclusiones

1. El tratamiento con antibióticos beta-lactámicos en pacientes con leucemia aguda provoca una disminución significativa de la diversidad microbiana.
2. El tratamiento con beta-lactámicos produce una reducción de géneros pertenecientes al filo Firmicutes: *Blautia*, *Roseburia* y *Dorea*
3. La reducción de dichos géneros viene acompañada de una disminución de los ácidos isovalérico, propiónico y acético, así como de un incremento del ácido succínico.
4. El tratamiento con beta-lactámicos produce una reducción en la expresión proteica de varios KOs relacionados con el metabolismo energético, el metabolismo de producción de componentes estructurales, y el procesamiento de la información genética.
5. En general se observan cambios similares en el microbioma inducidos por piperacilina-tazobactámico y meropenem, aunque únicamente son significativos los cambios producidos por piperacilina-tazobactámico.

6. Limitaciones del estudio

En cuanto a las limitaciones de este estudio, los resultados deberían ser validados utilizando una muestra más grande de pacientes y de muestras fecales, para garantizar la validez estadística de los resultados. Además, los resultados podrían estar influenciados por otros factores, como el sexo de los pacientes, que no se han tenido en cuenta en este estudio. Por tanto, sería recomendable realizar un posterior análisis multivariante atendiendo a estos otros factores, además de al tratamiento antibiótico, para confirmar que el efecto observado es debido principalmente al antibiótico y no a otros factores.

7. Referencias bibliográficas

Bibliografía citada

- AGENCIA ESPAÑOLA DE MEDICAMENTOS Y PRODUCTOS SANITARIOS (AEMPS, 2010). Ficha técnica. Recuperado de: https://cima.aemps.es/cima/pdfs/es/ft/73888/P_73888.pdf
- ANDERSON, M. J. (2001). A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral ecology*, 26(1), 32-46.
- ARIAS, C. A., y MURRAY, B. E. (2012). The rise of the Enterococcus: beyond vancomycin resistance. *Nature Reviews Microbiology*, 10(4), 266-278.
- ATARASHI, K., TANOUE, T., OSHIMA, K., SUDA, W., NAGANO, Y., NISHIKAWA, H., ... y KIM, S. (2013). T reg induction by a rationally selected mixture of Clostridia strains from the human microbiota. *Nature*, 500(7461), 232-236.
- BÄCKHED, F., FRASER, C. M., RINGEL, Y., SANDERS, M. E., BALFOUR SARTOR, R., SHERMAN, P. M., ... y BRETT FINLAY, B. (2012). Defining a healthy human gut microbiome: current concepts, future directions, and clinical applications. *Cell host y microbe*, 12(5), 611-622.
- BÄCKHED, F., LEY, R. E., SONNENBURG, J. L., PETERSON, D. A. y GORDON, J. I. (2005). Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science*, 307(5717):1915–1920.
- BADRI, M., KURTZ, Z., MULLER, C., y BONNEAU, R. (2018). Normalization methods for microbial abundance data strongly affect correlation estimates. *bioRxiv*, 406264.
- BAI, L., ZHOU, P., LI, D., y JU, X. (2017). Changes in the gastrointestinal microbiota of children with acute lymphoblastic leukaemia and its association with antibiotics in the short term. *Journal of medical microbiology*, 66(9), 1297-1307.
- BAUGHMAN, R. P. (2009). The use of carbapenems in the treatment of serious infections. *Journal of intensive care medicine*, 24(4), 230-241.
- BECATTINI, S., TAUR, Y., y PAMER, E. G. (2016). Antibiotic-induced changes in the intestinal microbiota and disease. *Trends in molecular medicine*, 22(6), 458-478.
- BENABBOU, T. A., KARAM, H. Z., y KARAM, N. E. (2019). Effect Oral Administration Ampicillin on the Ecological Balance of rat Enterococcal gut Microbiota. *Current microbiology*, 76(3), 329-337.
- BENJAMINI, Y., y HOCHBERG, Y. (1995). Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal statistical society: series B (Methodological)*, 57(1), 289-300.
- BHALODI, A. A., VAN ENGELEN, T. S., VIRK, H. S., y WIERSINGA, W. J. (2019). Impact of antimicrobial therapy on the gut microbiome. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 74(Supplement_1), i6-i15.

- BHALLA, A., PULTZ, N. J., RAY, A. J., HOYEN, C. K., ECKSTEIN, E. C., y DONSKEY, C. J. (2003). Antianaerobic antibiotic therapy promotes overgrowth of antibiotic-resistant, gram-negative bacilli and vancomycin-resistant enterococci in the stool of colonized patients. *Infection Control y Hospital Epidemiology*, 24(9), 644-649.
- CANANI, R. B., DI COSTANZO, M., LEONE, L., PEDATA, M., MELI, R., y CALIGNANO, A. (2011). Potential beneficial effects of butyrate in intestinal and extraintestinal diseases. *World journal of gastroenterology: WJG*, 17(12), 1519.
- CANDON, S., PEREZ-ARROYO, A., MARQUET, C., VALETTE, F., FORAY, A. P., PELLETIER, B., ... y CHATENOU, L. (2015). Antibiotics in early life alter the gut microbiome and increase disease incidence in a spontaneous mouse model of autoimmune insulin-dependent diabetes. *PloS one*, 10(5).
- COLARDYN, F. (2005). Appropriate and timely empirical antimicrobial treatment of ICU infections—a role for carbapenems. *Acta Clinica Belgica*, 60(2), 51-62.
- COLLINS, M. D., LAWSON, P. A., WILLEMS, A., CORDOBA, J. J., FERNANDEZ-GARAYZABAL, J., GARCIA, P., ... y FARROW, J. A. E. (1994). The phylogeny of the genus *Clostridium*: proposal of five new genera and eleven new species combinations. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 44(4), 812-826.
- CONNORS, J., DAWE, N., y VAN LIMBERGEN, J. (2019). The role of succinate in the regulation of intestinal inflammation. *Nutrients*, 11(1), 25.
- CHEN, W., ZHANG, C. K., CHENG, Y., ZHANG, S., y ZHAO, H. (2013). A comparison of methods for clustering 16S rRNA sequences into OTUs. *PloS one*, 8(8).
- DAVID, L., MAURICE, C., CARMODY, R., CARMODY, R. N., GOOTENBERG, D. B., BUTTON, J. E., ... y TURNBAUGH, P. J. (2014). Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature* 505, 559–563.
- DE VADDER, F., KOVATCHEVA-DATCHARY, P., ZITOUN, C., DUCHAMPT, A., BÄCKHED, F., y MITHIEUX, G. (2016). Microbiota-produced succinate improves glucose homeostasis via intestinal gluconeogenesis. *Cell metabolism*, 24(1), 151-157.
- DELZENNE, N. M., NEYRINCK, A. M., BÄCKHED, F., y CANI, P. D. (2011). Targeting gut microbiota in obesity: effects of prebiotics and probiotics. *Nature Reviews Endocrinology*, 7(11), 639.
- DETHLEFSEN, L., HUSE, S., SOGIN, M. L. y RELMAN, D. A. (2008). The pervasive effects of an antibiotic on the human gut microbiota, as revealed by deep 16S rRNA sequencing. *PLoS Biology*, 6(11):e280.
- DJUKOVIC, A., GONZÁLEZ-BARBERÁ, E. M., SANZ, J., ARTACHO, A., PEÑARANDA, I., HERRERA, B., ... y KUSTER, B. (2020). High Heterogeneity of Multidrug-Resistant Enterobacteriaceae Fecal Levels in Hospitalized Patients Is Partially Driven by Intravenous β -Lactams. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 64(2).
- DJUKOVIC, A., GONZÁLEZ-BARBERÁ, E. M., SANZ, J., ARTACHO, A., PEÑARANDA, I., HERRERA, B., ... y KUSTER, B. (2020). High Heterogeneity of Multidrug-Resistant Enterobacteriaceae Fecal Levels in Hospitalized Patients Is Partially Driven by Intravenous β -Lactams. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 64(2).
- ECKBURG, P. B., BIK, E. M., BERNSTEIN, C. N., PURDOM, E., DETHLEFSEN, L., SARGENT, ... y RELMAN, D. A. (2005). Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*, 308(5728), 1635-1638.
- EIJSINK, V. G., AXELSSON, L., DIEP, D. B., HÅVARSTEIN, L. S., HOLO, H. y NES, I. F. (2002). Production of class II bacteriocins by lactic acid bacteria; an example of biological warfare and communication. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 81(1-4), 639-654.

- FERRER, M., MÉNDEZ-GARCÍA, C., ROJO, D., BARBAS, C. y MOYA, A. (2017). Antibiotic use and microbiome function. *Biochemical pharmacology*, 134, 114-126.
- FINN, R. D., CLEMENTS, J., y EDDY, S. R. (2011). HMMER web server: interactive sequence similarity searching. *Nucleic acids research*, 39(suppl_2), W29-W37.
- FOSTER, D. M., JACOB, M. E., FARMER, K. A., CALLAHAN, B. J., THERIOT, C. M., KATHARIOU, S., ... y PAPICH, M. G. (2019). Ceftiofur formulation differentially affects the intestinal drug concentration, resistance of fecal *Escherichia coli*, and the microbiome of steers. *PloS one*, 14(10).
- FUKUDA, S., TOH, H., HASE, K., OSHIMA, K., NAKANISHI, Y., YOSHIMURA, K., ... y TAYLOR, T. D. (2011). Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. *Nature*, 469(7331), 543-547.
- FURUSAWA, Y., OBATA, Y., FUKUDA, S., ENDO, T. A., NAKATO, G., TAKAHASHI, D., ... y TAKAHASHI, M. (2013). Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature*, 504(7480), 446-450.
- GALLOWAY-PENÑA, J. R., SMITH, D. P., SAHASRABHOJANE, P., WADSWORTH, W. D., FELLMAN, B. M., AJAMI, N. J., ... y KONTOYIANNIS, D. P. (2017). Characterization of oral and gut microbiome temporal variability in hospitalized cancer patients. *Genome medicine*, 9(1), 21.
- GASPARRINI, A. J., CROFTS, T. S., GIBSON, M. K., TARR, P. I., WARNER, B. B. y DANTAS, G. (2016). Antibiotic perturbation of the preterm infant gut microbiome and resistome. *Gut microbes*, 7(5), 443-449.
- GASPARRINI, A. J., WANG, B., SUN, X., KENNEDY, E. A., HERNANDEZ-LEYVA, A., NDAO, I. M., ... y DANTAS, G. (2019). Persistent metagenomic signatures of early-life hospitalization and antibiotic treatment in the infant gut microbiota and resistome. *Nature microbiology*, 4 (12), 2285-2297.
- GIBSON, M. K., WANG, B., AHMADI, S., BURNHAM, C. A. D., TARR, P. I., WARNER, B. B., y DANTAS, G. (2016). Developmental dynamics of the preterm infant gut microbiota AND ANTIBIOTIC RESISTOME. *NATURE MICROBIOLOGY*, 1(4), 1-10.
- GURDEEP SINGH, R., TANCA, A., PALOMBA, A., VAN DER JEUGT, F., VERSCHAFFELT, P., UZZAU, S., ... y MESUERE, B. (2018). Unipept 4.0: functional analysis of metaproteome data. *Journal of proteome research*, 18(2), 606-615.
- HAE-YOUNG, K. (2017). Statistical notes for clinical researchers: chi-squared test and Fisher's exact test. *Restorative dentistry y endodontics*, 42(2), 152-155.
- HAKIM, H., DALLAS, R., WOLF, J., TANG, L., SCHULTZ-CHERRY, S., DARLING, V., ... y ROSCH, J. W. (2018). Gut Microbiome Composition Predicts Infection Risk During Chemotherapy in Children With Acute Lymphoblastic Leukemia. *Clinical Infectious Diseases*, 67(4), 541-548.
- HAMER, H. M., JONKERS, D., VENEMA, K., VANHOUTVIN, S., TROOST, F. J., y BRUMMER, R. J. (2008). The role of butyrate on colonic function. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 27(2), 104-119.
- HARMSSEN, H. J., RAANGS, G. C., HE, T., DEGENER, J. E., y WELLING, G. W. (2002). Extensive set of 16S rRNA-based probes for detection of bacteria in human feces. *Applied and environmental microbiology*, 68(6), 2982-2990.
- HATZIOANOU, D., MAYER, M. J., DUNCAN, S. H., FLINT, H. J., y NARBAD, A. (2013). A representative of the dominant human colonic Firmicutes, *Roseburia faecis* M72/1, forms a novel bacteriocin-like substance. *Anaerobe*, 23, 5-8.

- HAYAKAWA, M., ASAHARA, T., HENZAN, N., MURAKAMI, H., YAMAMOTO, H., MINAMI, Y., ... y GANDO, S. Dramatic Changes of the Gut Flora Immediately After Severe and Sudden Insults. *Dig Dis Sci* 56, 2361–2365 (2011).
- HAYASHI, H., SAKAMOTO, M., y BENNO, Y. (2002). Phylogenetic analysis of the human gut microbiota using 16S rDNA clone libraries and strictly anaerobic culture-based methods. *Microbiology and immunology*, 46(8), 535-548.
- HONG, P-Y., CROIX, J. A., GREENBERG, E., GASKINS, H. R. y MACKIE, R. I. (2011). Pyrosequencing-based analysis of the mucosal microbiota in healthy individuals reveals ubiquitous bacterial groups and micro-heterogeneity. *PLoS one* 6:e25042.
- HOOPER, L. V., STAPPENBECK, T. S., HONG, C. V., y GORDON, J. I. (2003). Angiogenins: a new class of microbicidal proteins involved in innate immunity. *Nature immunology*, 4(3), 269-273.
- HOYEN, C. K., PULTZ, N. J., PATERSON, D. L., ARON, D. C., y DONSKEY, C. J. (2003). Effect of parenteral antibiotic administration on establishment of intestinal colonization in mice by *Klebsiella pneumoniae* strains producing extended-spectrum β -lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 47(11), 3610-3612.
- HYATT, D., CHEN, G. L., LOCASCIO, P. F., LAND, M. L., LARIMER, F. W., y HAUSER, L. J. (2010). Prodigal: prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification. *BMC bioinformatics*, 11(1), 119.
- IIZUMI, T., BATTAGLIA, T., RUIZ, V., y PEREZ, G. I. P. (2017). Gut microbiome and antibiotics. *Archives of medical research*, 48(8), 727-734.
- INSTITUT NATIONAL DE RECHERCHE POUR L'AGRICULTURE, L'ALIMENTATION ET L'ENVIRONNEMENT (INRAE): <https://www6.toulouse.inrae.fr/metatoul>
- JACOBSON, A., LAM, L., RAJENDRAM, M., TAMBURINI, F., HONEYCUTT, J., PHAM, T., ... y BOULEY, D. M. (2018). A gut commensal-produced metabolite mediates colonization resistance to *Salmonella* infection. *Cell host & microbe*, 24(2), 296-307.
- JENQ, R. R., TAUR, Y., DEVLIN, S. M., PONCE, D. M., GOLDBERG, J. D., AHR, K. F., ... y DOCAMPO, M. D. (2015). Intestinal *Blautia* is associated with reduced death from graft-versus-host disease. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 21(8), 1373-1383.
- JORGENSEN, S. C. J., y RYBAK, M. J. (2018). Meropenem and Vaborbactam: Stepping up the Battle against Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*, 38(4), 444-461.
- KAU, A. L., AHERN, P. P., GRIFFIN, N. W., GOODMAN, A. L. y GORDON, J. I. (2011). Human nutrition, the gut microbiome and the immune system. *Nature*, 474(7351), 327-336.
- KAUL, A., MANDAL, S., DAVIDOV, O., Y PEDDADA, S. D. (2017). Analysis of microbiome data in the presence of excess zeros. *Frontiers in microbiology*, 8, 2114.
- KAYSEN, A., HEINTZ-BUSCHART, A., MULLER, E. E., NARAYANASAMY, S., WAMPACH, L., LACZNY, C. C., ... y WILMES, P. (2017). Integrated meta-omic analyses of the gastrointestinal tract microbiome in patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Translational Research*, 186, 79-94.
- KIM, S. G., BECATTINI, S., MOODY, T. U., SHLIAHA, P. V., LITTMANN, E. R., SEOK, R., ... y WRIGHT, R. (2019). Microbiota-derived lantibiotic restores resistance against vancomycin-resistant *Enterococcus*. *Nature*, 572(7771), 665-669.
- KONG, K. F., SCHNEPER, L., y MATHEE, K. (2010). Beta-lactam antibiotics: from antibiosis to resistance and bacteriology. *Apmis*, 118(1), 1-36.

- KOVATCHEVA-DATCHARY, P., NILSSON, A., AKRAMI, R., LEE, Y. S., DE VADDER, F., ARORA, T., ... y BÄCKHED, F. (2015). Dietary fiber-induced improvement in glucose metabolism is associated with increased abundance of *Prevotella*. *Cell metabolism*, 22(6), 971-982.
- LEY, R. E., TURNBAUGH, P. J., KLEIN, S., y GORDON, J. I. (2006). Human gut microbes associated with obesity. *Nature*, 444(7122), 1022-1023.
- LI, D., LIU, C. M., LUO, R., SADAKANE, K., y LAM, T. W. (2015). MEGAHIT: an ultra-fast single-node solution for large and complex metagenomics assembly via succinct de Bruijn graph. *Bioinformatics*, 31(10), 1674-1676.
- LOPETUSO, L. R., SCALDAFERRI, F., PETITO, V., y Gasbarrini, A. (2013). Commensal Clostridia: leading players in the maintenance of gut homeostasis. *Gut Pathogens* 5, 23.
- LOUIS, P., HOLD, G. L., y FLINT, H. J. (2014). The gut microbiota, bacterial metabolites and colorectal cancer. *Nature reviews microbiology*, 12(10), 661-672.
- LOUIS, P., y FLINT, H. J. (2017). Formation of propionate and butyrate by the human colonic microbiota. *Environmental microbiology*, 19(1), 29-41.
- LLOYD-PRICE, J., ABU-ALI, G., y HUTTENHOWER, C. (2016). The healthy human microbiome. *Genome medicine*, 8(1), 1-11.
- MACPHERSON, C. W., MATHIEU, O., TREMBLAY, J., CHAMPAGNE, J., NANTEL, A., GIRARD, S. A., y TOMPKINS, T. A. (2018). Gut bacterial microbiota and its resistome rapidly recover to basal state levels after short-term amoxicillin-clavulanic acid treatment in healthy adults. *Scientific reports*, 8(1), 1-14.
- MALBRUNY, B., CANU, A., BOZDOGAN, B., FANTIN, B., ZARROUK, V., DUTKA-MALEN, S., ... y LECLERCQ, R. (2002). Resistance to quinupristin-dalfopristin due to mutation of L22 ribosomal protein in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 46(7), 2200-2207.
- MARIAT, D., FIRMESSE, O., LEVENEZ, F., GUIMARÃES, V. D., SOKOL, H., DORÉ, J., ... y FURET, J. P. (2009). The Firmicutes/Bacteroidetes ratio of the human microbiota changes with age. *BMC microbiology*, 9(1), 123.
- MILLER, C., THOMSEN, L. E., GAGGERO, C., MOSSERI, R., INGMER, H., y COHEN, S. N. (2004). SOS response induction by β -lactams and bacterial defense against antibiotic lethality. *Science*, 305(5690), 1629-1631.
- MORJARIA, S., SCHLUTER, J., TAYLOR, B. P., LITTMANN, E. R., CARTER, R. A., FONTANA, E., ... y TAUR, Y. (2019). Antibiotic-induced shifts in fecal microbiota density and composition during hematopoietic stem cell transplantation. *Infection and immunity*, 87(9), e00206-19.
- MUKHERJEE, S., ZHENG, H., DEREBE, M. G., CALLENBERG, K. M., PARTCH, C. L., ROLLINS, ... y HOOPER, L. V. (2014). Antibacterial membrane attack by a pore-forming intestinal C-type lectin. *Nature*, 505(7481), 103-107.
- NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (NCBI): <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- NGUYEN, L. N., LOPES, L. C. L., CORDERO, R. J. y NOSANCHUK, J. D. (2011). Sodium butyrate inhibits pathogenic yeast growth and enhances the functions of macrophages. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 66(11), 2573-2580.
- OGATA, H., GOTO, S., SATO, K., FUJIBUCHI, W., BONO, H., y KANEHISA, M. (1999). KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic acids research*, 27(1), 29-34.

- PALLEJA, A., MIKKELSEN, K. H., FORSLUND, S. K., KASHANI, A., ALLIN, K. H., NIELSEN, T., ... y PYL, P. T. (2018). Recovery of gut microbiota of healthy adults following antibiotic exposure. *Nature microbiology*, 3(11), 1255-1265.
- PANDA, S., EL KHADER, I., CASELLAS, F., LÓPEZ VIVANCOS, J., GARCÍA CORS, M., SANTIAGO, A., ... y MANICHANH, C. (2014) Short-Term Effect of Antibiotics on Human Gut Microbiota. *PLoS one* 9(4): e95476.
- PENDLETON, J. N., GORMAN, S. P., y GILMORE, B. F. (2013). Clinical relevance of the ESKAPE pathogens. *Expert review of anti-infective therapy*, 11(3), 297-308.
- PENG, L., LI, Z. R., GREEN, R. S., HOLZMAN, I. R., y LIN, J. (2009). Butyrate enhances the intestinal barrier by facilitating tight junction assembly via activation of AMP-activated protein kinase in Caco-2 cell monolayers. *The Journal of nutrition*, 139(9), 1619-1625.
- PETTIGREW, M. M., GENT, J. F., KONG, Y., HALPIN, A. L., PINELES, L., HARRIS, A. D., y JOHNSON, J. K. (2019). Gastrointestinal microbiota disruption and risk of colonization with carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care unit patients. *Clinical Infectious Diseases*, 69(4), 604-613.
- PFALLER, M. A., HUBAND, M. D., MENDES, R. E., FLAMM, R. K., y CASTANHEIRA, M. (2018). In vitro activity of meropenem/vaborbactam and characterisation of carbapenem resistance mechanisms among carbapenem-resistant Enterobacteriaceae from the 2015 meropenem/vaborbactam surveillance programme. *International journal of antimicrobial agents*, 52(2), 144-150.
- PILMIS, B., LE MONNIER, A., y ZAHAR, J. R. (2020). Gut Microbiota, Antibiotic Therapy and Antimicrobial Resistance: A Narrative Review. *Microorganisms*, 8(2), 269.
- PIPER, H. G., FAN, D., COUGHLIN, L. A., HO, E. X., MCDANIEL, M. M., CHANNABASAPPA, N., ... y KOH, A. Y. (2017). Severe gut microbiota dysbiosis is associated with poor growth in patients with short bowel syndrome. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 41(7), 1202-1212.
- QUINCE, C., WALKER, A. W., SIMPSON, J. T., LOMAN, N. J., y SEGATA, N. (2017). Shotgun metagenomics, from sampling to analysis. *Nature biotechnology*, 35(9), 833.
- RAJAGOPALA, S. V., YOOSEPH, S., HARKINS, D. M., MONCERA, K. J., ZABORKRTSKY, K. B., TORRALBA, M. G., ... y 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(1), 635.
- RAKOFF-NAHOUM, S., PAGLINO, J., ESLAMI-VARZANEH, F., EDBERG, S., y MEDZHITOV, R. (2004). Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell*, 118(2), 229-241.
- RAMETTE, A. (2007). Multivariate analyses in microbial ecology. *FEMS microbiology ecology*, 62(2), 142-160.
- RAVI, A., HALSTEAD, F. D., BAMFORD, A., CASEY, A., THOMSON, N. M., VAN SCHAIK, W., ... y WHITEHOUSE, T. (2019). Loss of microbial diversity and pathogen domination of the gut microbiota in critically ill patients. *Microbial genomics*, 5(9).
- RECHENBERGER, J., SAMARAS, P., JARZAB, A., BEHR, J., FREJNO, M., DJUKOVIC, A., ... y XAVIER, K. B. (2019). Challenges in clinical metaproteomics highlighted by the analysis of acute leukemia patients with gut colonization by multidrug-resistant enterobacteriaceae. *Proteomes*, 7(1), 2.
- REICHARDT, N., DUNCAN, S. H., YOUNG, P., BELENGUER, A., LEITCH, C. M., SCOTT, K. P., ... y LOUIS, P. (2014). Phylogenetic distribution of three pathways for propionate production within the human gut microbiota. *The ISME journal*, 8(6), 1323-1335.

- RICE, L. B. (2012). Mechanisms of resistance and clinical relevance of resistance to β -lactams, glycopeptides, and fluoroquinolones. *In Mayo Clinic Proceedings (Vol. 87, No. 2, pp. 198-208)*. Elsevier.
- RICE, L. B., LAKTIČOVA, V., CARIAS, L. L., RUDIN, S., HUTTON, R., y MARSHALL, S. H. (2009). Transferable capacity for gastrointestinal colonization in *Enterococcus faecium* in a mouse model. *The Journal of infectious diseases, 199(3), 342-349*.
- RICE, L. B., THOMAS, R. H., LAKTICOVA, V., HELFAND, M. S., y DONSKEY, C. J. (2004). β -lactam antibiotics and gastrointestinal colonization with vancomycin-resistant enterococci. *The Journal of infectious diseases, 189(6), 1113-1118*.
- SARTOR, R. B., y WU, G. D. (2017). Roles for intestinal bacteria, viruses, and fungi in pathogenesis of inflammatory bowel diseases and therapeutic approaches. *Gastroenterology, 152(2), 327-339*.
- SAUVAGE, E., KERFF, F., TERRAK, M., AYALA, J. A., y CHARLIER, P. (2008). The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. *FEMS microbiology reviews, 32(2), 234-258*.
- SCHLOSS, P. D., WESTCOTT, S. L., RYABIN, T., HALL, J. R., HARTMANN, M., HOLLISTER, E. B., ... y SAHL, J. W. (2009). Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol., 75(23), 7537-7541*.
- SCHMIEDER, R. y EDWARDS, R. (2011). Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. *Bioinformatics, 27(6), 863-864*.
- SHIN, N. R., WHON, T. W., y BAE, J. W. (2015). Proteobacteria: microbial signature of dysbiosis in gut microbiota. *Trends in biotechnology, 33(9), 496-503*.
- SHONO, Y., DOCAMPO, M. D., PELED, J. U., PEROBELLI, S. M., VELARDI, E., TSAI, J. J., ... y LIEBERMAN, S. R. (2016). Increased GVHD-related mortality with broad-spectrum antibiotic use after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in human patients and mice. *Science translational medicine, 8(339), 339ra71-339ra71*.
- SORBARA, M. T., DUBIN, K., LITTMANN, E. R., MOODY, T. U., FONTANA, E., SEOK, R., ... y LITVAK, Y. (2019). Inhibiting antibiotic-resistant Enterobacteriaceae by microbiota-mediated intracellular acidification. *Journal of Experimental Medicine, 216(1), 84-98*.
- SORBARA, M. T., LITTMANN, E. R., FONTANA, E., MOODY, T. U., KOHOUT, C. E., GJONBALAJ, M., ... y PAMER, E. G. (2020). Functional and Genomic Variation between Human-Derived Isolates of Lachnospiraceae Reveals Inter-and Intra-Species Diversity. *Cell Host & Microbe 28, 1-13*.
- SORG, J. A. y SONENSHEIN, A. L. (2008). Bile salts and glycine as cogerminants for *Clostridium difficile* spores. *Journal of bacteriology, 190(7), 2505-2512*.
- STAPPENBECK, T. S., HOOPER, L. V., y GORDON, J. I. (2002). Developmental regulation of intestinal angiogenesis by indigenous microbes via Paneth cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 99(24), 15451-15455*.
- STARLIN, R. (Ed.). (2005). *The Washington Manual of Infectious Disease Subspecialty Consult*. Saint Louis, USA: Washington University School of Medicine.
- SULLIVAN, Å., EDLUND, C., y NORD, C. E. (2001). Effect of antimicrobial agents on the ecological balance of human microflora. *The Lancet infectious diseases, 1(2), 101-114*.
- SUN, Y. y O'RIORDAN, M. X. (2013). Regulation of bacterial pathogenesis by intestinal short-chain fatty acids. *In Advances in applied microbiology, 85, 93-118*.

- TAIT-KAMRADT, A., DAVIES, T., APPELBAUM, P. C., DEPARDIEU, F., COURVALIN, P., PETITPAS, J., ... y SUTCLIFFE, J. (2000). Two New Mechanisms of Macrolide Resistance in Clinical Strains of *Streptococcus pneumoniae* from Eastern Europe and North America. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 44(12), 3395-3401.
- TAMANAI-SHACOORI, Z., SMIDA, I., BOUSARGHIN, L., LOREAL, O., MEURIC, V., FONG, S. B., ... y JOLIVET-GOUGEON, A. (2017). Roseburia spp.: a marker of health?. *Future Microbiology*, 12(2), 157-170.
- TOUYAMA, M., JIN, J. S., KIBE, R., HAYASHI, H., y BENNO, Y. (2015). Quantification of *Blautia wexlerae* and *Blautia luti* in human faeces by real-time PCR using specific primers. *Beneficial microbes*, 6(4), 583-590.
- TRUONG, D. T., TETT, A., PASOLLI, E., HUTTENHOWER, C., y SEGATA, N. (2017). Microbial strain-level population structure and genetic diversity from metagenomes. *Genome research*, 27(4), 626-638.
- UBEDA, C., TAUR, Y., JENQ, R. R., EQUINDA, M. J., SON, T., SAMSTEIN, M., ... y PAMER, E. G. (2010). Vancomycin-resistant *Enterococcus* domination of intestinal microbiota is enabled by antibiotic treatment in mice and precedes bloodstream invasion in humans. *The Journal of clinical investigation*, 120(12), 4332-4341.
- UTTLEY, A. C., COLLINS, C. H., NAIDOO, J., y GEORGE, R. C. (1988). Vancomycin-resistant enterococci. *The Lancet*, 331(8575-8576), 57-58.
- VASHIST, J., TIWARI, V., KAPIL, A., y RAJESWARI, M. R. (2010). Quantitative profiling and identification of outer membrane proteins of β -lactam resistant strain of *Acinetobacter baumannii*. *Journal of proteome research*, 9(2), 1121-1128.
- WANG, Q., GARRITY, G. M., TIEDJE, J. M., y COLE, J. R. (2007). Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73(16), 5261-5267.
- WEIR, T. L., MANTER, D. K., SHEFLIN, A. M., BARNETT, B. A., HEUBERGER, A. L., y RYAN, E. P. (2013). Stool microbiome and metabolome differences between colorectal cancer patients and healthy adults. *PLoS one*, 8(8).
- WILCOXON, F. (1992). Individual comparisons by ranking methods. *In Breakthroughs in statistics (pp. 196-202)*. Springer, New York, NY.
- WOERTHER, P. L., LEPEULE, R., BURDET, C., DECOUSSER, J. W., RUPPÉ, É. y BARBIER, F. (2018). Carbapenems and alternative β -lactams for the treatment of infections due to extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae*: what impact on intestinal colonisation resistance?. *International journal of antimicrobial agents*, 52(6), 762-770.
- WOOLSON, R. F. (2007). Wilcoxon signed-rank test. *Wiley encyclopedia of clinical trials*, 1-3.
- ZHANEL, G. G., LAWRENCE, C. K., ADAM, H., SCHWEIZER, F., ZELENIYSKY, S., ZHANEL, M., ... y GIN, A. S. (2018). Imipenem-relebactam and meropenem-vaborbactam: two novel carbapenem- β -lactamase inhibitor combinations. *Drugs*, 78(1), 65-98.
- ZHANEL, G. G., WIEBE, R., DILAY, L., THOMSON, K., RUBINSTEIN, E., HOBAN, D. J., ... y KARLOWSKY, J. A. (2007). Comparative review of the carbapenems. *Drugs*, 67(7), 1027-1052.

Bibliografía de consulta

- BRAY, J. R., y CURTIS, J. T. (1957). An ordination of the upland forest communities of southern Wisconsin. *Ecological monographs*, 27(4), 325-349.

- DEMEY, J. R., PLA, L., VICENTE-VILLARDÓN, J. L., DI RIENZO, J., y CASANOVES, F. (2011). Medidas de distancia y de similitud. Validación y Análisis de la Diversidad Funcional y su Relación con los Servicios Ecosistémicos. *CATIE, Costa Rica*, 47-59.
- ESPINOSA, C. I. (2019, octubre). Similitud de Comunidades biológicas. Recuperado el 10 de junio de 2020, de <https://ciespinosa.github.io/Similitud/distancias-entresitios.html#distancia-bray-curtis>
- GOWER, J. C. (1966). Some distance properties of latent root and vector methods used in multivariate analysis. *Biometrika*, 53(3-4), 325-338.
- WEISS, S., XU, Z. Z., PEDDADA, S., AMIR, A., BITTINGER, K., GONZALEZ, A., ... y HYDE, E. R. (2017). Normalization and microbial differential abundance strategies depend upon data characteristics. *Microbiome*, 5(1), 27.

Anexo 1

Glosario de términos estadísticos

Bray Curtis: es un método estadístico, muy utilizado en ecología, que cuantifica la disimilitud entre dos muestras (u otros datos) diferentes, generando así una matriz de disimilitud o de distancia. La distancia Bray-Curtis hace referencia a la diferencia en la abundancia relativa de una especie (u otro nivel taxonómico) que existe entre dos muestras. Esta distancia toma valores que van del 0 al 1; así, la comparación de dos muestras idénticas dará un valor de 0, mientras que la de las dos muestras más diferentes dará 1. (Bray y Curtis, 1957; Espinosa, 2019).

Matriz de disimilitud o matriz de distancia: es una matriz de datos simétrica (mismo número de columnas que de filas) que compara un conjunto de muestras entre sí. La disimilitud indica cómo de diferentes son las muestras entre sí, devolviendo un valor para la comparación de cada muestra con respecto a las demás. Generalmente, la disimilitud se mide del 0 al 1, siendo 0 la distancia entre dos muestras idénticas, y 1 la distancia entre dos muestras completamente diferentes (Demey et al., 2011).

Normalización: transformación de los datos con el objetivo de corregir la forma de distribución de sus variables, obteniéndose así varianzas homogéneas para todas las variables. Estas condiciones permiten que los análisis multivariantes funcionen mejor (Ramette, 2007).

PCoA: el método de PCoA fue descrito por Gower (1966). Es un tipo de análisis de ordenación (es decir, que resume y proyecta un conjunto de datos multivariantes de una comunidad en el espacio dimensional o tridimensional). Se aplica a datos ya normalizados, para visualizar tendencias globales de cómo de similares o diferentes son las poblaciones bacterianas en ciertos tipos de muestras (p.e. pre- vs post-tratamiento). Esto permite visualizar fácilmente las diferencias entre los datos, así como agrupar las muestras en función de su similitud en composición bacteriana (Weiss *et al.*, 2017). La ventaja de utilizar un PCoA en lugar de un PCA es que este último se basa en distancia euclidiana, la cual se ve muy afectada cuando los datos tienen una gran cantidad de ceros, como es el caso de los datos de abundancia bacteriana. Por el contrario, el PCoA no se ve afectado por este exceso de ceros, lo cual lo convierte en un análisis de ordenación mucho más fiable que el PCA en lo que respecta a los análisis de la microbiota u otras comunidades bacterianas.