



**RECINTO UNIVERSITARIO RUBÉN DARÍO  
INSTITUTO POLITÉCNICO DE LA SALUD “DR. LUIS FELIPE MONCADA”  
DEPARTAMENTO DE BIOANÁLISIS CLÍNICO Y MICROBIOLOGÍA**

**SEMINARIO DE GRADUACIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO DE  
LICENCIATURA EN MICROBIOLOGÍA**

**Tema:**

COVID-19

**Sub tema:**

Papel de la microbiota intestinal y la infección por SARS-CoV-2 en humanos, a partir de estudios realizados a nivel mundial.

**Autores:**

Br. Darwin Antonio Hernández Mendoza.

Br. Maydeling Amparo Orozco Ortiz

**Tutor:**

Lic. Kenia García Rosales

Managua, 11 de marzo de 2022

# Indice

<b>1. Introducción</b> .....	1
<b>2. Justificación</b> .....	2
<b>3. Objetivos</b> .....	4
<b>3.1. Objetivo general</b> .....	4
<b>3.2. Objetivos específicos</b> .....	4
<b>5. Desarrollo del sub tema</b> .....	5
<b>5.1. SARS-CoV-2</b> .....	5
<b>5.1.1. Genoma</b> .....	6
<b>5.1.2. Estructura</b> .....	7
<b>5.1.3. Ciclo de replicación</b> .....	10
<b>5.1.4. Mecanismos patogénicos</b> .....	12
<b>5.1.5. Evasión de la respuesta inmunológica</b> .....	14
<b>5.1.6. Métodos diagnósticos</b> .....	16
<b>5.2. Microbiota intestinal</b> .....	17
<b>5.2.1. Composición</b> .....	17
<b>5.2.2. Funciones de la microbiota intestinal</b> .....	20
<b>5.2.3. Estudios realizados sobre la microbiota intestinal en pacientes con COVID-19 a nivel mundial</b> .....	22
<b>5.2.4. Géneros bacterianos identificados en la microbiota intestinal de pacientes con COVID-19 en los estudios realizados en el mundo</b> .....	26
<b>5.2.5. Microbiota intestinal e inmunidad</b> .....	28
<b>5.2.6. Microbiota, dieta y metabolismo</b> .....	32
<b>5.2.7. Métodos diagnósticos utilizados en los estudios documentados</b> .....	35
<b>5.3. Mecanismos de interacción entre la microbiota intestinal y SARS-CoV-2</b> .....	46
<b>5.3.1. Microbiota intestinal en la infección por SARS-CoV-2</b> .....	46
<b>5.3.2. Disbiosis intestinal y respuesta inflamatoria sistémica</b> .....	50
<b>5.3.3. Microbiota intestinal en casos graves de COVID-19</b> .....	51
<b>5.3.4. Excreción fecal del SARS-CoV-2</b> .....	54
<b>6. Diseño metodológico</b> .....	55
<b>7. Conclusiones</b> .....	57
<b>8. Referencias bibliográficas</b> .....	59

## **Dedicatoria**

Dedico el presente trabajo investigativo a:

**Dios:** Por brindarme la vida, salud y la sabiduría necesaria para lograr culminar mis estudios universitarios.

**Padres:** Quienes me apoyaron todo el tiempo tanto moral y espiritual para continuar con las dificultades que se presentaron en el transcurso de la carrera

**Personal docente:** Por ser los guías necesarios para ir por el camino correcto de esta investigación y que siempre compartieron conmigo y el resto de estudiantes, sus grandes conocimientos y experiencia.

## **Agradecimientos**

A mi hermana Yamali Hernandez Mendoza por haberme apoyado a lo largo de la carrera que sin duda manejo un papel decisivo en mi superación como profesional de la salud.

Al Instituto Politécnico de la Salud “Dr. Luis Felipe Moncada” de la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, Managua (UNAN-MANAGUA) por ser el centro de educación donde me formé como profesional de la salud.

A todos los que fueron un apoyo considerable e imprescindible en el transcurso de mi carrera y para el desarrollo posterior de este seminario de graduación.

;;;A todos muchas gracias!!!

## Resumen

La COVID 19 es una enfermedad respiratoria ocasionada por el SARS-CoV-2, de la misma familia del SARS-CoV causante del SARS. En el tracto respiratorio, el SARS-CoV-2 infecta las células alveolares al unirse a los receptores de la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE-2). Curiosamente, estos receptores también se expresan abundantemente en la superficie de los enterocitos, donde desempeñan un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis de la microbiota y la inflamación de la mucosa.

Se realizó un estudio cualitativo documental de tipo metasíntesis con el objetivo de analizar la asociación entre la microbiota intestinal y la infección por SARS-CoV-2 basado en la consulta de artículos científicos publicados entre los años 2020-2021. Se documentaron 5 estudios a nivel mundial con predominio del sexo femenino, edad media de 55 años con comorbilidades asociadas como: Diabetes mellitus, Insuficiencia renal y Obesidad. Los géneros bacterianos identificados en la microbiota intestinal fueron variables con un aumento de patógenos asociados a la gravedad como: Coprobacillus, Clostridium ramosum, Clostridium hathewayi, o bien patógenos oportunistas como: Bacteroidetes, Actinomyces viscosus, Bacteroides nordii, Bacteroides caccae, Streptococcus clase Bacilli, Streptococcus infantis, Morganella morgani, y disminución de especies propias de la microbiota como: Bacteroides dorei, Bacteroides thetaiotaomicron, Bacteroides massiliensis, Bacteroides ovatus, Lachnospiraceae bacterium 5\_1\_63FAA, Clostridium leptum, Bifidobacterium adolescencia, Faecalibacterium prausnitzii, Eubacterium rectale.

Los métodos diagnósticos utilizados en el estudio de la microbiota intestinal fueron métodos de extracción como PureFood de Maxwell RSC, kit QIAamp Viral RNA Mini, Kit DNeasy PowerSoil Pro, métodos de purificación como Kit de autenticación y OGM PureFood de Maxwell RSC (Maxwell® RSC), Instrumento Maxwell® RSC 48, métodos de amplificación como RT-qPCR, las bibliotecas se organizaron mediante el Kit Flex ADN, Entre los mecanismos de interacción entre la microbiota intestinal y el SARS-CoV-2 se encuentran los niveles de citocinas y los marcadores inflamatorios, lo cuales sugieren que el microbioma intestinal que el microbioma intestinal está involucrado en la magnitud de la gravedad.

Managua, 11 de marzo del 2022

### *Valoración del tutor*

El presente seminario de graduación con el subtema “*Papel de la microbiota intestinal y la infección por SARS-CoV-2 en humanos, a partir de estudios realizados a nivel mundial*”, contiene información científica actualizada, siendo un valioso aporte bibliográfico sobre esta temática de gran importancia para la salud pública.

Por lo antes expuesto, a través de la presente y en calidad de tutora, hago constar que el documento presentado por los bachilleres ***Br. Darwin Antonio Hernández Mendoza*** y ***Maydeling Amparo Orozco Ortiz***, reúne los requerimientos establecidos para ser presentado ante el comité de evaluación del Departamento de Bioanálisis Clínico del Instituto Politécnico de la Salud, POLISAL, UNAN-Managua.

---

MSc. Kenia Lizeth García Rosales  
Departamento de Bioanálisis Clínico  
Tutora

## 1. Introducción

La COVID 19 es una enfermedad respiratoria ocasionada por el SARS-CoV-2, de la misma familia del SARS-CoV causante del SARS, tras su aparición a finales del 2019 en Wuhan provincia de Hubei, China, se ha diseminado a nivel mundial y aunque especialmente se le relaciona con insuficiencia respiratoria también hay casos donde aparecen síntomas gastrointestinales en particular en etapas críticas de la infección, en las primeras investigaciones dirigidas a ese punto diana han logrado determinar la presencia de ARN en heces. Cañete et al (2020), expone que el SARS-CoV-2 se ha detectado en sangre y heces, de las heces de pacientes se ha podido aislar virus viables, aunque no está bien establecida la transmisión y diseminación a través de la vía fecal.

La microbiota intestinal en general ha cumplido y cumple con una serie de funciones necesarias para el bienestar humano, en esencia esa interacción simbiótica entre el ser humano y las bacterias que forman parte del componente intestinal también ha sido objeto de estudio en los cuales se ha determinado la capacidad inmunomoduladora de la microbiota y la influencia en la respuesta inmunológica.

La comprensión actual de la patogénesis del SARS-CoV-2 postula una hiperactivación rápida e intensa del sistema inmunológico, lo que resulta en una enfermedad crítica y mortalidad. Los datos en evolución sugieren que un estado de inflamación crónica o una activación inicial del sistema inmunitario podría influir en el curso de la COVID-19 más que los efectos citopáticos directos del SARS-CoV-2. Además, se ha observado que un subgrupo de pacientes desarrolla síntomas autoinflamatorios (como la enfermedad similar a Kawasaki en niños y el síndrome inflamatorio multisistémico) mucho después de la eliminación del virus SARS-CoV-2 del cuerpo, lo que sugiere una desregulación inmunitaria (Hussain et al, 2021).

Aproximadamente la mitad de los pacientes con COVID-19 desarrollan síntomas gastrointestinales, que a menudo preceden a los síntomas respiratorios. En el tracto respiratorio, el SARS-CoV-2 infecta las células alveolares al unirse a los receptores de la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE-2). Curiosamente, estos receptores también se expresan abundantemente en la superficie de los enterocitos, donde desempeñan un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis de la microbiota y la inflamación de la mucosa (Hussain et al, 2021).

## 2. Justificación

La reciente aparición del nuevo y patógeno SARS-CoV-2 en Wuhan, provincia de Hubei (China) y su rápida propagación nacional e internacional plantearon una emergencia sanitaria mundial que actualmente se desarrolla y que prácticamente compite con la gripe de 1918. El actual coronavirus es el causante de la COVID-19, aunque ya se habían identificado 2 especies de coronavirus antes del 2000, después de ese año se encontraron 3 nuevas especies, causando 3 brotes infecciosos (SARS, MERS y actualmente la COVID-19).

A finales del 2019, los conocimientos sobre el SARS-CoV-2 eran prácticamente nulos, y con la evolución precipitada del brote se vio la necesidad de investigar con esmero los mecanismos fisiopatológicos con los que se establecía el COVID-19 y la forma en que evolucionaba hasta producir la muerte en el paciente. Fue así como se dieron los primeros pasos en el estudio del SARS-CoV-2 descubriendo una interacción entre la gravedad y la microbiota intestinal.

Hoy en día la investigación mundial sobre la microbiota intestinal ha aumentado nuestro conocimiento en el campo de las enfermedades crónicas e infecciosas y es útil para abordar los desafíos que se encuentran en el manejo de pacientes con COVID-19 con enfermedades gastrointestinales asociadas.

En el presente trabajo investigativo se documentan los estudios realizados sobre el papel de la microbiota intestinal en pacientes con COVID-19 a nivel mundial, además se enumeran los géneros bacterianos identificados en la microbiota intestinal de pacientes con COVID-19 en los estudios realizados en el mundo, se explican los métodos de detección utilizados en los estudios documentados y los mecanismos de interacción entre la microbiota intestinal y SARS-CoV-2.

Identificar los mecanismos de interacción entre la microbiota intestinal y SARS-CoV-2. da a conocer las características básicas y la relación que existe entre el SARS-CoV-2 y la microbiota intestinal, un análisis de sus mecanismos de interacción y la capacidad inmunomoduladora de la microbiota intestinal, así mismo, se va a proveer información epidemiológica, científica y de interés social que permitirá fortalecer los conocimientos sobre

el manejo clínico de pacientes durante y después de la infección por COVID-19. De la misma manera, la investigación servirá de base teórica, científica y práctica para futuros estudios.

Los avances en materia de salud son importantes porque permiten un abordaje integral de las enfermedades y con ello una respuesta inmediata y efectiva. El conocimiento de la relación existente entre la microbiota intestinal y el SARS-CoV-2 permitirá dirigir nuestra atención a ese sistema olvidado (microbiota intestinal) que ejerce una enorme influencia en la respuesta inmunológica de los pacientes.

### **3. Objetivos**

#### **3.1. Objetivo general**

Analizar el papel de la microbiota intestinal en la infección por SARS-CoV-2, en humanos a partir de estudios realizados a nivel mundial.

#### **3.2. Objetivos específicos**

1. Documentar los estudios realizados sobre el papel de la microbiota intestinal en pacientes con COVID-19 a nivel mundial.
2. Enumerar los géneros bacterianos identificados en la microbiota intestinal de pacientes con COVID-19 en los estudios realizados en el mundo.
3. Explicar los métodos de detección utilizados en los estudios documentados.
4. Identificar los mecanismos de interacción entre la microbiota intestinal y SARS-CoV-2.

## 5. Desarrollo del sub tema

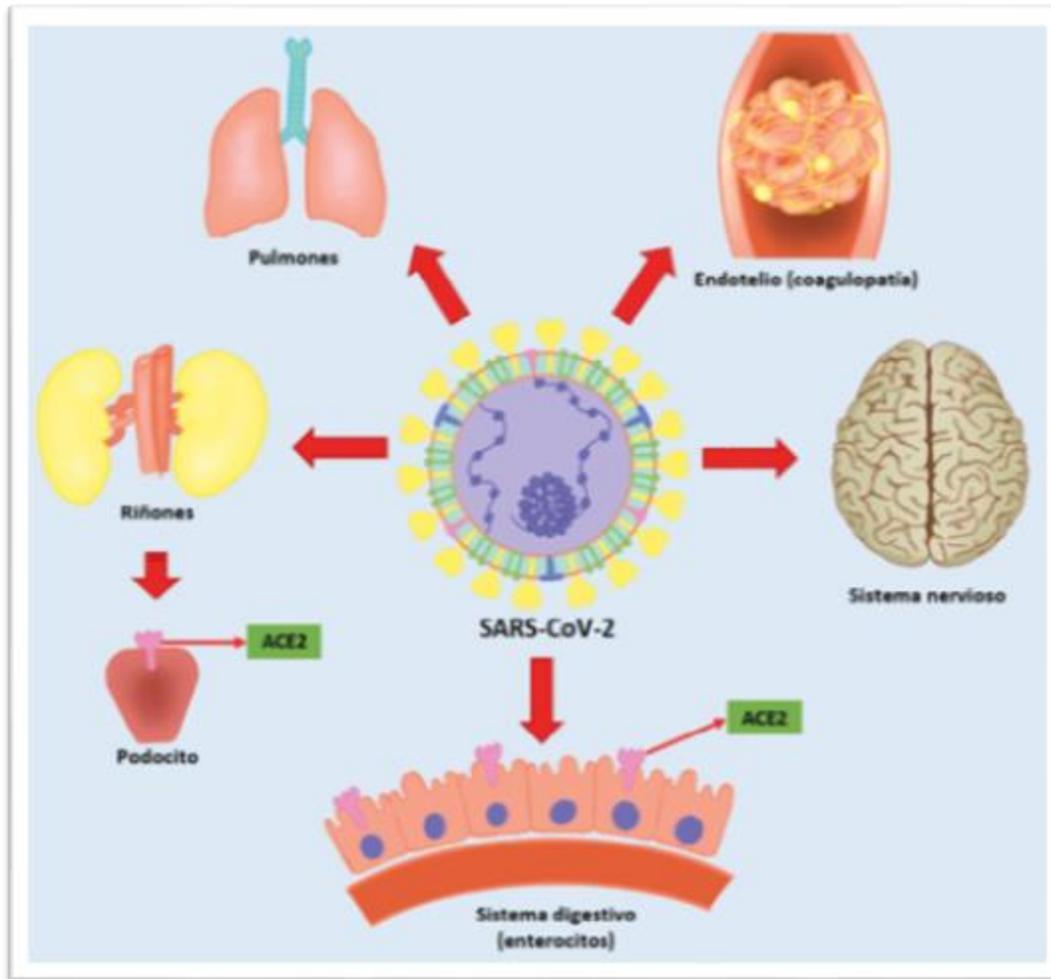
### 5.1. SARS-CoV-2

La enfermedad por el coronavirus de 2019 (COVID-19) es causada por el coronavirus del síndrome respiratorio agudo grave de tipo 2 (SARS-CoV-2), un coronavirus de reciente aparición que se identificó por vez primera en Wuhan, provincia de Hubei (China), en diciembre de 2019. EL SARS-CoV-2 es un virus de ARN monocatenario de hebra positiva que es contagioso para los seres humanos. Es el sucesor del SARS-CoV-1, la cepa que causó el brote epidémico de SRAS entre 2002 y 2004 (OMS, 2021).

Los coronavirus son agentes infecciosos frecuentes en animales y humanos. En humanos, los coronavirus pueden causar desde resfriados comunes (HCoV-NL63, HCoV-229E, Beta-CoV1 y HCoV-HKU1), hasta las enfermedades graves mencionadas (SARS y MERS) (Santos, Cortés, Vallejo y Reyes, 2021).

Los síntomas de COVID-19, varían dependiendo de si se trata de una forma leve, moderada o severa de la enfermedad. En casos de COVID-19 leve los síntomas pueden incluir alzas térmicas, tos seca, malestar general, mialgias, anosmia y ageusia; algunos pacientes tienen síntomas gastrointestinales, como anorexia, náuseas, vómitos y diarrea. Los casos graves de COVID-19 se producen sobre todo en pacientes con enfermedad crónica de base como ser patología cardiovascular, diabetes mellitus, enfermedad renal crónica y obesidad entre otros; sin embargo, también se han reportado en pacientes sin comorbilidad de cualquier edad. Estos pacientes pueden tener complicaciones graves como el síndrome de distrés respiratorio agudo (SDRA) con disnea e hipoxemia, linfopenia, también pueden existir trastornos del sistema nervioso central o periférico, falla renal, insuficiencia cardiaca, falla hepática, coagulopatías, y shock (Arandia y Antezana, 2020).

**Figura 1.** Infección primaria y evolución de COVID-19. En la figura se evidencian múltiples órganos que pueden ser afectados por SARS-CoV-2, debido a la presencia de receptores de la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2) en distintos órganos, incluyendo pulmones, riñones, neuronas y enterocitos entre otros.



**Fuente:** Arandía, J, y Antezana, G. (2020). SARS-CoV-2: estructura, replicación y mecanismos fisiopatológicos relacionados con COVID-19. *Gaceta Médica Boliviana*, 43(2), 170-178.

### 5.1.1. Genoma

El genoma de SARS-CoV-2 está formado por una única cadena de RNA monocatenario de polaridad positiva (+ssRNA) de aproximadamente 30.000 pares de bases. Esta cadena de RNA se asemeja, estructuralmente a un RNA mensajero (RNAm) de células eucarióticas, ya que, presenta un capuchón metilado (cap) en el extremo 5' y una cola poliadenilada (poli-A)

en el extremo 3', lo que le da un gran parecido a los RNAm de la célula huésped. Sin embargo, a diferencia de los RNAm eucarióticos, este genoma viral contiene al menos seis marcos abiertos de lectura (ORF). El genoma de SARSCoV-2 se puede dividir en tres tercios. Los dos primeros tercios (más cerca del extremo 5') codifican para el gen de la replicasa viral. Este gen está constituido por dos ORF (ORF 1a y ORF 1b), los que, al comienzo de la infección, serán traducidos directamente en dos poliproteínas de gran tamaño llamadas pp1a y pp1ab. Estas poliproteínas posteriormente serán procesadas proteolíticamente para generar 16 proteínas no estructurales (nsps), las cuales estarán implicadas en la replicación del genoma viral y en la transcripción de RNAm subgenómicos (sgRNAs). El último tercio del genoma (más cerca del extremo 3') codifica los genes de las 4 proteínas estructurales principales (proteína (S), proteína (M), proteína (E) y proteína (N) y los genes de las proteínas accesorias (proteína (HE), 3, 7a, entre otras) (Pastrian, 2020).

**Figura 2.** Organización genética de SARS-CoV-2. Esquema del genoma RNA monocatenario de polaridad positiva (+ssRNA) de SARS-CoV-2. Hacia el extremo 5', se codifica el gen de la replicasa viral por medio de ORF 1a y ORF 1b para la traducción de las poliproteínas pp1a y pp1ab. Hacia el extremo 3', se codifican los genes de las 4 proteínas estructurales principales (S), (M), (E) y (N) (en verde) y las de las proteínas accesorias (en azul).



**Fuente:** Pastrian, G. (2020). Bases Genéticas y Moleculares del COVID-19 (SARS-CoV-2). Mecanismos de Patogénesis y de Respuesta Inmune. *Revista internacional de odontostomatología*, 14 (3), 331-337.

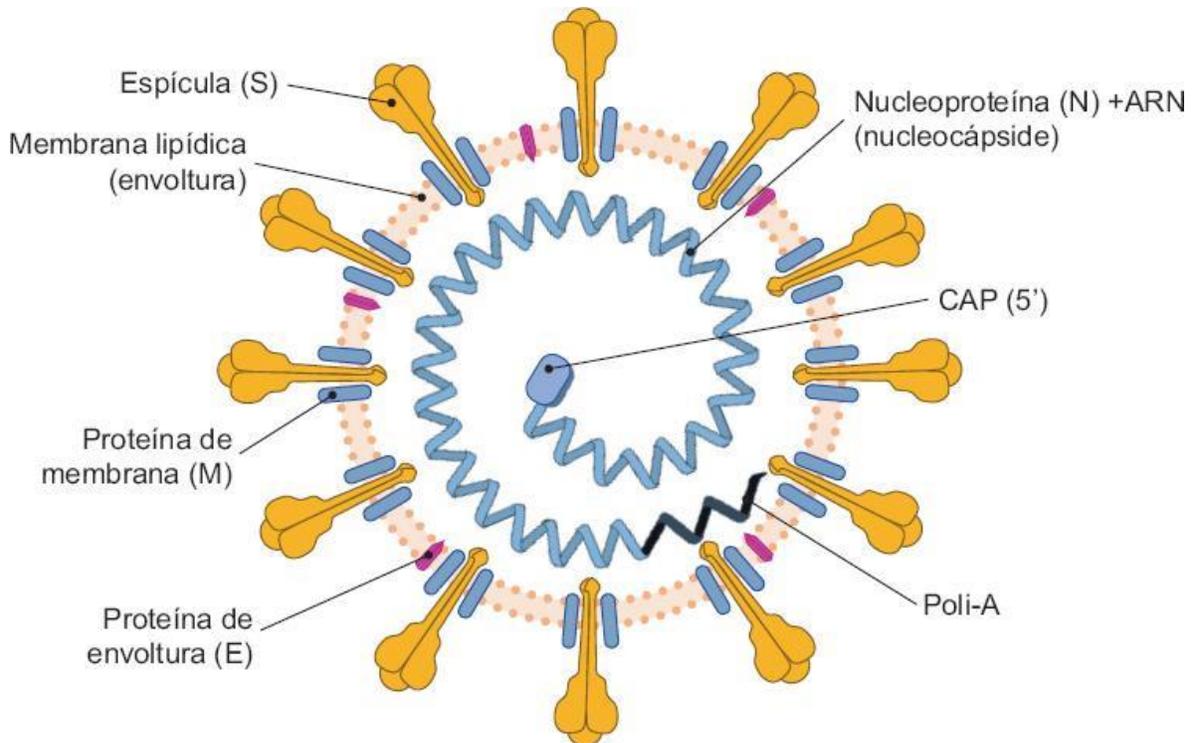
### 5.1.2. Estructura

Se reconocen cuatro géneros de coronavirus: *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus* y *Deltacoronavirus*. El examen genealógico del SARS-CoV-2 reveló que pertenece al coronavirus del género betacoronavirus.

Los coronavirus reciben su nombre debido al aspecto que presentan sus viriones al microscopio electrónico, semejante a una corona solar (con proyecciones de superficie)

gracias a sus proteínas de superficie. Estructuralmente los coronavirus son virus esféricos que miden entre 80 a 160 nanómetros de diámetro, con una envoltura de bicapa lipídica y que contienen genoma de ARN monocatenario (ssRNA) de polaridad positiva de entre 27 y 30 kilobases de longitud. El virus SARS-CoV-2 codifica 5 proteínas estructurales, las cuales están codificadas dentro del extremo 3' del genoma viral (Arandia y Antezana, 2020).

**Figura 3.** Diagrama esquemático del virión de SARS-CoV-2.



**Fuente:** Santos, G, Cortés, P, Vallejo, V, y Reyes, J. (2021). SARS-CoV-2: generalidades, origen y avances en el tratamiento. *Gaceta médica de México*, 157(1), 88-93.

### **Glucoproteína S (espiga)**

La glucoproteína S trimérica es una proteína de fusión de clase I y media la unión al receptor del huésped. La glucoproteína S es escindido por una proteasa similar a la furina de la célula huésped en dos polipéptidos separados denominados S1 y S2. S1 constituye el gran dominio de unión al receptor de la proteína S, mientras que S2 forma el tallo de la molécula espiga (Arandia y Antezana, 2020).

La subunidad S1 presenta un dominio N-terminal, un dominio C-terminal y un dominio de unión al receptor conservado (RBD) que contiene un núcleo y un motivo de unión al receptor (RBM). Esta subunidad media la unión al receptor ACE 2, donde los residuos de aminoácidos como Lys317 y Phe486 del dominio RBD podrían ser claves para esta interacción. Por otro lado, la subunidad S2 posee en su estructura un dominio péptido de fusión (FP), dominios de repetición heptad-1 y -2 (HR1, HR2) y un dominio transmembrana (TM), que le permiten la fusión de las membranas viral y celular. Además, presenta una gran superficie mutada, con cuatro insertos nuevos en la proteína; de los cuales, tres se ubican en el primer dominio NTD, mientras que el cuarto se ubica inmediatamente antes del sitio de escisión S2 y dentro de la interfaz de interacción de homo-trimerización. Asimismo, el dominio RBD no está afectado por estos insertos, pero es la región más mutada con potenciales alteraciones en su función de unión a ACE 2 (Lam et al, 2021).

### **Proteína de Envoltura (E)**

Presenta gran identidad con las secuencias de otros coronavirus; sin embargo, existen características distintivas como la sustitución de residuos de glutamato, glutamina o aspartato por arginina en la posición y el reemplazo de la diada Ser-Phe por Thr-Val en las posiciones 55-56. Esta proteína es la más pequeña de las cuatro proteínas estructurales, con 76 aminoácidos de longitud. Su estructura posee un extremo amino hidrófilo corto cargado negativamente que consta de 7 a 12 aminoácidos, seguido de un dominio transmembrana hidrófobo (TMD) grande de 25 aminoácidos, y termina con un extremo carboxilo hidrófilo largo de carga variable. La región hidrófoba de la TMD contiene una hélice  $\alpha$  anfipática que se oligomeriza para formar un poro conductor de iones en las membranas; una parte del TMD consta de dos aminoácidos neutros no polares, Val y Leu, que confieren una fuerte hidrofobicidad a la proteína. El extremo C-terminal también exhibe cierta hidrofobicidad, pero menos que el TMD debido a la presencia de un grupo de aminoácidos básicos cargados positivamente, además contiene un residuo de prolina conservado centrado en un motivo  $\beta$ -coil- $\beta$ , que probablemente funciona como una señal de dirección hacia el complejo de Golgi (Lam et al, 2021).

### **Proteína N (nucleocápside)**

Se compone de dos dominios separados, un dominio N-terminal y un dominio C-terminal, ambos capaces de unirse al ARN in vitro, pero cada dominio utiliza diferentes mecanismos para unirse al ARN. La proteína N también está muy fosforilada, y se ha sugerido que la fosforilación desencadena un cambio estructural que mejora la afinidad por el ARN viral versus el no viral. La proteína N se une al genoma viral en una conformación de tipo perlas en una cuerda (Arandia y Antezana, 2020).

### **Hemaglutinina-esterasa (HE)**

Está presente en un subconjunto de betacoronavirus. La proteína actúa como una hemaglutinina, se une a los ácidos siálicos en las glucoproteínas de superficie y contiene actividad acetil-esterasa. Se cree que estas actividades mejoran la entrada de células mediadas por la proteína S y la propagación del virus a través de la mucosa (Arandia y Antezana, 2020).

### **Proteínas accesorias**

Las proteínas accesorias del SARS-CoV-2 son expresadas por los genes ORF3a, ORF3b, ORF6, ORF7a, ORF7b, ORF8, ORF9a, ORF9b y ORF10. Varias de estas proteínas tienen funciones aún desconocidas, se sospecha que no intervienen en la replicación viral, pero pueden tener roles importantes en la patogénesis viral (Lam et al, 2021).

#### **5.1.3. Ciclo de replicación**

Después del ingreso del virus a la célula huésped, por la vía endocítica, se requiere acidificación endosómica, es decir una disminución de pH mediada por lisosomas, permitiendo la unión de la membrana del endosoma con la envoltura viral, liberando su nucleocápside al citoplasma.

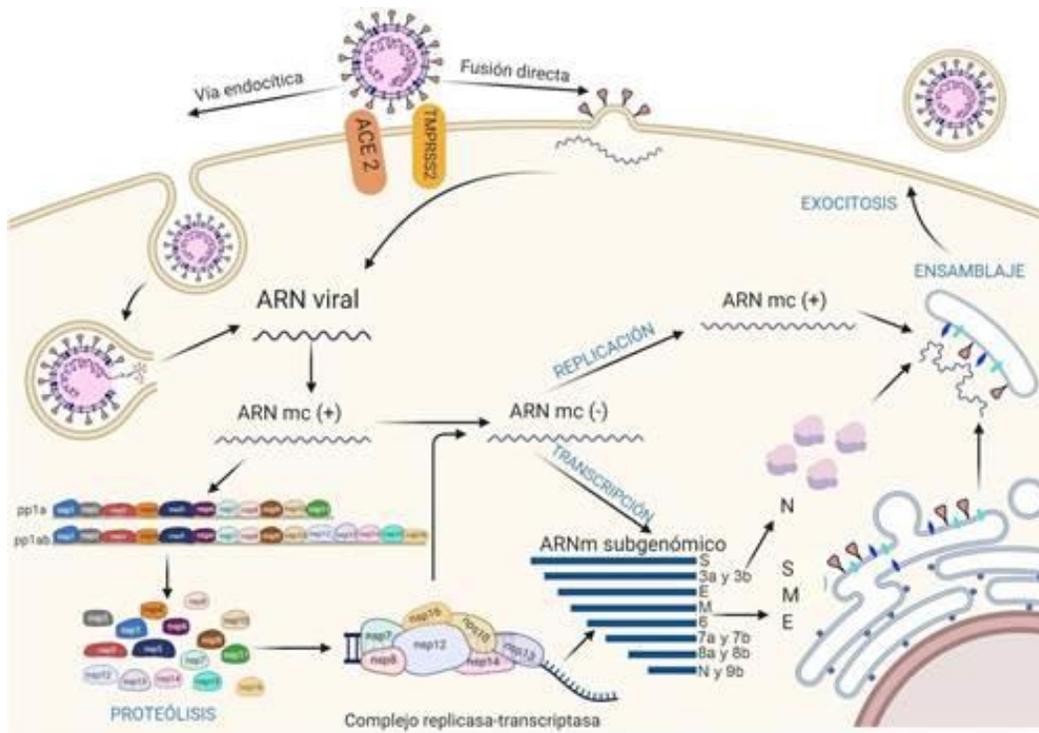
El ARN del virus en las regiones ORF1a y ORF1b actúa como un ARNm donde se transcribe directamente el gen de la replicasa viral con la maquinaria de la célula huésped, traduciéndose en las poliproteínas PP1a y PP1ab. Estas se escinden por las proteasas tipo papaína (PLpro; correspondiente a Nsp3) y tipo 3C (3CLpro o Mpro; correspondiente a Nsp5) para formar las 16 proteínas no estructurales (Nsps). A continuación, las proteínas no estructurales se

reorganizan en vesículas de doble membrana a partir del retículo endoplasmático (RE), y se ensamblan en la región perinuclear, en el complejo replicasa-transcriptasa (RTC), creando un entorno adecuado para la síntesis de ARN de sentido negativo (-) a través de la replicación y la transcripción, de manera que replica y sintetiza un conjunto de ARNm subgenómicos (sgARN) (Lam et al, 2021).

Los ARN subgenómicos se sintetizan combinando longitudes variables del extremo 3' del genoma con la secuencia líder 5' necesaria para la traducción. Estos ARN subgenómicos (-) se transcriben en ARNm subgenómicos (+), que codifican a las proteínas estructurales S, M, E, N y las accesorias (hacia el extremo 3'). El ARN genómico viral recién sintetizado se une a la proteína N originando la nucleocápside. Las proteínas S, M, E y las accesorias, expresadas a partir de los sgARN, son sintetizadas en las membranas del RE y luego transportadas al complejo de Golgi para ser ensambladas con la nucleocápside, produciendo nuevas partículas víricas; que, por medio del sistema de transporte de vesículas, viajarán hasta la superficie, liberándolo por exocitosis. Como ya se mencionó anteriormente, el SARS-CoV-2 utiliza como receptor a la ACE 2, la cual está expresada en diferentes células del sistema vascular, sistema nervioso central, ojos, vías aéreas superiores, corazón, pulmones e intestino; siendo más vulnerables los últimos tres (Lam et al, 2021).

**Figura 4.** Mecanismo de interacción y patogénesis del SARS-CoV-2.

Entrada del SARS-CoV-2 a través de 2 vías: endocitosis (a la izquierda) y fusión directa (a la derecha). El ARN genómico ingresa a la célula y el ARN monocatenario en sentido positivo (ARN mc +) se traduce en las poliproteínas pp1a y pp1ab a partir de las regiones ORF 1a y ORF 1ab. Posteriormente, un proceso de autoclivaje por 3CLpro y Mpro, dará lugar a las 16 proteínas no estructurales (Nsp), que formarán el complejo replicasa transcriptasa (RTC), que producirá ARN monocatenario de polaridad negativa a partir de la cadena positiva; que se asociará con la proteína de nucleocápside. Por otra parte, el complejo RTC, sintetizará ARN subgenómico (ARN sg) que codificarán las proteínas S, M y E, ensambladas en retículo endoplasmático antes de ser transportadas al compartimiento RE-Golgi, donde se asociará con el nuevo ARN genómico y la proteína N. Finalmente se exportará en forma de vesículas para la posterior liberación del nuevo virus.



**Fuente:** Lam, E, León, A, León, K, Llamo, G, López, R, Luzuriaga, Mendoza, A, y Huamán, J. (2021). Bases moleculares de la patogénesis de Covid-19 y estudios in silico de posibles tratamientos farmacológicos. *Revista de la Facultad de Medicina Humana*, 21(2), 417-432.

#### 5.1.4. Mecanismos patogénicos

Según la literatura publicada y las observaciones clínicas de pacientes con COVID-19, se han propuesto hipótesis razonables sobre la patogénesis de la infección por SARSCoV-2 en humanos. El virus puede acceder al tracto respiratorio a través de las membranas mucosas, especialmente la nasal, orofaríngea y laríngea, y luego ingresar a los pulmones por continuidad. Posteriormente, ingresa a la sangre desde los pulmones causando viremia, y así, adquiere acceso y ataca a todos los órganos que expresan ACE2. ACE2, el receptor identificado como puerta de entrada para SARS-CoV-2, es una enzima adherida a la membrana celular de células ubicadas en el cerebro, corazón, arterias, endotelio respiratorio, pulmones, específicamente en sus células alveolares tipo II (AT2, por sus siglas en inglés), hígado, intestinos, riñones y testículos. Su función principal es reducir la presión arterial al catalizar la escisión de angiotensina II (un péptido vasoconstrictor) en angiotensina 1-7 (un vasodilatador) (Olivas, 2020).

La proteína (S) de SARS-CoV-2 posee dos subunidades (S1 y S2). La subunidad S1 es la que interacciona y se une al receptor ACE2 por medio del dominio de unión al receptor (RBD), mientras que, la subunidad S2 determina la fusión de la membrana del virus con la de la célula huésped. Para que el virus complete la entrada en la célula hospedera, la proteína (S) debe ser cortada o escindida por una enzima proteasa (TMPRSS2). La escisión de la proteína (S) ocurre en 2 diferentes posiciones de la subunidad S2, esto contribuye a la separación de la unión RBD de la subunidad S1 con el receptor ACE2 y a la posterior fusión de las membranas, facilitándose así, la entrada del virus mediante endocitosis (Patrian, 2020).

El SARS-CoV-2 se une a toda célula corporal que expresa ACE2 y TMPRSS2 en su superficie, causando una respuesta inflamatoria sistémica. Esta se inicia con una tormenta de citocinas, la cual consiste en una liberación de grandes cantidades de citocinas pro inflamatorias (IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, IL-18, IL-33, TNF- $\alpha$ , TGF $\beta$ , etc.) y quimiocinas (CCL2, CCL3, CCL5, CXCL8, CXCL9, CXCL10). Se trata de un violento ataque del sistema inmune, causando daño alveolar difuso, insuficiencia orgánica múltiple y muerte, en los casos graves de infección por SARS-CoV-2, al igual que ocurrió con SARS-CoV-1 y ocurre con MERS-CoV. La unión de SARS-CoV-2 a los receptores ACE2 ubicados en la superficie de las AT2 reviste especial importancia, ya que desencadena una cascada de inflamación en las vías respiratorias inferiores, ocasionando un síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA). La lesión característica de este síndrome, el daño alveolar difuso, ha sido encontrado en la mayoría de pacientes fallecidos por neumonía grave por COVID-19 (Olivas, 2020).

El SARS-CoV-2 no solo obtiene la entrada a las células pulmonares a través de ACE2. Regula de forma negativa su expresión en la superficie de estas células, a tal grado que la enzima se torna incapaz de ejercer sus efectos protectores sobre los órganos corporales. La regulación negativa de la expresión de ACE2 en las células pulmonares, conlleva a la acumulación sin oposición de angiotensina II y a la activación local del sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA). Se ha postulado, pero no probado, que esta actividad no controlada de angiotensina II puede ser en parte responsable de la lesión orgánica en COVID-19, conllevando a lesión pulmonar aguda, remodelación desfavorable del miocardio, vasoconstricción periférica y permeabilidad vascular aumentada. Mientras que la activación

local del SRAA puede modular las lesiones pulmonares provocadas por la agresión viral (Olivas, 2020).

COVID-19 a lo largo de la pandemia se ha caracterizado por presentar complicaciones como la miocarditis, la enfermedad tromboembólica, la coagulación intravascular diseminada, la hipercitoquinemia y las complicaciones renales, además de la enfermedad respiratoria. Los mecanismos subyacentes de estas comorbilidades aún no se comprenden completamente. Sin embargo, es de hacer notar que los receptores ACE2 también son expresados ampliamente en las células endoteliales de múltiples lechos vasculares y de muchos órganos (Olivas, 2020).

Vargas et al (2020) reportó en abril de 2020, haber encontrado en una serie de pacientes con COVID-19, mediante estudio histopatológico, evidencia de daño en las células endoteliales de múltiples vasos sanguíneos y órganos, así como evidencia de infección viral directa en las mismas, inflamación endotelial difusa y apoptosis.

Estos hallazgos sugieren que la infección por SARS-CoV-2 facilita la inducción de endotelitis en varios órganos, como consecuencia directa de la infección viral y/o de la respuesta inflamatoria del huésped. La endotelitis por COVID-19 podría explicar la disfunción microcirculatoria sistémica y sus secuelas clínicas, al cambiar el equilibrio vascular hacia una mayor vasoconstricción, con una isquemia orgánica subsecuente, edema tisular y un estado proclive a la hipercoagulación (Olivas, 2020).

#### **5.1.5. Evasión de la respuesta inmunológica**

Para su ingreso a la célula hospedera, el SARS-CoV-2 requiere la unión de su espícula (proteína S) a la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE-2) en la membrana plasmática de la célula hospedera. Sin embargo, primero dicha proteína debe ser escindida por la proteasa transmembrana de serina 2 (*Transmembrane Protease Serine* - TMPRSS2) de la membrana de la célula hospedera en dos subunidades: S1, que contiene el dominio de unión de región (*Region Binding Domain* - RBD) a la ACE-2 y S2, que facilita la fusión viral al acercar las membranas viral y celular (Xia, Zhu, y Liu *et al*, 2020).

La proteína S del SARS-CoV-2 evade el reconocimiento del sistema inmune al estar cubierta por varios glucanos no inmunogénicos y al ocultar su RBD en sus regiones internas,

mostrándola únicamente ante la proximidad de ACE-2, y estabilizando dicha conformación con 2 moléculas de glucanos debajo de la RBD (Casalino, 2020).

Asimismo, el SARS-Cov-2 prefiere utilizar la proteína TMPRSS2 para su ingreso a la célula hospedera porque, además de su mayor rapidez, le permite evitar las proteínas antivirales endosomales. Ensayos clínicos realizados con cloroquina, fármaco que altera el pH endosomal y dificulta la entrada de virus por esta vía, no han tenido resultados positivos, a pesar de que evitan la replicación viral *in vitro*. Esto se debe a que la cloroquina actúa en células cultivadas con SARS-Cov-2 que expresan catepsina-L, mas no la proteína TMPRSS2 (Bedoya et al, 2020).

Al replicarse, el SARS-CoV-2 evade el sistema inmune mediante diversos mecanismos. Uno de ellos implica la conversión del retículo endoplasmático liso en vesículas que recubren al ARN viral, evitando que sea reconocido por los receptores reconocedores de patrones (Pattern Recognition Receptors - PRR) de las células del sistema inmune innato. Otros mecanismos involucran sus proteínas virales no estructurales (Non-Structural Protein - NSP), como el poro formado por NSP3 en la vesícula antes descrita que expulsa el ARN viral hacia el citosol para su traducción. Cabe resaltar a la NSP1, que inhibe la respuesta de interferón a varios niveles: 1) utiliza las proteasas de la célula hospedera para degradar cualquier ARN mensajero (ARNm) no viral, 2) ocluye la entrada del canal ribosomal, inhibiendo así la traducción del ARN no viral, y 3) se une a los canales de salida del núcleo celular, evitando la salida del ARNm al citoplasma. Aunque falta confirmar el rol del resto de estas proteínas, hay evidencia de que serían más potentes que sus contrapartes en otros coronavirus, incluyendo al SARS-CoV y al MERS-CoV (Bedoya et al, 2020).

Asimismo, algunas proteínas S, en lugar de anclarse a nuevos viriones, viajan a la membrana celular de la célula infectada, en donde activan canales iónicos y facilitan la formación de una cubierta lipídica que induce la fusión de varias células. De esta manera, se forman sincitios que permiten la expulsión de millones de viriones y la evasión del sistema inmune al fusionarse incluso con células de dicho sistema, como linfocitos. Esto podría explicar en parte la linfopenia observada en casos graves de COVID-19 (Zhang et al, 2021)

Por otro lado, se intenta encontrar una explicación fisiopatológica de los factores de riesgo conocidos para enfermedad severa. Un artículo reciente postula que la presencia de

autoanticuerpos contra las proteínas de la respuesta interferón tipo 1 (IFN-1), que incrementan con la edad, podrían estar implicadas en este riesgo. Además, se postula que el desarrollo de casos severos en pacientes mayores (inmunosenescencia) o con factores de riesgo (obesidad, diabetes mellitus, falla renal, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, tratamiento inmunosupresor, etc.) puede deberse a una dificultad para montar una respuesta inmune adaptativa de tipo Th1 (contra patógenos intracelulares) adecuada. En estos casos, puede generarse o por un estado proinflamatorio basal, con predominio de interleuquina 1 (IL-1), interleuquina 6 (IL-6) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) o por una inmunosupresión celular. Ello, junto con lo detallado anteriormente, facilita una gran replicación viral descontrolada (Bedoya et al, 2020).

#### **5.1.6. Métodos diagnósticos**

En caso de tener sospecha de una infección por SARS-CoV-2, causante de la COVID-19, las pruebas en orden de importancia son:

- Amplificación de ácido nucleico (NAAT), con la técnica de RT-PCR.
- Secuenciación viral: las pruebas para la detección de las secuencias del gen de la envoltura viral, de la ARN polimerasa viral y de la nucleoproteína han sido implementadas eficazmente para confirmación del virus y son útiles para mostrar mutaciones del genoma viral.
- Cultivo viral: no recomendada por motivos de bioseguridad.
- Estudios serológicos.

La prueba de RT-PCR en tiempo real está diseñada para la detección cualitativa de ácidos nucleicos de SARS-CoV-2 en muestras tanto del tracto respiratorio superior como del inferior, mediante hisopados nasofaríngeos, orofaríngeos, lavado broncoalveolar, aspirado bronquial o esputo. Es una técnica sensible y específica en muestras respiratorias y se realiza en todos los pacientes que cumplen con criterios clínicos de SARS-CoV-2. El algoritmo diagnóstico emplea varias secuencias del genoma viral para confirmar positividad para SARS-CoV-2 (Ramos, Carreto, Salcedo, 2020).

Los ensayos serológicos, por otro lado, son importantes para comprender la epidemiología de los coronavirus emergentes, incluida la carga y el papel de las infecciones asintomáticas.

Sólo en el 15% de los pacientes es detectable el ARN viral en suero; sin embargo, en los pacientes afectados que no amplifican el ARN viral, particularmente en la fase presintomática de la enfermedad, se puede demostrar retrospectivamente que han desarrollado una respuesta inmune. Se recomienda utilizar la serología para facilitar el diagnóstico de infecciones por SARS-CoV-2 cuando no se recolectó una muestra de hisopado apropiadamente o cuando los ensayos moleculares no se realizaron de manera satisfactoria (Ramos et al, 2020).

## **5.2. Microbiota intestinal**

La microbiota intestinal humana es un ecosistema muy dinámico y de alta complejidad, compuesta por cerca de 100 trillones de células microbianas con aproximadamente 9.9 millones de genes en su totalidad. En los últimos años, se ha estudiado ampliamente y se ha visto su intervención activa en forma importante con diversos procesos fisiológicos del huésped, al alterar su composición, diversidad y metabolismo se influye en el desarrollo y curso de diversas patologías intestinales y extraintestinales (Merino, Taracena, Díaz, y Rodríguez, 2021).

La formación de la microbiota es un proceso muy dinámico, el cual inicia desde la vida intrauterina, se ha demostrado la presencia de diversas bacterias de predominio intracelular en la placenta, las cuales se caracterizan por compartir taxonomía con las bacterias que formarán parte de la biota de la piel, vagina, cavidad oral y tracto gastrointestinal. En el líquido amniótico y en el meconio se ha encontrado material genético bacteriano relacionado con especies que componen el ecosistema de la microbiota. (Aagaard et al, 2014).

### **5.2.1. Composición**

Su composición, diversidad y metabolismo va cambiando a lo largo de las distintas etapas de la vida. El tipo de nacimiento y la atención neonatal proporcionada influye de manera importante en la composición de enterobacterias y bifidobacterias. Se ha visto que los niños que nacen por cesárea presentan una menor cantidad de bacterias y no colonización temprana por *bifidobacterias*, *bacteroidetes* y *Escherichia coli*, comparado con los que nacen vía vaginal. Inadecuadas condiciones de higiene favorecen colonización temprana por enterobacterias y exposición temprana a antibióticos –principalmente en unidades de

cuidados intensivos neonatales– la cual altera la cantidad y la diversidad de especies adquiridas al momento del nacimiento (Gómez y Acero, 2011).

La colonización dominante por *bifidobacterias* es otro de los múltiples beneficios descritos a la lactancia materna exclusiva durante los primeros meses de vida, ya que la presencia preponderante de esta especie bacteriana facilita el uso de glucanos, polisacáridos y oligosacáridos de la leche materna favoreciendo su digestión y adaptando el tracto gastrointestinal para la futura digestión de comida sólida, esto sucede gracias a señales bioquímicas producidas por las bacterias al llevar a cabo metabolismo de moléculas de la leche sin valor nutricional. Después, la diversidad de la microbiota se expande de manera acelerada los primeros cinco años de vida, en menor medida durante la adultez, y sufre una regresión importante después de los 60 años, donde la composición es representada en un 95% por *Firmicutes* y *bacteroidetes*, muy similar a la encontrada en los primeros meses de vida (Merino et al, 2021).

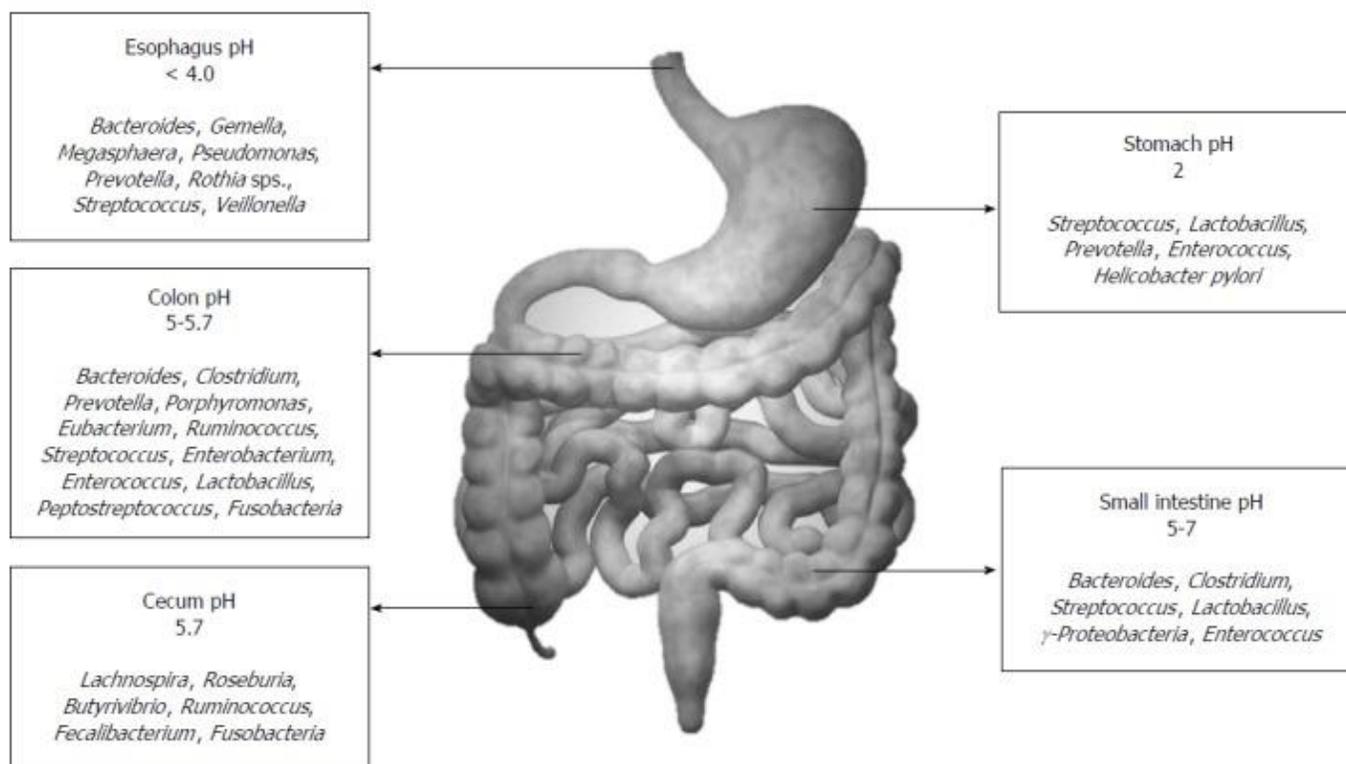
**Tabla 1.** Bacterias que componen la microbiota intestinal.

TABLA 1		
Principales divisiones o phyla del Dominio Bacteria que componen la microbiota del intestino humano.		
Phylum	Características	Géneros representativos
Firmicutes	Es una división de las bacterias que agrupa a más de 250 géneros, compuesta por bacterias Gram positivo de bajo contenido en Guanina y Citosina (G+C) en su DNA. Pueden tener forma bacilar o cocacea y se subdivide en dos clases taxonómicas: Bacilli y Clostridia.	<i>Ruminococcus</i> <i>Clostridium</i> <i>Peptostreptococcus</i> <i>Lactobacillus</i> <i>Enterococcus</i>
Bacteroidetes	Esta división incluye alrededor de 20 géneros bacterianos y está compuesta por 3 clases: Bacteroidia, Flavobacteria y Sphingobacteria	<i>Bacteroides</i>
Proteobacterias	Son el grupo o phylum más grande de las bacterias e incluye una amplia variedad de bacterias patógenas. Todos sus miembros son bacterias Gram negativo que poseen una membrana externa y lipopolisacradido. Está dividido en 6 clases: Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria, Gammaproteobacteria, Deltaproteobacteria, Epsilonproteobacteria y Zetaproteobacteria.	<i>Desulfovibrio</i> <i>Escherichia</i> <i>Helicobacter</i>
Actinobacteria	Es uno de los grupos dominantes del dominio bacteria. Está compuesto por bacterias Gram positivo de alto contenido G+C de su DNA de hábitat terrestre o acuático.	<i>Bifidobacterium</i> <i>Actinomyces</i>
Verrucomicrobia	Es un grupo o phylum reciente del dominio Bacteria y se han descrito unas pocas especies. Está formado por tres clases: Spartobacteria, Opitutae y Verrucomicrobiae.	<i>Verrucomicrobium</i>

**Fuente:** Mönckeberg, B, y Corsini, A. (2011). Microbiota intestinal, metabolismo y balance calórico. *Revista chilena de nutrición*, 38(4), 477-481.

La microbiota intestinal mantiene una relación simbiótica con la mucosa intestinal e imparte importantes funciones metabólicas, inmunológicas y protectoras del intestino en el individuo sano. La microbiota intestinal, que obtiene sus nutrientes de los componentes de la dieta del huésped y elimina las células epiteliales, es un órgano en sí mismo con una gran capacidad metabólica y una sustancial plasticidad funcional. Estas características del microbioma intestinal han cambiado rápidamente el enfoque de la investigación de la abundancia y diversidad de los miembros microbianos a los aspectos funcionales.

**Figura 5.** Distribución de la flora intestinal Normal



**Fuente:** Jandhyala, S. M., Talukdar, R., Subramanyam, C., Vuyyuru, H., Sasikala, M., & Nageshwar Reddy, D. (2015). Role of the normal gut microbiota. *World journal of gastroenterology*, 21(29), 8787–8803.

### 5.2.2. Funciones de la microbiota intestinal

Las enfermedades gastrointestinales son una causa importante de morbilidad y mortalidad alrededor del mundo. Involucran enfermedades inflamatorias crónicas como colitis ulcerativa y enfermedad de Crohn, además de afecciones infecciosas y funcionales como el síndrome de intestino irritable. El tratamiento ha sido de difícil manejo dada la ambigüedad y las múltiples teorías que rodean la etiología. Se han relacionado elementos psicosociales, cambios en la motilidad gastrointestinal, factores inmunológicos, genéticos y hace poco alteraciones en la flora intestinal. Esta microflora bacteriana es un tema complejo y olvidado que contribuye de manera importante no sólo en los procesos de degradación y absorción de sustratos de la dieta, sino que cumple funciones inmunológicas y protectoras en cada organismo. Conocer su composición, distribución y las múltiples acciones que cumple para mantener el equilibrio en el ecosistema gastrointestinal, resulta esencial para comprender su

participación en la prevención y tratamiento de trastornos inflamatorios y de la motilidad gastrointestinal (Gómez y Acero, 2011).

La microbiota intestinal ha pasado de considerarse un comensal acompañante, a considerarse un «órgano metabólico», con funciones en la nutrición, la regulación de la inmunidad y la inflamación sistémica. Los mamíferos que crecen libres de gérmenes (LG) tienen un desarrollo corporal anormal, con pared intestinal atrófica, corazón, pulmones e hígado de bajo peso y sistema inmune inmaduro con niveles bajos de inmunoglobulinas (Icaza, 2013).

La microbiota intestinal tiene enzimas que transforman a los polisacáridos complejos de la dieta, que el intestino humano no puede digerir ni absorber, en monosacáridos y ácidos grasos de cadena corta (AGCC), principalmente acético, propiónico y butírico. Los 2 primeros se absorben a la circulación portal y el tercero es empleado por los colonocitos como fuente de energía. Los AGCC pueden ser transportados al hígado para ser usados en la síntesis lipídica; de hecho, se estima que las calorías derivadas de esta digestión bacteriana constituyen alrededor del 10% de toda la energía que absorbemos (Turnbaugh et al, 2006).

La cantidad de AGCC en el colon y en la sangre son importantes para la inmunorregulación del hospedero. Algunos estudios reportan efectos positivos de los AGCC en pacientes con alteraciones inflamatorias del intestino, de hecho, dichos individuos tienen concentraciones mucho menores de AGCC. Además, parece ser que la microbiota es capaz de modular los genes que afectan la disposición de la energía en los adipocitos. Los microbios y los vertebrados evolucionaron juntos a través de miles de años, y el funcionamiento normal del sistema digestivo e inmunológico depende de la presencia de la microbiota simbiótica (Icaza, 2013).

A continuación, se detallan estudios documentados sobre la microbiota intestinal en pacientes con COVID-19, a partir de revistas científicas disponibles en páginas web.

**5.2.3. Estudios realizados sobre la microbiota intestinal en pacientes con COVID-19 a nivel mundial.**

<b>Autores /País</b>	<b>Título</b>	<b>Metodología</b>	<b>Universo</b>	<b>Edades</b>	<b>Sexo</b>	<b>Comorbilidades</b>	<b>Resultados</b>
Effenberg r, et al. (2020)  <b>Austria</b>	Faecal calprotectin (FC) indicates intestinal inflammation in COVID-19	PCR en tiempo real  RNeasy Power Microbiome Kit	N= 40 pacientes	No especificado	No especificado	No especificado	La concentración de FC se correlacionó significativamente con la concentración sérica de interleucina-6 (IL-6) $p < 0,001$ , pero no con la proteína C reactiva (PCR) o la ferritina. Se detectó SARS-CoV-2-ARN en heces de 12 de 40 (30%) pacientes con COVID-19.
Gu, et al (2020)  <b>China</b>	Alterations of the Gut Microbiota in Patients With Coronavirus Disease 2019 or H1N1 Influenza	RT-qPCR  Kit DNeasy PowerSoil Pro (Qiagen)  Secuenciación de la región V3-V4 del gen del ARN	Controles sanos (n = 30)  H1N1 (n = 24)	53,5 (43,8–60,3)  48,5 (33,3–66,8)  55,0	F 13/M 30  F 24/M 9  F 13/M 30	Hipertensión en grupos con H1N1 y en grupo con COVID-19	En comparación con los controles normales, los pacientes con COVID-19 tenían una diversidad bacteriana significativamente reducida; una abundancia relativa significativamente mayor de patógenos oportunistas, como <i>Streptococcus</i> , <i>Rothia</i> , <i>Veillonella</i> y <i>Actinomyces</i>

		ribosomal 16S con el Illumina MiSeq PE300.	COVID-19 (n = 30)	(48,0–62,0)			
Yeoh, et al (2021)	Gut microbiota composition reflects disease severity and dysfunctional immune responses in patients with COVID-19	RT-qPCR Kit QIAamp Viral RNA Mini. Kit de autenticación y OGM PureFood de Maxwell RSC	N= 100 Pacientes	No especificado	No especificado	No especificado	Varios comensales intestinales con potencial inmunomodulador conocido, como <i>Faecalibacterium prausnitzii</i> , <i>Eubacterium rectale</i> y bifidobacterias, estuvieron subrepresentados en los pacientes y permanecieron bajos en las muestras recolectadas hasta 30 días después de la resolución de la enfermedad. El microbioma intestinal está involucrado en la magnitud de la gravedad de COVID-19, a través de la modulación de las respuestas inmunes del huésped.
Zuo, et al. (2021)	Depicting SARS-CoV-2 faecal viral activity in	Secuenciación de metagenómica de escopeta de	N= 15 Pacientes	No especificado 55 años	Masc 7 Fem 8	Hipertensión Hepatitis B Obesidad Diabetes mellitus	Las muestras fecales con firma de alta infectividad del SARS-CoV-2 tuvieron mayores abundancias de especies bacterianas como <i>Collinsella</i>

<p><b>Hong Kong</b></p>	<p>association with gut microbiota composition in patients with COVID-19</p>	<p>ARN en extracciones virales fecales seriadas.</p>		<p>(IQR: 44–67)</p>		<p>Insuficiencia renal</p>	<p><i>aerofaciens, Collinsella tanakaei, Streptococcus infantis, Morganella morganiiy, Parabacteroides merdae, Bacteroides stercoris, Alistipes onderdonkii y Lachnospiraceae bacterium 1_1_57FAA.</i></p> <p>La microbiota intestinal de los pacientes con infección gastrointestinal activa por SARS-CoV-2 se caracterizó por el enriquecimiento de patógenos oportunistas y la pérdida de bacterias saludables.</p>
<p>Zuo, et al. (2020)</p> <p><b>Hong Kong</b></p>	<p>Alterations in Gut Microbiota of Patients With COVID-19 During Time of Hospitalization</p>	<p>RT-qPCR Kit QIAamp Viral RNA Mini.</p>	<p>N = 15 Pacientes</p>	<p>Media: 55 años Rangos: (44, 67.5)</p>	<p>Masc = 7 Fem = 8</p>	<p>Hiperlipidemia, úlceras duodenales Diabetes mellitus Insuficiencia renal Obesidad Epilepsia</p>	<p>La abundancia inicial de <i>Coprobacillus</i>, <i>Clostridium ramosum</i> y <i>Clostridium hathewayi</i> se correlacionó con la gravedad de COVID-19; hubo una correlación inversa entre la abundancia de <i>Bacteroides</i></p>

		Kit de autenticación y OGM PureFood de Maxwell RSC				Hepatitis Hígado graso	<i>dorei</i> , <i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> , <i>Bacteroides massiliensis</i> y <i>Faecalibacterium prausnitzii</i> (una bacteria antiinflamatoria) y la gravedad de la enfermedad. En el transcurso de la hospitalización, <i>bacteroides ovatus</i> , que regulan a la baja la expresión de la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2) en el intestino murino, se correlacionaron inversamente con la carga de SARS-CoV-2 en muestras fecales de pacientes.
--	--	--	--	--	--	------------------------	---

**5.2.4. Géneros bacterianos identificados en la microbiota intestinal de pacientes con COVID-19 en los estudios realizados en el mundo.**

<b>Género y especie</b>	<b>Referencia</b>	<b>Resultado</b>
<i>Coprobacillus</i>	Zuo, et al (2020)	<i>F. prausnitzii</i> tiene propiedades antiinflamatorias.
<i>Clostridium ramosum</i>		
<i>Clostridium hathewayi</i>		
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	Zuo, et al (2020)	
<i>Bacteroides dorei</i>	Zuo, et al (2020)	Especies de <i>Bacteroides</i> pueden tener un papel protector potencial en la lucha contra la infección por SARS-CoV-2 al dificultar la entrada del huésped a través de ACE2.
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>		
<i>Bacteroides massiliensis</i>		
<i>Bacteroides ovatus</i>		
<i>Lachnospiraceae bacterium 5_1_63FAA</i>	Zuo, et al (2020)	Simbiontes beneficiosos para la inmunidad del huésped.
<i>Eubacterium rectale</i>		
<i>Ruminococcus obeum</i>		
<i>Dorea formicigenerans</i>	Zuo, et al (2020)	
<i>Actinomyces viscosus</i>		
<i>Bacteroides nordii</i>		
<i>Alistipes onderdonkii</i>	Zuo, et al (2020)	<i>Las especies de Alistipes</i> son indol positivas, implicadas en el metabolismo del triptófano precursor de la serotonina y en el mantenimiento de la homeostasis inmune.
<i>Erysipelotrichaceae 2_2_44A</i>	Zuo, et al (2020)	<i>Erysipelotrichaceae</i> se ha implicado en trastornos relacionados con la inflamación del tracto gastrointestinal. Considerando la fuerte asociación de la abundancia basal de <i>Erysipelotrichaceae</i> con la gravedad de COVID-19.
<i>Collinsella aerofaciens</i>	Zuo, et al (2021)	Entre estas especies, <i>C. aerofaciens</i> y <i>M. morgani</i> se han asociado con infecciones oportunistas. <i>S. infantis</i> fue un
<i>Collinsella tanakaei</i>		
<i>Streptococcus infantis</i>		

<i>Morganella morganii</i>		colonizador abundante en el tracto respiratorio superior y cavidad oral.
<i>Parabacteroides merdae</i>	Zuo, et al (2021)	Géneros <i>Parabacteroides</i> , <i>Bacteroides</i> y <i>Lachnospiraceae</i> son conocidos productores de ácidos grasos de cadena corta (particularmente butirato), que juegan un papel crucial en aumentar la inmunidad del huésped. Las especies de <i>Alistipes</i> están implicadas en el mantenimiento de la homeostasis inmune intestinal.
<i>Bacteroides stercoris</i>		
<i>Alistipes onderdonkii</i>		
<i>Lachnospiraceae bacterium 1_1_57FAA</i>		
<i>Bacteroidetes</i>	Yeoh, et al (2021)	Relativamente más abundantes en pacientes con COVID-19 en comparación con individuos sin COVID-19.
<i>Actinobacteria</i>	Yeoh, et al (2021)	Disminuidos en pacientes con COVID-19
<i>Adlercreutzia equolifaciens</i>		
<i>Dorea formicigenerans</i>		
<i>Clostridium leptum</i>		
<i>Bifidobacterium adolescencia</i>		
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>		
<i>Eubacterium rectale</i>		
<i>Ruminococcus gnavus</i>	Yeoh, et al (2021)	Relativamente más abundantes en pacientes con COVID-19 en comparación con individuos sin COVID-19.
<i>Ruminococcus torques</i>		
<i>Bacteroides dorei</i>		
<i>Parabacteroides</i>		
<i>Sutterella wadsworthensis</i>		
<i>Bacteroides caccae</i>		
<i>Streptococcus clase Bacilli</i>	Gu, et al (2020)	El microbioma intestinal del grupo COVID-19 presentaron un aumento respecto a los grupos controles.
<i>Rothia</i>		
<i>Veillonella</i>		
<i>Erysipelatoclostridium</i>		
<i>Actinomyces</i>		
<i>Ruminococcaceae</i>	Gu, et al (2020)	
<i>Fusicatenibacter</i>		

<i>Anaerostipes</i>		El microbioma intestinal del grupo COVID-19 presentaron una disminución respecto a los grupos controles.
<i>Agathobacter</i>		
<i>Lachnospiraceae</i>		
<i>Grupo E. hallii</i>		

### 5.2.5. Microbiota intestinal e inmunidad

La microbiota intestinal ejerce un importante efecto sobre la respuesta inmune del humano. En 1989, Strachan mostró que la disminución en la carga microbiana debida a la elevación de los estándares de higiene en los países desarrollados podría conducir a un incremento de las enfermedades autoinmunes. La dieta y los efectos de esta en la microbiota intestinal y en la respuesta inmune se han postulado como posibles explicaciones para el incremento en la incidencia de enfermedades inflamatorias como el asma y la diabetes tipo 1 en los países desarrollados. Nuevos hallazgos sobre la microbiota intestinal y su capacidad inmunomoduladora coinciden con los datos epidemiológicos que conectan la obesidad y el asma o la obesidad y la diabetes tipo 1 (Icaza, 2013).

Clásicamente, el sistema inmunológico de los mamíferos consta de mecanismos innatos y adaptativos que protegen al huésped de los patógenos ambientales. Los mecanismos innatos funcionan independientemente de la exposición previa del huésped al agente infeccioso e incluyen barreras mecánicas (p. Ej., Piel, epitelio mucoso) y componentes celulares (p. Ej., Principalmente macrófagos y neutrófilos). A diferencia del sistema inmunológico innato, la base celular (p. Ej., Principalmente linfocitos B y T) y molecular de los mecanismos adaptativos se basa en el reconocimiento específico del agente invasor y, como la inmunidad innata, conduce a la generación de memoria inmunológica, que, es decir, una propiedad por la cual un individuo, después de entrar en contacto con un antígeno por primera vez, adquirió la capacidad de responder mejor y más rápidamente al reexponerse al mismo antígeno (Wolowczuk et al, 2008).

El requisito de una microbiota intestinal saludable para la homeostasis normal coloca al sistema inmunológico de la mucosa intestinal en una situación desafiante, ya que debe ser tolerante a los comensales beneficiosos y, sin embargo, prevenir el crecimiento excesivo de los patógenos residentes. Uno de los mecanismos más simples de protección antimicrobiana

es la presencia de la capa de moco de dos niveles, que mantiene a los microbios luminales alejados del contacto epitelial, predominantemente en el intestino grueso (Jandhyala et al, 2015).

La mucosa intestinal ejerce funciones de inmunidad adaptativa ya que su sistema inmune tiene la capacidad de responder a una infinidad de antígenos, pero también existe la inmunidad innata que es el reconocimiento de determinados antígenos, y que es heredada filogenéticamente desde las plantas hasta los vertebrados. Estos antígenos se han llamado patrones moleculares asociados a patógenos (PMAP) e incluyen lípidos, lipopolisacáridos (LPS) y lipoproteínas. Los PMAP son reconocidos por los receptores de reconocimiento de patrones. La interacción entre estos y los PMAP induce la producción de citocinas e interferones. Entre otros, los receptores de reconocimiento de patrones incluyen a los receptores tipo Toll (TLR), que son receptores transmembrana. Varios de los PMAP que son ligandos de los TLR contienen lípidos, indispensables para su actividad agonista, como los LPS bacterianos (endotoxinas bacterianas), ligandos de los TLR-4. Los LPS son componentes esenciales de la pared celular bacteriana. Aunque no son estrictamente factores de virulencia bacterianos, despiertan una intensa respuesta de la inmunidad innata. Los TLR se expresan en las células encargadas de la inmunidad innata, como macrófagos, células epiteliales, células endoteliales y adipocitos, y en el parénquima de algunos órganos, pero también en células de la inmunidad adaptativa, que incluyen a las células B, los mastocitos, las células T y las células dendríticas (CD), las cuales son clave para el inicio de la inmunidad adaptativa (Icaza, 2013).

Se cree que la penetración de la mucosa intestinal por patógenos que expresan genes de invasión se produce principalmente a través de células epiteliales especializadas, llamadas células M, que se encuentran en las placas de Peyer. Sin embargo, *Salmonella typhimurium* que son deficientes en genes de invasión codificados por *Salmonella* isla de patogenicidad 1 (SPI1) todavía pueden llegar al bazo después de la administración oral. Esto sugiere la existencia de una ruta alternativa para la invasión bacteriana, una que es independiente de las células M. Las CD abren las uniones estrechas entre las células epiteliales, envían dendritas fuera del epitelio y toman muestras directamente de las bacterias. Además, debido a que las CD expresan proteínas de unión estrecha como ocludina,

claudina 1 y zonula occludens 1, se conserva la integridad de la barrera epitelial (Rescigno, et al, 2001).

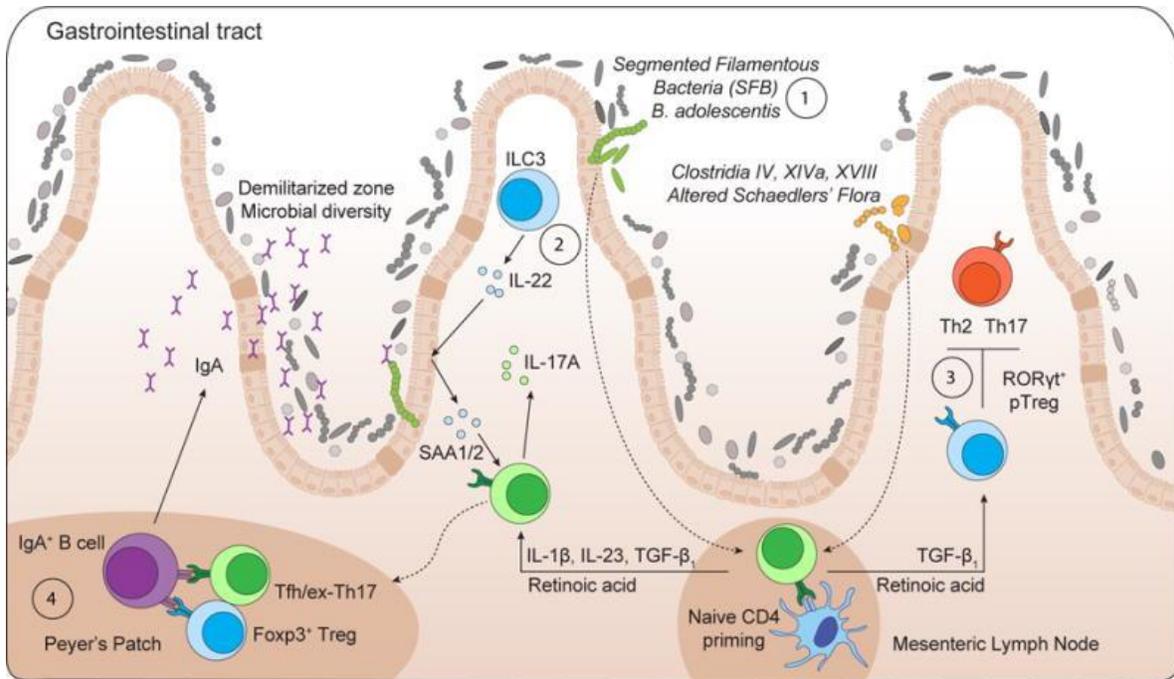
Cuando los LPS se unen a los TLR-4 se produce una respuesta inflamatoria intensa con daño al tejido blanco. Los LPS se detectan en la circulación de individuos sanos y sus niveles se incrementan después de la ingestión de alimentos ricos en energía (Amar et al, 2008).

Hasta hace poco se consideraba al tejido adiposo como un mero compartimento de almacenaje, sin embargo, el adipocito es una célula endocrina activa productora de adipocinas. En la obesidad, además del incremento del volumen del adipocito, el tejido adiposo está infiltrado de macrófagos. Estos tienen 2 subpoblaciones: M1, que producen citocinas inflamatorias, y M2, que generan productos antiinflamatorios. Los TLR promueven el fenotipo M1, con el consiguiente incremento de citocinas proinflamatorias (Icaza, 2013).

Parte del censo microbiológico intestinal es llevado a cabo por linfocitos T reguladores (Treg), lo cual es un proceso esencial para el desarrollo inmunológico y la expresión de FoxP3+ en los Treg, dicha interacción genera incremento en la síntesis de IgA y evita el sobrecrecimiento de ciertas bacterias filamentosas. La estimulación de las células plasmáticas incrementa la producción y el cambio de clase de IgA, lo cual favorece la maduración de las placas de Peyer (Belkaid & Harrison, 2017),

**Figura 6.** La colonización comensal promueve respuestas efectoras y reguladoras de las células T.

(1) La colonización intestinal por bacterias filamentosas segmentadas (SFB) o *Bifidobacterium adolescentis* promueve la diferenciación local de células Th17. (2) La colonización SFB impulsa un eje ILC3/IL-22/SAA1/2 que autoriza la producción de IL-17A a partir de células ROR $\gamma$ <sup>+</sup> Th17 dentro del íleon terminal. (3) La colonización de *Clostridia* promueve la acumulación de células ROR $\gamma$ <sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> pTreg, que, a su vez, limitan las respuestas de las células colónicas Th2 y Th17. (4) Las células Foxp3<sup>+</sup> Treg y las células ex-Th17 / Tfh se localizan en los parches de Peyer y promueven el cambio de clase de células B y la producción de IgA, lo que fomenta una microbiota diversa y garantiza la compartimentación comensal del epitelio intestinal.



**Fuente:** Belkaid, Y., & Harrison, O. J. (2017). Homeostatic Immunity and the Microbiota. *Immunity*, 46(4), 562–576.

En niños con inmunodeficiencias, se ha visto que la tolerancia inmunológica se encuentra alterada, al grado en que microorganismos comensales pueden ser los causantes de infección activa (Belkaid & Harrison, 2017).

En el caso de asmáticos, se ha visto que el incremento de interleucina-4, de linfocitos T CD4+ y la disminución de células CD25+ FOXP3+ se reproduce al trasplantar la microbiota de esta persona a otro niño sano (Lynch & Pedersen, 2016).

La evolución del sistema inmunológico humano ha coincidido con la adquisición de una microbiota compleja, lo que demuestra una relación simbiótica entre el sistema inmunológico del huésped y su microbiota comensal. Un diálogo dinámico que se refuerza a sí mismo asegura que la colonización comensal ocurre como un estado de mutualismo, cuya ruptura puede resultar en desórdenes inflamatorios crónicos, incluyendo autoinmunidad, alergias y síndromes metabólicos. Por el contrario, la modulación selectiva de la microbiota presenta un inmenso potencial terapéutico para reforzar la inmunoterapia tumoral, la vacunación y la resistencia a microbios resistentes a los antibióticos.

### 5.2.6. Microbiota, dieta y metabolismo.

Se reconoce cada vez más la relación entre la microbiota intestinal y la salud humana. Ahora está bien establecido que una flora intestinal saludable es en gran parte responsable de la salud general del huésped.

La microbiota intestinal normal imparte una función específica en el metabolismo de los nutrientes del huésped, el metabolismo de xenobióticos y fármacos, el mantenimiento de la integridad estructural de la barrera de la mucosa intestinal, la inmunomodulación y la protección contra patógenos. Varios factores influyen en la configuración de la microbiota intestinal normal. Incluyen (1) el modo de parto (vaginal o cesárea); (2) dieta durante la infancia (leche materna o fórmula) y la edad adulta (vegana o basada en carne); y (3) uso de antibióticos o moléculas similares a antibióticos que se derivan del medio ambiente o de la comunidad comensal intestinal (Jandhyala et al, 2015).

La microbiota es capaz de adaptarse a corto y largo plazo en su composición, diversidad y metabolismo, dependiendo de los hábitos dietéticos, la primer influencia de la dieta es la lactancia materna, la cual tiene beneficios indiscutibles en el desarrollo de la inmunidad innata y maduración del tejido linfoide asociado a intestino (GALT). En bebés alimentados con leche materna se ha visto abundancia en la población de *Bifidobacterium* y *Lactobacilli* *dominate*, quienes tienen capacidad de extraer compuestos bioactivos de los oligosacáridos no digeribles de la leche materna (HMO), a su vez la fermentación de estos HMO promueve la generación de ácidos grasos de cadena corta (SCFA) como el butirato, el cual tiene un papel metabólico importante (Jandhyala et al, 2015).

La microbiota intestinal obtiene en gran medida sus nutrientes de los carbohidratos de la dieta. La fermentación de los carbohidratos que escaparon a la digestión proximal y los oligosacáridos no digeribles por organismos colónicos como *Bacteroides*, *Roseburia*, *Bifidobacterium*, *Fecalibacterium* y *Enterobacteria* dan como resultado la síntesis de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) como butirato, propionato y acetato, que son fuentes ricas de energía para el anfitrión.

Se cree que este equilibrio energético del huésped está mediado *por* una interacción ligando-receptor de los SCFA con un receptor acoplado a proteína G Gpr41. Otra hormona

enteroendocrina PYY (péptido tirosina / péptido pancreático YY3-36) también se ha implicado en esta acción (Samuel et al, 2008).

El butirato puede prevenir la acumulación de subproductos metabólicos tóxicos como el D-lactato. Los miembros del género *Bacteroides*, que son los organismos predominantes que participan en el metabolismo de los carbohidratos, lo realizan expresando enzimas como glicosiltransferasas, glicósido hidrolasas y polisacáridos liasas. El mejor ejemplo entre estos organismos es *Bacteroides thetaiotaomicron* que está dotado de un genoma que codifica más de 260 hidrolasas, que es mucho más que el número codificado por el genoma humano (Jandhyala et al, 2015).

El oxalato que se sintetiza en el intestino como resultado de la fermentación de carbohidratos y el metabolismo bacteriano es contrarrestado por organismos como *Oxalobacter formigenes*, especies de *Lactobacillus* y especies de *Bifidobacterium* reduciendo así el riesgo de formación de cálculos de oxalato en el riñón (Jandhyala et al, 2015).

Así lo aborda Sidhu et al (1998) en su estudio Ausencia de *Oxalobacter formigenes* en pacientes con fibrosis quística: un factor de riesgo de hiperoxaluria donde concluyeron que 15 (71%) de 21 voluntarios sanos, pero solo siete (16%) de 43 pacientes con Fibrosis Quística (FQ) fueron colonizados con *O. formigenes*. La detección de *O. formigenes* en seis de estos siete pacientes requirió identificación basada en ADN, lo que sugiere un número bajo de unidades formadoras de colonias, y el paciente con FQ con números normales de *O. formigenes* fue el único de los 43 pacientes que no había sido tratado con antibióticos. Los siete pacientes con FQ colonizados con *O. formigenes* tenían niveles de oxalato urinario normales, pero 19 (53%) de 36 pacientes no colonizados con *O. formigenes* eran hiperoxalúricos, y la hiperoxaluria más grave se presentaba en pacientes jóvenes.

También se ha demostrado que la microbiota intestinal tiene un impacto positivo en el metabolismo de los lípidos al suprimir la inhibición de la actividad de la lipoproteína lipasa en los adipocitos. Además, se ha demostrado que *Bacteroides thetaiotaomicron* aumenta la eficacia de la hidrólisis de lípidos regulando al alza la expresión de una colipasa que es requerida por la lipasa pancreática para la digestión de lípidos (Hooper et al, 2001).

La microbiota intestinal también está enriquecida con una eficiente maquinaria de metabolización de proteínas que funciona a *través de* las proteinasas y peptidasas microbianas junto con las proteinasas humanas. Varios transportadores de aminoácidos en la pared celular bacteriana facilitan la entrada de aminoácidos desde el lumen intestinal a las bacterias, donde varios productos génicos convierten los aminoácidos en pequeñas moléculas de señalización y péptidos antimicrobianos (bacteriocinas). Ejemplos importantes incluyen la conversión de L-histidina en histamina por la enzima bacteriana histamina descarboxilasa, que está codificada por los genes bacterianos *hdcA* (Jandhyala et al, 2015).

La síntesis de vitamina K y varios componentes de la vitamina B es otra función metabólica importante de la microbiota intestinal. Se ha demostrado que los miembros del género *Bacteroides* sintetizan ácido linoleico conjugado (CLA) que se sabe que es antidiabético, antiaterogénico, antiobesogénico, hipolipidémico y que tiene propiedades inmunomoduladoras (Devillard et al, 2009).

### **5.2.7. Métodos diagnósticos utilizados en los estudios documentados.**

Se puede definir el método diagnóstico como un proceso analítico que permite conocer la situación real de determinada patología en su progreso y evolución, con el propósito de reconocer complicaciones u oportunidades en la terapéutica.

En caso de tener sospecha de una infección por SARS-CoV-2, causante de la COVID-19, las pruebas en orden de importancia son:

- Amplificación de ácido nucleico (NAAT), con la técnica de RT-PCR.
- Secuenciación viral: las pruebas para la detección de las secuencias del gen de la envoltura viral, de la ARN polimerasa viral y de la nucleoproteína han sido implementadas eficazmente para confirmación del virus y son útiles para mostrar mutaciones del genoma viral.
- Cultivo viral: no recomendada por motivos de bioseguridad.
- Estudios serológicos.

La prueba de RT-PCR en tiempo real está diseñada para la detección cualitativa de ácidos nucleicos de SARS-CoV-2 en muestras tanto del tracto respiratorio superior como del inferior, mediante hisopados nasofaríngeos, orofaríngeos, lavado broncoalveolar, aspirado bronquial o esputo. Es una técnica sensible y específica en muestras respiratorias y se realiza en todos los pacientes que cumplen con criterios clínicos de SARS-CoV-2. El algoritmo diagnóstico emplea varias secuencias del genoma viral para confirmar positividad para SARS-CoV-2 (Ramos, Carreto, Salcedo, 2020).

El aislamiento viral en cultivo celular no se realiza de forma rutinaria con fines diagnósticos, debido a la falta de líneas celulares permisivas, el tiempo que tarda la obtención de resultado y la falta de antisueros comerciales para la confirmación del cultivo, así como los requisitos de experiencia en el personal de laboratorio y las condiciones adecuadas de bioseguridad en las instalaciones de trabajo. Sin embargo, el aislamiento del virus en cultivos celulares es crítico para obtener la caracterización y apoyar el desarrollo de vacunas y agentes terapéuticos (Loeffelholz y Tang, 2020).

En el avance de estudios relacionados con el COVID-19 es importante dejar en claro que la aplicación y revolución de nuevos modelos de análisis en el campo de la biología molecular

y la secuenciación genómica han supuesto una rápida solución a problemas que antes no era posible corregir.

#### **5.2.7.1.Recolección de las muestras**

Wang W y colaboradores (a como cito Ramos et al, 2020) reportan que las muestras de líquido de lavado broncoalveolar mostraron las tasas de mayor positividad (93%), seguidas de esputo (72%). Sin embargo, la recolección de estas muestras a través de la broncoscopia aumenta el riesgo de bioseguridad para los trabajadores de la salud mediante la formación de gotas de aerosol. Los hisopados nasales reportan sólo el 63% de positividad, el cepillado broncoscópico 46% y los hisopados faríngeos 32%. El virus también se puede detectar en muestras de heces (29%), orina y sangre (1%), aunque en general se desconoce su utilidad clínica en comparación con las muestras respiratorias.

En el estudio de Yeoh, et al (2021) se reclutaron pacientes con COVID-19 de los hospitales Prince of Wales y United Christian en Hong Kong entre febrero y mayo de 2020. Estos pacientes fueron positivos para SARS-CoV-2 confirmados por laboratorio mediante PCR de transcripción inversa cuantitativa (RT-qPCR) realizado en hisopos nasofaríngeos recogidos por el personal del hospital. Se reclutaron sujetos sin COVID-19 antes de COVID-19 como parte de una encuesta de microbioma intestinal de la población de Hong Kong reclutada por publicidad o controles sin enfermedad de ensayos de colonoscopia, por lo que los sujetos tenían una colonoscopia normal (heces recogidas varios días antes de la preparación intestinal).

El personal del hospital recolectó la sangre y las heces de los pacientes hospitalizados, mientras que los pacientes dados de alta proporcionaron heces el día del seguimiento o tomaron muestras en casa. Las heces se recolectaron en tubos de recolección que contenían medios conservantes (cat. 63700, Norgen Biotek Corp, Ontario, Canadá) y se almacenaron a -80 °C hasta el procesamiento.

En el estudio de Gu et al (2020). se recolectaron muestras fecales de pacientes con COVID-19 y H1N1 al ingreso, y se recolectaron heces frescas de sujetos sanos durante el examen físico. Las muestras fecales se procesaron en el laboratorio dentro de las 4 horas posteriores a la recolección y se almacenaron a -80 °C hasta su análisis.

### **5.2.7.2. Extracción de ácidos nucleicos a partir de muestras fecales**

Dada la posible presencia de virus vivos en las heces, todas las muestras fecales se inactivaron a 56 °C durante 30 minutos antes de la extracción de ADN.

#### **PureFood de Maxwell RSC**

Yeoh, et al (2021) extrajeron el 0,1 g de ADN de muestras fecales homogeneizadas utilizando el kit de autenticación y OGM PureFood de Maxwell RSC y una plataforma de extracción de ácido nucleico de Maxwell RSC Instrument (Promega, Wisconsin, EE. UU.).

#### **Principio**

Maxwell® Instruments son instrumentos de manejo de partículas magnéticas que unen eficientemente el ADN a las partículas paramagnéticas en el primer pozo de un cartucho precargado y mueva la muestra a través de los pozos del cartucho, mezclando durante el procesamiento. Este enfoque de captura magnética evita problemas comunes experimentados con otros sistemas automatizados, como puntas obstruidas. o transferencias parciales de reactivos que dan como resultado un procesamiento de purificación subóptimo.

#### **Kit DNeasy PowerSoil Pro**

#### **Principio**

El kit DNeasy PowerSoil Pro cuenta con una tecnología de eliminación de inhibidores (IRT) optimizada para reducir el tiempo de procesamiento de muestras. Las muestras de suelo o heces se lisan mediante homogeneización química y mecánica. El tampón de lisis se agrega a un tubo de perlas de circonio mixto que contiene la muestra. El batido de perlas se puede llevar a cabo utilizando un vórtice de mesa estándar con adaptador de tubo de perlas o el PowerLyser de alta potencia. Luego, el lisado crudo se somete a la eliminación del inhibidor para su limpieza. Después de la limpieza, el lisado purificado se mezcla con un volumen igual de solución de unión de ADN y se pasa a través de una membrana de filtro giratorio de sílice. La membrana se lava con un régimen de lavado de dos pasos. A continuación, el ADN unido a sílice se eluye utilizando un tampón de elución Tris 10 mM. Las aplicaciones posteriores relevantes para el ADN aislado incluyen PCR, NGS y ensayos de digestión enzimática.

## **kit QIAamp Viral RNA Mini**

### **Principio**

En el estudio de Yeoh et al (2021) utilizaron el kit de ARN viral QIAamp el cual simplifica la purificación de ARN viral a partir de fluidos corporales libres de células con procedimientos rápidos de centrifugación en columna, vacío y placa. El ARN viral se une específicamente a la membrana de sílice QIAamp y el ARN viral puro se eluye en agua o en un tampón provisto con el kit. El ARN viral se une específicamente a la membrana de sílice QIAamp mientras pasan los contaminantes. Los inhibidores de la PCR, como los cationes divalentes y las proteínas, se eliminan por completo en dos pasos de lavado eficientes, lo que permite que el ARN viral puro se eluya en agua o en un tampón provisto con el kit.

### **5.2.7.3. Purificación de ácidos nucleicos**

#### **Instrumento Maxwell® RSC 48**

Maxwell® RSC 48 Instrument es una plataforma de purificación de ácido nucleico automatizada y compacta que procesa hasta 48 muestras simultáneamente. Con cartuchos precargados de Maxwell® RSC, Maxwell® RSC 48 Instrument brinda la misma purificación consistente y confiable de ADN o ARN de una variedad de tipos de muestras y un mayor rendimiento.

Maxwell® RSC ofrece una extracción de ADN o ARN con total fiabilidad en 25 a 60 minutos, según el tipo de muestra. Los métodos de extracción de ADN o ARN Maxwell® RSC utilizan cartuchos precargados con reactivos de purificación y partículas paramagnéticas, listos para sus muestras. Después de la adición de la muestra, el Maxwell® RSC mueve las partículas paramagnéticas y los ácidos nucleicos asociados a través de múltiples pasos, produciendo finalmente ARN o ADN altamente puro en 30–100 µl.

### **5.2.7.4. Amplificación de ácidos nucleicos**

#### **PCR de transcripción inversa cuantitativa (RT-qPCR)**

El DOGMA central de la biología molecular establece que la información fluye desde el ADN al ARNm y de ahí a la proteína. El flujo de información desde ADN a ARN constituye lo que se denomina expresión génica. Los cambios de expresión génica en la célula se dan

constantemente y son un mecanismo fino de regulación en muchos procesos que se produce como respuesta a cambios en el ambiente o a cambios internos.

No solo el ADN, sino también el RNA puede ser portador de información genética, es decir, el propio ARN puede actuar como plantilla para ser copiada y generar nuevas moléculas de ácidos nucleicos. El paso de información de ARN a ADN puede ser posible a la acción de un enzima particular denominada transcriptasa inversa o retrotranscriptasa. La principal función de este enzima es sintetizar ADN (al que se le denomina ADN complementario (ADNC), a partir de una plantilla de ARN. En la célula este proceso puede ser responsable, por ejemplo, de la inserción de retrotransposones en el genoma.

La qRT-PCR- implica varias etapas:

**Obtención, aislamiento y purificación del ARNm.** Mediante extracción con solventes orgánicos (por ejemplo, derivados del fenol).

**Retrotranscripción.** El mRNA servirá como plantilla para la acción de la retrotranscriptasa, que sintetizará moléculas de ADNc.

**Amplificación del ADNc:** mediante la utilización de oligonucleótidos específicos (Primers forward y reverse) que actuarán como cebadores de la acción de la polimerasa, se amplificará el ADNc de aquellos genes cuya expresión nos interese analizar.

Con la PCR de transcripción inversa cuantitativa (RT-qPCR) fueron procesadas todas las muestras para diagnóstico de COVID-19 aplicando los protocolos de Hong Kong y Alemania. Las bibliotecas de ADN se generaron a partir de amplicones de PCR dirigidos a las regiones hipervariables V3–V4 del gen 16S rRNA

Las cargas de virus SARS-CoV-2 se midieron mediante RT-qPCR como se describe en Zuo *et al.* (2020), el ARN se extrajo de 0,1 g de heces homogeneizadas utilizando el kit QIAamp Viral RNA Mini (QIAGEN, Hilden Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las secuencias del cebador y la sonda del SARS-CoV-2 fueron proporcionadas por los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades de EE. UU. (2019-nCoV\_N1-F: 5'-GACCCCAAATCAGC GAAAT-3', 2019-nCoV\_N1-R: 5'-TCTGGTACTGCCAGTTGAATCTG-3' y 2019-nCoV\_N1-P: 5'-FAM-ACCCCGCATTACGTTTGGTTGGACC-BHQ1-3').

Cada reacción de RT-qPCR de un paso contenía 10 µL de ARN extraído, 4 µL de TaqMan Fast Virus 1-Step Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EE. UU.) en un volumen de reacción final de 20 µL. Las concentraciones de cebador y sonda fueron de 0,5 µM y 0,125 µM, respectivamente. Las condiciones del ciclo fueron 25 °C durante 2 min, 50 °C durante 15 min, 95 °C durante 2 min, seguido de 45 ciclos de 95 °C durante 15 s y 55 °C durante 30 s.

El termociclado se realizó en un sistema de PCR en tiempo real StepOnePlus (Thermo Fisher Scientific). Los valores del umbral del ciclo (Ct) se convirtieron en copias de ARN viral en función de una curva estándar preparada a partir de diluciones en serie de 10 veces de copias conocidas de plásmidos que contenían el gen N completo (2019-nCoV\_N\_Positive Control, Integrated DNA Technologies, EE. UU.). Las muestras se consideraron negativas si los valores de Ct superaban los 39,9 ciclos. El límite de detección fue de 347 copias/mL.

#### **5.2.7.5. Secuenciación de ácidos nucleicos**

En el estudio de Gu, et al (2020), se analizó la microbiota intestinal mediante la secuenciación de la región V3-V4 del gen del ARN ribosomal 16S.

#### **Kit de preparación de biblioteca Flex de ADN de Nextera**

Aunque los avances en la tecnología de secuenciación de próxima generación (NGS) han acelerado el ritmo de la investigación genómica, numerosos laboratorios siguen experimentando cuellos de botella durante la fase de preparación de bibliotecas del flujo de trabajo de NGS. Muchos laboratorios en los que hacen falta varios pasos previos y posteriores a la preparación de bibliotecas tienen que lidiar con retrasos significativos en el proceso de secuenciación. Entre los pasos previos a la preparación de bibliotecas se incluyen la extracción, la cuantificación y la fragmentación del ADN, mientras que las evaluaciones de calidad, la cuantificación y la normalización de las bibliotecas constituyen pasos posteriores a dicha preparación.

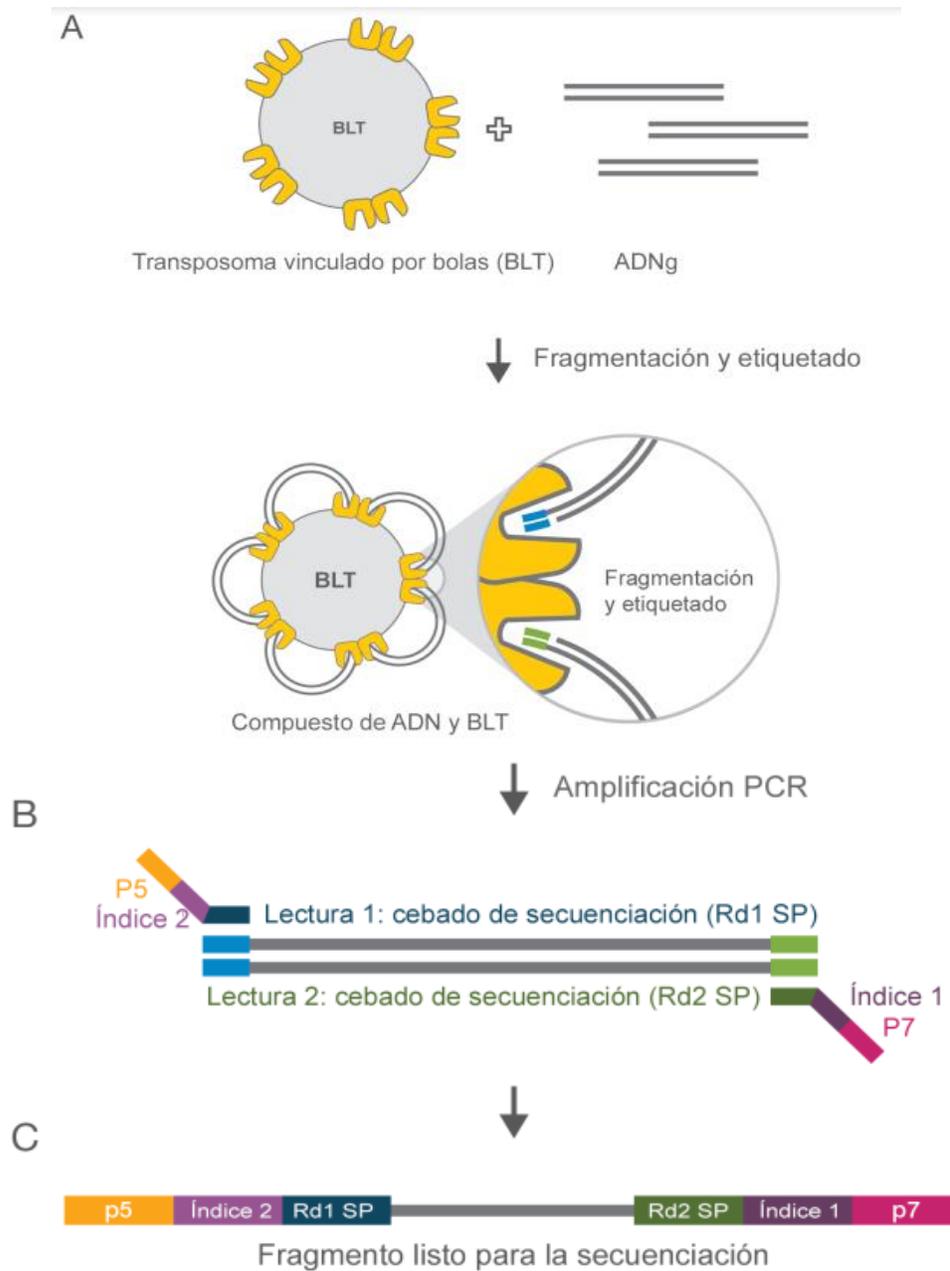
Con los kits de preparación de bibliotecas de ADN (ADNg) Nextera se introdujeron los procesos químicos de tagmentación, que combinaban los pasos de fragmentación de ADN y de ligadura de adaptadores en una única reacción de 15 minutos, con lo que se redujo el tiempo de preparación de bibliotecas a 90 minutos.

Con el lanzamiento de los kits de preparación de bibliotecas de ADN Nextera XT, dejó de ser necesario cuantificar las bibliotecas antes de agruparlas y secuenciarlas. Ya está aquí la última revolución en los procesos químicos de preparación de bibliotecas de Illumina: el kit flexible de preparación de bibliotecas de ADN Nextera.

El exclusivo proceso químico del kit flexible de preparación de bibliotecas de ADN Nextera integra los pasos de extracción y fragmentación de ADN y los de preparación y normalización de bibliotecas, para ofrecer los flujos de trabajo más rápidos y flexibles de la gama de soluciones de preparación de bibliotecas de Illumina.

Además de ofrecer un flujo de trabajo rápido, el kit flexible de preparación de bibliotecas de ADN Nextera proporciona una extraordinaria flexibilidad en cuanto a los tipos y cantidades de entrada, y permite aplicaciones muy variadas. Desde la secuenciación del genoma humano completo (WGS) hasta pequeños plásmidos microbianos, el kit flexible de preparación de bibliotecas de ADN Nextera ofrece una cobertura uniforme del genoma con la precisión demostrada de los procesos químicos de secuenciación por síntesis (SBS) de Illumina.

**Lámina 1:** Procesos químicos de transposomas vinculados por bolas Nextera. (A) Los transposomas vinculados por bolas actúan como mediadores entre la fragmentación simultánea de ADNg y la adición de cebadores de secuenciación de Illumina. (B) La PCR de ciclo reducido amplifica los fragmentos de ADN listos para la secuenciación y añade índices y adaptadores. (C) Los fragmentos listos para la secuenciación se lavan y se agrupan.



## **Sistema de secuenciación NovaSeq™ 6000**

El sistema NovaSeq 6000 establece una nueva era de secuenciación con sus revolucionarias innovaciones, que ofrece a los usuarios el rendimiento, la velocidad y la flexibilidad que necesitan para finalizar los proyectos con más rapidez y de forma más económica que nunca antes. Gracias a la tecnología probada de secuenciación de nueva generación (NGS, next generation sequencing) de Illumina, sus distintos tipos de celda de flujo, los dos flujos de trabajo de carga de bibliotecas y su variedad de combinaciones de longitudes de lectura, el sistema NovaSeq 6000 permite una adaptación eficaz de la productividad que permite satisfacer prácticamente cualquier necesidad de estudio.

El sistema NovaSeq 6000 ofrece un rendimiento de hasta 6 TB y 20 000 millones de lecturas en menos de dos días. Su variedad de combinaciones de longitud de lectura y tipos de celda de flujo ofrece configuraciones de rendimiento y duración del experimento flexibles según las necesidades del proyecto.

### **Lámina ilustrativa del Sistema NovaSeq 6000.**



### **5.2.7.6. Bioinformática**

En el estudio de Gu, et al (2020), las lecturas de secuenciación sin procesar fueron filtradas por calidad y fusionadas por Trimmomatic y FLASH. Las unidades taxonómicas operativas (OTU) con un límite de similitud del 97 % se agruparon mediante UPARSE versión 7.1 (<http://drive5.com/uparse>), y las secuencias quiméricas se identificaron y eliminaron. Después del filtrado, se obtuvo un promedio de 48 879 lecturas por muestra (mínimo, 33 476; máximo, 63 480). La taxonomía de cada secuencia representativa de OTU fue analizada por RDP Classifier (<http://rdp.cme.msu.edu/>) contra la base de datos 16S rRNA (Silva SSU132). La diversidad alfa se evaluó utilizando el índice Chao 1 y el índice de Shannon. La diversidad beta se estimó mediante la distancia Bray-Curtis y se visualizó mediante el análisis de coordenadas principales.

#### **Trimmomatic V.39**

Trimmomatic realiza una variedad de tareas de recorte útiles para datos de extremo único y emparejado de Illumina. La selección de pasos de recorte y sus parámetros asociados se proporcionan en la línea de comando.

Funciona con FASTQ (utilizando puntajes de calidad phred + 33 o phred + 64, según la canalización de Illumina utilizada), ya sea FASTQ sin comprimir o comprimido con gzip. El uso del formato gzip se determina en función de la extensión .gz.

Para datos de terminación única, se especifican un archivo de entrada y uno de salida, además de los pasos de procesamiento. Para datos de extremos emparejados, se especifican dos archivos de entrada y 4 archivos de salida, 2 para la salida "emparejada" en la que ambas lecturas sobrevivieron al procesamiento y 2 para la salida "no emparejada" correspondiente en la que sobrevivió una lectura, pero la lectura asociada no.

#### **UPARSE versión 7.1**

UPARSE es un método para generar agrupaciones (OTU) a partir de lecturas de secuenciación de próxima generación de genes marcadores como 16S rRNA, la región ITS fúngica y el gen COI (Edgar, 2013)

## **RDP Classifier**

Las secuencias de cada muestra se pueden clasificar, asignarle un taxonomía a cada una, por medio de varios clasificadores, uno de los mejores es el [Ribosomal Database Project](#) (RDP) Classifier (Wang, et al, 2007).

### **5.3. Mecanismos de interacción entre la microbiota intestinal y SARS-CoV-2.**

Aunque COVID-19 es principalmente una enfermedad respiratoria, existe una creciente evidencia que sugiere que el tracto gastrointestinal está involucrado en esta enfermedad. Se ha investigado si el microbioma intestinal está relacionado con la enfermedad en pacientes con COVID-19 y si las alteraciones en la composición del microbioma, si las hay, se resuelven con la eliminación del virus SARS-CoV-2.

El espectro clínico de COVID-19 varía desde una enfermedad asintomática hasta una enfermedad grave que pone en peligro la vida. El conocimiento actual de la patogenia postula una hiperactivación rápida e intensa del sistema inmunológico, lo que resulta en enfermedad crítica y mortalidad. La edad avanzada, la carga de comorbilidades, la obesidad, los estados inmunodeprimidos, la malignidad o el tratamiento del cáncer en curso, y ser un receptor de trasplante, se han relacionado estrechamente con resultados graves y, en ocasiones, mortales. Los datos en evolución sugieren que un estado de inflamación crónica o activación inicial del sistema inmunológico podría influir en el curso de COVID-19 más que los efectos citopáticos directos del SARS-CoV-2. Además, se ha observado que un subgrupo de pacientes desarrolla síntomas autoinflamatorios (como enfermedad similar a Kawasaki en niños y síndrome inflamatorio multisistémico) mucho después de la eliminación del virus SARS-CoV-2 del cuerpo, lo que sugiere una desregulación inmunitaria (Hussain et al, 2021).

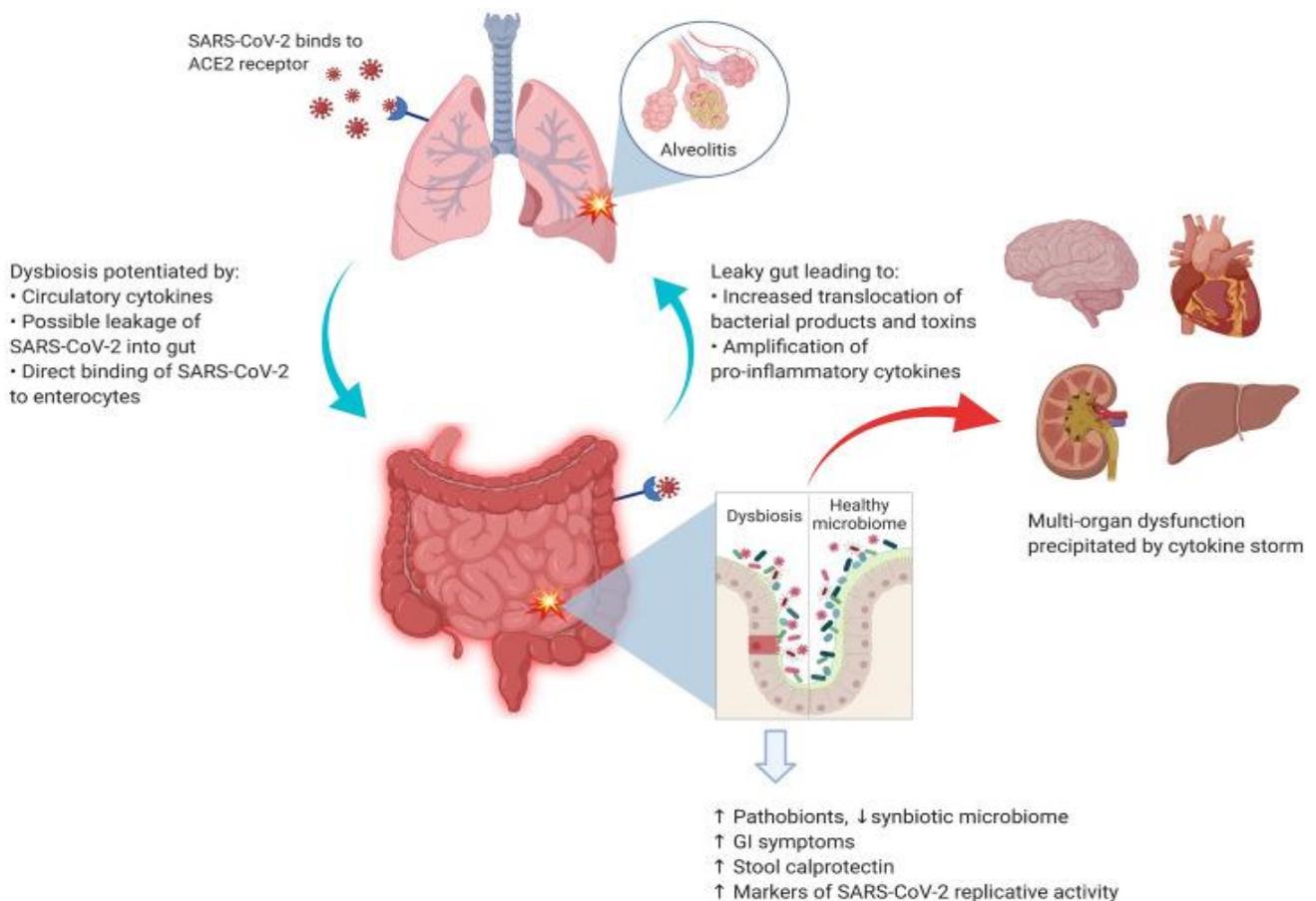
#### **5.3.1. Microbiota intestinal en la infección por SARS-CoV-2**

Si bien las interacciones immuno-relacionadas entre el intestino residente y la microbiota del tracto respiratorio aún no se han explorado completamente, se puede extrapolar una comprensión conceptual del impacto de la microbiota intestinal en pacientes con COVID-19.

Aunque hasta la fecha no se ha identificado ninguna interacción específica entre ninguna especie microbiana intestinal y el SARS-CoV-2, existe evidencia indirecta de que la microbiota intestinal puede tener un papel en la patogenia general de COVID-19. Tomando el corolario más allá de la disbiosis intestinal no mediada por el virus del SARS-Cov-2, es concebible que la infección por el SARS-CoV-2 también pueda verse afectada por interacciones inmunológicas con la microbiota intestinal.

**Figura 7.** SARS-CoV-2 y el eje pulmón-intestino

El SARS-CoV-2 ingresa a las células alveolares uniéndose a los receptores ACE2, que también abundan en la superficie de los enterocitos. La implicación de la infección directa de los enterocitos por el SARS-CoV-2 aún se está explorando. Las citocinas circulatorias de la alveolitis (y / o la infección viral directa de los enterocitos) causan la disbiosis GI con alteraciones resultantes en la barrera de la mucosa GI. La entrada de productos bacterianos y toxinas del TGI inunda el sistema circulatorio con más citocinas proinflamatorias.



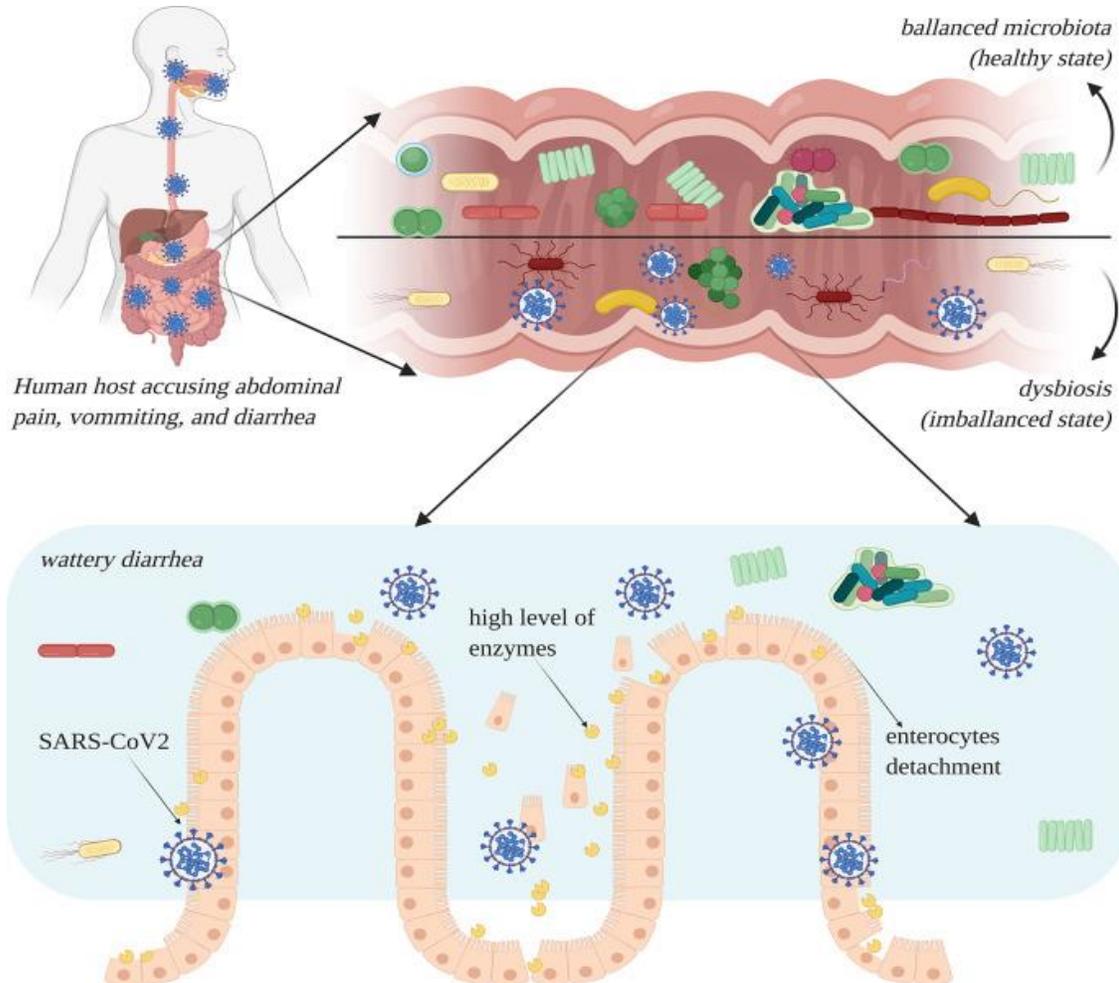
**Fuente:** Hussain, I., Cher, G., Abid, M. A., & Abid, M. B. (2021). Role of Gut Microbiome in COVID-19: An Insight Into Pathogenesis and Therapeutic Potential. *Frontiers in immunology*, 12, 765965

Se cree que los pacientes que padecen trastornos metabólicos y gastrointestinales (GI) tienen un riesgo moderado a alto de infección por SARS-CoV-2, lo que indica la implicación directa

de la disbiosis intestinal en la gravedad de COVID-19. Sin embargo, se requieren esfuerzos adicionales para identificar los síntomas gastrointestinales iniciales de COVID-19 para una posible intervención temprana. Las alteraciones de la microbiota fecal se asociaron con concentraciones fecales de gravedad de SARS-CoV-2 y COVID-19. Se cree que los pacientes que padecen trastornos metabólicos y gastrointestinales (GI) tienen un riesgo moderado a alto de infección por SARS-CoV-2, lo que indica la implicación directa de la disbiosis intestinal en la gravedad de COVID-19. Sin embargo, se requieren esfuerzos adicionales para identificar los síntomas gastrointestinales iniciales de COVID-19 para una posible intervención temprana. Las alteraciones de la microbiota fecal se asociaron con concentraciones fecales de gravedad de SARS-CoV-2 y COVID-19 (Vodnar et al, 2020).

**Figura 8.** Infección por SARS-CoV-2 y disbiosis intestinal

La infección intestinal con el SARS-CoV-2 conduce a disbiosis, especialmente debido a la aparición de diarrea. Los enterocitos están dañados y muestran un alto nivel de sobreexpresión de enzimas que conducen a una rápida degradación celular.



**Fuente:** Vodnar, D. C., Mitrea, L., Teleky, B. E., Szabo, K., Călinoiu, L. F., Nemeş, S. A., & Martău, G. A. (2020). Coronavirus Disease (COVID-19) Caused by (SARS-CoV-2) Infections: A Real Challenge for Human Gut Microbiota. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 10, 575559

En el estudio realizado por Yeoh et al (2021) sobre la composición de la microbiota intestinal y la gravedad de la enfermedad y las respuestas inmunes disfuncionales en pacientes con COVID-19, determinaron que, en una población de 100 pacientes, la composición del microbioma intestinal se alteró significativamente en pacientes con COVID-19 en comparación con individuos sin COVID-19, independientemente de si los pacientes habían recibido medicación ( $p < 0,01$ ). Varios comensales intestinales con potencial

inmunomodulador conocido como *Faecalibacterium prausnitzii*, *Eubacterium rectale* y bifidobacteria estaban subrepresentados en los pacientes y permanecieron bajos en las muestras recolectadas hasta 30 días después de la resolución de la enfermedad. Además, esta composición perturbada exhibió estratificación con la gravedad de la enfermedad concordante con concentraciones elevadas de citocinas inflamatorias y marcadores sanguíneos tales como proteína C reactiva, lactato deshidrogenasa, aspartato aminotransferasa y gamma-glutamil transferasa.

Las asociaciones entre la composición de la microbiota intestinal, los niveles de citocinas y los marcadores inflamatorios en pacientes con COVID-19 sugieren que el microbioma intestinal está involucrado en la magnitud de la gravedad de COVID-19 posiblemente mediante la modulación de las respuestas inmunitarias del huésped. Además, la disbiosis de la microbiota intestinal después de la resolución de la enfermedad podría contribuir a la persistencia de los síntomas, lo que destaca la necesidad de comprender cómo los microorganismos intestinales están involucrados en la inflamación y el COVID-19.

### **5.3.2. Disbiosis intestinal y respuesta inflamatoria sistémica**

Gu y col. presentó por primera vez evidencia de una microbiota intestinal alterada en pacientes con COVID-19 mediante el uso de secuenciación de alto rendimiento de ARN ribosómico 16S para comparar los taxones intestinales de pacientes con COVID-19, influenza H1N1 y controles sanos. En comparación con los controles sanos, los pacientes con COVID-19 tenían una diversidad bacteriana significativamente reducida, una mayor abundancia de patógenos oportunistas (como *Streptococcus*, *Rothia*, *Veillonella* y *Actinomyces*) y especies simbióticas significativamente menos diversas. Curiosamente, la firma microbiana alterada en COVID-19 fue diferente a la de los pacientes con la cepa H1N1 (Hussain et al, 2021).

Aunque anteriormente se creía que la disbiosis intestinal en COVID-19 era impulsada principalmente por mediadores inflamatorios de la infección del tracto respiratorio, un estudio reciente sugiere que la replicación activa del SARS-CoV-2 en el intestino puede estar impulsando la disbiosis (Zuo et al, 2021).

En general, la evidencia actualmente en expansión sugiere que los pacientes con COVID-19 sufren una alteración en la microbiota intestinal durante y después de la enfermedad. Tanto la inflamación sistémica como el potencial replicativo del SARS-CoV-2 en el intestino pueden contribuir a la disbiosis (Hussain et al, 2021).

### **5.3.3. Microbiota intestinal en casos graves de COVID-19.**

Existe una creciente evidencia de que ser anciano y tener un estado inflamatorio crónico (debido a condiciones médicas crónicas) predispone a un estado pro-disbiótico. Es improbable una coincidencia que las tasas más altas de morbilidad y mortalidad por COVID-19 también se hayan observado en los ancianos, aquellos con condiciones médicas crónicas subyacentes y entre los pacientes inmunosuprimidos con cánceres (Hussain et al, 2021).

Es probable que la gravedad de la enfermedad COVID-19 dependa del huésped y esté impulsada por la respuesta inflamatoria. En muestras de autopsia de un paciente con COVID-19 grave, se observaron células inflamatorias en los pulmones, lo que sugiere una intensa respuesta inflamatoria (Xu et al, 2020).

Además, los estudios también han informado niveles plasmáticos elevados de citocinas proinflamatorias como la interleucina-1 (IL-1), IL-6 y el factor de necrosis tumoral alfa en el COVID-19 grave. En pacientes propensos a la disbiosis intestinal, otros desencadenantes inflamatorios pueden inclinar la balanza hacia un intestino permeable, lo que da como resultado un círculo de retroalimentación inflamatoria que se perpetúa a sí mismo. En particular, dos estudios pequeños mostraron una correlación directa entre el COVID-19 grave y la disbiosis intestinal. Otros dos estudios han demostrado que los pacientes con COVID-19 grave experimentaron síntomas gastrointestinales más pronunciados, junto con niveles más altos de calprotectina en las heces (un indicador de inflamación gastrointestinal y alteración de la integridad de la mucosa). Esto apoya el concepto de una diafonía inmunológica entre los pulmones y el intestino, presumiblemente moderada por la microbiota intestinal. (Hussain et al, 2021).

#### **5.3.3.1. Microbiota intestinal en la Tormenta de citocinas**

Los niveles séricos elevados de marcadores proinflamatorios, como la interleucina-6 (IL-6) y la interleucina-10 (IL-10), son características de la infección grave por COVID-19. Estas

citocinas predisponen a la disbiosis, que en consecuencia altera la permeabilidad intestinal, un estado conocido como “intestino permeable”. Esto permite una mayor entrada de una multitud de productos bacterianos y toxinas, activando una cascada proinflamatoria. En un estudio en 204 pacientes con COVID-19, Pan et al (2020). informó que a medida que aumentaba la gravedad de la enfermedad, los síntomas digestivos se volvían más pronunciados. Los pacientes con síntomas digestivos tenían niveles medios más altos de enzimas hepáticas, menor recuento de monocitos, mayor tiempo de protrombina y recibieron más tratamiento antimicrobiano que aquellos sin síntomas digestivos.

El aumento de FC y la IL-6 sérica caracterizan la diarrea aguda en COVID-19. Se concibe que este virus infecta células epiteliales que provocan la liberación de citocinas y quimiocinas, que provocan una inflamación intestinal aguda caracterizada por la infiltración de neutrófilos, macrófagos y células T. Presentamos evidencia de que la infección por SARS-CoV-2 en pacientes con COVID-19 de hecho instiga una respuesta inflamatoria en el intestino, como lo demuestra la diarrea, FC elevada (expresada en gran parte por granulocitos neutrófilos) y una respuesta sistémica de IL-6. Los niveles de calprotectina fecal (un marcador de inflamación de la mucosa gastrointestinal) estaban elevados en pacientes que tenían diarrea durante la enfermedad por COVID-19 (Effenberger et al, 2020).

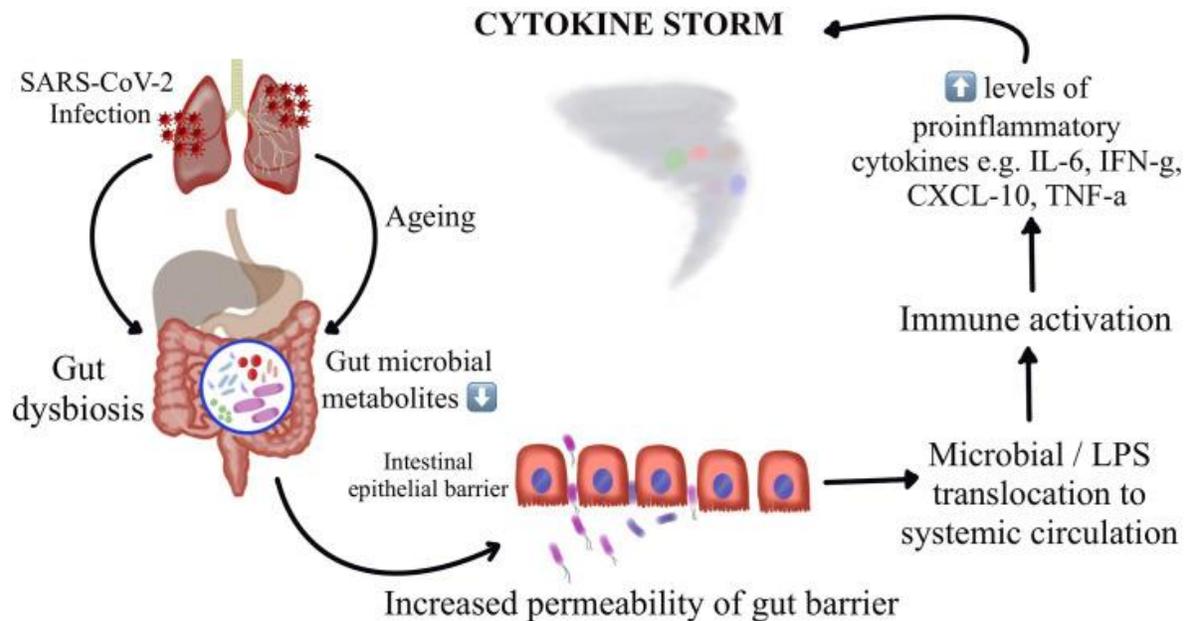
Con base en los hallazgos discutidos anteriormente, durante condiciones como COVID-19, la microbiota intestinal saludable es un requisito para equilibrar las respuestas inmunes óptimas y prevenir una serie de reacciones inflamatorias excesivas que podrían ser perjudiciales. Este equilibrio es muy importante para que la respuesta inmune pueda tener diferentes resultados clínicos y consecuencias cuando es reactiva o sobrereactiva.

El LPS bacteriano, los patrones moleculares asociados a microbios (MAMP) de las bacterias gramnegativas, pueden activar fuertemente las células del sistema inflamatorio y se ha demostrado que los niveles de LPS en plasma se correlacionan con el grado de permeabilidad intestinal en diversas condiciones. Varios estudios han demostrado la asociación de LPS con la activación de células T y respuestas proinflamatorias elevadas que conducen a una "tormenta de citocinas" (Santos-Oliveira et al, 2011).

Se ha observado que la quimiocina CXCL10 juega un papel clave en el reclutamiento de células inflamatorias en el sitio de la inflamación y su papel en la tormenta de citocinas

inducida por COVID-19 se ha demostrado tanto en modelos experimentales como en pacientes. Un estudio de modelo de ratones que utilizó ratones transgénicos K18 hACE2 infectados con SARS-CoV-2 reveló niveles significativamente pronunciados de CXCL-10 entre aquellos con tormenta de citocinas (Oladunni et al, 2020).

**Figura 9.** Representación esquemática de la hipótesis propuesta de perturbación de la microbiota intestinal que conduce a COVID-19 grave por tormenta de citocinas.



**Fuente:** Vignesh, R., Swathirajan, C. R., Tun, Z. H., Rameshkumar, M. R., Solomon, S. S., & Balakrishnan, P. (2021). Could Perturbation of Gut Microbiota Possibly Exacerbate the Severity of COVID-19 via Cytokine Storm? *Frontiers in immunology*, 11.

Los estudios han demostrado niveles elevados de CXCL10 en pacientes con COVID-19 que en los controles sanos. Entre los pacientes con COVID-19, los niveles de CXCL 10 fueron más altos entre los que requirieron ingreso a cuidados intensivos que entre los que tuvieron menos gravedad. Este hallazgo respalda el posible papel de LPS en la gravedad de COVID-19. Los estudios también informaron que los niveles aumentados de IL-1B, IFN- $\gamma$ , CXCL-10 y CCL2 también se demostraron como resultado de las respuestas Th1. Expresiones aberrantes de una batería de citocinas y quimiocinas proinflamatorias como IL-6, IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-12, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, FGF, G-CSF, GM-CSF, IP-10, MCP-1, MIP-1A, MIP1-B, PDGF, IL-18, IL-33, TGF- $\beta$ , VEGF, CXCL8, CXCL9, CCL2, CCL3 y CCL5

entre los casos infectados y graves de pacientes infectados también se documentaron (Vignesh et al, 2021).

#### **5.3.4. Excreción fecal del SARS-CoV-2**

El SARS-CoV-2 se transmite principalmente por gotitas respiratorias, pero se están acumulando pruebas de transmisión fecal-oral. La hipótesis está respaldada por la presencia de síntomas GI, la detección de huellas dactilares nucleares del SARS-CoV-2 en la mucosa GI y la detección de fragmentos virales en muestras fecales. Curiosamente, el primer paciente con COVID-19 en los Estados Unidos dio positivo al SARS-CoV-2 a través de muestras de heces, y los estudios posteriores han documentado consistentemente la eliminación de ARN viral en las muestras de heces en pacientes con COVID-19. Además, se ha observado que la diseminación viral en las muestras de heces persiste más tiempo que en las muestras respiratorias (Hussain et al, 2021).

##### **5.3.4.1. Transmisión fecal oral**

Se han presentado algunas pruebas de que el virus de la COVID-19 puede producir infección intestinal y estar presente en las heces. Sin embargo, solo un estudio ha cultivado este virus a partir de una sola muestra de heces y, hasta la fecha, no se ha notificado transmisión fecal-oral (OMS, 26 de marzo de 2020).

No obstante, en el estudio de Cheung et al (2020) sobre manifestaciones gastrointestinales de la infección por SARS-CoV-2 y carga de virus en muestras fecales en 59 pacientes, determino que Entre los 59 pacientes con COVID-19 en Hong Kong, 15 pacientes (25,4%) tenían síntomas gastrointestinales y 9 pacientes (15,3%) tenían heces que dieron positivo para el ARN del virus. Se detectó ARN viral en heces en 38,5% y 8,7% entre aquellos con y sin diarrea, respectivamente ( $p = 0,02$ ). La mediana de la carga viral fecal fue de 5,1  $\log_{10}$  copias por mililitro en pacientes con diarrea frente a 3,9  $\log_{10}$  copias por mililitro en pacientes sin diarrea ( $p = 0,06$ ). Se detectó ARN del virus en muestras de heces de 48,1% de los pacientes, incluso en heces recolectadas después de que las muestras respiratorias tuvieran resultados negativos. Por lo tanto, los trabajadores de la salud deben tener cuidado al recolectar muestras fecales o realizar procedimientos endoscópicos en pacientes con COVID-19, incluso durante la recuperación del paciente.

## **6. Diseño metodológico**

### **6.1. Tipo de estudio**

Se realizó un estudio cualitativo documental de tipo meta síntesis enfocado en el virus SARS-CoV-2 y sus interacciones con la microbiota intestinal, basada en la consulta de documentos libros, artículos y web.

### **6.2. Área de estudio**

Áreas de Microbiología (Bacteriología y virología). Realizando un análisis documental con base en las variables SARS-CoV-2 y microbiota intestinal.

### **6.3. Recolección de la información**

Se obtuvo de fuente secundaria, se realizó una revisión sistemática que abordó dos variables específicas, SARS-CoV-2 y microbiota intestinal. Con el propósito de mantener la calidad del trabajo en cuanto a la calidad científica se utilizaron únicamente artículos publicados en revistas internacionales con sus respectivos Identificadores de Objetos Digitales (DOI) tal como lo rige la ISO 26324 y o bien desde la página web de la Organización Mundial de la Salud, ente regulador en materia de salud pública a nivel mundial. Así mismo, la información sobre SARS-CoV-2 proviene de periodos 2020-2021.

### **6.4. Instrumentos de recolección de la información**

Una vez establecido los criterios de selección de la información se estableció un bosquejo de los aspectos teóricos que permitieran darle salida a los objetivos planteados, el cual sería la guía que regiría la búsqueda de información. Posteriormente, se utilizó el motor de búsqueda de Google, [www.google.com](http://www.google.com) y <https://scholar.google.com/> de la cual se accedió a las distintas revistas científicas.

### **6.5. Presentación de la información**

El análisis de toda la información y presentación de la misma se realizó en el programa Microsoft Office 365.

## **6.6. Ética y confidencialidad de los datos**

En el transcurso de la investigación no fue necesario contar con ninguna forma de consentimiento, ni verbal, escrito o institucional. Sin embargo, se respetó el uso de las normas de referenciación para evitar el plagio que directamente se puede traducir a una transgresión ética como profesional e investigador.

## 7. Conclusiones

1. A partir de la revisión bibliográfica realizada, se documentaron 5 estudios a nivel mundial (Austria, Pekín y Hong Kong) sobre la microbiota intestinal en pacientes con COVID-19. En la mayoría de los estudios el mayor porcentaje de los pacientes fueron mujeres. Las principales comorbilidades asociadas fueron: úlcera duodenal, diabetes mellitus, insuficiencia renal, obesidad, epilepsia y hepatitis.
2. Los géneros bacterianos identificados en la microbiota intestinal de pacientes con COVID-19 en los estudios documentados en esta investigación fueron variables con un aumento de patógenos que se asociaron a la gravedad como: *Coprobacillus*, *Clostridium ramosum*, *Clostridium hathewayi*, o bien patógenos oportunistas como: *Bacteroidetes*, *Actinomyces viscosus*, *Bacteroides nordii*, *Bacteroides caccae*, *Streptococcus* clase *Bacilli*, *Rothia*, *Veillonella*, *Erysipelatoclostridium*, *Actinomyces*, *Erysipelotrichaceae 2\_2\_44<sup>a</sup>*, *Collinsella aerofaciens*, *Collinsella tanakaei*, *Streptococcus infantis*, *Morganella morganii*, *Parabacteroides merdae*, *Bacteroides stercoris*, *Alistipes onderdonkii*. De igual manera se describió una disminución de especies propias de la microbiota con amplia capacidad de regulación de la respuesta inmune e incluso dificultar la entrada del virus en los receptores ACE2 como: *Bacteroides dorei*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Bacteroides massiliensis*, *Bacteroides ovatus*, *Lachnospiraceae bacterium 5\_1\_63FAA*, *Eubacterium rectale*, *Ruminococcus obeum*, *Dorea formicigenerans*, *Alistipes onderdonkii*, *Adlercreutzia equolifaciens*, *Dorea formicigenerans*, *Clostridium leptum*, *Bifidobacterium adolescentia*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Eubacterium rectale*.
3. Los métodos diagnósticos utilizados en el estudio de la microbiota intestinal fueron métodos de extracción como PureFood de Maxwell RSC, kit QIAamp Viral RNA Mini, Kit DNeasy PowerSoil Pro, métodos de purificación como Kit de autenticación y OGM PureFood de Maxwell RSC (Maxwell® RSC), Instrumento Maxwell® RSC 48, métodos de amplificación como RT-qPCR, las bibliotecas se organizaron mediante el Kit Flex ADN de nextera con secuenciación de la región V3-V4 del gen del ARN ribosomal 16S con el sistema NovaSeq™ 6000. Se organizaron y clasificaron con el sistema Uparse 7.1 y RDP Classifier.

4. Entre los mecanismos de interacción entre la microbiota intestinal y el SARS-CoV-2 se encuentran los niveles de citocinas y los marcadores inflamatorios, lo cuales sugieren que el microbioma intestinal está involucrado en la magnitud de la gravedad de COVID-19 posiblemente mediante la modulación de las respuestas inmunitarias del huésped, además los trastornos metabólicos y gastrointestinales (GI) tienen un riesgo moderado a alto de infección por SARS-CoV-2, lo que indica la implicación directa de la disbiosis intestinal en la gravedad de COVID-19.

## 8. Referencias bibliográficas

- Aagaard, K., J., Antony, K., Ganu, R., Petrosino, J., & Versalovic, J. (2014). The placenta harbors a unique microbiome. *Science translational medicine*, 6(237), 237-65. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3008599>
- Amar, J., Burcelin, R., Ruidavets, J. B., Cani, P. D., Fauvel, J., Alessi, M. C., Chamontin, B., & Ferrières, J. (2008). Energy intake is associated with endotoxemia in apparently healthy men. *The American journal of clinical nutrition*, 87(5), 1219–1223. <https://doi.org/10.1093/ajcn/87.5.1219>
- Arandia, J, y Antezana, G. (2020). SARS-CoV-2: estructura, replicación y mecanismos fisiopatológicos relacionados con COVID-19. *Gaceta Médica Boliviana*, 43(2), 170-178. Recuperado de [http://www.scielo.org/bo/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1012-29662020000200009&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org/bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1012-29662020000200009&lng=es&tlng=es)
- Bedoya, M, Medina, J, Chau, V, Li, R, Vera, Á, García, P. (2020) Variantes del SARS-CoV-2: epidemiología, fisiopatología y la importancia de las vacunas. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 38(3):442-51. Doi: <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2021.383.8734>
- Belkaid, Y., & Harrison, O. (2017). Homeostatic Immunity and the Microbiota. *Immunity*, 46(4), 562-576. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.04.008>
- Cañete, R., Noda, A., Ferreira, V., Brito, K, y García, A. (2020). SARS-Cov-2, el virus emergente que causa la pandemia de COVID-19. *Revista Médica Electrónica*, 42(3), 1862-1881. Epub 30 de junio de 2020. Recuperado de [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1684-18242020000301862&lng=es&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1684-18242020000301862&lng=es&tlng=es).
- Casalino, L., Gaieb, Z., Goldsmith, J., Hjorth, C., Dommer, A., Harbison, A., Fogarty, C., Barros, E., Taylor, B., McLellan, J., Fadda, E. y Amaro, R. (2020). Beyond Shielding: The Roles of Glycans in the SARS-CoV-2 Spike Protein. *ACS Central Science* 6 (10), 1722-1734. Doi: <https://doi.org/10.1021/acscentsci.0c01056>

- Cheng, J. L., Huang, C., Zhang, G. J., Liu, D. W., Li, P., Lu, C. Y. y Li, J. (2020). *Zhonghua jie he hu xi za zhi = Zhonghua jiehe he huxi zazhi = Revista china de tuberculosis y enfermedades respiratorias*, 43(4), 327–331. <https://doi.org/10.3760/cma.j.cn112147-20200222-00148>
- Cheung, K. S., Hung, I., Chan, P., Lung, K. C., Tso, E., Liu, R., Ng, Y. Y., Chu, M. Y., Chung, T., Tam, A. R., Yip, C., Leung, K. H., Fung, A. Y., Zhang, R. R., Lin, Y., Cheng, H. M., Zhang, A., To, K., Chan, K. H., Yuen, K. Y., ... Leung, W. K. (2020). Gastrointestinal Manifestations of SARS-CoV-2 Infection and Virus Load in Fecal Samples From a Hong Kong Cohort: Systematic Review and Meta-analysis. *Gastroenterology*, 159(1), 81–95. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.03.065>
- Devillard, E., McIntosh, F. M., Paillard, D., Thomas, N. A., Shingfield, K. J., & Wallace, R. J. (2009). Differences between human subjects in the composition of the faecal bacterial community and faecal metabolism of linoleic acid. *Microbiology (Reading, England)*, 155(Pt 2), 513–520. <https://doi.org/10.1099/mic.0.023416-0>
- Edgar R. C. (2013). UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nature methods*, 10(10), 996–998. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2604>
- Effenberger, M., Grabherr, F., Mayr, L., Schwaerzler, J., Nairz, M., Seifert, M., Hilbe, R., Seiwald, S., Scholl-Buergi, S., Fritsche, G., Bellmann-Weiler, R., Weiss, G., Müller, T., Adolph, T. E., & Tilg, H. (2020). Faecal calprotectin indicates intestinal inflammation in COVID-19. *Gut*, 69(8), 1543–1544. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2020-321388>
- Gómez, M., y Acero, F. (2011). Composición y funciones de la flora bacteriana intestinal. *Revista Repertorio De Medicina Y Cirugía*, 20(2), 74–82. <https://doi.org/10.31260/RepertMedCir.v20.n2.2011.680>
- Gu, S., Chen, Y., Wu, Z., Chen, Y., Gao, H., Lv, L., ... y Li, L. (2020). Alteraciones de la microbiota intestinal en pacientes con enfermedad por coronavirus 2019 o gripe H1N1. *Enfermedades infecciosas clínicas*, 71 (10), 2669-2678. Doi: <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa709>

- Guan, W. J., Ni, Z. Y., Hu, Y., Liang, W. H., Ou, C. Q., He, J. X., Liu, L., Shan, H., Lei, C. L., Hui, D., Du, B., Li, L. J., Zeng, G., Yuen, K. Y., Chen, R.C., Tang, C. L., Wang, T., Chen, P. Y., Xiang, J., Li, S. Y (2020). Características clínicas de la enfermedad por coronavirus 2019 en China. *El New England journal of medicine (Revista de medicina de Nueva Inglaterra)*, 382(18), 1708–1720. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2002032>
- Hooper, L. V., Wong, M. H., Thelin, A., Hansson, L., Falk, P. G., & Gordon, J. I. (2001). Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine. *Science (New York, N.Y.)*, 291(5505), 881–884. <https://doi.org/10.1126/science.291.5505.881>
- Hussain, I., Cher, G., Abid, M. A., & Abid, M. B. (2021). Role of Gut Microbiome in COVID-19: An Insight Into Pathogenesis and Therapeutic Potential. *Frontiers in immunology*, 12, 76 59 65. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.765965>
- Icaza, M. (2013). Microbiota intestinal en la salud y la enfermedad. *Revista de Gastroenterología de México*, 78(4), 240-248. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.rgmx.2013.04.004>
- Jandhyala, S. M., Talukdar, R., Subramanyam, C., Vuyyuru, H., Sasikala, M., & Nageshwar Reddy, D. (2015). Role of the normal gut microbiota. *World journal of gastroenterology*, 21(29), 8787–8803. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i29.8787>
- Lam, E, León, A, León, K, Llamo, G, López, R, Luzuriaga, Mendoza, A, y Huamán, J. (2021). Bases moleculares de la patogénesis de Covid-19 y estudios in silico de posibles tratamientos farmacológicos. *Revista de la Facultad de Medicina Humana*, 21(2), 417-432. <https://dx.doi.org/10.25176/rfmh.v21i1.3327>
- Loeffelholz, M, y Tang, Y. (2020) Laboratory diagnosis of emerging human coronavirus infections-the state of the art. *Emerg Microbes Infect.* 9, 748-758. Doi: <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1745095>
- Lynch, S. & Pedersen, O. (2016). The Human Intestinal Microbiome in Health and Disease. *The New England journal of medicine*, 375(24), 2369–2379. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1600266>

- Merino, R, Taracena, P, Díaz, G, y Rodríguez, W. (2021) Microbiota intestinal: “el órgano olvidado”. *Acta Medica*. 19 (1): 92-100. <https://dx.doi.org/10.35366/98577>
- Mönckeberg, B, y Corsini, A. (2011). Microbiota intestinal, metabolismo y balance calórico. *Revista chilena de nutrición*, 38(4), 477-481. <https://dx.doi.org/10.4067/S0717-75182011000400011>
- Oladunni, F. S., Park, J. G., Pino, P. A., Gonzalez, O., Akhter, A., Allué-Guardia, A., Olmo-Fontáñez, A., Gautam, S., Garcia-Vilanova, A., Ye, C., Chiem, K., Headley, C., Dwivedi, V., Parodi, L. M., Alfson, K. J., Staples, H. M., Schami, A., Garcia, J. I., Whigham, A., Platt, R. N., 2nd, ... Torrelles, J. B. (2020). Lethality of SARS-CoV-2 infection in K18 human angiotensin-converting enzyme 2 transgenic mice. *Nature communications*, 11(1), 6122. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19891-7>
- Oliva, J. (2020). SARS-CoV-2 origen, estructura, replicación y patogénesis. *Alerta*, 3(2):79-86. DOI: <https://doi.org/10.5377/alerta.v3i2.9619>
- Organización Mundial de la Salud (26 de marzo de 2020). *Modos de transmisión del virus de la COVID-19*. Recuperado de <https://www.who.int/es/news-room/commentaries/detail/modes-of-transmission-of-virus-causing-covid-19-implications-for-ipc-precaution-recommendations>
- Organización Mundial de Salud (2021). *Manejo Clínico de la COVID-19: Orientaciones evolutivas*. Recuperado de <https://www.who.int/es/publications/i/item/WHO-2019-nCoV-clinical-2021-1>
- Pan, L., Mu, M., Yang, P., Sun, Y., Wang, R., Yan, J., Li, P., Hu, B., Wang, J., Hu, C., Jin, Y., Niu, X., Ping, R., Du, Y., Li, T., Xu, G., Hu, Q., & Tu, L. (2020). Clinical Characteristics of COVID-19 Patients With Digestive Symptoms in Hubei, China: A Descriptive, Cross-Sectional, Multicenter Study. *The American journal of gastroenterology*, 115(5), 766–773. <https://doi.org/10.14309/ajg.0000000000000620>
- Pastrian, G. (2020). Bases Genéticas y Moleculares del COVID-19 (SARS-CoV-2). Mecanismos de Patogénesis y de Respuesta Inmune. *Revista internacional de odontostomatología*, 14 (3), 331-337. <https://dx.doi.org/10.4067/S0718-381X2020000300331>

- Ramos, G, Carreto, B, Salcedo, C. (2020) Métodos diagnósticos. *Rev Latin Infect Pediatr.* 33 (s1): 33-41. <https://dx.doi.org/10.35366/96669>
- Rescigno, M., Urbano, M., Valzasina, B. *et al.* (2001) Las células dendríticas expresan proteínas de unión estrecha y penetran en las monocapas del epitelio intestinal para tomar muestras de bacterias. *Inmunologia de la naturaleza* 2, 361-367 Doi: <https://doi.org/10.1038/86373>
- Samuel, B. S., Shaito, A., Motoike, T., Rey, F. E., Backhed, F., Manchester, J. K., Hammer, R. E., Williams, S. C., Crowley, J., Yanagisawa, M., & Gordon, J. I. (2008). Effects of the gut microbiota on host adiposity are modulated by the short-chain fatty-acid binding G protein-coupled receptor, Gpr41. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(43), 16767–16772. <https://doi.org/10.1073/pnas.0808567105>
- Santos, G, Cortés, P, Vallejo, V, y Reyes, J. (2021). SARS-CoV-2: generalidades, origen y avances en el tratamiento. *Gaceta médica de México*, 157(1), 88-93. <https://doi.org/10.24875/gmm.20000505>
- Santos-Oliveira, J. R., Regis, E. G., Leal, C. R., Cunha, R. V., Bozza, P. T., & Da-Cruz, A. M. (2011). Evidence that lipopolisaccharide may contribute to the cytokine storm and cellular activation in patients with visceral leishmaniasis. *PLoS neglected tropical diseases*, 5(7), e1198. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001198>
- Sidhu, H., Hoppe, B., Hesse, A., Tenbrock, K., Brömme, S., Rietschel, E., & Peck, A. B. (1998). Absence of Oxalobacter formigenes in cystic fibrosis patients: a risk factor for hyperoxaluria. *Lancet (London, England)*, 352(9133), 1026–1029. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(98\)03038-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(98)03038-4)
- Turnbaugh, P., Ley, R., Mahowald, M., Magrini, V., Mardis, E. & Gordon, J. (2006). An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* 444, 1027–1031. Doi: <https://doi.org/10.1038/nature05414>
- Varga Z, Flammer AJ, Steiger P, Haberecker M, Andermatt R, Zinkernagel AS, et al. (2020). Endothelial cell infection and endotheliitis in COVID-19. *The Lancet*. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30937-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30937-5)

- Vignesh, R., Swathirajan, C. R., Tun, Z. H., Rameshkumar, M. R., Solomon, S. S., & Balakrishnan, P. (2021). Could Perturbation of Gut Microbiota Possibly Exacerbate the Severity of COVID-19 via Cytokine Storm? *Frontiers in immunology*, *11*, 607734. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.607734>
- Vodnar, D. C., Mitrea, L., Teleky, B. E., Szabo, K., Călinoiu, L. F., Nemeş, S. A., & Martău, G. A. (2020). Coronavirus Disease (COVID-19) Caused by (SARS-CoV-2) Infections: A Real Challenge for Human Gut Microbiota. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, *10*, 575559. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.575559>
- Wang, Q., Garrity, G. M., Tiedje, J. M., & Cole, J. R. (2007). Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Applied and environmental microbiology*, *73*(16), 5261–5267. <https://doi.org/10.1128/AEM.00062-07>
- Wolowczuk, I., Verwaerde, C., Viltart, O., Delanoye, O., Delacre, M., Pot, B. y Grangette C. (2008). Alimentando nuestro sistema inmunológico: impacto en el metabolismo. *Journal of Immunology Research*, 2008. Doi: <https://doi.org/10.1155/2008/639803>
- Xia, S., Zhu, Y., Liu, M. *et al.* (2020). Fusion mechanism of 2019-nCoV and fusion inhibitors targeting HR1 domain in spike protein. *Cell Mol Immunol* *17*, 765–767. <https://doi.org/10.1038/s41423-020-0374-2>
- Xu, Z., Shi, L., Wang, Y., Zhang, J., Huang, L., Zhang, C., Liu, S., Zhao, P., Liu, H., Zhu, L., Tai, Y., Bai, C., Gao, T., Song, J., Xia, P., Dong, J., Zhao, J., & Wang, F. S. (2020). Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome. *The Lancet. Respiratory medicine*, *8*(4), 420–422. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(20\)30076-X](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(20)30076-X)
- Yeoh, Y. K., Zuo, T., Lui, G. C., Zhang, F., Liu, Q., Li, A. Y., Chung, A. C., Cheung, C. P., Tso, E. Y., Fung, K. S., Chan, V., Ling, L., Joynt, G., Hui, D. S., Chow, K. M., Ng, S., Li, T. C., Ng, R. W., Yip, T. C., Wong, G. L., ... Ng, S. C. (2021). Gut microbiota composition reflects disease severity and dysfunctional immune responses in patients with COVID-19. *Gut*, *70*(4), 698–706. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2020-323020>

- Zhang Y, Zeng G, Pan H, Li C, Hu Y, Chu K, et al. (2021) Safety, tolerability, and immunogenicity of an inactivated SARS-CoV-2 vaccine in healthy adults aged 18-59 years: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1/2 clinical trial. *Lancet Infect Dis.* 2021;21(2):181-92. Doi: [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30843-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30843-4)
- Zuo, T., Liu, Q., Zhang, F., Lui, G. C., Tso, E. Y., Yeoh, Y. K., Chen, Z., Boon, S. S., Chan, F. K., Chan, P. K., & Ng, S. C. (2021). Depicting SARS-CoV-2 faecal viral activity in association with gut microbiota composition in patients with COVID-19. *Gut*, 70(2), 276–284. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2020-322294>
- Zuo, T., Zhang, F., Lui, G., Yeoh, Y. K., Li, A., Zhan, H., Wan, Y., Chung, A., Cheung, C. P., Chen, N., Lai, C., Chen, Z., Tso, E., Fung, K., Chan, V., Ling, L., Joynt, G., Hui, D., Chan, F., Chan, P., ... Ng, S. C. (2020). Alterations in Gut Microbiota of Patients With COVID-19 During Time of Hospitalization. *Gastroenterology*, 159(3), 944–955. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.05.048>