

UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA
Facultad de Ciencias y Filosofía “Alberto Cazorla Talleri”



Análisis metagenómico de la microbiota fecal de infantes con
previa microbiota alterada después de la administración de
lactoferrina bovina como tratamiento preventivo contra
diarrea

González Villaseca, Luis Antonio

TESIS PARA OPTAR POR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

Asesor:

MD/PhD. Theresa Ochoa Woodell

Co-Asesor:

Ph.D. Pablo Tsukayama

Lima - Perú

2020

A mis padres: Raquel y Luis

Irrumabo movet in montibus

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer en primer lugar a la doctora Theresa Ochoa, quien siempre me estuvo apoyando en la realización de este proyecto desde la tesis de Bachillerato hasta la tesis de Licenciatura. Muchas gracias por enseñarme cómo plantear una investigación, cómo escribir un grant, cómo comunicar mis ideas, entre muchas otras cosas. Muchas gracias por confiar en mí desde el inicio. Gran parte de lo que soy ahora se lo debo a usted. Siempre estaré eternamente agradecido.

En segundo lugar, al doctor Pablo Tsukayama, quien siempre me apoyó en la ejecución experimental y bioinformática de mi trabajo. Por enseñarme la importancia de planificar bien un experimento antes de ejecutarlos. Gracias por aclararme muchas dudas que tuve en el camino y por la paciencia y dedicación en la transmisión de conocimientos. Gracias por sacar lo mejor mí.

Quiero agradecer de forma especial a Susan Mosquito, quien me apoyó en la revisión de mi documento. Gracias por tu apoyo totalmente desinteresado y por tu aporte de ideas de pruebas bioinformáticas que se podrían agregar al trabajo. Gran parte de esta tesis no hubiera sido lo que es sin tu ayuda.

Así mismo, me gustaría agradecer a los miembros del Laboratorio de Infectología Pediátrica y el Laboratorio de Genómica Microbiana por su apoyo. En especial a David Durand por su apoyo técnico en algunos procedimientos y consejos en la parte experimental de mi tesis.

Gracias a mis padres por haberme apoyado durante la realización de mi tesis. Por entender mi necesidad de terminar mis experimentos y regresar de madrugada todos los días a casa. Gracias por dejarme volar.

Gracias a todas aquellas personas que donaron sus muestras para el desarrollo de mi tesis. Sin ustedes nada de esto sido posible.

También me gustaría agradecer al jurado de mi tesis. Muchas gracias por el tiempo dedicado a la revisión de mi documento sin dejar ningún cabo suelto. Gracias a ustedes el trabajo mejoró sustancialmente.

Finalmente quiero agradecer a mis amigos de la universidad: Lucero Mascaró, David Castañeda, Leonardo Hostos, Joaquín Gomez, Ivan Vasquez, Myriam Palacios, Stephany Mendieta, Luz Saavedra, Anika Eca, Brayan Gonzales, entre otros. En especial a Luz y Lucero por estar y escucharme cuando los necesité.

Una vez más, gracias a todos

Luis Antonio González Villaseca

ÍNDICE

I.	INTRODUCCIÓN	1
1.2	MARCO TEÓRICO	2
1.2.1	Microbiota intestinal infantil.....	2
1.2.2	Lactoferrina	4
1.3	JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO.....	7
II.	PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN Y OBJETIVOS	9
2.1	PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	9
2.2	OBJETIVO GENERAL.....	9
2.3	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	9
III.	MATERIALES Y MÉTODOS	10
3.1	DISEÑO DEL ESTUDIO.....	10
3.2	POBLACIÓN, MUESTRA Y TAMAÑO MUESTRAL	10
3.3	PROCEDIMIENTOS Y TÉCNICAS.....	12
A.	Extracción de ADN bacteriano.....	12
B.	Secuenciamiento del gen 16S ADNr.....	13
C.	Análisis bioinformático de la composición de la microbiota fecal	14
IV.	RESULTADOS	17
4.1	ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE SECUENCIAMIENTO	17
4.1.1	Extracción de ADN bacteriano	17
4.1.2	Preparación de la librería para el gen 16S ADNr.....	17
4.1.3	Secuenciamiento de librería 16S ADNr	18
4.1.4	Filtro de calidad de las secuencias.....	20
4.1.5	Análisis de diversidad y composición bacteriana	21
4.2	Secuenciamiento del marcador 16S ADNr de las muestras del estudio clínico de LF	22
4.2.1	Análisis de la integridad de las muestras	22
4.2.2	Extracción de ADN genómico bacteriano	23
4.2.3	Preparación de librería 16S.....	23
4.2.4	Secuenciamiento de librería 16s ADNr.....	24
4.2.5	Filtro de calidad de las secuencias.....	26
4.2.6	Control de calidad del secuenciamiento	27
4.3	Análisis de composición y diversidad bacteriana de las muestras.....	28
A.	Análisis de diversidad bacteriana	28
B.	Análisis de composición taxonómica de la microbiota fecal.....	30
C.	Búsqueda de biomarcadores taxonómicos bacterianos.....	35

V. DISCUSIÓN.....	37
VI. LIMITACIONES Y RECOMENDACIONES.....	41
VII. CONCLUSIONES.....	43
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44
IX. ANEXOS	50

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de la Lactoferrina..	4
Figura 2. Complejo receptor de Lactoferrina.....	6
Figura 3. Diagrama del marcador 16S ADNr.	7
Figura 4. Diseño del estudio..	12
Figura 5. Comprobación de la presencia de amplicón 16S ADNr.....	18
Figura 6. Comprobación de adición de adaptadores e índices - Estandarización Carril 1: Marcador de pares de bases.	18
Figura 7. Evaluación de la calidad de lectura de las muestras - Estandarización.....	20
Figura 8. Diversidad total encontrada por muestra según la profundidad de lecturas por muestra - Estandarización.	21
Figura 9. Frecuencia relativa de taxas bacterianas por cada muestra – Estandarización.....	22
Figura 10. Evaluación de integridad del ADN bacteriano total.	23
Figura 11. Comprobación de adición de adaptadores e índices - Muestras clínicas.....	24
Figura 12. Evaluación de la calidad de lecturas de las muestras clínicas.	25
Figura 13. Diversidad total encontrada por muestra según la profundidad de lecturas por muestra - Muestras clínicas.....	27
Figura 14. Gráfica de abundancia relativa de taxas bacterianas en las muestras control de secuenciamiento.	28
Figura 15. Diagrama de caja del índice de diversidad de Shannon para grupos LF y PB en diferentes puntos en el tiempo..	29
Figura 16. Diagrama de caja de índices de diversidad de Shannon para grupos LF-Disbiosis, LF-No-Disbiótico, PB-Disbiosis y PB-No-Disbiótico en diferentes puntos en el tiempo.	29
Figura 17. Composición bacteriana de la microbiota intestinal para cada individuo a nivel taxonómico de filo.	31
Figura 18. Diferencia de la abundancia relativa de los filos bacterianos más abundantes..	31
Figura 19. Composición bacteriana de la microbiota intestinal para cada individuo a nivel taxonómico de género.	32
Figura 20. Diferencia de la abundancia relativa de los géneros bacterianos más abundantes.	33
Figura 21. Comparación de composición de la microbiota intestinal según el tratamiento seguido (LF o PB).....	34
Figura 22. Comparación de composición de la microbiota intestinal según la condición previa de participante (Disbiótico o No-Disbiótico).....	35
Figura 23. Análisis discriminativo linear (LDA).....	36

LISTA DE FIGURAS SUPLEMENTARIAS

Figura Suplementaria 1. Índice de Shannon.	56
Figura Suplementaria 2. Unweighted Unifrac..	56
Figura Suplementaria 3. Diferencia en la abundancia relativa entre los biomarcadores encontrados por el análisis discriminativo linear.....	57

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Abundancia de lecturas únicas después del filtro de calidad - Estandarización de secuenciamiento del marcador 16S ADNr.....	20
Tabla 2. Abundancia de lecturas - Muestras de estudio.....	26

LISTA DE TABLAS SUPLEMENTARIAS

Tabla Suplementaria 1. Número de secuencias crudas (Secuencias sin procesamiento de calidad) y secuencias filtradas (secuencias después del procesamiento de calidad por el programa DADA2 – Secuenciamiento de estandarización.....	50
Tabla Suplementaria 2. Número de secuencias crudas (Secuencias sin procesamiento de calidad) y secuencias filtradas (secuencias después del procesamiento de calidad por el programa DADA2 – Secuenciamiento de estandarización.....	51
Tabla Suplementaria 3. Comparación del índice de diversidad de Shannon para los grupos LF y PB en diferentes puntos en el tiempo – Pruebas estadísticas.....	52
Tabla Suplementaria 4. Comparación de media y mediana del índice de Shannon para los grupos LF y PB en diferentes puntos en el tiempo	52
Tabla Suplementaria 5. Comparación del índice de diversidad de Shannon para los grupos LF y PB considerando su condición previa antes del inicio del tratamiento (Disbiótico/No-Disbiótico) en diferentes puntos en el tiempo – Pruebas estadísticas.....	53
Tabla Suplementaria 6. Comparación de media y mediana del índice de diversidad de Shannon para los grupos LF y PB considerando su condición previa antes del inicio del tratamiento (Disbiótico/No-Disbiótico) en diferentes puntos en el tiempo.	53
Tabla Suplementaria 7. Diferencia de la abundancia relativa de los filos más abundantes – Pruebas estadísticas.....	54
Tabla Suplementaria 8. Diferencia de la abundancia relativa de los géneros más abundantes – Pruebas estadísticas.....	54
Tabla Suplementaria 9. Comparación de la composición de la microbiota intestinal según el tratamiento seguido (LF o PB) en diferentes puntos en el tiempo – Pruebas estadísticas.....	55
Tabla Suplementaria 10. Comparación de la composición de la microbiota intestinal según el tratamiento (LF/PB) y condición previa (Disbiótico / No-Disbiótico) de los participantes en diferentes puntos en el tiempo – Pruebas estadísticas..	55
Tabla Suplementaria 11. Diferencia en la abundancia relativa entre los biomarcadores	

LISTA DE ABREVIATURAS

LF	Lactoferrina
bLF	Lactoferrina bovina
PB	Placebo
16S ADNr	Gen del ARN ribosomal componente de la subunidad menor (30S) de los ribosomas procariotas
PCoA	Análisis de coordenadas principales
LDA	Análisis Discriminativo Linear
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
kDa	Kilodalton
ASV	Variantes de secuencia de amplicones
QS	Puntaje de Calidad
pb	Pares de Bases
LID	Laboratorios de Investigación y Desarrollo
NEC	Enterocolitis Necrotizante
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana

RESUMEN

La diarrea está relacionada con una microbiota disbiótica que favorece la colonización y expansión de bacterias patógenas en el hospedero. La lactoferrina (LF) inhibe el crecimiento de patógenos y promueve el crecimiento de bacterias probióticas (de efecto beneficioso) en el intestino; sin embargo, se desconoce el efecto de la LF sobre una microbiota intestinal disbiótica. Este trabajo tiene como objetivo describir el efecto de la LF sobre la composición de una microbiota intestinal disbiótica de infantes de 12 a 18 meses de edad. Treinta niños divididos en dos grupos participaron en el estudio: 16 niños con múltiples episodios de diarrea el mes previo al tratamiento (Grupo Disbiótico) y 16 niños sanos (Grupo No-Disbiótico). En cada grupo, 8 infantes recibieron LF y 7 recibieron placebo durante 6 meses. Se secuenciaron las muestras fecales de los participantes a los 0, 2 y 4 meses después de iniciado el tratamiento (Tiempos M0, M2 y M4). La composición microbiana fue caracterizada mediante secuenciamiento del marcador 16s ADNr y análisis bioinformático. Los niños que recibieron LF aumentaron la diversidad de su microbiota en el tiempo M4 respecto a M0 (p -value <0.005 , prueba de Wilcoxon). Así mismo, infantes tratados con LF en el tiempo M4 presentaron un aumento de géneros bacterianos probióticos como *Ruminococcus* y *Roseburia* con respecto al punto M0. Identificamos un crecimiento de bacterias probióticas y de diversidad en la microbiota fecal después de la administración de LF independientemente de la condición inicial del paciente. Futuros estudios con un mayor número de pacientes permitirán confirmar estos resultados preliminares.

Palabras clave: Microbiota, Disbiosis, Lactoferrina,

ABSTRACT

Diarrhea is related to a dysbiotic microbiota that favors the growth of bacterial pathogens. Lactoferrin (LF) inhibits the growth of pathogens and promotes the growth of probiotic (beneficial) bacteria; nonetheless, the effect of LF on a dysbiotic microbiota is unknown. This work aims to describe the effect of LF in dysbiotic gut microbiota of infants aged between 12 and 18 months. Thirty infants divided into two groups had participated in this study: 16 infants with multiple episodes of diarrhea the month prior to the start of the treatment (Dysbiotic group) and 16 healthy children (Non-dysbiotic group). Within each group, 8 infants received LF as treatment, and 7 received placebo for six months. Fecal samples from participants were sequenced at 0, 2, and 4 months after treatment (Time points M0, M2, and M4). Microbiota composition was characterized by 16S rDNA sequencing and bioinformatic analysis. Infants who received LF presented an increase in microbiota diversity at time point M4 respect to M0 (p-value < 0.005, Wilcoxon test). Furthermore, infants treated with LF at M4 point presented an increase in probiotic bacterial genera such as *Ruminococcus* y *Roseburia*, respect to M0 point. We identified an increase of probiotic bacteria and diversity on fecal microbiota after the oral administration of LF independently of the initial condition of the patient. Further studies with larger number of patients are necessary to confirm these preliminary results.

Keywords: Microbiome, Dysbiosis, Lactoferrin.

I. INTRODUCCIÓN

La microbiota humana es un ecosistema de microorganismos (bacterias, virus, hongos, parásitos, entre otros) que tiene una influencia significativa en las funciones metabólicas, inmunológicas y cognitivas de su hospedero (individuo en el que habita), además de evitar la colonización por patógenos (1,2). Las bacterias representan el grupo predominante en la microbiota humana; estas tienen la capacidad de influir directamente en el estado de salud en su hospedero gracias a la producción de metabolitos y proteínas que regulan el metabolismo humano (3,4). La microbiota se encuentra en todo el cuerpo humano, sin embargo es el intestino el nicho con mayor abundancia y diversidad de bacterias (3).

En individuos sanos, la microbiota tiene una relación simbiótica con el huésped (denominada normobiosis); por el contrario, cualquier desviación de ese estado es considerado una disbiosis, la cual se caracteriza por favorecer el crecimiento de patógenos (2,3,5). Una microbiota intestinal en disbiosis se suele asociar con una infección en el tracto digestivo, que a su vez está relacionada con un cuadro de diarrea (definida por tres o más deposiciones acuosas o una deposición acuosa con sangre al día) (6,7). La diarrea es una de las principales causas de mortalidad infantil en menores de 5 años representando un 14% del total de las muertes infantiles a nivel mundial, siendo los países en vías de desarrollo los más afectados (6,7).

La lactoferrina (LF) es una proteína de la leche materna involucrada en la formación de la microbiota intestinal del neonato (8,9). Esta proteína favorece el crecimiento de bacterias ácido-lácticas intestinales que actúan como barrera protectora intestinal (ej: *Lactobacillus Leuconostoc*, *Peptoniphilus*, entre otros) y son consideradas bacterias probióticas (de efecto beneficioso) al evitar la colonización de patógenos intestinales, regulando positivamente el metabolismo del hospedero (9–11). Es por ello que la administración oral de LF puede ser un posible tratamiento preventivo contra un estado de disbiosis en la microbiota intestinal.

Sin embargo, en los últimos años se han reportado bacterias patógenas capaces de evadir la

acción biológica de la LF (12). Se reportaron bacterias capaces de expresar receptores específicos para LF que les permiten captar hierro que previamente había sido quelado por dicha proteína (12). Así mismo, estudios en ratones reportaron que la acción inmunomoduladora de la LF se podría reprimir cuando ésta es aplicada sobre una microbiota con composición bacteriana empobrecida (11).

Hasta la fecha no hay estudios clínicos que evalúen el efecto de la LF en una microbiota disbiótica. En este trabajo realizaremos un estudio descriptivo del efecto de la administración oral de LF sobre una microbiota intestinal en disbiosis mediante el análisis metagenómico de heces provenientes de infantes en un rango de edad entre 12 y 18 meses. Este es el primer estudio del efecto de la LF sobre una microbiota en disbiosis y mejorará el entendimiento del efecto de la suplementación de la administración de LF sobre la microbiota intestinal.

1.2 MARCO TEÓRICO

1.2.1 Microbiota intestinal infantil

La microbiota es un ecosistema de microorganismos (bacterias, hongos, virus, parásitos, entre otros) que colonizan e influyen significativamente en funciones metabólicas, inmunológicas y cognitivas del hospedero (1,2). Su composición se ve influenciada por factores tales como la genética del hospedero, tipo de parto, estilo de vida, tratamiento médico, entre otros (13). La microbiota bacteriana regula el metabolismo del hospedero gracias a la producción de metabolitos y proteínas (3,4). Los individuos saludables poseen una microbiota en estado de normobiosis (relación armónica con el hospedero); sin embargo la desviación de ese estado es considerado una disbiosis, en la cual se ve favorecido el crecimiento de microorganismos patógenos (1,14,15).

Si bien existe una microbiota bacteriana en todas las superficies del cuerpo del hospedero, el intestino es el nicho con mayor cantidad de bacterias (14,16). La microbiota intestinal cumple roles importantes desde el nacimiento en el neonato tales como la maduración de enterocitos, la diferenciación de linfocitos T, resistencia a la colonización por parte de bacterias patógenas, entre otros (3,14,17,18). Así mismo, la microbiota intestinal posee un conjunto genético 100 veces más grande que el del humano, el cual expresa productos bacterianos tales como aminoácidos esenciales, nucleótidos, metabolitos y proteínas; los cuales pueden ser utilizados por el huésped (16). Cualquier cambio en la composición de la microbiota

intestinal tendrá un impacto en la expresión de este conjunto bacteriano; el cual afectará directamente la salud del hospedero (4,16).

A. Formación de la microbiota intestinal en infantes

La microbiota del neonato proviene de la madre, y se transmite mediante la placenta, parto vaginal y consumo de leche materna (8,19). Dicha microbiota es predominantemente colonizada por especies bacterianas ácido-lácticas beneficiosas como *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, las cuales al producir proteínas con sitios N-terminales ácidos reducen el pH del ambiente intestinal e inhiben el crecimiento de bacterias patógenas (3,20,21). La colonización inicial con bacterias ácido lácticas permite al neonato resistir la colonización de bacterias patógenas, disminuyendo su susceptibilidad a infecciones (22).

La colonización de bacterias de efecto beneficioso es necesaria para la estabilización del metabolismo y el sistema inmune del infante entre los 18 meses y tres años de edad (2). La perturbación de la microbiota a una edad temprana afectará el desarrollo del infante y traerá repercusiones en su vida adulta (19,22).

B. Impacto del microbioma intestinal en disbiosis

Un estado de disbiosis puede ocurrir por contaminación bacteriana directa (contacto con el pezón durante la lactancia, uso de medicamentos, agua y equipo contaminado en la preparación de la leche en fórmula, entre otros) e indirectas (cambios en la función de la mucosa intestinal y alteraciones inmunológicas) (8). Así mismo, la interrupción de la transmisión de bacterias de efecto beneficioso (lo cual se puede ocasionar por parto por cesárea, baños excesivos, uso de antibióticos, alimentación con leche en fórmula, entre otros) incrementa la susceptibilidad a la colonización de bacterias patógenas, lo cual puede originar una disbiosis (3,8). Además, el uso de antibióticos elimina la microbiota del hospedero, dejando espacios y recursos disponibles para que bacterias exógenas (no propias de la persona) puedan colonizar el intestino (3,15,23).

La infección del intestino puede dañar el epitelio intestinal, lo cual puede favorecer una diarrea acuosa (condición en la cual aumenta el fluido y tránsito intestinal) que permite el crecimiento de patógenos con capacidad de adherirse a la mucosa intestinal y desplazar a la microbiota intestinal comensal (propia del hospedero), pudiendo intensificar el cuadro de la

diarrea (5,24,25). Infantes con diarrea aguda presentan una microbiota intestinal menos estable y un retraso significativo en su maduración intestinal, haciendo que la persona sea más propensa a desarrollar un cuadro diarreico en el futuro (5). En infantes, un episodio de diarrea hace que el intestino entre a un estado de disbiosis (5).

En neonatos la composición de la microbiota intestinal se caracteriza por ser inestable ya que se encuentra en formación; esto la hace propensa a ser perturbada y desarrollar un estado disbiótico (8,13,14). Una microbiota intestinal disbiótica es un factor de riesgo considerable para el desarrollo de sepsis, asma, colitis ulcerosas, enfermedad de Crohn, enterocolitis necrotizante (NEC), entre otras enfermedades (26–28).

1.2.2 Lactoferrina

La lactoferrina (LF) es una proteína que se encuentra en la leche materna humana en una concentración de 3.16 g/L y representa el 20% del total de proteínas presentes en este alimento (**Figura 1**) (9). Pesa 80 KDa, contiene 692 residuos de aminoácidos, se encuentra glicosilada en la zona N-terminal y posee dos lóbulos; cada uno de estos rodea al ión férrico con las cadenas laterales de Tyr, Asp y His (9). Dado que la gran mayoría de neonatos reciben leche materna como alimento exclusivo durante los primeros meses de vida, existe un contacto permanente de la LF con el intestino es constante (8).

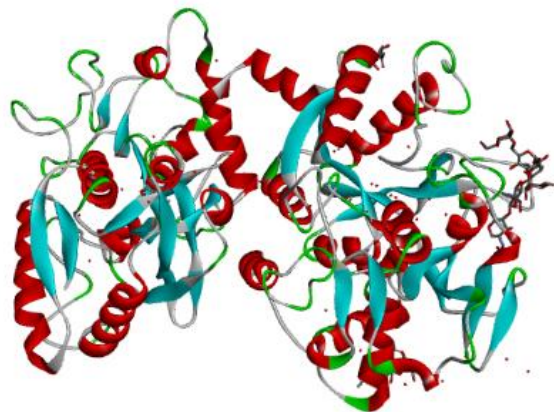


Figura 1. Estructura de la Lactoferrina. La lactoferrina (LF) es una proteína que se encuentra en la leche materna humana en una concentración de 3.16 g/L y representa el 20% del total de proteínas presentes en este alimento. Pesa 80 KDa, contiene 692 residuos de aminoácidos, se encuentra glicosilada en la zona N-terminal y posee dos lóbulos; cada uno de estos rodea al ión férrico con las cadenas laterales de Tyr, Asp y His (9). La estructura se descargó del Protein Data Bank (Código de acceso: 1LFG).

A. Función antimicrobiana de la lactoferrina

La LF posee propiedades antimicrobianas bacteriostáticas y bactericidas (29). En su acción bacteriostática la LF quela (secuestra) el hierro del ambiente, disminuyendo la disponibilidad de este elemento para el crecimiento bacteriano (9). En su acción bactericida, la LF desestabiliza la membrana celular bacteriana mediante la unión a los lipopolisacáridos y al ácido lipoteicoico (29). La LF en su forma nativa (20% de saturación de hierro) tiene la capacidad de unirse al lipopolisacárido (componente estructural bacteriano que puede ocasionar inflamación en la mucosa humana) libre en sangre, evitando la activación de respuestas proinflamatorias y shock séptico (29).

B. Efecto de la lactoferrina en la definición de la microbiota

La LF es una proteína capaz de definir la composición y estructura de la microbiota intestinal neonatal (8). En su forma nativa inhibe el crecimiento de bacterias patógenas mediante su actividad bactericida y bacteriostática (9). Además, esta proteína fomenta el crecimiento de bacterias acidolácticas como *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* (30,31).

Asimismo, se reportó que un grupo de infantes recién nacidos alimentados con leche materna, donde la LF (en su forma nativa) está presente, tuvieron una microbiota más diversa (mayor número de especies bacterianas) en comparación a un segundo grupo de infantes alimentados con leche en fórmula carente de LF (8). Sin embargo, un tercer grupo compuesto por infantes alimentados con leche de fórmula fortificada con LF (misma concentración de 3.16 g/L al igual que en la leche materna) presentaron una microbiota similar al grupo alimentado con leche materna (8). Este estudio sugiere que la LF promueve una mayor diversidad bacteriana en la microbiota intestinal.

Sin embargo, algunos estudios han reportado que existen bacterias de las familias *Neisseriaceae* y *Moraxellaceae* son que capaces de quelar el hierro que previamente había sido quelado por dicha proteína (**Figura 2**) (12). Además muchas bacterias patógenas secretan metaloproteínas capaces de quelar hierro del ambiente con mayor afinidad que la LF, compitiendo por la captura de hierro del ambiente (30).

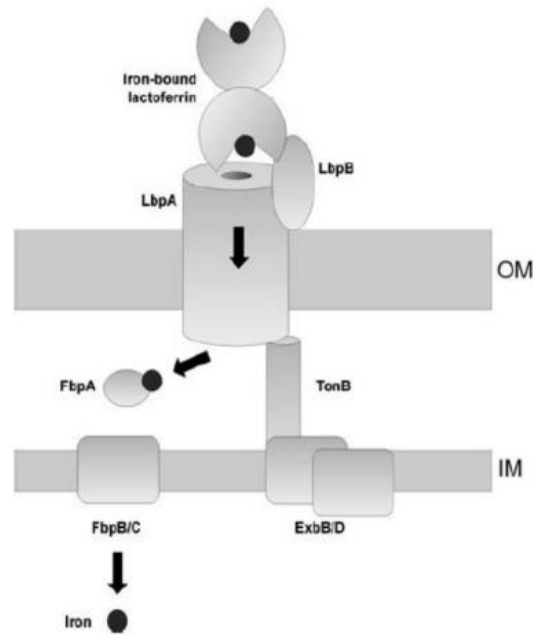


Figura 2. Complejo receptor de Lactoferrina. La lactoferrina cargada de hierro se une a las proteínas LbpA y LbpB. Posteriormente la interacción entre TonB y LbpA va a efectuar un cambio conformacional que va a permitir el transporte del hierro hasta el espacio intermembrana, en el hierro se une a la proteína FbpA. Finalmente el hierro es transportado hacia el interior del citoplasma a través del transportador FbpB/C (12).

Así mismo, algunos estudios han reportado que la leche materna y LF podrían tener un efecto negativo en modelos animales con una microbiota en disbiosis (11,32). Un estudio aplicó distintas concentraciones de leche a ratas prematuras y se determinó que el riesgo de desarrollar enterocolitis necrotizante (NEC) aumenta mientras se incrementa la cantidad de leche administrada (32). Sin embargo, este estudio no explica si la LF cumple un rol en este resultado. Además se sugiere que la acción inmunomoduladora de la LF se podría reprimir cuando esta es aplicada sobre una microbiota con composición bacteriana empobrecida, lo cual podría afectar la colonización de bacterias probióticas (11,33).

La leche materna, cuyo contenido de LF representa el 20% del total proteico, es el alimento exclusivo durante los primeros 6 meses de vida del infante (34). Debido al frecuente contacto del infante con LF, es relevante conocer su impacto en la composición de la microbiota intestinal en estado de disbiosis, ya que podría favorecer el crecimiento de patógenos en estas condiciones.

1.2.3 Secuenciamiento del marcador 16S ADNr para caracterizar la microbiota fecal

El estudio de la microbiota intestinal se realiza a través del secuenciamiento del marcador

16S ADNr en muestras fecales, las cuales son representativas de la composición de la microbiota intestinal. Se usa este marcador ya que presenta regiones variables que son únicas para cada género bacteriano, por lo que son usadas para identificar a las bacterias presentes en el material fecal (35).

Si bien este marcador tiene nueve regiones variables (V1-V9), se suelen secuenciar solo dos o tres regiones (**Figura 3**). Esto se debe a que los equipos de secuenciación por síntesis secuencian cadenas cortas (300 pares de bases de longitud aproximadamente), razón por la cual se suelen secuenciar los marcadores V3-V4 ya que se adaptan mejor a dicha longitud (36). Estandarizaciones previas reportan que estas regiones son capaces de describir la diversidad total de la microbiota intestinal de manera costo efectiva en el secuenciador MiSeq (Illumina® [San Diego, California – USA]) (36).



Figura 3. Diagrama del marcador 16S ADNr. Este marcador mide aproximadamente 1500 pares de bases y presenta nueve regiones variables únicas para cada taxa bacteriana (35). Dado el secuenciador MiSeq (Illumina® [San Diego, California – USA]) permite un secuenciar amplicones con una longitud máxima de 300 pares de bases se decidió secuenciar los fragmentos V3 y V4 dado que se ajustan a dicha medida. Así mismo estudios anteriores demostraron que esta región permite describir la microbiota intestinal humana a partir de muestras fecales (36).

1.3 JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

La microbiota intestinal posee un conjunto genético 100 veces más grande que el del humano, impactando directamente en la salud de su hospedero (16). En infantes, la microbiota intestinal cumple roles importantes en infantes como la maduración de enterocitos, la diferenciación de linfocitos T, resistencia a la colonización por parte de bacterias patógenas, entre otros (3). Un estado de disbiosis favorece la proliferación de patógenos en el intestino, lo cual afectará la composición de la microbiota intestinal y en consecuencia la expresión genética de este ecosistema bacteriano; pudiendo afectar la salud del hospedero (4,14,16).

Aunque ha sido demostrado mediante múltiples estudios en infantes que la aplicación de LF favorece el crecimiento de bacterias ácido lácticas que inhiben el crecimiento de patógenos intestinales (8,31), hay reportes en modelos animales que sugieren que la aplicación de LF en

una microbiota disbiótica puede intensificar la disbiosis en la microbiota intestinal (11,12,32). Existe una controversia, ya que hay estudios que sugieren que LF no tiene un efecto benéfico bajo condiciones iniciales en disbiosis; sin embargo, dicha afirmación no ha sido confirmada hasta la fecha.

Por lo tanto, **es relevante conocer el efecto que tiene la LF sobre la composición de una microbiota inicialmente disbiótica ya que podría intensificar un estado de disbiosis que afecte directamente a la salud del hospedero.** Considerando que el alimento exclusivo en los primeros seis meses de vida del infante es leche materna, la exposición que tendrá con LF será constante (8). Así mismo prácticas comunes hoy en día como la cesárea, el uso de antibióticos o alimentación con leche en botella son factores de riesgo para el desarrollo de disbiosis intestinal en infantes (3).

La literatura actual no presenta un estudio clínico que estudie la composición de la microbiota intestinal disbiótica en infantes después de la administración oral de la LF. El presente estudio tiene como objetivo describir el efecto que tiene la administración oral de LF sobre la composición de una microbiota intestinal en disbiosis en infantes. Para ello se utilizarán muestras de un ensayo clínico previo aleatorizado y doble ciego que comparó la incidencia de episodios de diarrea en infantes de 12 a 18 meses de edad tratados con lactoferrina bovina (bLF) (37). Este es el primer reporte del efecto de la LF sobre una microbiota en disbiosis, lo cual servirá para ampliar el conocimiento sobre el papel que tiene la LF sobre la microbiota intestinal y evaluar su uso como posible adyuvante en el tratamiento futuro para el aumento de diversidad bacteriana y la prevención de infecciones en el intestino.

II. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN Y OBJETIVOS

2.1 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es el efecto de la administración oral de LF sobre la microbiota intestinal de infantes de 12 a 18 meses de edad en estado disbiótico?

2.2 OBJETIVO GENERAL

Describir el efecto que tiene la administración oral de LF sobre la composición de una microbiota intestinal en disbiosis de infantes en un rango de edad de 12 a 18 meses a través del secuenciamiento de material fecal.

2.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Estandarizar la técnica de secuenciamiento del marcador 16S ADNr en el instrumento MiSeq (Illumina ® [San Diego, California – USA]) para el análisis de composición taxonómica de la microbiota fecal. Para lograr este objetivo, se realizó la extracción de ADN de heces frescas de 24 voluntarios adultos, y se secuenciaron librerías genómicas a partir de ellas.
- b) Describir el efecto de la administración oral de la LF sobre la composición de la microbiota fecal de infantes en estado de disbiosis (infantes que hayan presentado múltiples episodios de diarrea en el último mes antes de iniciar el tratamiento). Para ello se realizó la extracción de ADN, preparación de librerías y secuenciamiento de 90 muestras fecales procedentes de un estudio clínico previo (“Randomized double-blind controlled trial of bovine lactoferrin for prevention of diarrhea in children”) (37).
- c) Identificar los géneros bacterianos cuyo crecimiento se haya visto favorecido en el grupo de infantes que recibió administración oral de LF y en el grupo de infantes que recibió placebo como tratamiento.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 DISEÑO DEL ESTUDIO

Estudio exploratorio y transversal para determinar el efecto de la LF en la composición de la microbiota intestinal en disbiosis, estudiada a través de análisis metagenómico de materia fecal en infantes en un rango de edad entre 12 y 18 meses.

En resumen, se extrajo ADN genómico de muestras fecales y se amplificó por PCR la región V3-V4 del marcador 16S ADNr. Estos amplicones de PCR se secuenciaron para la determinación de las especies bacterianas que componen la microbiota fecal. Así mismo se describieron las especies bacterianas cuyo crecimiento se haya visto favorecido en alguno de los grupos experimentales.

3.2 POBLACIÓN, MUESTRA Y TAMAÑO MUESTRAL

Las muestras de material fecal provienen de un ensayo clínico aleatorizado y doble ciego que comparó la incidencia de episodios de diarrea en infantes de 12 a 18 meses de edad tratados con lactoferrina bovina (bLF [Tatua Co-operative Dairy Co, Ltd, Morrinsville, New Zeland]) o maltodextrín (azúcar de trigo inocuo [Montana SA, Lima, Perú]) como placebo (PB) en el distrito de Independencia – Lima desde enero del 2008 a mayo del 2011 (37). El objetivo de este estudio fue determinar el efecto de la administración oral de bLF en la prevención de diarrea. Estas muestras se encuentran en el banco de muestras del Laboratorio de Infectología Pediátrica (Laboratorios de Investigación y Desarrollo [LID], UPCH) almacenadas a -20°C.

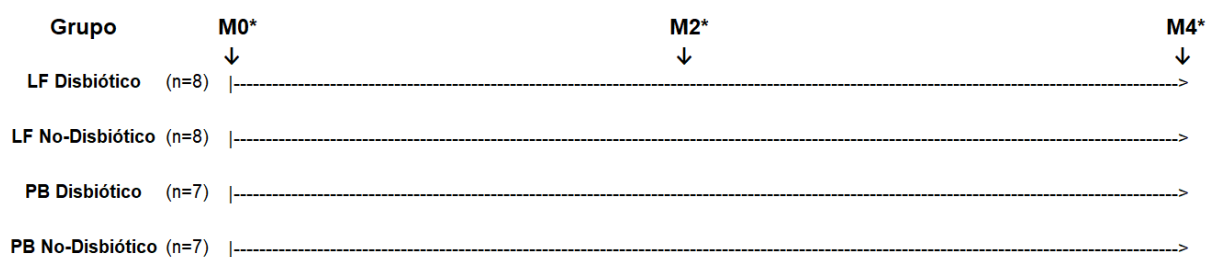
El estudio consistió en la administración oral aleatoria de LF a 278 infantes o PB a 277 niños. Los participantes recibieron administración oral de 0.5 g de LF o PB diluido en 25 ml de agua hervida dos veces al día por un periodo de 6 meses; la cual fue administrada por enfermeras comunitarias. Los criterios de inclusión fueron los niños cuyas madres aceptaron la participación de sus hijos en el estudio, con el criterio de tener entre 12 a 18 meses de edad. Se eligió ese rango de edad porque a partir de los 12 meses los infantes ya no se encuentran lactando generalmente, pero siguen en riesgo de presentar diarrea. Todos los infantes participantes tuvieron que ser destetados antes de iniciar el tratamiento ya que la leche materna contiene naturalmente LF en concentraciones variables, lo cual dificultaría la

evaluación de una concentración constante de LF sobre los participantes. Los criterios de exclusión fueron la presencia de diarrea severa, persistente o crónica, desnutrición severa, infecciones que requirieron hospitalización previa al estudio, VIH, enfermedades crónicas, historia de alergia e intolerancia a la leche, eczema, rinitis alérgica o asma al momento de iniciar el estudio.

Se seleccionaron 16 y 14 infantes que recibieron LF o PB respectivamente (30 participantes en total). En cada grupo experimental (LF o PB) se subdividieron en dos grupos: la primera mitad conformada por participantes microbiota disbiótica (infantes con múltiples episodios de diarrea un mes antes de iniciar el tratamiento) y la otra mitad con microbiota no-disbiótica (infantes que no presentaron episodios de diarrea en los últimos 6 meses previos al estudio). Un episodio de diarrea está definido clínicamente como la presencia de tres o más deposiciones de heces acuosas o al menos una deposición de heces acuosa y con sangre al día (38). Se analizaron las muestras fecales de los 30 infantes en tres tiempos diferentes (teniendo como tiempo cero el inicio de la administración oral de LF): a los 0; 2 (+/- 2 semanas) y 4 meses (+/- 2 semanas) después de haber iniciado el tratamiento, teniendo un total de 90 muestras fecales secuenciadas (**Figura 4**). Estos participantes no presentaron episodios de diarrea ni consumo de antibióticos a lo largo de los cuatro meses después de haber iniciado el tratamiento. Las muestras fecales se encontraban almacenadas en tubos colectores de heces (los cuales contienen una deposición fecal correspondiente a un día determinado), de los cuales se usaron 25 gramos para el análisis de la microbiota intestinal de cada participante.

Con el fin de evaluar únicamente la condición de presentar una microbiota en disbiosis antes del inicio del tratamiento se excluyeron muestras de niños con desnutrición y obesidad basados en datos antropométricos del estudio debido a que dichas condiciones afectan la composición de la microbiota intestinal (3).

Puntos en el tiempo y tratamientos



*Muestras fecales colectadas a los 0, 2 y 4 meses

Figura 4. Diseño del estudio. Se analizó la composición de la microbiota fecal en infantes que recibieron LF o PB como tratamiento preventivo. Se formaron dos subgrupos a partir de cada grupo experimental según la condición previa del infante (Disbiótico/No-Disbiótico) y se analizaron sus muestras fecales a los 0, 2 y 4 meses después de haber iniciado el tratamiento.

Todas las muestras fecales de infantes fueron codificadas, por lo que se prescindió de la identidad de los participantes del estudio. Dichas muestras fueron colectadas para el estudio titulado “Estudio randomizado, controlado de lactoferrina bovina para la prevención de diarrea en niños” (37); el cual fue aprobado por el Comité Institucional de Ética de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (SIDISI 51407).

3.3 PROCEDIMIENTOS Y TÉCNICAS

3.3.1 Estandarización de la técnica de secuenciamiento

Para realizar la estandarización de la técnica de secuenciamiento en el sistema MiSeq (Illumina ® [San Diego, California – USA]) de Illumina se solicitaron muestras fecales frescas a 24 voluntarios sanos entre 19 y 24 años de edad mediante consentimiento verbal. Luego de obtener las muestras, estas fueron codificadas para proteger la identidad de los voluntarios y almacenadas a -70°C en el Laboratorio de Infectología Pediátrica - UPCH hasta su procesamiento. El procesamiento consistió en: Extracción de ADN bacteriano, secuenciamiento del gen 16S ADNr y análisis bioinformático de la composición de la microbiota fecal en QIIME2.

A. Extracción de ADN bacteriano

Se extrajo el ADN bacteriano total de todas las muestras fecales siguiendo las indicaciones del protocolo del PowerSoil Pro Kit (QIAGEN ® [Venlo – Netherlands]) (39). Se tomaron 250 mg de material fecal y fueron colocados en tubos con perlas de granate junto a 800 µL de buffer que protege el ácido nucleico. El tubo se colocó en un adaptador de tubos de 2ml para el equipo Vortex-Genie® 2 (cat. no. 13000-V1-24) y lisaron las muestras con el vortex a una velocidad máxima por un tiempo de 20 minutos. Luego se centrifugaron las muestras a 15000 rpm a temperatura ambiente por un minuto y se trasladó el sobrenadante (500 µL) a un nuevo tubo y se agregó una solución (200 µL) que remueve inhibidores de PCR (ADN no orgánico, material inorgánico, proteínas, entre otros). Después, se centrifugó la muestra a 15000 rpm a temperatura ambiente por un minuto y se transfirió el sobrenadante a una alta solución salina con el fin que el ADN se pueda unir a una membrana de sílica. Se pasó el sobrenadante por una membrana de sílica en un nuevo tubo y se le agregó un buffer de lavado (500 µL), el cual

remueve proteínas y contaminantes no solubles en agua atrapados en la membrana. Después, se le agregó otro buffer de lavado (500 µL) cuya composición está basada en etanol, el cual removió residuos de sal. Finalmente se agregó el buffer de elución (50 µL) y se precipitó el ADN. Posteriormente se midió la concentración de ADN en el equipo Nanodrop 2000 midiendo a una longitud de onda de 260 nm. La pureza se calculó midiendo la muestra a una longitud de onda de 230 nm (con el fin de evaluar contaminación por sales) y 280 nm (con el fin de evaluar contaminación por proteínas. Se aplicaron los ratios de 260/230 nm y 260/280 nm. Idealmente se buscan valores alrededor de 1.7 – 2.0; en caso que algún valor no esté dentro de dicho rango podría indicar una contaminación por sales (en caso que el ratio 260/230 supere el valor de 2.0) o por proteínas (en caso que el ratio 260/280 supere el valor de 2.0) (40).

B. Secuenciamiento del gen 16S ADNr

Se realizó un secuenciamiento paired-end (Secuenciamiento de amplicones producidos por primers forward y reverse) del marcador 16S ADNr en el equipo MiSeq (Illumina® [San Diego, California – USA]) (41). Brevemente, se amplificó la región V3-V4 del marcador 16S ADNr del ADN bacteriano amplificado mediante PCR. Luego se eliminaron los restos del ADN bacteriano mediante limpiezas por perlas magnéticas y se le añadió un índice único (secuencia nucleotídica única para asignar la pertenencia de una secuencia a su muestra de origen) a cada muestra usando el kit Nextera XT (Illumina® [San Diego, California – USA]) mediante PCR. Los amplicones (productos de PCR) fueron secuenciados en corridas de 2x300 pb (Secuenciamiento de productos de los primers forward y reverse leyendo 300 pares de bases). Finalmente, se asignaron las secuencias a sus muestras correspondientes según sus secuencias de índices únicos.

Se utilizaron las siguientes muestras control para el secuenciamiento de muestras clínicas: réplicas de las muestras de estandarización (STD) de los voluntarios adultos 1, 2 y 4 (muestras que fueron secuenciadas en el primer secuenciamiento de estandarización) y una réplica de la muestra clínica LF-D-3-M4. Esto se realizó con el fin de estudiar la reproducibilidad de los resultados del secuenciamiento de estandarización y el secuenciamiento de las muestras clínicas.

C. Análisis bioinformático de la composición de la microbiota fecal

Al final del secuenciamiento se obtiene un archivo fastq (formato de texto que contiene las secuencias de ADN con su respectivo puntaje de calidad de secuenciamiento para cada nucleótido). Se analizó la composición de la microbiota de los participantes en el programa QIIME2 versión 2020.2 (42). Se siguieron los siguientes pasos:

C.1 Control de calidad de las secuencias

Se realizó un análisis de calidad utilizando el programa *dada2* para cortar las secuencias cuya calidad promedio fuera menor que 25 QS (valor que hace referencia a la probabilidad de haber leído un nucleótido erróneo, el cual en este caso es de 0.3 %); terminando así con secuencias de 251 pares de bases de longitud. Para ello el programa analiza cada secuencia y elimina aquellas que hayan presentado como máximo dos errores de lectura en una secuencia.

Luego, se eliminaron los índices (secuencia nucleotídica única para asignar la pertenencia de una secuencia a su muestra de origen – Sección 3.3.1 - B) y secuencias quimeras (secuencias híbridas procedentes de distintas muestras). Las secuencias que pasaron el filtro de calidad fueron agrupadas con un 100% de similaridad, formando grupos llamados ASVs (Variantes de secuencia de amplicones) (43).

C.2 Análisis de composición de la microbiota fecal

Se analizó la diversidad, composición e identidad taxonómica de la microbiota de los participantes con el fin de describir la composición de la microbiota fecal. Para ello se realizaron los siguientes análisis:

Análisis de diversidad

Se comparó la diversidad taxonómica entre los grupos experimentales aplicando el Índice de Shannon, el cual asigna un valor proporcional al número de ASVs encontrada en cada muestra (Riqueza) y su abundancia relativa (**Figura suplementaria 1**). Se comparó el número de ASVs de cada grupo experimental aplicando una prueba de Wilcoxon (prueba no-paramétrica) con una corrección de FDR (False discovery rate), el cual controla el error tipo I (la probabilidad de rechazar incorrectamente la hipótesis nula) cuando se realizan múltiples comparaciones (44).

Se eligió esta prueba estadística ya que está diseñada para hacer comparaciones pareadas (comparación de dos muestras) correspondiente a dos grupos diferentes, lo cual se ideal para comparar el índice de diversidad de dos grupos diferentes (45). Este cálculo se realizó en R versión 3.6.1 utilizando la función ‘compare_means’ del paquete ‘[ggpubr](#)’ versión 0.3.0.

Comparación de composición entre grupos experimentales

Se comparó la composición de la microbiota fecal aplicando la métrica de *Unweighted Unifrac* (medida que toma en cuenta diferencias filogenéticas entre dos muestras diferentes). Brevemente, se crean árboles filogenéticos con los ASVs encontrados para cada muestra y luego cada árbol es comparado con cada uno de los participantes (**Figura suplementaria 2**). Para crear estos árboles se hace un alineamiento inicial de las secuencias por el programa *mafft* y para luego ser procesados por el programa *fast-tree* aplicando el método de maximum likelihood (42). Valores más altos en el índice de *Unweighted Unifrac* hacen referencia a una mayor diferencia de composición de la microbiota intestinal entre los participantes. Los resultados son representados en un gráfico de coordenadas principales (PCoA), en donde las muestras con una composición similar de microbiota se encuentran más cercanas entre sí. Los grupos fueron comparados aplicando una prueba de Permanova (Prueba No-paramétrica).

Identificación taxonómica de la microbiota fecal

Se realizó una identificación taxonómica a partir de las secuencias obtenidas mediante la comparación con la base de datos de Silva (Versión 132) (46). Se eligió esta base de datos debido a ser una de las más actualizadas (versión del 10 de abril del 2018) compatibles con Qiime2 2020.2 (<https://www.arb-silva.de/download/archive/qiime>). Para ello se utilizó el programa Vsearch para realizar la identificación de los ASVs encontrados con la base de datos de Silva (47). Finalmente se construyó un gráfico de barras de abundancia relativa que muestra la composición de la microbiota de cada participante, en donde se muestran los 25 géneros más abundantes de la microbiota intestinal para cada muestra analizada.

Análisis Discriminativo Linear (LDA)

Esta prueba identifica géneros bacterianos que se hayan visto enriquecidos en grupos

experimentales específicos (llamados también biomarcadores). Brevemente, se usa la tabla de abundancia relativa (en porcentaje) de cada género bacteriano identificado para cada participante (Creado anteriormente por el programa Dada2). Se le adiciona manualmente a esta tabla una etiqueta que indique la pertenencia de una muestra a un determinado grupo y se sube a la aplicación web Galaxy para que los datos sean procesados por el programa LefSe (<http://huttenhower.org/galaxy/>) (48). Luego, el programa compara los géneros cuyas abundancias difieren entre dos grupos experimentales (el programa aplica un test estadístico de Kruskal Wallis con un método de corrección de FDR). Para cada género que haya diferido se le asigna un puntaje de acuerdo a la diferencia de abundancia entre los grupos experimentales. Finalmente se grafican aquellos géneros que superen un log-score de 2 (48).

3.3.2 Análisis de la composición taxonómica de la microbiota intestinal en disbiosis de infantes que recibieron administración oral de LF

Se procedió con el procesamiento de las muestras del estudio clínico de Lactoferrina de infantes entre 12 y 18 meses de edad antes mencionado. Se realizó la misma metodología descrita en la estandarización de la técnica (sección 3.3.1). Se extrajo el ADN y se corrieron 5 μ L en un gel de agarosa al 1% comparando la integridad del ADN de las muestras frescas (voluntarios entre 19-24 años de edad) contra muestras almacenadas por 10 años (estudio clínico de administración oral de LF). Luego se procedió con el secuenciamiento y análisis bioinformático.

IV. RESULTADOS

4.1 ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE SECUENCIAMIENTO

Se hizo una estandarización de la preparación de librería y secuenciamiento del gen marcador 16S ADN_r, ya que fue la primera vez que se usó este protocolo en el equipo MiSeq de la Unidad de Epidemiología Molecular - UPCH. Para ello se trabajó con muestras fecales frescas externas al estudio clínico y se determinó que el protocolo implementado permitió obtener secuencias de calidad.

4.1.1 Extracción de ADN bacteriano

La concentración de ADN en las 24 muestras de voluntarios adultos fue de 286 +/- 70 ng/ μ l. La absorbancia promedio a 260/230 fue de 1.82 +/- 0.59, la cual indica la que no hay presencia de contaminantes como EDTA, carbohidratos y fenoles. Así mismo la absorbancia a 260/280 fue de 1.78 +/- 0.29, el cual indica que no hay contaminación de proteínas (40). Estos ratios de absorbancias son los permitidos para la preparación de librería del marcador 16S ADN_r según el protocolo de Illumina.

4.1.2 Preparación de la librería para el gen 16S ADN_r

Se realizó un primer PCR con el fin de amplificar el marcador 16S ADN_r. Se eliminaron dímeros de primers y primers libres mediante purificación con perlas magnéticas. Para comprobar la presencia de amplicones, se corrieron 18 muestras representativas en un gel de agarosa al 1%. Se muestra una banda de aproximadamente 500 pb en los 18 carriles, correspondiente al amplicón de interés (**Figura 5**). Se observó una amplificación en todos los carriles, mas no en aquellos que fueron cargados con controles negativos (Reactivos de PCR que no fueron cargador con ADN) en los carriles 35 y 36.

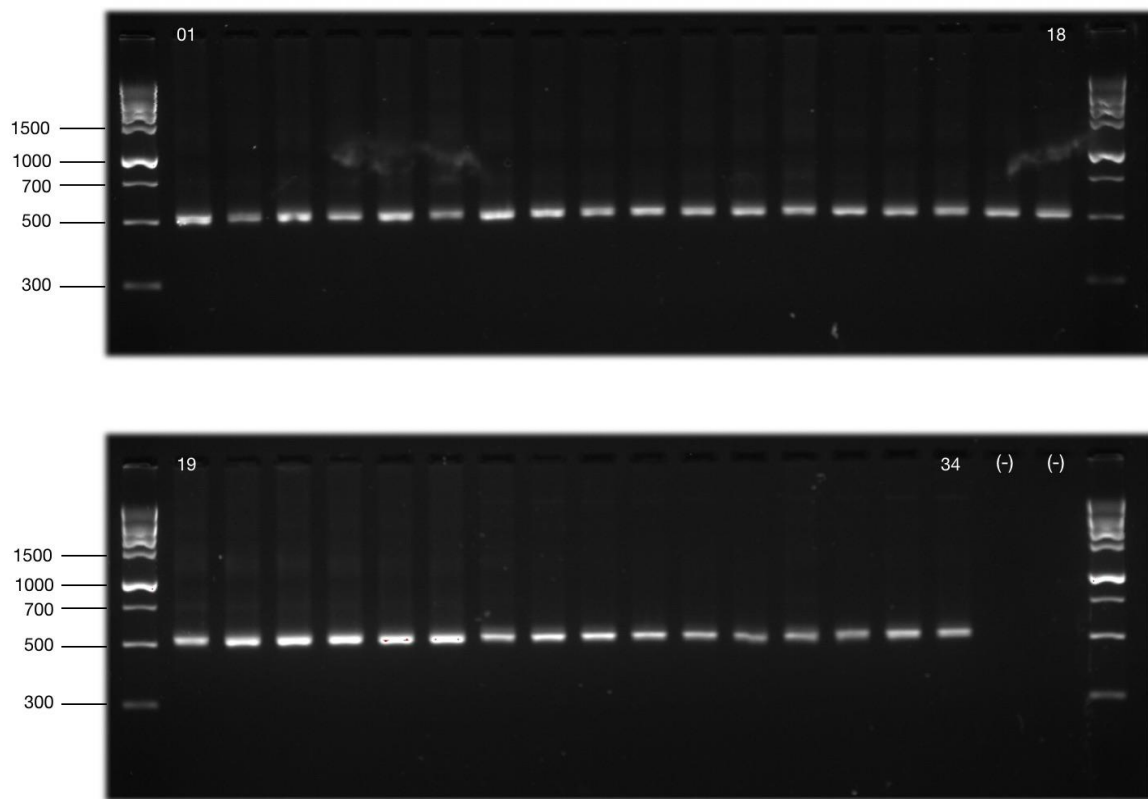


Figura 5. Comprobación de la presencia de amplicón 16S ADNr. Carril 1: Marcador de pares de bases. Carril 2-19: Muestras de ADN después de la amplificación del gen 16s ADNr. Se comprueba la presencia del amplicón de interés en todas las muestras.

Luego, se realizó un segundo PCR para añadir los índices únicos a los amplicones obtenidos con el fin de asignar la pertenencia de las secuencias a su muestra de origen. Se realizó otra limpieza con perlas magnéticas y una segunda corrida de electroforesis con 6 muestras representativas comparando el primer y el segundo PCR para determinar la adición de los índices (**Figura 6**). Los carriles que terminan en el número 1 corresponden al producto del primer PCR, en los cuales se observan bandas de aproximadamente 500 pb. Las muestras que terminan en 2 corresponden al producto del segundo PCR y se observan bandas por encima de los 500 pb, lo cual sugiere que se añadieron los índices de forma correcta.

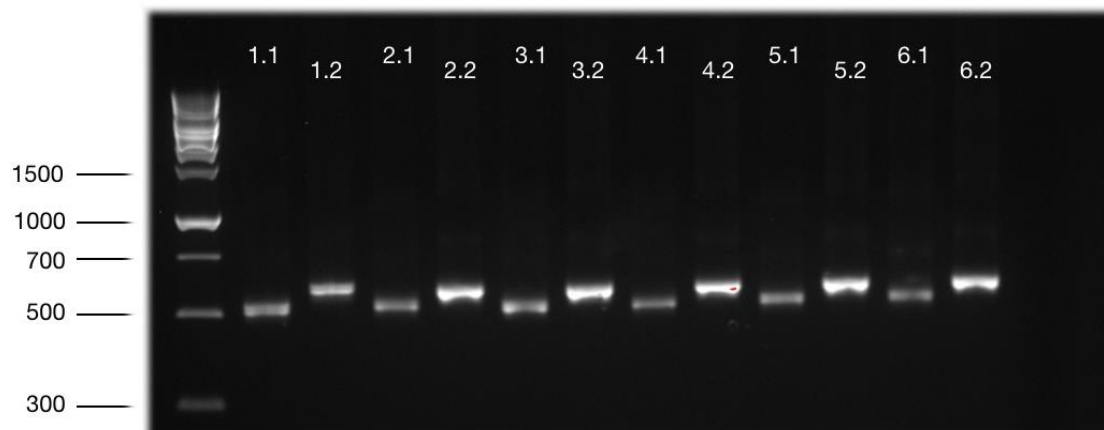


Figura 6. Comprobación de adición de adaptadores e índices - Estandarización Carril 1: Marcador de pares de bases. Carril 2-13: muestras representativas de ADN del estudio. Las muestras que terminan en 1 son los amplicones producidos en el primer PCR, mientras las que terminan en 2 son las que se le adicionaron los adaptadores y los índices.

4.1.3 Secuenciamiento de librería 16S ADNr

Se realizó el secuenciamiento paired-end (Secuenciamiento de los productos Forward y Reverse) de las librerías del marcador 16S ADNr en el equipo MiSeq (Illumina® [San Diego, California – USA]). Se obtuvieron un total de 961 665 secuencias crudas. Se hizo un análisis de calidad de las secuencias en el programa Qiime2-2020.2 (**Figura 7**). Se muestran gráficas de la calidad promedio de las lecturas forward y reverse para cada base nucleotídica. Se obtuvo una calidad promedio de 38 QS que indica una probabilidad de 1.58×10^{-4} de cometer un error de lectura de base, lo cual es esperado para lecturas de secuencias de calidad alta (**Figura 7**) (49).

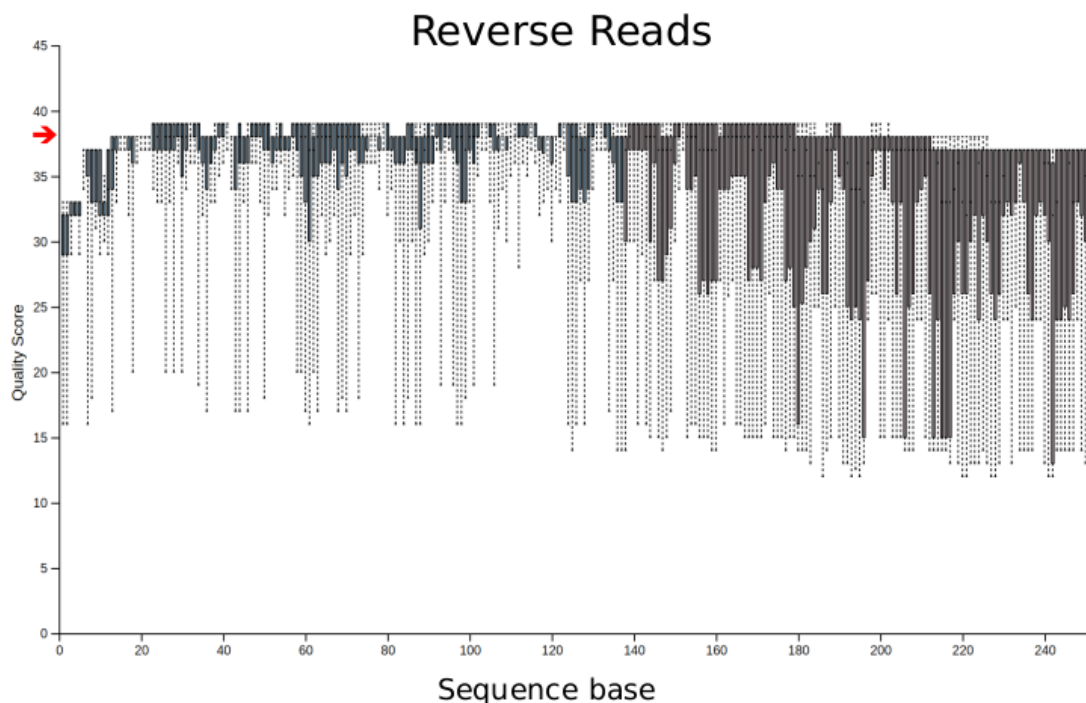
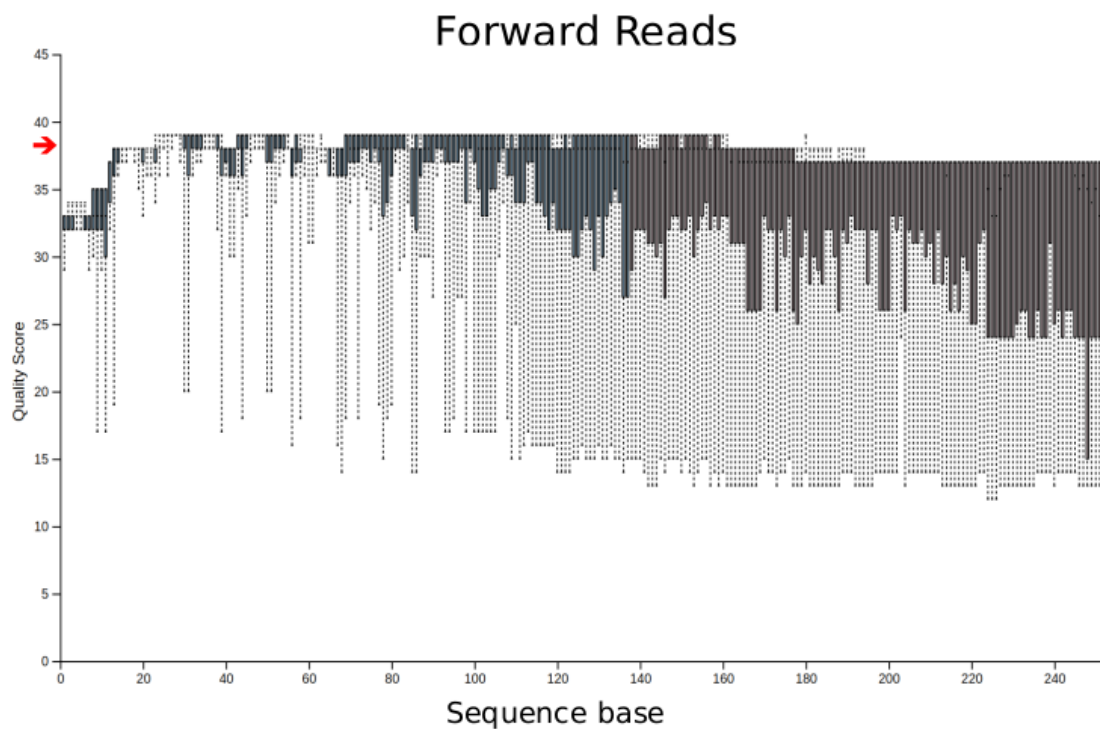


Figura 7. Evaluación de la calidad de lectura de las muestras - Estandarización. Se muestran los datos en diagramas de calidad de las lecturas de secuenciamiento para cada nucleótido a lo largo del amplicón para cada primer usado: A (primer Forward) y B (primer reverse). En promedio, la calidad fue de 38 QS (indicado por la flecha roja).

4.1.4 Filtro de calidad de las secuencias

Se cortaron los extremos de las secuencias cuyo promedio de calidad fuera menor a 25 QS, usando el amplicón de PCR del marcador 16S ADNr desde el nucleótido 0 hasta el 251 (tanto para las secuencias forward y reverse). Se ejecutó el programa *dada2*, el cual elimina secuencias que presentaron más de dos errores de lectura de nucleótidos (43). Después se eliminaron las secuencias quimeras (secuencias que son formadas por amplicones de dos muestras diferentes durante el PCR) y se formaron grupos de secuencias que presentaban un 100% de similitud (ASVs). Se eliminaron las secuencias repetidas y se almacenó la abundancia relativa de cada secuencia. Los datos de las abundancias relativas para cada amplicón se almacenaron para posteriores análisis. Se obtuvo un promedio de 10 606 secuencias filtradas únicas por muestra, lo cual está dentro de lo esperado en un secuenciamiento de calidad (**Tabla 1**) (50). La información detallada del número de secuencias crudas de entrada y secuencias filtradas después del procesamiento se encuentra en la información suplementaria (**Tabla suplementaria 1**).

Abundancia de lecturas únicas	
Mínimo	9053
Mediana	10 338
Media	10 606
Máximo	13 201

Tabla 1. Abundancia de lecturas únicas después del filtro de calidad - Estandarización de secuenciamiento del marcador 16S ADNr.

Se recomienda que al menos cada muestra humana presente 1000 lecturas únicas al menos después del filtro de calidad para realizar posteriores análisis debido a que dicha profundidad de secuenciamiento no representa la diversidad total de la microbiota fecal; sin embargo todas las muestras superaron dicha cifra, razón por la cual ninguna fue descartada (51).

Se evaluó si el secuenciamiento fue capaz de representar la diversidad bacteriana presente en cada muestra. Para ello se graficó el número de secuencias únicas (eje x) contra la diversidad bacteriana (eje y) encontrada en dicho punto representado por el índice de Shannon (índice el cual asigna un valor proporcional al número de especies presentes en un ecosistema) (**Figura suplementaria 5**) (**Figura 8**). Se observa que todas las muestras alcanzan un valor máximo de diversidad cuando pasan de las 1000 lecturas únicas, indicando que se ha secuenciado la diversidad bacteriana total presente en cada muestra. Este resultado sugiere que se logró cuantificar la diversidad total bacteriana para cada muestra.

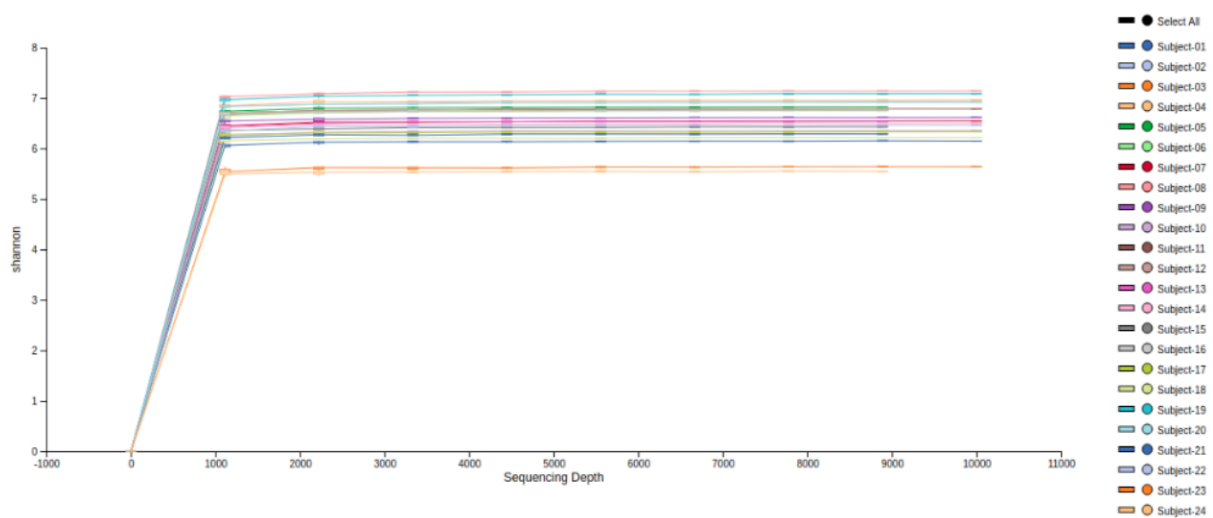


Figura 8. Diversidad total encontrada por muestra según la profundidad de lecturas por muestra - Estandarización. Se cuantificó la diversidad encontrada para cada muestra aplicando un índice de Shannon conforme se va aumentando la profundidad de secuenciamiento.

4.1.5 Análisis de diversidad y composición bacteriana

Se reportó el género *Faecalibacterium* como el más abundante en la mayoría de participantes voluntarios. Del total de 1418 taxas reportadas, 1407 pudieron ser identificadas a un nivel de género. Las otras dos bacterias más abundantes fueron del género *Bacteroides* y *Blautia* respectivamente. Se observó que todos los participantes presentaron una composición única en su microbiota fecal, lo cual respalda estudios anteriores que estudiaron el microbioma humano (3) (**Figura 9**). Fue posible una identificación hasta nivel de género en la mayoría de especies reportadas (**Figura 9**).

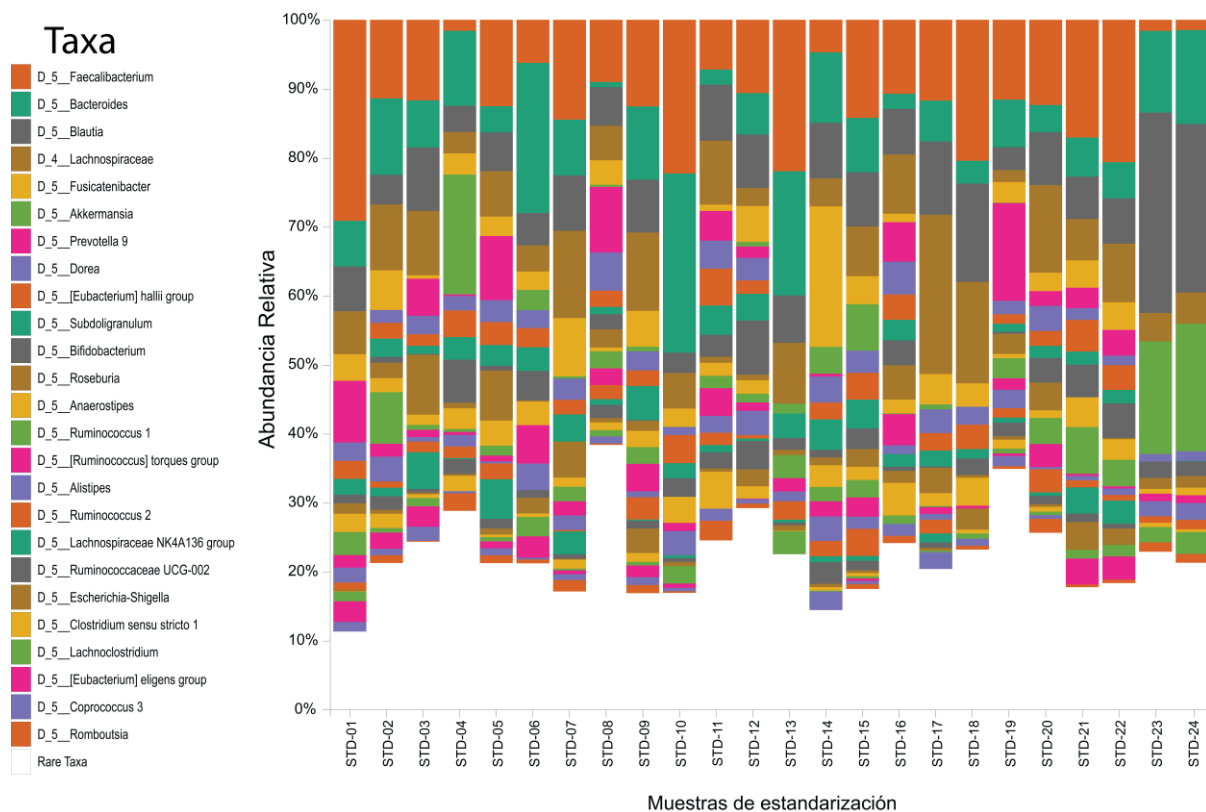


Figura 9. Frecuencia relativa de taxas bacterianas por cada muestra – Estandarización. Gráfico de abundancia relativa de las 25 especies bacterianas más abundantes durante el secuenciamiento de 16S ADNr V3-V4. Las muestras corresponden a 24 voluntarios adultos (STD). Los prefijos ‘D4’ y ‘D5’ hacen referencia a niveles taxonómicos de familia y género respectivamente.

4.2 Secuenciamiento del marcador 16S ADNr de las muestras del estudio clínico de LF

4.2.1 Análisis de la integridad de las muestras

Debido a que las muestras del estudio fueron almacenadas por 10 años, se realizó una corrida en gel de agarosa para comparar la integridad del ADN de las muestras del estudio con muestras frescas de voluntarios. Se corrieron 8 muestras del estudio clínico y 4 de voluntarios con un volumen de 5 uL cada una. No se normalizaron las concentraciones de cada muestra al momento de ser cargadas en el gel.

Los carriles 1 y 2 pertenecen a infantes que recibieron placebo con una microbiota disbiótica previo al tratamiento; carriles 3 y 4, a infantes con microbiota no-disbiótica que recibieron placebo; carriles 5 y 6, a infantes con microbiota disbiótica que recibieron LF y carriles 7 y 8 a los grupos que recibieron LF en estado no-disbiótico. Los carriles 9, 10, 11 y 12 pertenecen a los voluntarios adultos. Todas las muestras, independiente de su tiempo de colección, presentan signos de degradación, indicados por un ‘smear’ de las bandas (**Figura 10**).

Dado que las muestras de voluntarios fueron secuenciadas exitosamente a partir de ADN parcialmente degradado, se espera que las muestras del estudio presenten el mismo rendimiento.

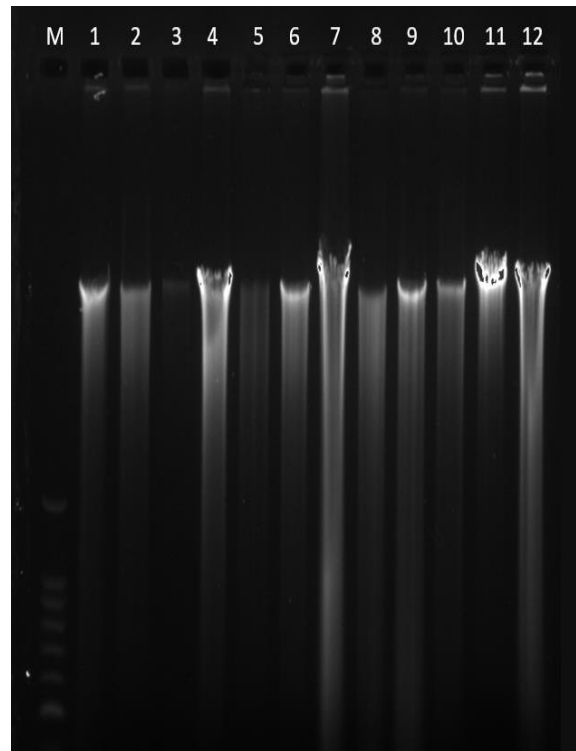


Figura 10. Evaluación de integridad del ADN bacteriano total. M: Marcador. Carriles 1-8: Muestras del estudio clínico de LF. Carriles 9-12: Muestras de los voluntarios.

4.2.2 Extracción de ADN genómico bacteriano

La concentración promedio de ADN de las muestras del estudio fue de 109.13 ng/ μ l. La absorbancia a 260/230 fue de 1.35 +/- 0.35, la cual indica una mínima la presencia de contaminantes como EDTA, carbohidratos y fenoles. Así mismo la absorbancia a 260/280 fue de 1.93 +/- 0.12, la cual indica que no hay contaminación de proteínas (40).

4.2.3 Preparación de librería 16S

Se utilizaron 90 muestras del estudio clínico de LF en infantes y 5 muestras control para la preparación de la librería 16S ADNr. Las muestras control corresponden a 3 muestras de voluntarios adultos que ya fueron previamente secuenciados con el objetivo de validar la reproducibilidad de nuestro secuenciamiento. Así mismo se secuenció una réplica de una muestra procedente del estudio clínico de LF (muestra N°9) y un control negativo de PCR (muestra que solo contiene los reactivos necesarios para la preparación del PCR).

Se realizó un primer PCR para amplificar el marcador 16S y se realizó una primera corrida de electroforesis en gel de agarosa al 2 % para comprobar la presencia del marcador (**Figura 8**). Los carriles 1-6 y 8 muestran la presencia de una banda de aproximadamente 500 pb donde se cargaron muestras representativas del estudio clínico de LF; así mismo no se observa presencia de amplicones en el carril perteneciente al control negativo (carril 7).

Se añadieron los índices a los amplicones mediante un segundo PCR. Los carriles 9-16 muestran bandas de aproximadamente 600 pb donde se cargaron muestras representativas del estudio clínico de LF. Este resultado sugiere la adición exitosa de índices a los amplicones del marcador 16S ADNr.

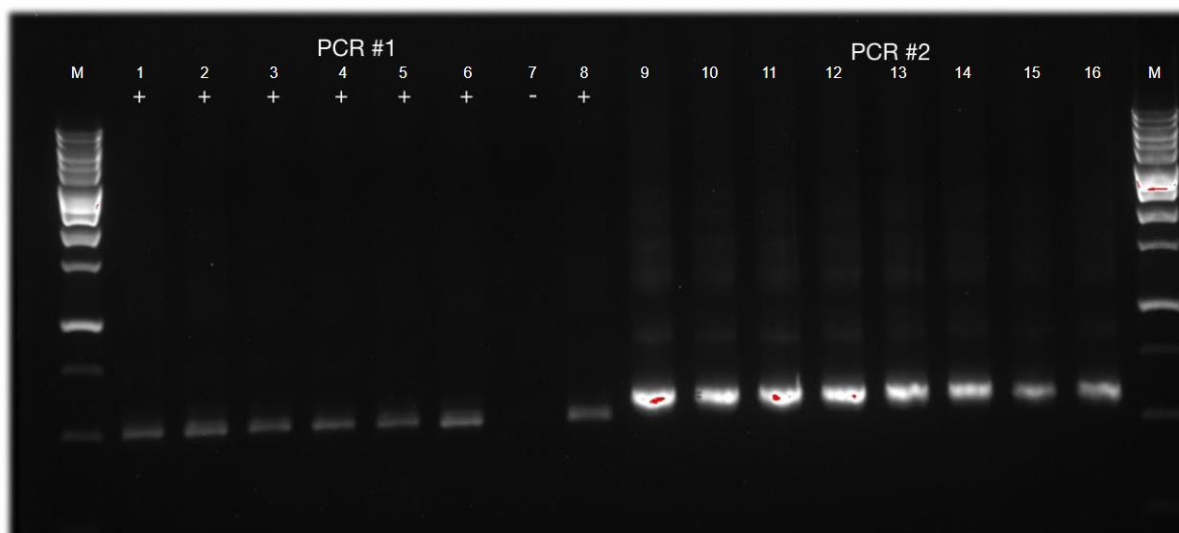
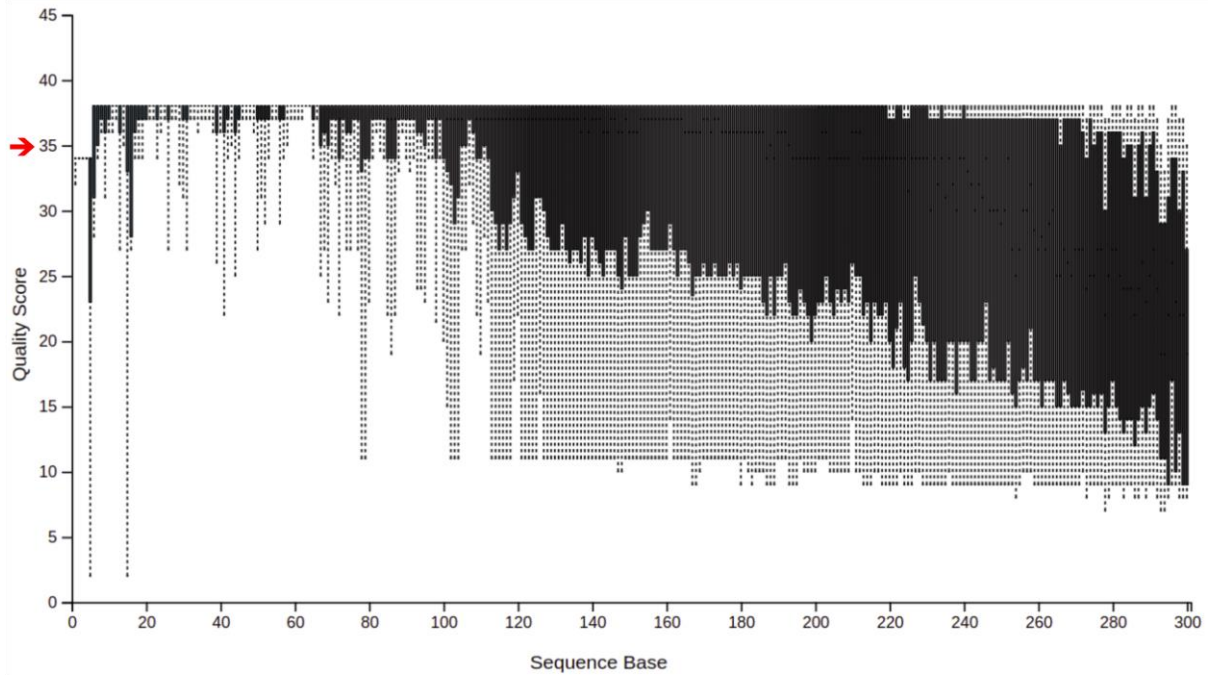


Figura 11. Comprobación de adición de adaptadores e índices - Muestras clínicas. M: Marcador. Carriles 1-6 y 8: Muestras representativas del estudio clínico de LF donde se cargaron las muestras del primer PCR. Se observa la presencia del marcador 16S ADNr (tamaño aproximado: 500 pb) y ausencia de producto en el control negativo (Carril 7). Carriles 9-16: Muestras representativas del estudio clínico de LF donde se cargaron las muestras del segundo PCR (los cuales se encuentran por encima de los 500 pb).

4.2.4 Secuenciamiento de librería 16s ADNr

Se secuenciaron los amplicones en el equipo MiSeq (Illumina ® [San Diego, California – USA]) y se obtuvo una calidad media de 35 QS en las secuencias pertenecientes al primer forward, sin embargo las secuencias provenientes del primer reverse no tuvieron una buena calidad debido a que alcanzaron una media de 15 QS aproximadamente (**Figura 12**).

Forward Reads



Reverse Reads

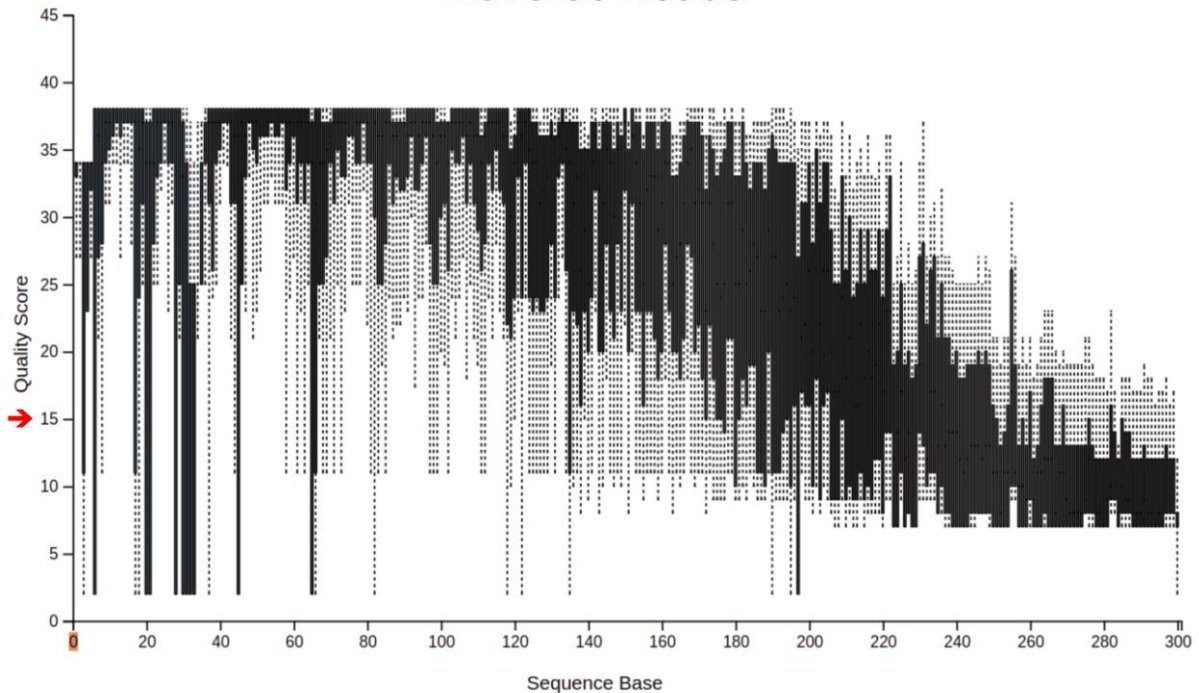


Figura 12. Evaluación de la calidad de lecturas de las muestras clínicas. Los datos representan gráficas de cajas de la calidad de las lecturas para cada nucleótido a lo largo de los amplicones usados (A: Forward y B: Reverse). En promedio, la calidad para el primer forward fue de 35 QS mientras que para el Reverse fue de 15 QS (ambos indicados por flechas rojas respectivamente).

Debido a que ambos primers (forward y reverse) flanquean a la misma secuencia (16S ADN_r), podría utilizarse solo uno de los grupos de estas secuencias para estudiar la diversidad total de las muestras. Se cuenta con el antecedente que el uso de un solo grupo de secuencias (forward o reverse) es suficiente para la descripción total de la diversidad y composición total en una muestra; por lo cual se decidió usar solo el primer forward para

posteriores análisis (51).

4.2.5 Filtro de calidad de las secuencias

Se usaron las secuencias desde el nucleótido 0 hasta el 251. Después de aplicar el filtro de calidad y dejar una sola copia para cada secuencia única se obtuvo un promedio de 19 054 secuencias filtradas por muestra (**Tabla 2**). La información detallada del número de secuencias crudas y el número de secuencias filtradas después del procesamiento de calidad (**Tabla suplementaria 2**).

Abundancia de lecturas filtradas	
Mínimo	41
Mediana	20 241
Media	19 054
Máximo	33 057

Tabla 2. Abundancia de lecturas - Muestras de estudio

Se eliminaron aquellas muestras que no presentaron un número mayor a 1000 lecturas. Cinco muestras no fueron consideradas para el análisis:

- D-1119-1 (Grupo: LF-Disbiosis | mes de toma de muestra: 0)
- D-1149-1 (Grupo: LF-Disbiosis | mes de toma de muestra: 0)
- PN-1165-3 (Grupo: PB-No-Disbiótico | mes de toma de muestra: 4)
- PD-1037-3 (Grupo: PB-Disbiosis | mes de toma de muestra: 4)
- PD-1067-2 (Grupo: PB-Disbiosis | mes de toma de muestra: 2)

Se evaluó si el secuenciamiento fue capaz de representar la diversidad bacteriana presente en cada muestra. Para ello se graficó el número de secuencias únicas (eje x) contra la diversidad bacteriana (eje y) encontrada en dicho punto representado por el índice de Shannon (**Figura 13**). Se observa que todas las muestras alcanzan un valor máximo de diversidad cuando pasan de las 1000 lecturas únicas, indicando que se ha secuenciado la diversidad bacteriana total presente en cada muestra. Se observa una menor diversidad en este secuenciamiento comparado con las muestras de los voluntarios adultos, lo cual es esperable ya que un adulto presenta una mayor diversidad y maduración en su microbiota intestinal comparado con un

infante cuya microbiota sigue en formación (2).

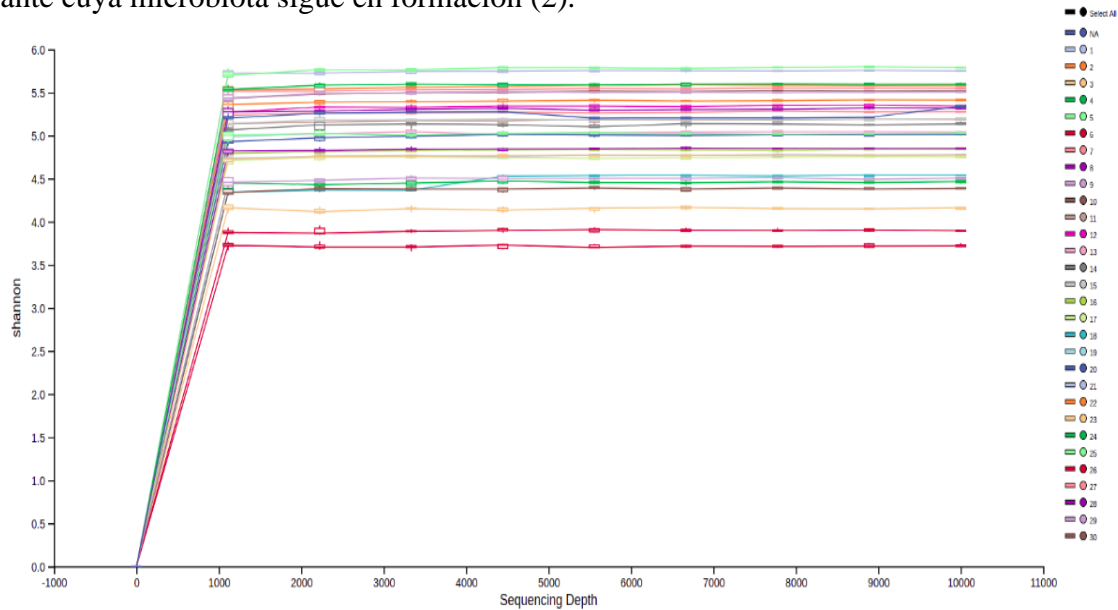


Figura 13. Diversidad total encontrada por muestra según la profundidad de lecturas por muestra - Muestras clínicas. Se cuantificó la diversidad encontrada para cada muestra aplicando un índice de Shannon conforme se va aumentando la profundidad de secuenciamento.

4.2.6 Control de calidad del secuenciamento

Con el fin de garantizar la reproducibilidad de nuestros resultados agregamos muestras que se secuenciaron en nuestra prueba piloto y una muestra repetida del segundo secuenciamento (Muestras provenientes del estudio clínico de LF). Se observan los mismos perfiles taxonómicos entre las muestras provenientes de un mismo individuo independiente del secuenciamento, lo que sugiere que los datos brindados por el secuenciador son reproducibles (**Figura 14**).

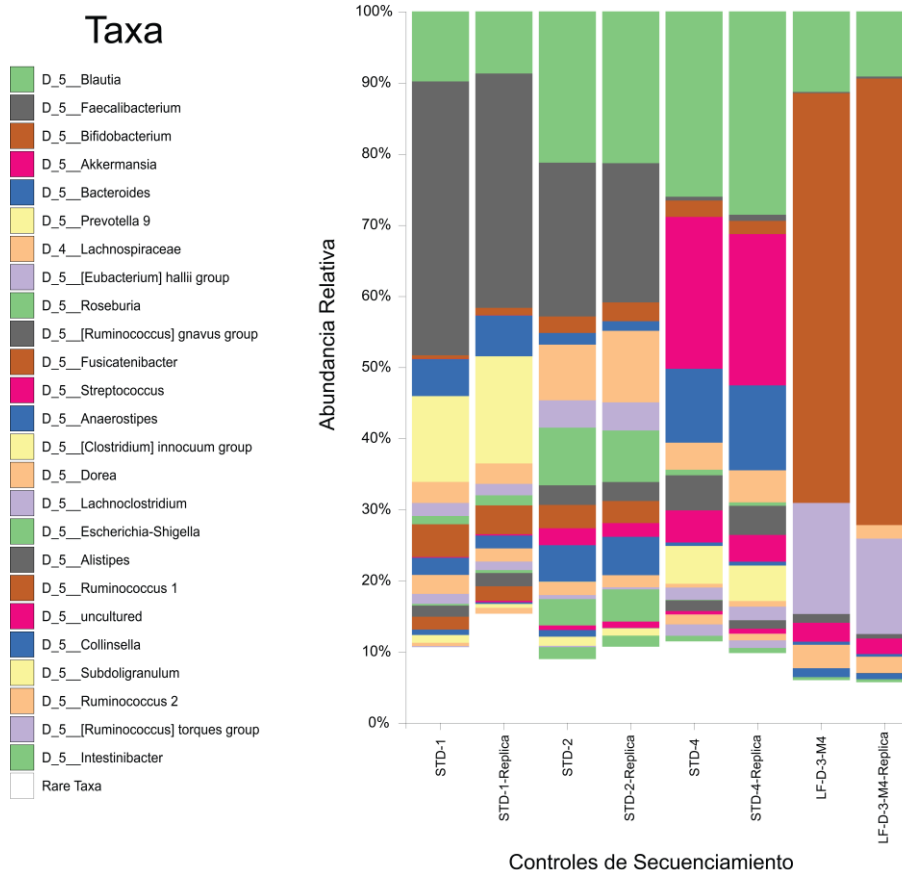


Figura 14. Gráfica de abundancia relativa de taxas bacterianas en las muestras control de secuenciación. Se muestra el top 25 de taxas bacterianas más abundantes por individuo. Cuatro muestras provienen de los voluntarios adultos sanos (STD) que fueron secuenciadas en el secuenciamiento piloto y en el secuenciamiento junto a las muestras del estudio clínico de LF (STD-replica). Así mismo se secuenció una replica de las muestras del estudio clínico de LF (LF-D-3-M4). Los prefijos 'D4' y 'D5' hacen referencia a niveles taxonómicos de familia y género respectivamente.

Adicionalmente incluimos en nuestro secuenciamiento un control negativo de PCR. Después del filtro de calidad realizado no se encontraron secuencias de calidad, por lo que dichas lecturas fueron descartadas de posteriores análisis (**Tabla suplementaria 2**).

4.3 Análisis de composición y diversidad bacteriana de las muestras

A. Análisis de diversidad bacteriana

Se comparó la diversidad bacteriana entre los grupos que recibieron LF o PB independientemente de su condición previa al tratamiento (disbiosis o no-disbiosis) en diferentes puntos en el tiempo (**Figura 15**). Ambos grupos presentaron una diversidad inicial similar (las muestras del punto M0 corresponden a las muestras iniciales de los participantes tomadas al momento del enrolamiento) (**Tabla suplementaria 3**). Luego de cuatro meses de iniciar el tratamiento se encontró una diferencia significativa (Wilcoxon – p-value = 0.005) entre el grupo LF y el grupo PB, siendo el grupo que recibió LF aquel que presenta mayor diversidad bacteriana con una media de 5.37 contra una media de 4.81 por parte del grupo PB (**Tabla suplementaria 4**). Sin embargo, esta diferencia no es significativa después de aplicar la corrección de FDR (Wilcoxon – p-value = 0.056). No obstante, se observa una clara tendencia hacia la significancia de aumento de diversidad en su microbiota intestinal por parte de los participantes que recibieron LF. Así mismo se observó un aumento significativo (Wilcoxon – p-value adj = 0.039), en la diversidad comparando el inicio (M0) y cuarto mes (M4) de tratamiento en aquellos niños que recibieron LF, siendo el punto M4 el cual presentó mayor diversidad. Esto no se observó en infantes tratados con PB (Wilcoxon – p-value adj = 0.49) (**Figura 15**).

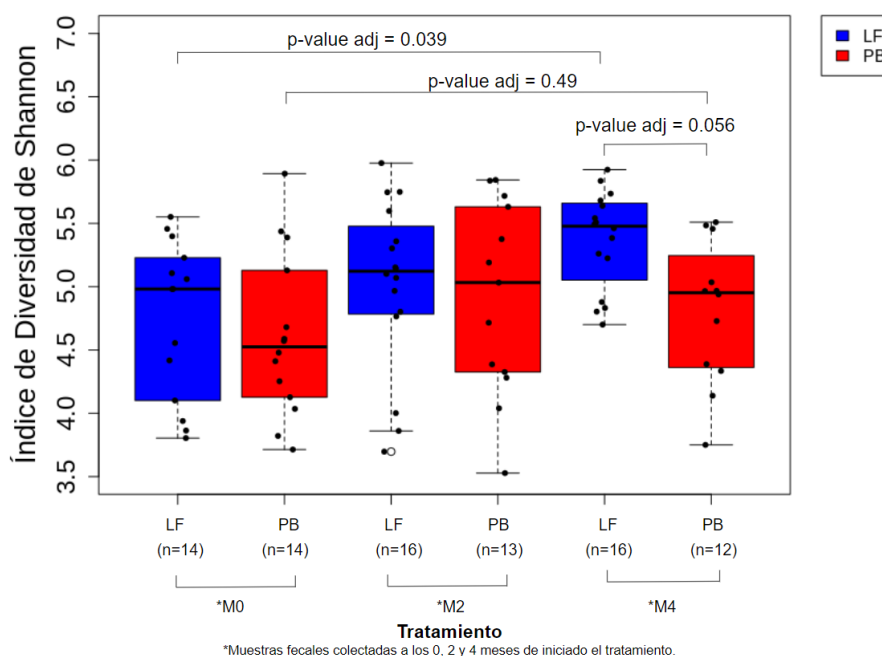


Figura 15. Diagrama de caja del índice de diversidad de Shannon para grupos LF y PB en diferentes puntos en el tiempo.

Así mismo, se subdividió a los grupos que recibieron LF o PB según la condición previa que los participantes presentaron antes de iniciar el tratamiento (Múltiples episodios de diarrea el mes previo al inicio de tratamiento – Disbiótico, Ningún episodio de diarrea los 6 meses previos al inicio del tratamiento – No-Disbióticos) (**Figura 16**). Se observó un aumento (Wilcoxon – p-value = 0.029) significativo en la diversidad bacteriana en aquellos niños que recibieron LF y tuvieron una condición disbiótica al inicio del tratamiento, presentando una media de 5.41 (**Tabla Suplementaria 6**). No obstante, dicha diferencia estadística se pierde después de aplicar la corrección de FRD (Wilcoxon – p-value adj = 0.73). Este mismo comportamiento se observó en aquellos niños que recibieron LF y presentaron una condición no-disbiótica al momento de haber iniciado el tratamiento; sin embargo, el resultado no llega a ser estadísticamente significativo (Wilcoxon – p-value adj = 0.083). Esta tendencia no se observa en ninguno de los participantes que recibieron PB como tratamiento independientemente de su condición previa (disbiótico o no-disbiótico) (**Tabla suplementaria 5**) (**Figura 16**). Existe una tendencia hacia la significancia (Wilcoxon – p-value adj = 0.059) por parte de ambos grupos experimentales que recibieron LF comparado con los que recibieron PB al cuarto mes de iniciado el tratamiento (**Figura 16**).

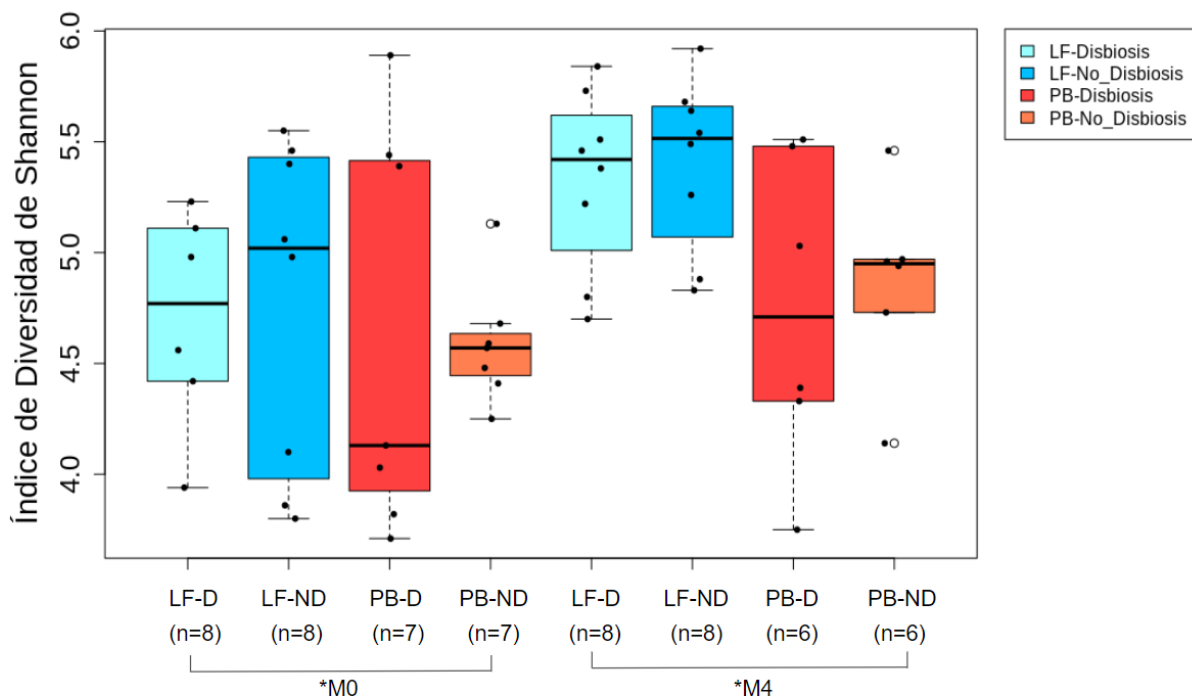


Figura 16. Diagrama de caja de índices de diversidad de Shannon para grupos LF-Disbiosis, LF-No-Disbiótico, PB-Disbiosis y PB-No-Disbiótico en diferentes puntos en el tiempo.

B. Análisis de composición taxonómica de la microbiota fecal

Se comparó la composición taxonómica a nivel de filo en la microbiota fecal de pacientes que recibieron LF o PB como tratamiento según su condición previa (condición disbiótica o no-disbiótica) (**Figura 17**). Se encontró que en ambos grupos los filos más predominantes son *Firmicutes* y *Actinobacteria* (conformando ambos el 99% de la microbiota fecal en promedio en todos los participantes). No se observó diferencia estadística en la abundancia de estos filos entre los diferentes grupos experimentales (LF o PB considerando o no su condición previa antes del inicio del tratamiento [Disbiótica – No Disbiótica]) (**Tabla suplementaria 7**) (**Figura 18**).

* Tratamiento - Condición (D-Disbiótico, ND-No_Disbiótico)
- Número de paciente - Mes de colección de la muestra

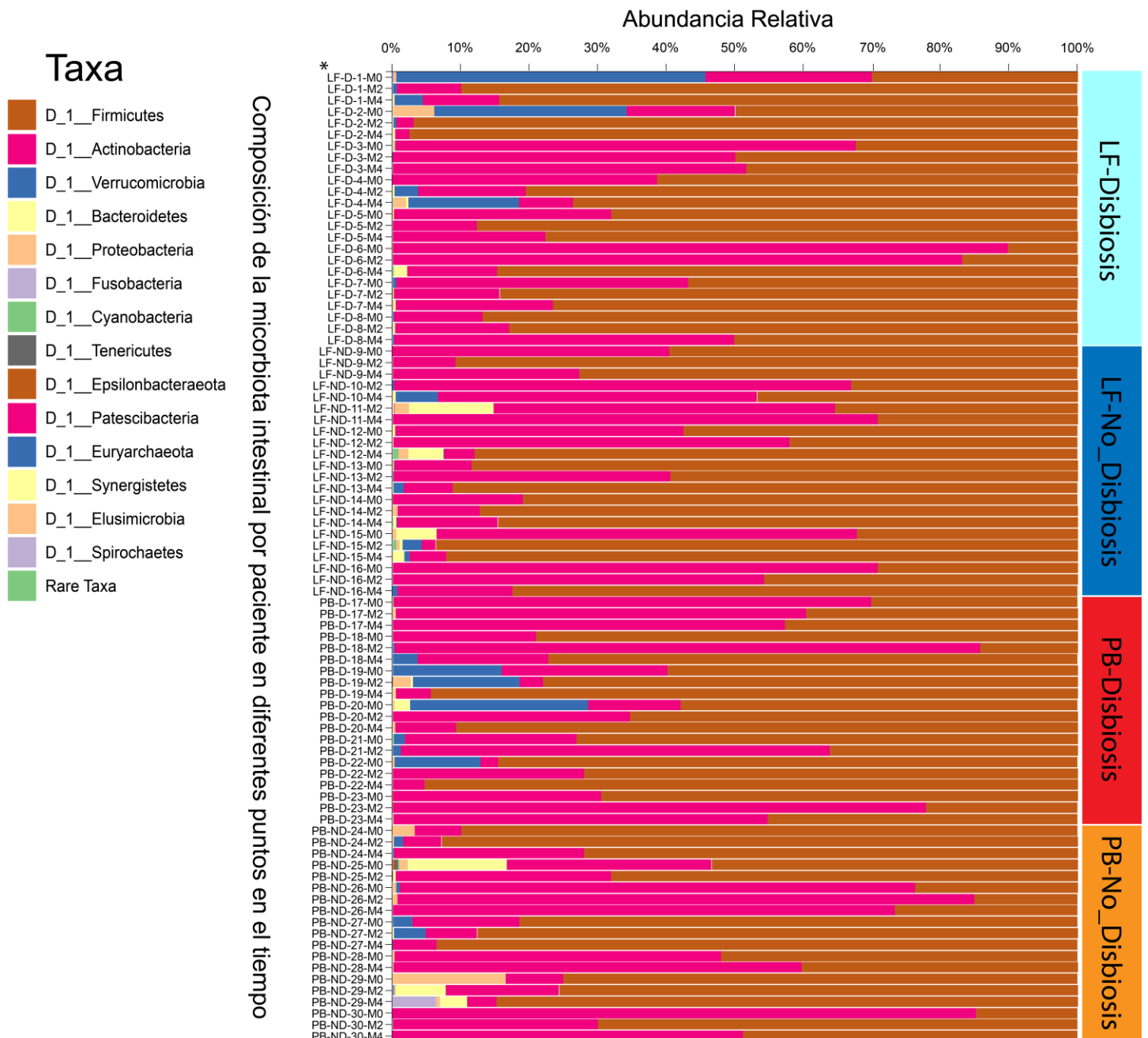


Figura 17. Composición bacteriana de la microbiota intestinal para cada individuo a nivel taxonómico de filo. Se muestra la abundancia relativa de los filos encontrados en pacientes que recibieron LF o PB independientemente de su condición previa antes del tratamiento (Disbiótico o No-Disbiótico). Los prefijos 'D4' y 'D5' hacen referencia a niveles taxonómicos de familia y género respectivamente.

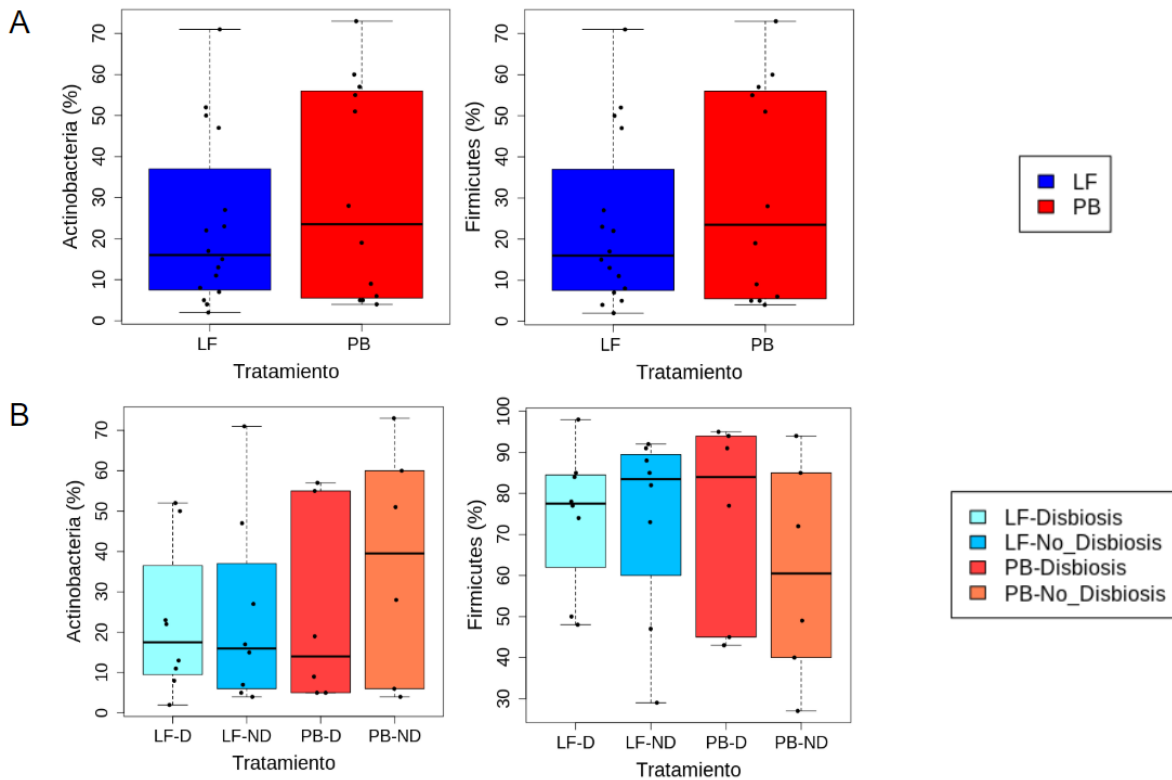


Figura 18. Diferencia de la abundancia relativa de los filos bacterianos más abundantes. (A) Diferencia de abundancia de filos bacterianos entre participantes que fueron tratados con LF o PB. (B) Diferencia de filos bacterianos entre participantes que recibieron LF o PB según su condición inicial antes de haber iniciado el tratamiento (Disbiótico o No-Disbiótico).

Así mismo, se comparó la composición taxonómica a nivel de género de la microbiota fecal de los participantes según su tratamiento (LF o PB) y condición previa (Disbiótico – No-Disbiótico), mostrando los 25 géneros bacterianos más abundantes, los cuales fueron *Bifidobacterium* (perteneciente a la familia: *Bifidobacteriaceae*), *Blautia* (Pertenece a la familia *Lachnospiraceae*) y *Streptococcus* (Pertenece a la familia: *Streptococcaceae*); conformando los tres en conjunto un 52% de la microbiota fecal en promedio en todos los participantes) (**Figura 19**). No se observó diferencia estadística significativa en la abundancia de estos géneros bacterianos en ninguno de los grupos experimentales (LF o PB considerando o no su condición previa antes del inicio del tratamiento [Disbiótica – No Disbiótica]) (**Tabla suplementaria 8**) (**Figura 20**).

* Tratamiento - Condición (D-Disbiótico, ND-No_Disbiótico)
 - Número de paciente - Mes de colección de la muestra

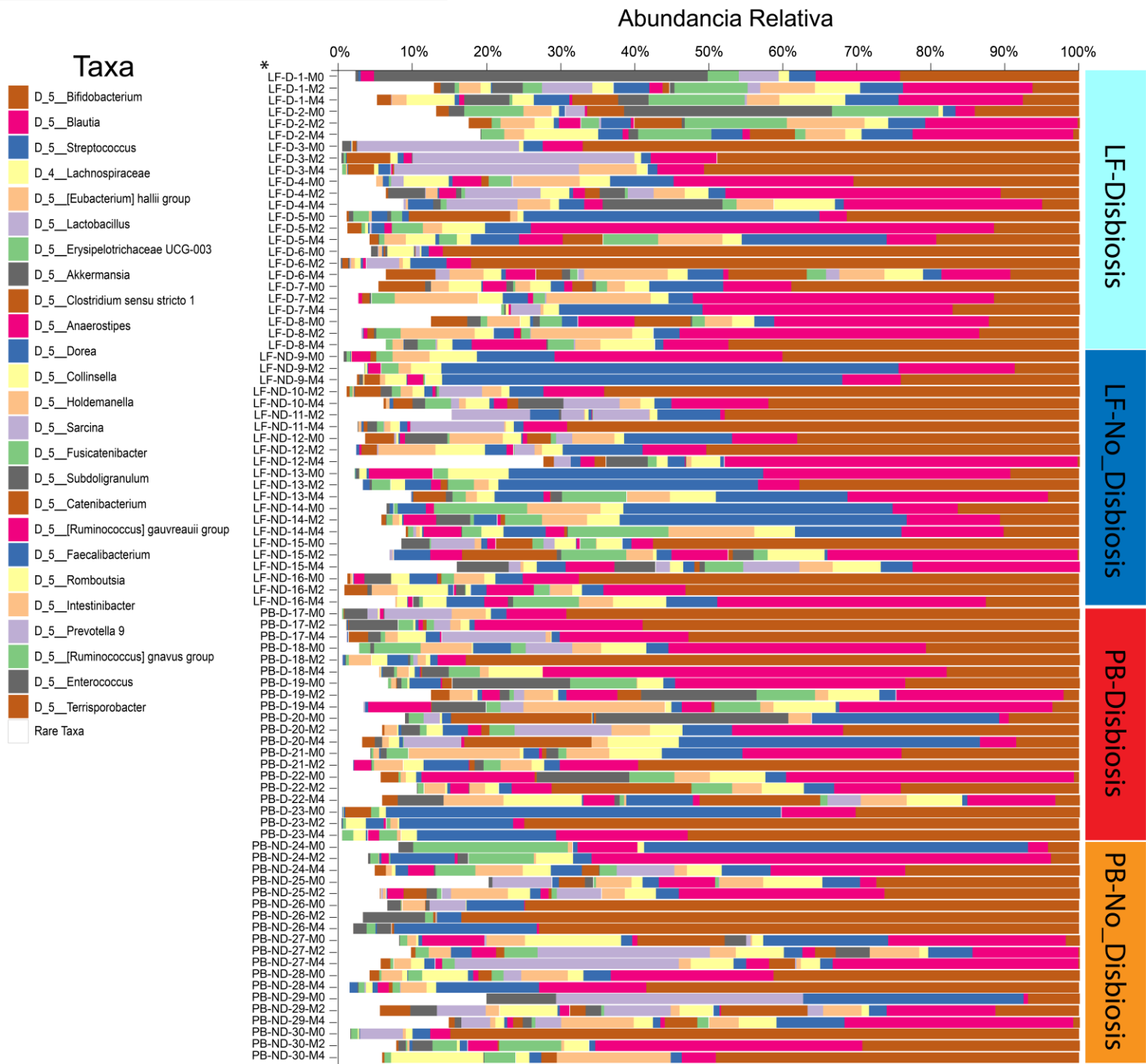


Figura 19. Composición bacteriana de la microbiota intestinal para cada individuo a nivel taxonómico de género. Se muestra la abundancia relativa de los 25 géneros más abundantes en la microbiota fecal de los pacientes que recibieron LF o PB según su condición previa antes del tratamiento (Disbiótico – No-Disbiótico). Los prefijos ‘D4’ y ‘D5’ hacen referencia a niveles taxonómicos de familia y género respectivamente.

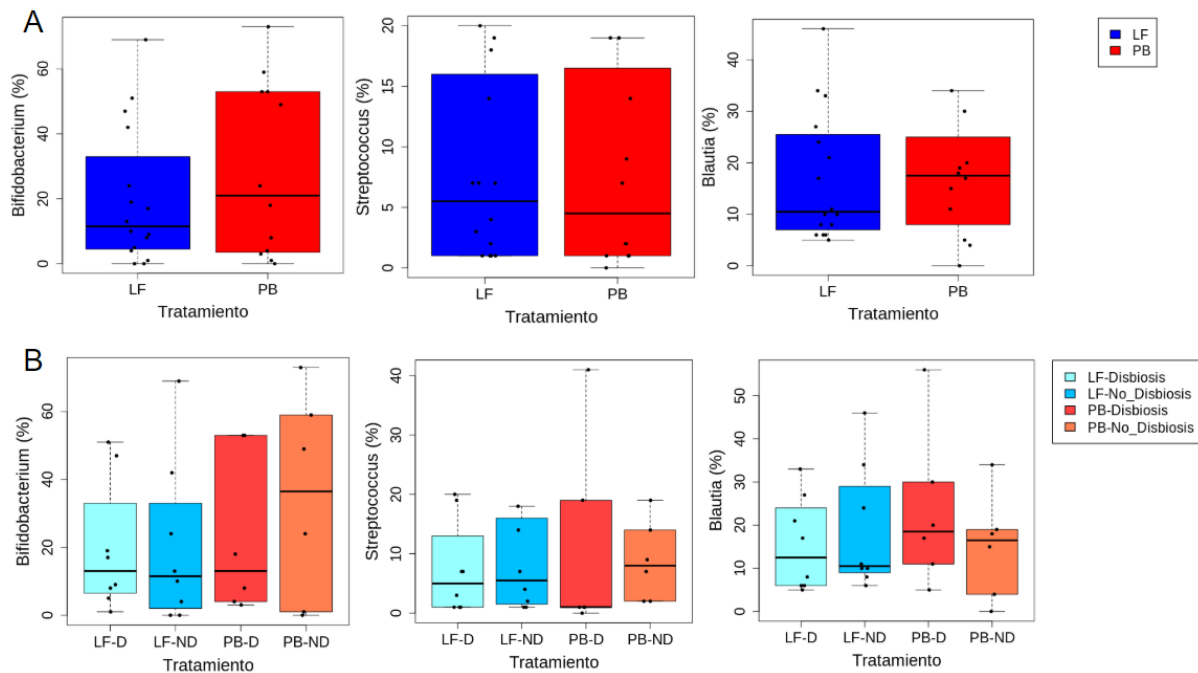


Figura 20. Diferencia de la abundancia relativa de los géneros bacterianos más abundantes. (A) Diferencia de abundancia de géneros bacterianos entre participantes que fueron tratados con LF o PB. (B) Diferencia de géneros bacterianos entre participantes que recibieron LF o PB según su condición inicial antes de haber iniciado el tratamiento (Disbiótico o No-Disbiótico).

Se analizó la composición de la microbiota fecal entre los participantes que habían recibido un mismo tratamiento realizando un análisis de coordenadas principales (PCoA) con la métrica de *Unweighted UniFrac*; el cual representa la microbiota de cada individuo en un punto (44). Esta prueba busca si los pacientes se agrupan en la gráfica según su tratamiento; lo cual demostraría que los pacientes con un mismo tratamiento presentan una composición de microbiota fecal similar (52).

Se comparó la composición de la microbiota de los participantes a los 0, 2 y 4 meses después de iniciado el tratamiento. No se observó un patrón específico en la composición de la microbiota según el tratamiento seguido (LF o PB) (**Tabla suplementaria 9**) (**Figura 21**); así mismo no se encontró diferencia estadística en la composición de ninguno de los grupos experimentales considerando su condición previa antes del inicio del tratamiento (Disbiótico o No-Disbiótico) (**Tabla suplementaria 10**) (**Figura 22**).

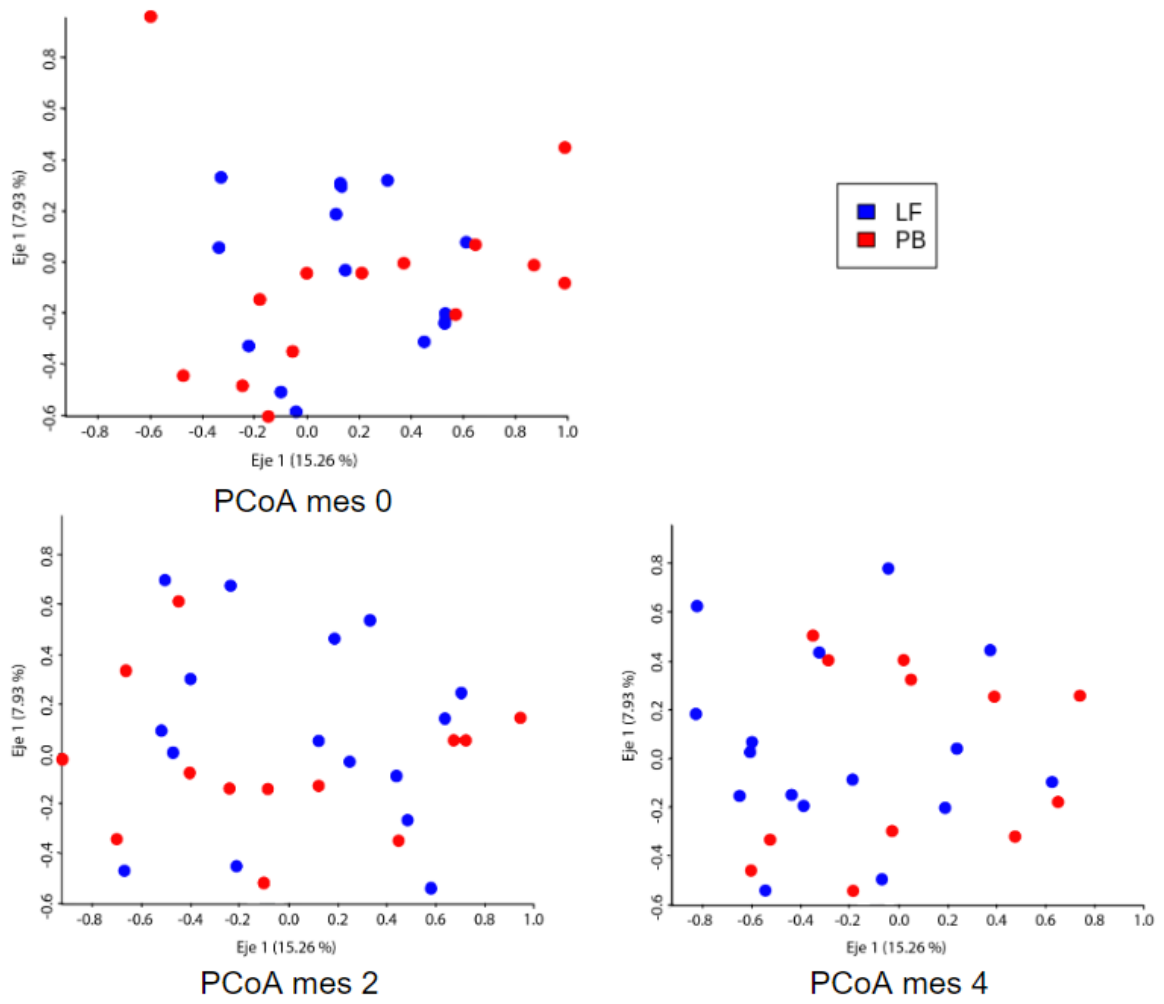


Figura 21. Comparación de composición de la microbiota intestinal según el tratamiento seguido (LF o PB). Cada punto representa la composición de la microbiota de un paciente.

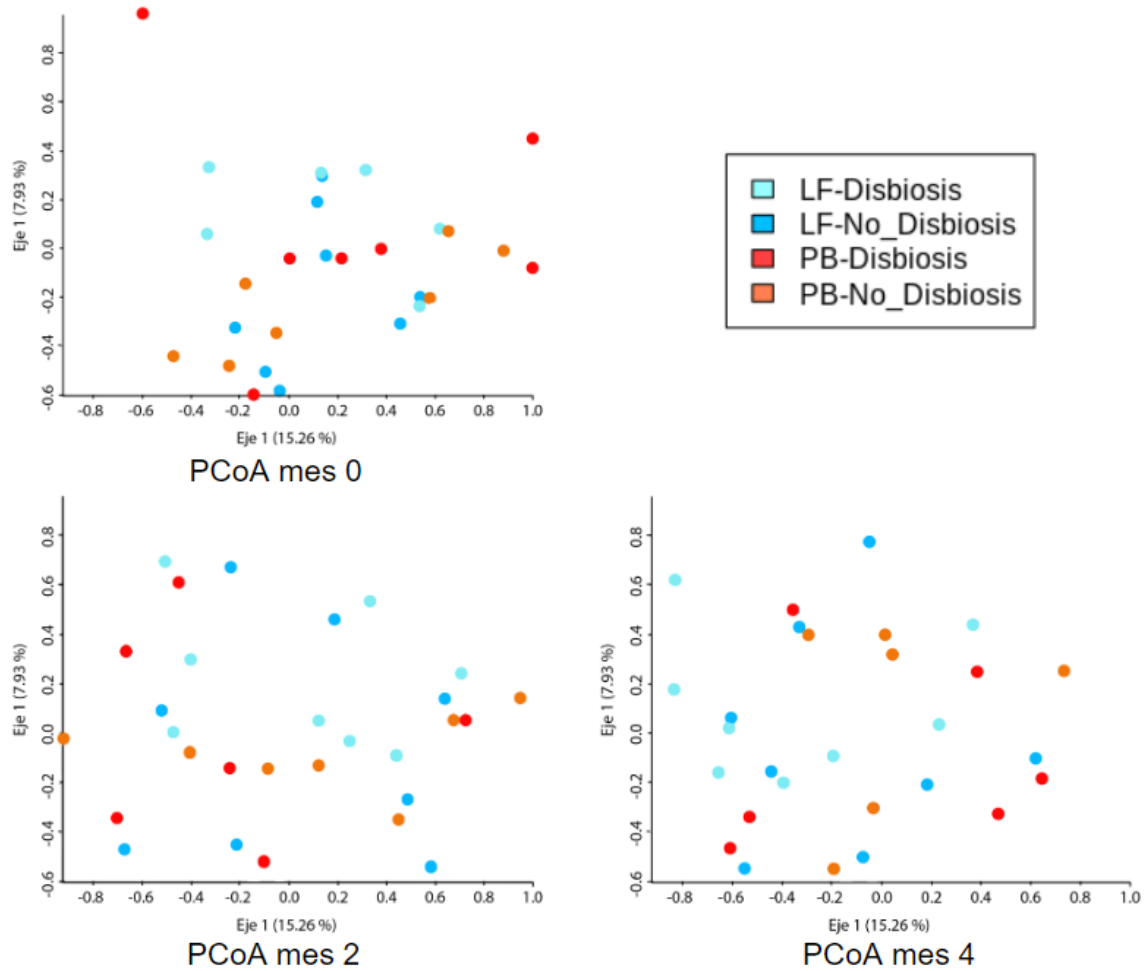


Figura 22. Comparación de composición de la microbiota intestinal según la condición previa de participante (Disbiótico o No-Disbiótico). Cada punto representa la composición de la microbiota de un paciente.

C. Búsqueda de biomarcadores taxonómicos bacterianos

Se realizó una prueba de análisis discriminativo lineal (LDA) en el programa LEfSe con el fin de buscar géneros bacterianos cuyo crecimiento se haya favorecido según el tratamiento administrado. Para ello se comparan los géneros cuyas abundancias difieren entre dos grupos experimentales (aplicando un test estadístico de Kruskal Wallis aplicado por el programa LEfSe). Para cada género que haya diferido se le asigna un puntaje de acuerdo a la diferencia de abundancia entre los grupos experimentales. Finalmente se muestran aquellos géneros que superen un log-score de 2 (48).

Los géneros bacterianos que aparecen en la gráfica son aquellos que se encuentran con una mayor abundancia de forma significativa respecto al grupo con el que fue comparado. Aquellos géneros bacterianos que presenten un log-score más alto significa que presentaron una mayor abundancia con respecto al grupo contrario con el que fue comparado (48). La comparación de la abundancia de cada género bacteriano entre los participantes se encuentra disponible en la información suplementaria (**Figura suplementaria 3**) (**Tabla suplementaria 11**).

Se comparó la composición de la microbiota fecal de los participantes que recibieron LF o PB al cuarto mes de inicio de tratamiento (LF-M4 vs PB-M4). Se encontró que los participantes que recibieron LF presentaron mayor abundancia de los géneros *Akkermansia* (Enriquecidos en 10 de 16 participantes del grupo LF-M4), *Gemella* (Enriquecidos en 8 de 16 participantes del grupo LF-M4) y *Staphylococcus* (Enriquecidos en 8 de 16 participantes del grupo LF-M4) respecto a aquellos que recibieron PB; sin embargo, no se observó ningún género bacteriano favorecido en aquellos participantes que recibieron PB (**Figura 23 A**).

Se comparó la microbiota de los participantes que recibieron LF al inicio (M0) y mes cuatro (M4) de tratamiento (LF-M0 vs LF-M4). Se observó que en el tiempo M4 se encontró mayor abundancia de los géneros *Ruminococcus* (Enriquecidos en 10 de 16 participantes del grupo LF-M4), *Roseburia* (Enriquecidos en 9 de 16 participantes del grupo LF-M4) y *Dorea*

(Enriquecidos en 15 de 16 participantes del grupo LF-M4) comparado con las muestras del grupo LF-M0; mientras que en M0 se una encontró mayor abundancia de los géneros *Enterococcus* (Enriquecidos en 10 de 14 participantes del grupo LF-M0) y *Bifidobacterium* (Enriquecidos en 14 de 14 participantes del grupo LF-M0) con respecto a M4 (**Figura 23 B**).

Por último, se comparó la microbiota de los participantes que recibieron LF o PB y presentaron condiciones disbióticas en el tiempo M4 (LF-D-M4 vs PB-D-M4). Se observó el mayor abundancia del género *Eubacterium coprostanoligenes group* (Enriquecidos en 6 de 8 participantes del grupo LF-D-M4) en el grupo LF-D-M4 con respecto al grupo PB-D-M4, mientras que se observó mayor abundancia de los géneros *Turicibacter* (Enriquecidos en 4 de 6 participantes del grupo PB-D-M4) y *Clostridium Sensuscripto 1* (Enriquecidos en 6 de 6 participantes del grupo PB-D-M4) en el grupo PB-D-M4 respecto al grupo LF-D-M4 (**Figura 23 C**).

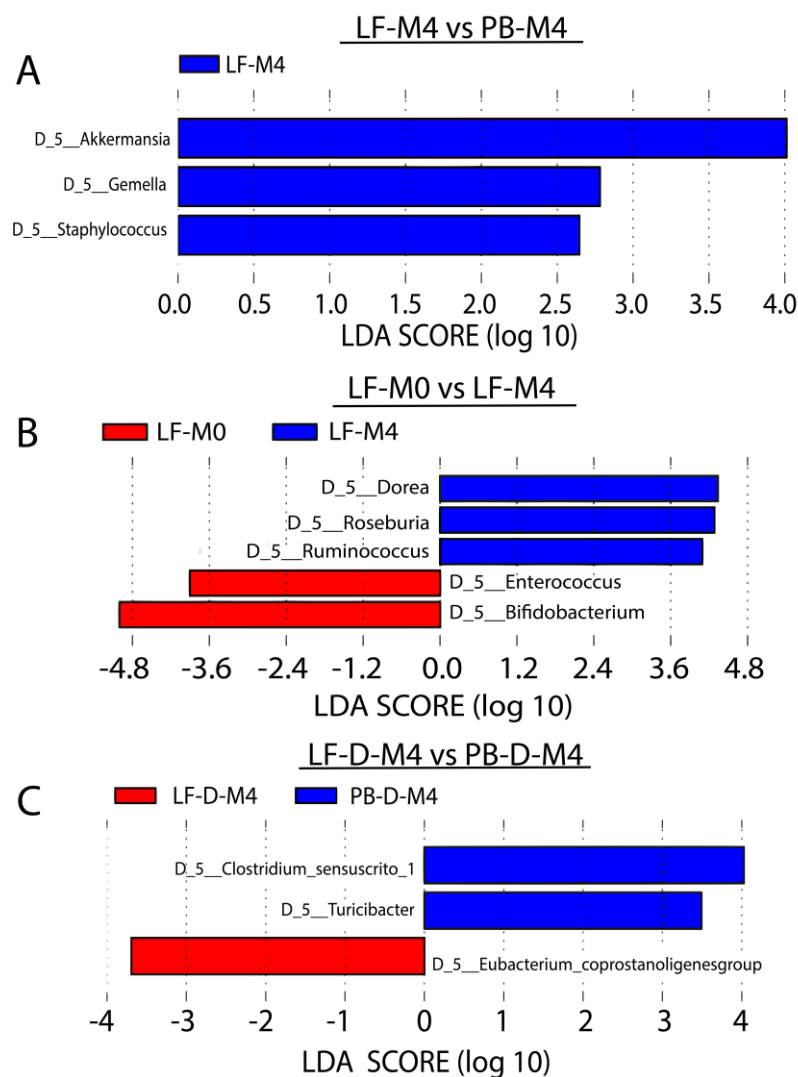


Figura 23. Análisis discriminativo lineal (LDA). Se buscaron biomarcadores taxonómicos bacterianos al cuarto mes de haber iniciado el tratamiento entre los grupos LF y PB, comparando el inicio y fin de tratamiento en aquellos infantes que consumieron LF y entre los grupos LF y PB que presentaron condiciones disbióticas al cuarto mes de haber iniciado el tratamiento.

V. DISCUSIÓN

Este este trabajo se estudió el efecto que tiene la LF sobre la microbiota fecal de infantes con una condición de disbiosis. La LF interactúa de forma permanente con el infante en sus primeros años de vida a través de la leche materna; sin embargo, hasta la fecha no se describió el efecto que tiene la LF en la microbiota intestinal disbiótica infantil. Es relevante conocer el efecto de esta interacción ya afecta directamente la composición de la microbiota intestinal, pudiendo afectar directamente el desarrollo del infante.

Los participantes que recibieron LF tuvieron un aumento significativo de diversidad en su microbiota fecal respecto a aquellos que recibieron PB. Este resultado coincide con reportes previos en donde se reporta que la administración de LF promueve una microbiota más diversa (8,53). Estudios previos relacionan el hecho de presentar una alta diversidad intestinal como un indicador de una microbiota saludable (54).

Sin embargo, no se observó un aumento estadísticamente significativo en la diversidad de su microbiota intestinal en aquellos infantes que recibieron LF y presentaron una microbiota disbiótica después de aplicar la corrección de FDR. Esto podría explicarse por el pequeño número de muestras que se están analizando, lo cual reduce el poder estadístico de nuestros resultados. No obstante, tampoco se observó una disminución de la diversidad de la microbiota intestinal en este grupo a los cuatro meses de haber iniciado el tratamiento; lo cual sugiere que la LF no tiene un efecto negativo sobre una microbiota inicialmente disbiótica. Es necesario realizar una replicación de este estudio con un mayor número de muestras.

Los filos *Actinobacteria* y *Firmicutes* fueron los grupos bacterianos más abundantes en todas las muestras clínicas, independientemente de su tratamiento o condición (**Figura 17**). A diferencia de la microbiota fecal de un adulto promedio, el filo *Actinobacteria* resultó ser el segundo más abundante en los infantes participantes del estudio (en lugar de *Bacteroidetes*). Estudios previos reportaron que el filo *Actinobacteria* está asociado con el consumo de leche (tanto materna como en fórmula), por lo cual es previsible encontrarlo de forma abundante en muestras de infantes debido al consumo casi exclusivo de leche en sus primeros meses de vida (55).

A nivel taxonómico de género se encontraron a las bacterias *Bifidobacterium*, *Streptococcus* y *Blautia* como las más abundantes en todas las muestras clínicas, independientemente de su

tratamiento y condición. Estos grupos bacterianos están conformados por bacterias no patógenas y suelen formar parte de la microbiota intestinal (3). El género *Blautia* es conocido por ser un contribuyente importante en la formación de ácidos grasos de cadena corta, los cuales son importantes para la maduración y la integridad del intestino, siendo esta bacteria fundamental para el desarrollo del intestino en el infante (56).

Se observó que cada participante presentó una composición única en su microbiota fecal independientemente de la condición o tratamiento que hayan seguido en el tiempo. Esto es consistente con otros estudios de microbiota que muestran que los pacientes presentan una microbiota única a pesar de compartir un mismo tratamiento o cuadro clínico con otros pacientes (57).

Se observó un aumento en los géneros *Akkermansia*, *Staphylococcus* y *Gemella* en aquellos infantes que recibieron LF respecto a aquellos que recibieron PB en el tiempo M4. Estudios previos reportaron una relación entre la presencia de bacterias del género *Akkermansia* y una disminución de riesgo de desarrollar diabetes tipo uno y obesidad; por lo que este género es considerado como un indicador de buena salud (58). Por otro lado, las bacterias del género *Staphylococcus* han sido reportadas como bacterias comensales de la microbiota intestinal, conformado mayoritariamente por bacterias no patógenas (3). Por último, el género *Gemella* es reportado como huésped común de superficies con mucosa de la cavidad oral e intestinal, sin embargo puede ser causante de sepsis en pacientes inmunodeficientes (59).

Interesantemente, se enriquecieron los géneros *Ruminococcus*, *Roseburia* y *Dorea* en el grupo experimental LF-M4 respecto al grupo LF-M0. El género *Ruminococcus* se encuentra relacionado con una alta diversidad en la microbiota intestinal (60), lo cual refuerza nuestro resultado en donde se correlacionaba el tratamiento de LF con una mayor diversidad en la microbiota intestinal (**Figura 15**). El género *Roseburia* por su parte se encuentra relacionado con la producción de ácidos grasos de cadena corta, los cuales son fuentes de energía para las células intestinales; así mismo estudios anteriores encontraron este género con una abundancia reducida en pacientes con diabetes tipo II y obesidad, postulando a esta bacteria como posible biomarcador contra estas enfermedades (56,61). Con respecto al género *Dorea*, se reportó en un estudio que sus metabolitos secundarios son utilizados por el género probiótico bacteriano *Blautia*, el cual gracias a ello produce acetato (62). Sin embargo, no hay muchos estudios que confirmen el rol que cumple el género *Dorea* en la homeostasis de

su hospedero. La mayoría de estas bacterias tienen un impacto positivo en la salud del hospedero, lo cual sugiere que LF favoreció el crecimiento de bacterias probióticas en la microbiota intestinal de los infantes. Por otra parte, los géneros *Enterococcus* y *Bifidobacterium* se vieron favorecidos en el grupo LF-M0, los cuales son como géneros comensales (3). Este resultado sugiere que LF favoreció el incremento de géneros bacterianos probióticos, lo cual ha sido reportado en estudios previos (31).

Se encontró un aumento del género *Eubacterium coprostanoligenes group* en el grupo experimental LF-D-M4 respecto al grupo PB-D-M4. El género bacteriano *Eubacterium* es considerado como una bacteria comensal que podría volverse patógena bajo condiciones oportunistas (63). Sin embargo, un estudio previo in-vitro muestra que la taxa *Eubacterium coprostanoligenes group* convierte el colesterol en coprostanol; postulando que podría disminuir los niveles de colesterol en el hospedero (64). Por otro lado, se encontró que el grupo PB-D-M4 tuvo el incremento de bacterias del género *Clostridium sensuscripto 1* y *Turicibacter*. Estas bacterias han sido reportadas como bacterias comunes de encontrar en el tracto intestinal, sin embargo, la relevancia clínica de estas bacterias hasta la fecha es desconocida (65,66).

Si bien existe un enriquecimiento de la abundancia de ciertos géneros bacterianos comprobado estadísticamente, este no se observó en todos los participantes. Por ejemplo, los géneros *Gemella* y *Staphylococcus* presentaron una mayor abundancia de 8 de 16 individuos del grupo LF-M4 con respecto al grupo PB-M4. Así mismo, el género *Roseburia* presentó una mayor abundancia en 9 de 16 participantes del grupo LF-M4 con respecto al grupo LF-M0. No podemos establecer una relación entre el enriquecimiento de un determinado género bacteriano con el tratamiento que siguió un grupo (LF o PB a los 0, 2 y 4 meses después de haber iniciado el tratamiento) debido al bajo tamaño muestral. Es necesario realizar estudio con un mayor número de participantes para poder confirmar estas observaciones.

El secuenciamiento de las muestras clínicas generó lecturas de no tan buena calidad con respecto al amplicón reverse (**Figura 12**), el cual podría ser resultado del gasto de los reactivos del secuenciamiento. Posiblemente se cargaron demasiadas muestras (96 muestras) en una sola corrida de secuenciamiento, haciendo que los reactivos se gastaran con el producto del primer forward, iniciando así el secuenciamiento de los primers reverse con reactivos parcialmente degradados. Lo ideal hubiera sido realizar un primer secuenciamiento

de estandarización con 96 muestras para calcular el número óptimo de muestras que podrían secuenciarse; obteniendo secuencias de calidad en los amplicones de los primers forward y reverse. Así mismo hubiera sido preferible secuenciar voluntarios infantes de 12 a 18 meses ya que representarían de forma más cercana la naturaleza de las muestras clínicas. Sin embargo, se ha demostrado en estudios anteriores que con el producto del primer forward es suficiente para describir la composición de la microbiota intestinal (siempre y cuando tanto el primer forward como reverse flanqueen a la misma región, como en este caso) (67). Así mismo se encontró la diversidad total presente en cada muestra (**Figura 13**), lo cual sugiere que nuestro secuenciamiento permitió describir satisfactoriamente la composición de la microbiota intestinal de los participantes.

Estudios previos sugieren que la administración oral de LF en modelos animales con un estado inicial disbiótico podría intensificar este estado (11,32); sin embargo, este estudio sugiere que la administración de LF en una microbiota disbiótica no tiene un efecto negativo. Un estudio en ratones reportó que la LF pierde su acción inmunomoduladora cuando es administrada en una microbiota disbiótica (11), lo cual podría afectar la colonización de bacterias comensales de la microbiota intestinal (33). Así mismo un estudio aplicó distintas concentraciones de leche a ratas prematuras y se determinó que el riesgo de desarrollar enterocolitis necrotizante (NEC) aumenta mientras se incrementa la cantidad de leche administrada (32); sin embargo, dicho estudio nunca reportó si esto podría deberse a la administración de LF. En este estudio no encontramos una disminución en la diversidad de la microbiota intestinal en pacientes que recibieron LF con una microbiota inicialmente disbiótica, lo cual sugiere que LF no tiene un efecto negativo en dicho contexto.

Este es un primer estudio piloto que describe el efecto de la LF sobre una microbiota intestinal disbiótica en infantes de 12 a 18 meses. Se describe por primera vez el efecto beneficioso que tiene la administración oral de LF asociado al aumento de la diversidad bacteriana y de taxas bacterianas de efecto beneficioso en el intestino, lo cual sugiere que la LF podría ser usada como adyuvante para el enriquecimiento de la microbiota intestinal. Futuros estudios con un mayor número de pacientes enrolados y con mayor tiempo de seguimiento permitirán confirmar estos resultados preliminares.

VI. LIMITACIONES Y RECOMENDACIONES

La principal limitación de este estudio es que cuenta con un poder estadístico limitado debido al bajo tamaño muestral, por lo que el estudio se considera de naturaleza exploratoria. Se trabajó con un número limitado de muestras por el alto costo de secuenciamiento (Aproximadamente \$100 por muestra). Sin embargo, estudios previos con número limitado de individuos (cuatro pacientes) han permitido estudiar la estructura y composición de la microbiota intestinal frente a episodios de diarrea (4).

Una segunda limitante es que las muestras fecales fueron almacenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por un periodo de 8 años aproximadamente. El tiempo y forma de almacenamiento (se recomienda almacenar las muestras fecales a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$) pueden afectar la integridad de ADN, lo cual afectaría todos los pasos subsiguientes como la preparación de librería, secuenciamiento y análisis bioinformático. Sin embargo, se comparó el nivel de degradación entre las muestras clínicas con las muestras frescas de los voluntarios (las cuales fueron secuenciadas con éxito) y se vio que ambos grupos se encontraban degradados. Este resultado sugería que el secuenciamiento de las muestras clínicas sería posible.

El hecho de haber realizado la estandarización del secuenciamiento con muestras de voluntarios adultos no refleja la naturaleza de las muestras clínicas debido a que los infantes presentan una menor diversidad en su microbiota intestinal (2), haciendo que los resultados de ambos secuenciamientos tengan limitaciones en sus comparaciones. Así mismo la estandarización se realizó con solo 24 muestras, mientras que el secuenciamiento de muestras clínicas se hizo con 96. Un secuenciamiento de estandarización con 96 muestras hubiera sido lo ideal para calcular el número máximo de muestras que se podrían secuenciar y que brinde secuencias de calidad (tanto para los productos de los primers forward y reverse).

Otra limitante es la falta de información del posible consumo de antibióticos antes del inicio del tratamiento. Los antibióticos hacen que la microbiota intestinal entre a un estado de disbiosis por un periodo de hasta seis meses (3). Sin esta información no se puede asegurar que el grupo “No-Disbiótico” no presentó un estado de disbiosis al momento de iniciar el tratamiento.

Futuros estudios deben evaluar el efecto de LF en la microbiota de infantes con tres años de

edad como mínimo debido a que en este punto la microbiota intestinal alcanza su punto de maduración; permitiendo evaluar el efecto de LF sin que influyan factores como el cambio de la composición por el desarrollo del infante. Sería recomendable considerar aquellos factores como consumo de antibióticos y el tipo de parto ya que son factores determinantes en la composición de su microbiota intestinal. Así mismo, realizar un secuenciamiento ADN metagenómico total (“Shotgun sequencing”) en lugar del análisis del marcador 16S ADNr ya que esta técnica permitiría una identificación taxonómica de nivel de especie y la obtención de información adicional como genes de resistencia y virulencia o el perfil metabólico (proteínas y metabolitos producidos por la microbiota intestinal). Por último, se recomienda analizar una mayor cantidad de muestras para obtener resultados más robustos.

VII. CONCLUSIONES

1. Este trabajo sugiere que LF se encuentra relacionada con un aumento en la diversidad del microbiota intestinal a los cuatro meses de haber iniciado el tratamiento. Así mismo se observó que el tratamiento de LF estuvo correlacionado con el crecimiento de géneros bacterianos de efecto beneficioso tales como *Akkermansia*, *Ruminococcus*, *Roseburia*, entre otros. Por otra parte, no se observó una disminución en la diversidad intestinal en aquellos participantes que recibieron LF y presentaron una condición inicial disbiótica.
2. La estandarización del secuenciamiento del marcador ADNr 16S nos permitió obtener secuencias capaces de describir la composición de la microbiota intestinal; demostrando que brinda resultados reproducibles.
3. Este es el primer estudio que reporta el efecto de LF sobre una microbiota disbiótica en infantes; sin embargo, limitaciones tales como: Número de muestras analizadas, técnica de congelamiento y la falta de información sobre el consumo previo de antibióticos y tipo de nacimiento hacen necesaria la realización de nuevos ensayo clínico para corroborar los resultados descritos de este trabajo.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Hayes CL, Dong J, Galipeau HJ, Jury J, McCarville J, Huang X, et al. Commensal microbiota induces colonic barrier structure and functions that contribute to homeostasis. *Sci Rep*. 2018;8:14184.
2. Tamburini S, Shen N, Wu HC, Clemente JC. The microbiome in early life: implications for health outcomes. *Nat Med*. 2016 Jul 1;22:713–22.
3. Cho I, Blaser MJ. The human microbiome: At the interface of health and disease. *Nat Rev Genet*. 2012;13:260–70.
4. Wikoff WR, Anfora AT, Liu J, Schultz PG, Lesley SA, Peters EC, et al. Metabolomics analysis reveals large effects of gut microflora on mammalian blood metabolites. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106:3698–703.
5. Dinleyici EC, Martínez-Martínez D, Kara A, Karbuz A, Dalgic N, Metin O, et al. Time Series Analysis of the Microbiota of Children Suffering From Acute Infectious Diarrhea and Their Recovery After Treatment. *Front Microbiol*. 2018;9:1230.
6. Black RE, Cousens S, Johnson HL, Lawn JE, Rudan I, Bassani DG, et al. Global, regional, and national causes of child mortality in 2008: a systematic analysis. *Lancet (London, England)*. 2010 Jun 5;375(9730):1969–87.
7. Liu L, Oza S, Hogan D, Perin J, Rudan I, Lawn JE, et al. Global, regional, and national causes of child mortality in 2000–13, with projections to inform post-2015 priorities: an updated systematic analysis. *Lancet*. 2015;385(9966):430–40.
8. Guaraldi F, Salvatori G. Effect of Breast and Formula Feeding on Gut Microbiota Shaping in Newborns. *Front Cell Infect Microbiol*. 2012;2:94.
9. Vogel HJ. Lactoferrin, a bird's eye view. *Biochem Cell Biol*. 2012;90:233–44.
10. Tian H, Maddox IS, Ferguson LR, Shu Q. Influence of bovine lactoferrin on selected probiotic bacteria and intestinal pathogens. *Biometals*. 2010 Jun;23(3):593–6.
11. Wen Y, He Q, Ma D, Hou Q, Zhang H, Kwok LY. An intact gut microbiota may be required for lactoferrin-driven immunomodulation in rats. *J Funct Foods*. 2017 Dec 1;39:268–78.
12. Beddek AJ, Schryvers AB. The lactoferrin receptor complex in Gram negative bacteria. *Biometals*. 2010;23(3):377–86.
13. Falony G, Joossens M, Vieira-Silva S, Wang J, Darzi Y, Faust K, et al. Population-level analysis of gut microbiome variation. *Science (80-)*. 2016 Apr 29;352(6285):560–4.

14. Stecher B, Maier L, Hardt WD. “Blooming” in the gut: How dysbiosis might contribute to pathogen evolution. *Nat Rev Microbiol.* 2013;11:277–84.
15. Fröhlich EE, Farzi A, Mayerhofer R, Reichmann F, Jačan A, Wagner B, et al. Cognitive impairment by antibiotic-induced gut dysbiosis: Analysis of gut microbiota-brain communication. *Brain Behav Immun.* 2016 Aug;56:140–55.
16. Morgan XC, Tickle TL, Sokol H, Gevers D, Devaney KL, Ward D V., et al. Dysfunction of the intestinal microbiome in inflammatory bowel disease and treatment. *Genome Biol.* 2012;13(9).
17. Ivanov II, Frutos R de L, Manel N, Yoshinaga K, Rifkin DB, Sartor RB, et al. Specific Microbiota Direct the Differentiation of IL-17-Producing T-Helper Cells in the Mucosa of the Small Intestine. *Cell Host Microbe.* 2008;4:337–49.
18. Round JL, Mazmanian SK. Inducible Foxp3⁺ regulatory T-cell development by a commensal bacterium of the intestinal microbiota. *Proc Natl Acad Sci.* 2010;107:12204–9.
19. Putignani L, Del Chierico F, Petrucca A, Vernocchi P, Dallapiccola B. The human gut microbiota: A dynamic interplay with the host from birth to senescence settled during childhood. Vol. 76, *Pediatric Research.* Nature Publishing Group; 2014. p. 2–10.
20. Stinson LF, Payne MS, Keelan JA. Planting the seed: Origins, composition, and postnatal health significance of the fetal gastrointestinal microbiota. *Crit Rev Microbiol.* 2017;43:352–69.
21. Aagaard K, Ma J, Antony KM, Ganu R, Petrosino J, Versalovic J. The placenta harbors a unique microbiome. *Sci Transl Med.* 2014;6(237):237ra65.
22. Walker WA. The importance of appropriate initial bacterial colonization of the intestine in newborn, child, and adult health. *Pediatr Res.* 2017 Sep;82(3):387–95.
23. Ng KM, Ferreyra JA, Higginbottom SK, Lynch JB, Kashyap PC, Gopinath S, et al. Microbiota-liberated host sugars facilitate post-antibiotic expansion of enteric pathogens. *Nature.* 2013 Oct 3;502(7469):96–9.
24. Gorkiewicz G, Thallinger GG, Trajanoski S, Lackner S, Stocker G, Hinterleitner T, et al. Alterations in the Colonic Microbiota in Response to Osmotic Diarrhea. *PLoS One.* 2013 Feb 8;8(2).
25. Schubert AM, Rogers MAM, Ring C, Mogle J, Petrosino JP, Young VB, et al. Microbiome data distinguish patients with clostridium difficile infection and non-c. Difficile-associated diarrhea from healthy controls. *MBio.* 2014 May 6;5(3).
26. Biedermann L, Rogler G. The intestinal microbiota: its role in health and disease. *Eur J*

- Pediatr. 2015;174:151–67.
27. Benson AK, Kelly SA, Legge R, Ma F, Low SJ, Kim J, et al. Individuality in gut microbiota composition is a complex polygenic trait shaped by multiple environmental and host genetic factors. *Proc Natl Acad Sci.* 2010;107:18933–8.
 28. Sim K, Shaw AG, Randell P, Cox MJ, McClure ZE, Li MS, et al. Dysbiosis anticipating necrotizing enterocolitis in very premature infants. *Clin Infect Dis.* 2015;60:389–97.
 29. Ochoa TJ, Sizonenko S V. Lactoferrin and prematurity: a promising milk protein? *Biochem Cell Biol.* 2017;95:22–30.
 30. Chen P-W, Ku Y-W, Chu F-Y. Influence of bovine lactoferrin on the growth of selected probiotic bacteria under aerobic conditions. *Biometals.* 2014;27(5):905–14.
 31. Mastromarino P, Capobianco D, Campagna G, Laforgia N, Drimaco P, Dileone A, et al. Correlation between lactoferrin and beneficial microbiota in breast milk and infant’s feces. *Biometals.* 2014 Oct;27(5):1077–86.
 32. Okada K, Fujii T, Ohtsuka Y, Yamakawa Y, Izumi H, Yamashiro Y, et al. Overfeeding Can Cause NEC-Like Enterocolitis in Premature Rat Pups. *Neonatology.* 2010;97:218–24.
 33. Donaldson GP, Ladinsky MS, Yu KB, Sanders JG, Yoo BB, Chou W-C, et al. Gut microbiota utilize immunoglobulin A for mucosal colonization. *Science (80-).* 2018;360:795–800.
 34. Manzoni P, Dall’Agnola A, Tomé D, Kaufman DA, Tavella E, Pieretto M, et al. Role of Lactoferrin in Neonates and Infants: An Update. *Am J Perinatol.* 2018;35:561–5.
 35. Janda JM, Abbott SL. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: Pluses, perils, and pitfalls. Vol. 45, *Journal of Clinical Microbiology.* American Society for Microbiology Journals; 2007. p. 2761–4.
 36. Wu X, Zhang H, Chen J, Shang S, Wei Q, Yan J, et al. Comparison of the fecal microbiota of dholes high-throughput Illumina sequencing of the V3–V4 region of the 16S rRNA gene. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2016 Apr 1;100(8):3577–86.
 37. Ochoa TJ, Chea-Woo E, Baiocchi N, Pecho I, Campos M, Prada A, et al. Randomized double-blind controlled trial of bovine lactoferrin for prevention of diarrhea in children. *J Pediatr.* 2013;162:349–56.
 38. Kelly P. Diarrhoeal disease. *Clin Med J R Coll Physicians London.* 2011;11(5):488–91.
 39. QIAGEN. DNeasy PowerSoil Pro Kit Handbook. QIAGEN. 2018;I:1–24.

40. Boyer R. Biochemistry Laboratory: Modern Theory and Techniques. *Biochemistry*. 2012;4:289–306.
41. Illumina. 16S Metagenomic Sequencing Library. *Illumina.com*. 2013.
42. Bolyen E, Rideout JR, Dillon MR, Bokulich NA, Abnet C, Ghalith GA Al, et al. QIIME 2: Reproducible, interactive, scalable, and extensible microbiome data science. *PeerJ Prepr*. 2018 Dec 3;9–10.
43. Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ, Han AW, Johnson AJA, Holmes SP. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat Methods*. 2016;13(7):581–3.
44. Noble WS. How does multiple testing correction work? Vol. 27, *Nature Biotechnology*. Nature Publishing Group; 2009. p. 1135–7.
45. Divine G, Norton HJ, Hunt R, Dienemann J. A Review of Analysis and Sample Size Calculation Considerations for Wilcoxon Tests. *Anesth Analg* [Internet]. 2013 Sep [cited 2020 Jun 10];117(3):699–710. Available from: <http://journals.lww.com/00000539-201309000-00023>
46. Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. [cited 2020 Jun 2]; Available from: <https://academic.oup.com/nar/article-abstract/41/D1/D590/1069277>
47. Rognes T, Flouri T, Nichols B, Quince C, Mahé F. VSEARCH: A versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ*. 2016;2016(10).
48. Segata N, Izard J, Waldron L, Gevers D, Miropolsky L, Garrett WS, et al. Metagenomic biomarker discovery and explanation [Internet]. Vol. 12, *Genome Biology*. 2011 [cited 2020 May 3]. Available from: <http://genomebiology.com/2011/11/6/R60>
49. Illumina. Quality Scores for Next-Generation Sequencing. *Tech Note Seq*. 2011;1–2.
50. Endrullat C, Glökler J, Franke P, Frohme M. Standardization and quality management in next-generation sequencing. *Appl Transl genomics*. 2016;10:2–9.
51. Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, Berg-Lyons D, Lozupone CA, Turnbaugh PJ, et al. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proc Natl Acad Sci*. 2011 Mar 15;108(Supplement_1):4516–22.
52. Lozupone C, Lladser ME, Knights D, Stombaugh J, Knight R. UniFrac: An effective distance metric for microbial community comparison. Vol. 5, *ISME Journal*. Nature Publishing Group; 2011. p. 169–72.

53. Vega-Bautista A, de la Garza M, Carrero JC, Campos-Rodríguez R, Godínez-Victoria M, Drago-Serrano ME. The impact of lactoferrin on the growth of intestinal inhabitant bacteria. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019.
54. Lloyd-Price J, Abu-Ali G, Huttenhower C. The healthy human microbiome. Vol. 8, *Genome Medicine*. BioMed Central Ltd.; 2016. p. 1–11.
55. Rinninella E, Raoul P, Cintoni M, Franceschi F, Abele G, Miggiiano D, et al. microorganisms What is the Healthy Gut Microbiota Composition? A Changing Ecosystem across Age, Environment, Diet, and Diseases. 2019;7:14.
56. Feng Y, Wang Y, Wang P, Huang Y, Wang F. Short-Chain Fatty Acids Manifest Stimulative and Protective Effects on Intestinal Barrier Function Through the Inhibition of NLRP3 Inflammasome and Autophagy. *Cell Physiol Biochem*. 2018 Sep 1;49(1):190–205.
57. Walker JN, Hanson BM, Pinkner CL, Simar SR, Pinkner JS, Parikh R, et al. Insights into the Microbiome of Breast Implants and Periprosthetic Tissue in Breast Implant-Associated Anaplastic Large Cell Lymphoma. *Sci Rep*. 2019 Dec 1;9(1):1–12.
58. Bobowiec R, Wessely-Szponder J, Hola P. Crosstalk between coagulation and inflammation in mastitis and metritis in dairy cows. *Acta Vet Hung*. 2009 Jun;57(2):283–93.
59. Sinner SW, Tunkel AR. Viridans Streptococci, Nutritionally Variant Streptococci, Groups C and G Streptococci, and Other Related Organisms. In: Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. Elsevier Inc.; 2014. p. 2349-2361.e2.
60. Litvak Y, Mon KKZ, Nguyen H, Chanthavixay G, Liou M, Velazquez EM, et al. Commensal Enterobacteriaceae Protect against Salmonella Colonization through Oxygen Competition. *Cell Host Microbe*. 2019 Jan 9;25(1):128-139.e5.
61. Ryan PM, Delzenne NM. Gut Microbiota and Metabolism. In: The Gut-Brain Axis Dietary, Probiotic, and Prebiotic Interventions on the Microbiota. Elsevier Inc.; 2016. p. 391–401.
62. Rajilić-Stojanović M, de Vos WM. The first 1000 cultured species of the human gastrointestinal microbiota. *FEMS Microbiol Rev*. 2014 Sep 1;38(5):996–1047.
63. Actor JK AJ. Elsevier's Integrated Review Immunology and Microbiology (Second Edition) | ScienceDirect. 2012.
64. Freier TA, Beitz DC, Li L, Hartman PA. Characterization of *Eubacterium coprostanoligenes* sp. nov., a cholesterol- reducing anaerobe. *Int J Syst Bacteriol*. 1994

- Jan 1;44(1):137–42.
65. O’Cuív P, Klaassens ES, Durkin AS, Harkins DM, Foster L, McCorrison J, et al. Draft genome sequence of *Turicibacter sanguinis* PC909, isolated from human feces. *J Bacteriol.* 2011 Mar 1;193(5):1288–9.
 66. Gupta RS, Gao B. Phylogenomic analyses of clostridia and identification of novel protein signatures that are specific to the genus *Clostridium sensu stricto* (cluster I). *Int J Syst Evol Microbiol.* 2009;59(2):285–94.
 67. Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, Berg-Lyons D, Lozupone CA, Turnbaugh PJ, et al. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108:4516–22.

IX. ANEXOS

Muestra	Secuencias Crudas	Secuencias Filtradas
STD-1	43907	28807
STD-2	35848	22718
STD-3	32311	18219
STD-4	47366	26952
STD-5	37754	25135
STD-6	34629	21632
STD-7	40970	27414
STD-8	34823	20001
STD-9	40279	24147
STD-10	38040	25607
STD-11	33288	21934
STD-12	35501	21229
STD-13	43257	27278
STD-14	34040	21786
STD-15	39584	19256
STD-16	31157	19184
STD-17	37853	27824
STD-18	38577	27187
STD-19	50614	29786
STD-20	43955	26901
STD-21	42805	24307
STD-22	54656	37521
STD-23	50382	35578
STD-24	40069	27233

Tabla Suplementaria 1. Número de secuencias crudas (Secuencias sin procesamiento de calidad) y secuencias filtradas (secuencias después del procesamiento de calidad por el programa DADA2 – Secuenciamiento de estandarización).

Código de muestra	* Descripción de la muestra	Secuencias crudas	Secuencias Filtradas
N1045.1	LF-ND-1-M0	87792	21383
N1045.2	LF-ND-1-M2	91740	27052
N1045.3	LF-ND-1-M4	77685	23563
N1077.1	LF-ND-2-M0	115625	31604
N1077.2	LF-ND-2-M2	103710	32019
N1077.3	LF-ND-2-M4	96746	28124
N1080.1	LF-ND-3-M0	135796	33361
N1080.2	LF-ND-3-M2	67894	14868
N1080.3	LF-ND-3-M4	78252	15455
N1130.1	LF-ND-4-M0	84296	21235
N1130.2	LF-ND-4-M2	103081	29927
N1130.3	LF-ND-4-M4	89123	25618
N1216.1	LF-ND-5-M0	83270	20260
N1216.2	LF-ND-5-M2	89673	27196
N1216.3	LF-ND-5-M4	75089	22515
N1245.1	LF-ND-6-M0	100610	22971
N1245.2	LF-ND-6-M2	96486	23022
N1245.3	LF-ND-6-M4	100974	26191
N1319.1	LF-ND-7-M0	136614	34969
N1319.2	LF-ND-7-M2	82314	23595
N1319.3	LF-ND-7-M4	51519	13078
N1320.1	LF-ND-8-M0	85155	21355
N1320.2	LF-ND-8-M2	115939	31989
N1320.3	LF-ND-8-M4	101957	27091
D1113-1	LF-D-9-M0	110587	31705
D1113-2	LF-D-9-M2	132371	39990
D1113-3	LF-D-9-M4	132188	39716
D1119-1	LF-D-10-M0	1858	154
D1119-2	LF-D-10-M2	127235	33092
D1119-3	LF-D-10-M4	131317	36003
D1149-1	LF-D-11-M0	3013	239
D1149-2	LF-D-11-M2	112575	31722
D1149-3	LF-D-11-M4	109646	29044
D1170-1	LF-D-12-M0	89417	25270
D1170-2	LF-D-12-M2	113491	30759
D1170-3	LF-D-12-M4	95167	30149
D1225-1	LF-D-13-M0	118722	32685
D1225-2	LF-D-13-M2	119703	31789
D1225-3	LF-D-13-M4	83840	25812
D1535-1	LF-D-14-M0	97966	26400
D1535-2	LF-D-14-M2	123594	36388
D1535-3	LF-D-14-M4	122804	33287
D1382.1	LF-D-15-M0	131052	32298
D1382.2	LF-D-15-M2	108635	32452

*Tratamiento - Condición (D-Disbiótico, ND - No_Disbiótico) -
Número de paciente - Mes de colección de muestra

Código de muestra	* Descripción de la muestra	Secuencias crudas	Secuencias Filtradas
D1382.3	LF-D-15-M4	110429	30769
D1468.1	LF-D-16-M0	107450	25795
D1468.2	LF-D-16-M2	106966	25583
D1468.3	LF-D-16-M4	99957	28351
PN-1079.1	PB-ND-17-M0	86475	19407
PN-1079.2	PB-ND-17-M2	100069	26470
PN-1079.3	PB-ND-17-M4	91329	24565
PN-1101.1	PB-ND-18-M0	30090	4133
PN-1101.2	PB-ND-18-M2	106022	27843
PN-1101.3	PB-ND-18-M4	92005	25390
PN-1129.1	PB-ND-19-M0	69270	18387
PN-1129.2	PB-ND-19-M2	76678	23324
PN-1129.3	PB-ND-19-M4	84840	22703
PN-1200.1	PB-ND-20-M0	106987	27659
PN-1200.2	PB-ND-20-M2	105275	28820
PN-1200.3	PB-ND-20-M4	87825	23673
PN-1165.1	PB-ND-21-M0	78725	11978
PN-1165.2	PB-ND-21-M2	144407	31568
PN-1165.3	PB-ND-21-M4	3193	440
PN-1230.1	PB-ND-22-M0	153628	38742
PN-1230.2	PB-ND-22-M2	124145	32423
PN-1230.3	PB-ND-22-M4	104241	21913
PN-1206.1	PB-ND-23-M0	125714	26919
PN-1206.2	PB-ND-23-M2	95474	18656
PN-1206.3	PB-ND-23-M4	92935	19043
PD-1016.1	PB-D-24-M0	100797	23578
PD-1016.2	PB-D-24-M2	101194	25763
PD-1016.3	PB-D-24-M4	91170	19984
PD-1037.1	PB-D-25-M0	106401	25575
PD-1037.2	PB-D-25-M2	131048	36910
PD-1037.3	PB-D-25-M4	1060	88
PD-1052.1	PB-D-26-M0	143202	33358
PD-1052.2	PB-D-26-M2	79267	17248
PD-1052.3	PB-D-26-M4	92595	20345
PD-1056.1	PB-D-27-M0	96227	26190
PD-1056.2	PB-D-27-M2	90731	26997
PD-1056.3	PB-D-27-M4	158938	45795
PD-1067-1	PB-D-28-M0	103517	22750
PD-1067-2	PB-D-28-M2	2350	264
PD-1067-3	PB-D-28-M4	111225	28696
PD-1061-1	PB-D-29-M0	70515	17218
PD-1061-2	PB-D-29-M2	79720	21587
PD-1061-3	PB-D-29-M4	67679	19275
PD-1108-1	PB-D-30-M0	85196	18071
PD-1108-2	PB-D-30-M2	104152	28068
PD-1108-3	PB-D-30-M4	110290	27652
STD-1-Replica	STD-1-Replica	96399	24804
STD-2-Replica	STD-2-Replica	21450	5874
STD-4-Replica	STD-4-Replica	103395	26899
N1080.3 - Replica	N1080.3 - Replica	101977	23428
Control negativo	Control negativo	2106	0

Tabla Suplementaria 2. Número de secuencias crudas (Secuencias sin procesamiento de calidad) y secuencias filtradas (secuencias después del procesamiento de calidad por le programa DADA2 – Secuenciamiento de estandarización.

Índice de Diversidad	Grupo 1	Grupo 2	p-value	p.adj	p.adj - significancia	Método
shannon	0-LF	0-PB	0.6027	1	ns	Wilcoxon
shannon	0-LF	2-LF	0.2939	1	ns	Wilcoxon
shannon	0-LF	2-PB	0.4879	1	ns	Wilcoxon
shannon	0-LF	4-LF	0.0052	0.073	ns	Wilcoxon
shannon	0-LF	4-PB	0.9798	1	ns	Wilcoxon
shannon	0-PB	2-LF	0.1103	1	ns	Wilcoxon
shannon	0-PB	2-PB	0.3255	1	ns	Wilcoxon
shannon	0-PB	4-LF	0.0006	0.0092	**	Wilcoxon
shannon	0-PB	4-PB	0.3217	1	ns	Wilcoxon
shannon	2-LF	2-PB	0.846	1	ns	Wilcoxon
shannon	2-LF	4-LF	0.1486	1	ns	Wilcoxon
shannon	2-LF	4-PB	0.2601	1	ns	Wilcoxon
shannon	2-PB	4-LF	0.1318	1	ns	Wilcoxon
shannon	2-PB	4-PB	0.6885	1	ns	Wilcoxon
shannon	4-LF	4-PB	0.0113	0.15	ns	Wilcoxon

Tabla Suplementaria 3. Comparación del índice de diversidad de Shannon para los grupos LF y PB en diferentes puntos en el tiempo – Pruebas estadísticas.

Grupo	Media	Mediana	N° de Muestras
0-LF	4.75	4.98	14
0-PB	4.61	4.53	14
2-LF	5.02	5.12	16
2-PB	4.92	5.03	13
4-LF	5.37	5.48	16
4-PB	4.81	4.95	12

Tabla Suplementaria 4. Comparación de media y mediana del índice de Shannon para los grupos LF y PB en diferentes puntos en el tiempo

Índice de Diversidad	Grupo 1	Grupo 2	p-value	p.adj	p.adj - significancia	Método
shannon	0-LF-D	0-LF-ND	0.796	1	ns	Wilcoxon
shannon	0-LF-D	0-PB-D	0.9452	1	ns	Wilcoxon
shannon	0-LF-D	0-PB-ND	0.7308	1	ns	Wilcoxon
shannon	0-LF-D	4-LF-D	0.0293	0.73	ns	Wilcoxon
shannon	0-LF-D	4-LF-ND	0.02	0.52	ns	Wilcoxon
shannon	0-LF-D	4-PB-D	1	1	ns	Wilcoxon
shannon	0-LF-D	4-PB-ND	0.9372	1	ns	Wilcoxon
shannon	0-LF-ND	0-PB-D	0.7789	1	ns	Wilcoxon
shannon	0-LF-ND	0-PB-ND	0.6126	1	ns	Wilcoxon
shannon	0-LF-ND	4-LF-D	0.1719	1	ns	Wilcoxon
shannon	0-LF-ND	4-LF-ND	0.083	1	ns	Wilcoxon
shannon	0-LF-ND	4-PB-D	1	1	ns	Wilcoxon
shannon	0-LF-ND	4-PB-ND	0.796	1	ns	Wilcoxon
shannon	0-PB-D	0-PB-ND	0.7104	1	ns	Wilcoxon
shannon	0-PB-D	4-LF-D	0.1893	1	ns	Wilcoxon
shannon	0-PB-D	4-LF-ND	0.0939	1	ns	Wilcoxon
shannon	0-PB-D	4-PB-D	0.6282	1	ns	Wilcoxon
shannon	0-PB-D	4-PB-ND	0.5338	1	ns	Wilcoxon
shannon	0-PB-ND	4-LF-D	0.0012	0.035	*	Wilcoxon
shannon	0-PB-ND	4-LF-ND	0.0012	0.035	*	Wilcoxon
shannon	0-PB-ND	4-PB-D	0.9452	1	ns	Wilcoxon
shannon	0-PB-ND	4-PB-ND	0.1807	1	ns	Wilcoxon
shannon	4-LF-D	4-LF-ND	0.5737	1	ns	Wilcoxon
shannon	4-LF-D	4-PB-D	0.1551	1	ns	Wilcoxon
shannon	4-LF-D	4-PB-ND	0.1209	1	ns	Wilcoxon
shannon	4-LF-ND	4-PB-D	0.0593	1	ns	Wilcoxon
shannon	4-LF-ND	4-PB-ND	0.0593	1	ns	Wilcoxon
shannon	4-PB-D	4-PB-ND	0.9372	1	ns	Wilcoxon

Tabla Suplementaria 5. Comparación del índice de diversidad de Shannon para los grupos LF y PB considerando su condición previa antes del inicio del tratamiento (Disbiótico/No-Disbiótico) en diferentes puntos en el tiempo – Pruebas estadísticas.

Grupo	Media	Mediana	N° de Muestras
0-LF-Disbiosis	4.70	4.77	6
0-LF-No-Disbiosis	4.78	5.02	8
0-PB-Disbiosis	4.63	4.13	7
0-PB-No-Disbiosis	4.59	4.57	7
2-LF-Disbiosis	5.01	5.09	8
2-LF-No-Disbiosis	5.03	5.22	8
2-PB-Disbiosis	5.01	5.33	6
2-PB-No-Disbiosis	4.83	4.72	7
4-LF-Disbiosis	5.33	5.42	8
4-LF-No-Disbiosis	5.41	5.52	8
4-PB-Disbiosis	4.75	4.71	6
4-PB-No-Disbiosis	4.87	4.95	6

Tabla Suplementaria 6. Comparación de media y mediana del índice de diversidad de Shannon para los

grupos LF y PB considerando su condición previa antes del inicio del tratamiento (Disbiótico/No-Disbiótico) en diferentes puntos en el tiempo.

Filo	Grupo 1	Grupo 2	p-value	p.adj	p.format	significancia	Método
<i>Actinobacteria</i>	LF	PB	0.52	0.52	0.52	ns	Wilcoxon
<i>Firmicutes</i>	LF	PB	0.66	0.66	0.66	ns	Wilcoxon
<i>Actinobacteria</i>	LF-D	LF-ND	0.96	1	0.96	ns	Wilcoxon
<i>Actinobacteria</i>	LF-D	PB-D	0.86	1	0.86	ns	Wilcoxon
<i>Actinobacteria</i>	LF-D	PB-ND	0.52	1	0.52	ns	Wilcoxon
<i>Actinobacteria</i>	LF-ND	PB-D	0.77	1	0.77	ns	Wilcoxon
<i>Actinobacteria</i>	LF-ND	PB-ND	0.56	1	0.56	ns	Wilcoxon
<i>Actinobacteria</i>	PB-D	PB-ND	0.63	1	0.63	ns	Wilcoxon
Abundancia	LF-D	LF-ND	0.96	1	0.96	ns	Wilcoxon
<i>Firmicutes</i>	LF-D	PB-D	0.86	1	0.86	ns	Wilcoxon
<i>Firmicutes</i>	LF-D	PB-ND	0.52	1	0.52	ns	Wilcoxon
<i>Firmicutes</i>	LF-ND	PB-D	0.77	1	0.77	ns	Wilcoxon
<i>Firmicutes</i>	LF-ND	PB-ND	0.56	1	0.56	ns	Wilcoxon
<i>Firmicutes</i>	PB-D	PB-ND	0.63	1	0.63	ns	Wilcoxon

Tabla Suplementaria 7. Diferencia de la abundancia relativa de los fillos más abundantes – Pruebas estadísticas. No se observa significancia en ninguna de las comparaciones

Género	Grupo	Grupo	p-value	p.adj	p.format	significancia	Método
<i>Bifidobacterium</i>	LF	PB	0.47	0.47	0.47	ns	Wilcoxon
<i>Streptococcus</i>	LF	PB	0.89	0.89	0.89	ns	Wilcoxon
<i>Blautia</i>	LF	PB	0.83	0.83	0.83	ns	Wilcoxon
<i>Bifidobacterium</i>	LF-D	LF-ND	0.79	1	0.79	ns	Wilcoxon
<i>Bifidobacterium</i>	LF-D	PB-D	0.73	1	0.73	ns	Wilcoxon
<i>Bifidobacterium</i>	LF-D	PB-ND	0.66	1	0.66	ns	Wilcoxon
<i>Bifidobacterium</i>	LF-ND	PB-D	0.68	1	0.68	ns	Wilcoxon
<i>Bifidobacterium</i>	LF-ND	PB-ND	0.51	1	0.51	ns	Wilcoxon
<i>Bifidobacterium</i>	PB-D	PB-ND	0.87	1	0.87	ns	Wilcoxon
<i>Streptococcus</i>	LF-D	LF-ND	0.79	1	0.79	ns	Wilcoxon
<i>Streptococcus</i>	LF-D	PB-D	0.67	1	0.67	ns	Wilcoxon
<i>Streptococcus</i>	LF-D	PB-ND	0.55	1	0.55	ns	Wilcoxon
<i>Streptococcus</i>	LF-ND	PB-D	0.48	1	0.48	ns	Wilcoxon
<i>Streptococcus</i>	LF-ND	PB-ND	0.77	1	0.77	ns	Wilcoxon
<i>Streptococcus</i>	PB-D	PB-ND	0.37	1	0.37	ns	Wilcoxon
<i>Blautia</i>	LF-D	LF-ND	0.46	1	0.46	ns	Wilcoxon
<i>Blautia</i>	LF-D	PB-D	0.52	1	0.52	ns	Wilcoxon
<i>Blautia</i>	LF-D	PB-ND	0.71	1	0.71	ns	Wilcoxon
<i>Blautia</i>	LF-ND	PB-D	0.56	1	0.56	ns	Wilcoxon
<i>Blautia</i>	LF-ND	PB-ND	0.66	1	0.66	ns	Wilcoxon
<i>Blautia</i>	PB-D	PB-ND	0.34	1	0.34	ns	Wilcoxon

Tabla Suplementaria 8. Diferencia de la abundancia relativa de los géneros más abundantes – Pruebas estadísticas. No se observa significancia en ninguna de las comparaciones.

Group 1	Group 2	Sample size	Permutations	pseudo-F	p-value	q-value
0-LF	0-PB	28	999	1.15	0.26	0.39
2-LF	2-PB	29	999	1.09	0.32	0.43
4-LF	4-PB	28	999	1.17	0.24	0.39

Tabla Suplementaria 9. Comparación de la composición de la microbiota intestinal según el tratamiento seguido (LF o PB) en diferentes puntos en el tiempo – Pruebas estadísticas. No se observa diferencias en ninguna de las comparaciones.

Group 1	Group 2	Sample size	Permutations	pseudo-F	p-value	q-value
0-LF-Disbiosis	0-LF-Normobiosis	14	999	0.97	0.51	0.72
0-LF-Disbiosis	0-PB-Disbiosis	13	999	1.31	0.15	0.43
0-LF-Disbiosis	0-PB-Normobiosis	13	999	1.21	0.23	0.51
0-LF-Normobiosis	0-PB-Disbiosis	15	999	1.08	0.34	0.66
0-LF-Normobiosis	0-PB-Normobiosis	15	999	0.67	0.88	0.93
0-PB-Disbiosis	0-PB-Normobiosis	14	999	0.98	0.40	0.71
2-LF-Disbiosis	2-LF-Normobiosis	16	999	0.92	0.58	0.74
2-LF-Disbiosis	2-PB-Disbiosis	14	999	1.43	0.08	0.41
2-LF-Disbiosis	2-PB-Normobiosis	15	999	1.12	0.30	0.62
2-LF-Normobiosis	2-PB-Disbiosis	14	999	1.10	0.32	0.65
2-LF-Normobiosis	2-PB-Normobiosis	15	999	0.68	0.76	0.84
2-PB-Disbiosis	2-PB-Normobiosis	13	999	1.23	0.21	0.47
4-LF-Disbiosis	4-LF-Normobiosis	16	999	0.99	0.47	0.71
4-LF-Disbiosis	4-PB-Disbiosis	14	999	1.31	0.13	0.41
4-LF-Disbiosis	4-PB-Normobiosis	14	999	1.06	0.36	0.68
4-LF-Normobiosis	4-PB-Disbiosis	14	999	0.80	0.71	0.83
4-LF-Normobiosis	4-PB-Normobiosis	14	999	0.72	0.86	0.93
4-PB-Disbiosis	4-PB-Normobiosis	12	999	0.68	0.89	0.93

Tabla Suplementaria 10. Comparación de la composición de la microbiota intestinal según el tratamiento (LF/PB) y condición previa (Disbiótico / No-Disbiótico) de los participantes en diferentes puntos en el tiempo – Pruebas estadísticas. No se observa diferencia en ninguna de las comparaciones.

Género	Grupo 1	Grupo 2	p	p.adj	p.format	P-signif	Method
<i>Akkermansia</i>	LF-M4	PB-M4	0.04	0.04	0.04	*	Kruskal-Wallis
<i>Gemella</i>	LF-M4	PB-M4	0.03	0.03	0.03	*	Kruskal-Wallis
<i>Staphylococcus</i>	LF-M4	PB-M4	0.03	0.03	0.03	*	Kruskal-Wallis
<i>Dorea</i>	LF-M0	LF-M4	0.01	0.01	0.01	**	Kruskal-Wallis
<i>Roseburia</i>	LF-M0	LF-M4	0.01	0.01	0.01	*	Kruskal-Wallis
<i>Ruminococcus</i>	LF-M0	LF-M4	0.05	0.05	0.05	*	Kruskal-Wallis
<i>Enterococcus</i>	LF-M0	LF-M4	0.02	0.02	0.02	*	Kruskal-Wallis
<i>Bifidobacterium</i>	LF-M0	LF-M4	0.02	0.03	0.03	*	Kruskal-Wallis
<i>Clostridium.sensu.stricto.1</i>	LF-D-M4	PB-D-M4	0.01	0.01	0.01	*	Kruskal-Wallis
<i>Turicibacter</i>	LF-D-M4	PB-D-M4	0.04	0.04	0.04	*	Kruskal-Wallis
<i>Eubacterium..coprostanoligenes.group</i>	LF-D-M4	PB-D-M4	0.01	0.01	0.01	*	Kruskal-Wallis

Tabla Suplementaria 11. Diferencia en la abundancia relativa entre los biomarcadores encontrados por el análisis discriminativo lineal – Pruebas estadísticas.

$$H' = - \sum_{i=1}^S p_i \log_2 p_i$$

Figura Suplementaria 1. Índice de Shannon. Este índice toma en cuenta el número de ASVs presentes en cada muestra y con la su respectiva abundancia relativa con el fin de cuantificar la diversidad presente en cada muestra. Este valor es calculado con la siguiente fórmula en donde las siguientes variables son las siguientes : S – Número de ASVs, encontrados en la muestra, N – Número de ASVs totales encontrados en todas las muestras, ni – Número de individuos de la especie i, pi – ni/N.

$$\frac{\text{Suma de la longitud de ramas no compartidas}}{\text{Suma de la longitud de ramas totales}} = \text{Fracción de la longitud total de ramas no compartidas}$$

Figura Suplementaria 2. Unweighted Unifrac. Este índice es usado para asignar el grado de diferencia en la composición de la microbiota de dos poblaciones. Valores más altos de la fracción de la longitud total de ramas no compartidas hace referencia a una mayor diferencia en la composición de la microbiota de dos poblaciones diferentes. Esta diferencia se ve representada como una distancia mayor entre un punto y otro (los cuales representan la composición de la microbiota de cada participante) en un gráfico de PCoA.

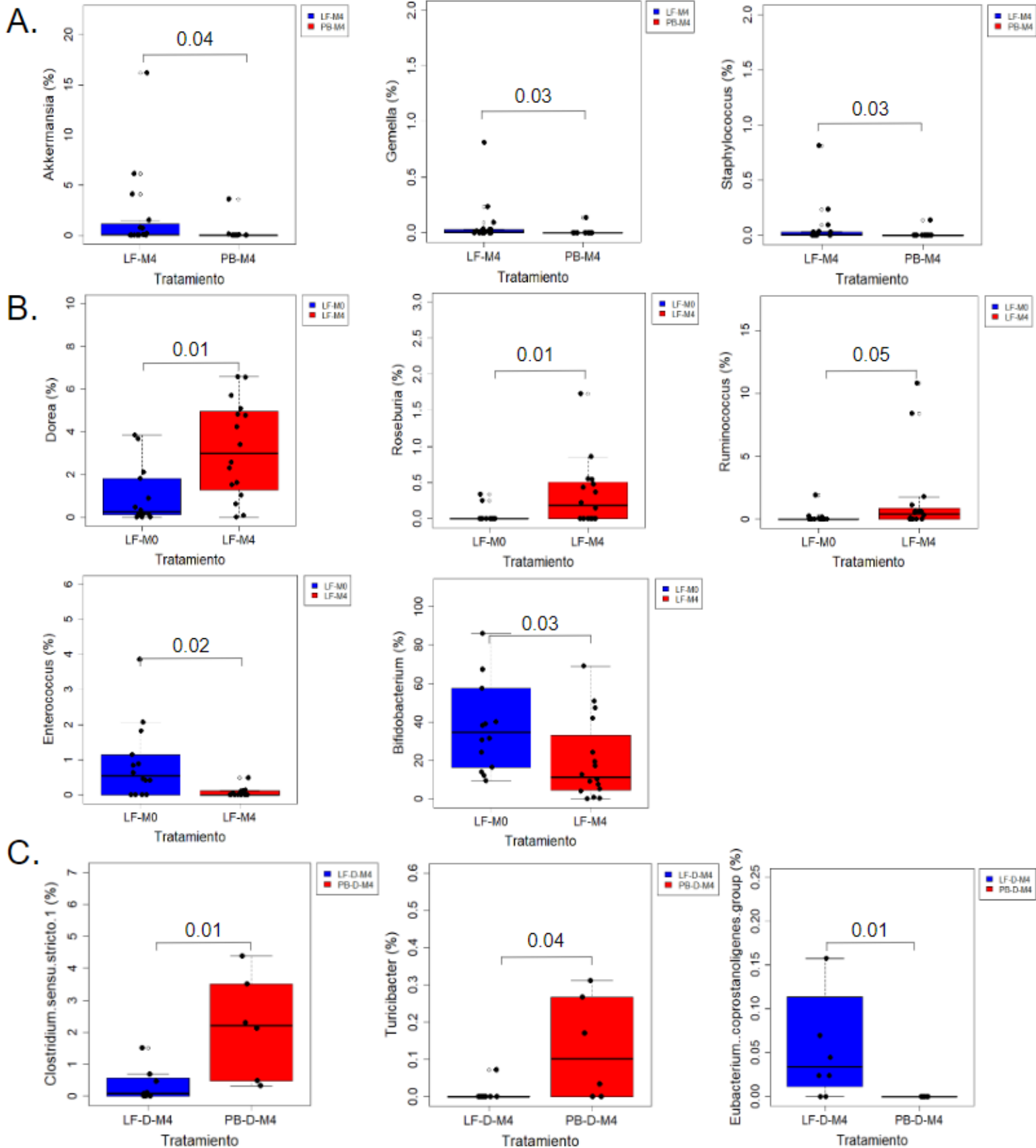


Figura Suplementaria 3. Diferencia en la abundancia relativa entre los biomarcadores encontrados por el análisis discriminativo lineal. A) Biomarcadores encontrados comparando los grupos LF-M4 y PB-M4. B) Biomarcadores encontrados comparando los grupos LF-M0 y LF-M4. C). Biomarcadores encontrados comparando los grupos LF-D-M4 y PB-D-M4. Cada punto representa a un participante y la respectiva abundancia relativa (en porcentaje) del género bacteriano reportado. Se reporta la significancia estadística (p-value ajustado por una corrección de FDR) de la comparación de abundancia relativa para cada género (Tabla suplementaria 11).