Universidad ORT Uruguay

Facultad de Ingeniería

Optimización de herramientas biotecnológicas de detección de biomarcadores de salud intestinal en TEA

Entregado como requisito para la obtención del título de Ingeniería en Biotecnología

Maite Irastorza - 255960

Tutora: Nadia Riera

2025

Declaración de autoría

Yo, Maite Irastorza, declaro que el trabajo que se presenta en esa obra es de mi propia mano. Podemos asegurar que:

- La obra fue producida en su totalidad mientras realizaba el proyecto final de la carrera Ingeniería en Biotecnología;

- Cuando he consultado el trabajo publicado por otros, lo he atribuido con claridad;

- Cuando he citado obras de otros, he indicado las fuentes. Con excepción de estas citas, la obra es enteramente mía;

- En la obra, he acusado recibo de las ayudas recibidas;

- Cuando la obra se basa en trabajo realizado conjuntamente con otros, he explicado claramente qué fue construido por otros, y qué fue contribuido por mí;

- Ninguna parte de este trabajo ha sido publicada previamente a su entrega, excepto donde se han realizado las aclaraciones correspondientes.

Aclaración: Maite Irastorza

Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecer a mi tutora, la doctora Nadia Riera, por la oportunidad y las enseñanzas durante todo el proyecto. Gracias por su confianza y paciencia.

También quiero agradecer a todo el equipo de LGM, sobre todo a Flor y Jose, por brindarme su ayuda cuando lo precisaba y aconsejarme.

A mi familia, mis padres y hermanos, quienes fueron mis pilares durante toda la carrera. Gracias por su apoyo, contención y por siempre impulsarme a seguir adelante.

A mis amigas por su amistad incondicional, su compañía y motivación durante los momentos más difíciles.

A mis compañeros de facultad, quienes hicieron todo este proceso más divertido, por todos los momentos que pasamos juntos.

Por último, gracias a todos los que fueron parte de este proceso.

Resumen

En el último tiempo, el rol del microbioma intestinal se ha estudiado con mayor profundidad en el desarrollo de enfermedades neurológicas incluido el trastorno de espectro autista. Los trastornos del espectro autista (TEA) se refieren a un grupo de enfermedades neuroconductuales influenciadas por factores tanto genéticos como ambientales. El predominio de síntomas gastrointestinales (GI) en el TEA ha motivado a los investigadores a explorar el papel potencial de la microbiota intestinal en el autismo. La microbiota humana es una población compleja de 10^{14} microorganismos incluyendo bacterias, hongos, virus y arqueas. Los mismos contribuyen al metabolismo normal, a la homeostasis inmunológica y controlan las actividades del sistema nervioso central (SNC) a través de vías neuronales, inmunitarias y endócrinas. El microbioma se ha asociado a otras patogénesis neurológicas, ya que, los microorganismos huéspedes producen metabolitos, como ácidos grasos de cadena corta, que interfieren con las funciones normales del sistema gastrointestinal y del sistema nervioso central evidenciado por la alteración de neurotransmisores y uniones comunicantes. El estudio de las herramientas de detección de biomarcadores de la microbiota es esencial para avanzar en el conocimiento de su papel en la salud. La combinación de técnicas como *qPCR*, y la secuenciación completa del gen de ARN ribosomal 16S por la tecnología de Oxford Nanopore (ONT) permite una evaluación integral del perfil microbiano de bacterias, facilitando el desarrollo de estrategias diagnósticas y terapéuticas innovadoras. En esta investigación, se busca optimizar herramientas de detección de biomarcadores bacterianos de salud intestinal en niños con TEA mediante *qPCR* con el objetivo de brindar una estrategia más rápida, accesible y sensible que una secuenciación completa. Para ello, se probaron distintos *primers* que apuntan a filos y géneros microbianos específicos y se estudiaron dos estrategias de normalización de datos mediante curvas de calibración. Para el estudio de la composición y diversidad de la microbiota de niños con TEA y hermanos neurotípicos, se realizó una caracterización taxonómica mediante la secuenciación completa del gen de ARN ribosomal 16S con la tecnología de Oxford Nanopore. Se identificaron diferentes bacterias enriquecidas en un grupo de estudio frente al otro siendo algunas pertenecientes a los géneros *Clostridium perfringens*, *Paeniclostridium sordellii* más predominantes en niños con TEA, y, *Blautia phocaeensis y Roseburia inulinivorans,* más predominantes en niños sin diagnóstico. También se estudió la microbiota intestinal mediante técnicas dependientes de cultivo en condiciones anaeróbicas con el objetivo de aislar bacterias de interés y utilizarlas como referencia en el desarrollo de herramientas de diagnóstico molecular.

Palabras claves: **Biomarcadores, microbiota, PCR en tiempo real, secuenciación, autismo**

Abreviaciones

16S - subunidad del ribosoma procariota.

ADN - ácido desoxirribonucleico

ADNg- ácido desoxirribonucleico genómico

AMX- adapter mix

ARN- ácido ribonucleico

ARNr - ARN ribosomal

BLAST- Basic Local Alignment Search Tool

BSM- Medio selectivo de *Bifidobacterium* (del inglés *Bifidobacterium Broth)*

CCDA- Agar sin sangre para *Campylobacter* (del inglés *Campylobacter Blood Free Agar*)

Ct- threshold cycle o ciclo umbral

dNTP- desoxinucleótidos trifosfatos

GI - Gastrointestinal

LB - caldo de lisogenia (del inglés lisogenia broth)

NEB - New England Biolabs

NT- Neurotípico

NCBI -National Center for Biotechnology Information

ONT- Oxford Nano Technologies

PBS - buffer fosfato salino

p/v - radio peso volumen

qPCR - real-time PCR

rpm- revoluciones por minuto

SNC - sistema nervioso central

SCFA -ácidos grasos de cadena corta (del inglés *short chain fatty acids*)

TEA - Trastorno del espectro autista

Tm- temperatura de *melting*

TMF - transplante de materia fecal

mL - Mililitro

µg - Microgramo

µL - Microlitro

UV - radiación ultravioleta

YCFA - Ácidos grasos de casitona de levadura (del inglés yeast casitone fatty acids)

Índice

1. Introducción 10
1.1 Trastorno del espectro autista (TEA) 10
1.2 Microbiota intestinal 11
1.2.1 Factores que influyen en la microbiota 13
1.3 Relación entre la microbiota y el autismo 14
1.3.1 Eje intestino-cerebro 14
1.3.2 Biomarcadores de salud intestinal 15
1.3.3 Probióticos 16
1.4 Herramientas de detección de biomarcadores 16
1.4.1 Tecnología de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) 16
1.4.1.1 PCR en tiempo real 17
1.4.2 Secuenciación de tercera generación 18
1.4.2.1 Secuenciación del ADNr 16S 18
1.5 Justificación del proyecto 19
2. Objetivos 19
2.1 Objetivo general 19
2.2 Objetivos específicos 19
3. Metodología 20
3.1 Procesamiento de muestras 20
3.2 Métodos independientes de cultivo 21
3.2.1 Extracción ADN bacteriano de muestras de materia fecal 21
3.2.2 Análisis de calidad del ADN 21
3.2.3 Análisis de Real time PCR para la detección de microorganismos intestinales 22
3.2.4 Curva de calibración para los primers de Bifidobacterium sp. 24
3.2.5 Determinación del perfil taxonómico microbiano mediante secuenciación del gen 16S con ONT 27
3.2.6 Análisis de las secuencias 28
3.3 Métodos dependientes de cultivo 28
3.3.1 Cultivo de bacterias en cámara anaeróbica 28
3.3.2 Medios de cultivo y procesamiento de muestras 28
3.3.3 Selección de colonias 29
3.3.4 Almacenamiento e identificación de cepas 29
3.3.5 Identificación de bacterias aisladas mediante secuenciación del 16S con tecnología Sanger 30
3.3.6 Identificación molecular de las bacterias aisladas mediante el gen de 16S 31
4. Resultados y discusión 31
4.1 Detección molecular de microorganismos intestinales en muestras de materia fecal mediante qPCR 31
4.1.1 Curvas de amplificación 31

4.1.2 Especificidad de los primers 33
4.1.3 Curva de calibración: ADNg y vector de clonado 34
4.1.4 Análisis de abundancia de microorganismos por qPCR entre TEA y NT 37
4.2 Identificación de biomarcadores intestinales 42
4.2.1 Secuenciación 16S por Oxford Nanopore Technologies 42
4.3 Cultivo anaeróbico 49
4.3.1 Bacterias aisladas en los medios de cultivo 49
4.3.2 Identificación molecular de bacterias aisladas por métodos dependientes de cultivo 51
5. Conclusiones 56
6. Bibliografía 58
7. Anexos 65

1. Introducción

1.1 Trastorno del espectro autista (TEA)

El trastorno del espectro autista (TEA), también conocido como autismo, es una condición del neurodesarrollo compleja y heterogénea que se caracteriza por dificultades en la comunicación social y patrones restrictivos y repetitivos de comportamiento. Esta condición está frecuentemente acompañada por otras alteraciones y comportamientos relacionados que incluyen anormalidades sensoriales (hipo o hipersensibilidad) y problemas gastrointestinales. Aunque puede diagnosticarse a cualquier edad, se describe como un trastorno del desarrollo porque los síntomas generalmente aparecen en los primeros dos años de vida. El TEA es visto como un espectro el cual varía de muy leve a severo, donde la mayoría de los individuos, aunque no todos, precisan soporte de algún tipo por el resto de su vida (1).

Los comportamientos y desafíos de las personas con autismo han atraído la atención de científicos y médicos hace más de 50 años (Figura 1). Fue descrito por primera vez en la década de 1940 por Leo Kanner y Hans Asperger en forma paralela e independiente pero contemporánea y desde entonces se han logrado grandes avances en comprender este trastorno inusual (2, 3). En 2013 se redefine el autismo como un espectro y se lo diferencia de la enfermedad de Asperger. Años después, diversos estudios genéticos estudiaron con mayor profundidad los múltiples subtipos de autismo.

En las últimas décadas, la prevalencia del TEA ha incrementado de manera significativa lo que ha generado un creciente interés en comprender sus causas, mecanismos subyacentes y estrategias terapéuticas. Si bien la etiología del TEA es compleja y multifactorial, se ha establecido que tanto factores genéticos como ambientales desempeñan un papel crucial en su desarrollo. La herencia genética es un componente muy fuerte donde se ha estimado que la heredabilidad es del 74-93%. Los niños nacidos en una familia con un hermano afectado tienen un riesgo diez veces mayor de desarrollar características dentro del espectro, por lo que sugiere una combinación de factores genéticos y ambientales no mendelianos en la etiología del TEA (1-4).

El diagnóstico temprano está asociado a una mejor calidad de vida, por eso existen grandes esfuerzos por identificar y desarrollar nuevas estrategias, como la identificación de

biomarcadores moleculares, que ayuden a la evaluación clínica. La detección temprana del TEA es fundamental para la implementación de intervenciones efectivas. Esta se basa principalmente en herramientas de evaluación clínica como entrevistas estructuradas, observaciones del comportamiento y cuestionarios estandarizados dirigidos a padres y cuidadores (5). Una vez diagnosticados, la atención mediante terapia congnitivo conductual es fundamental para mejorar la calidad de vida de los individuos y sus familias. En los últimos años, la alimentación y la microbiota intestinal han emergido como áreas clave en la investigación del TEA. Se ha prestado mayor atención a intervenciones alimentarias, particularmente en lo relacionado con dietas libres de gluten y caseína, debido a la alta incidencia de problemas gastrointestinales en niños con TEA (5–7).

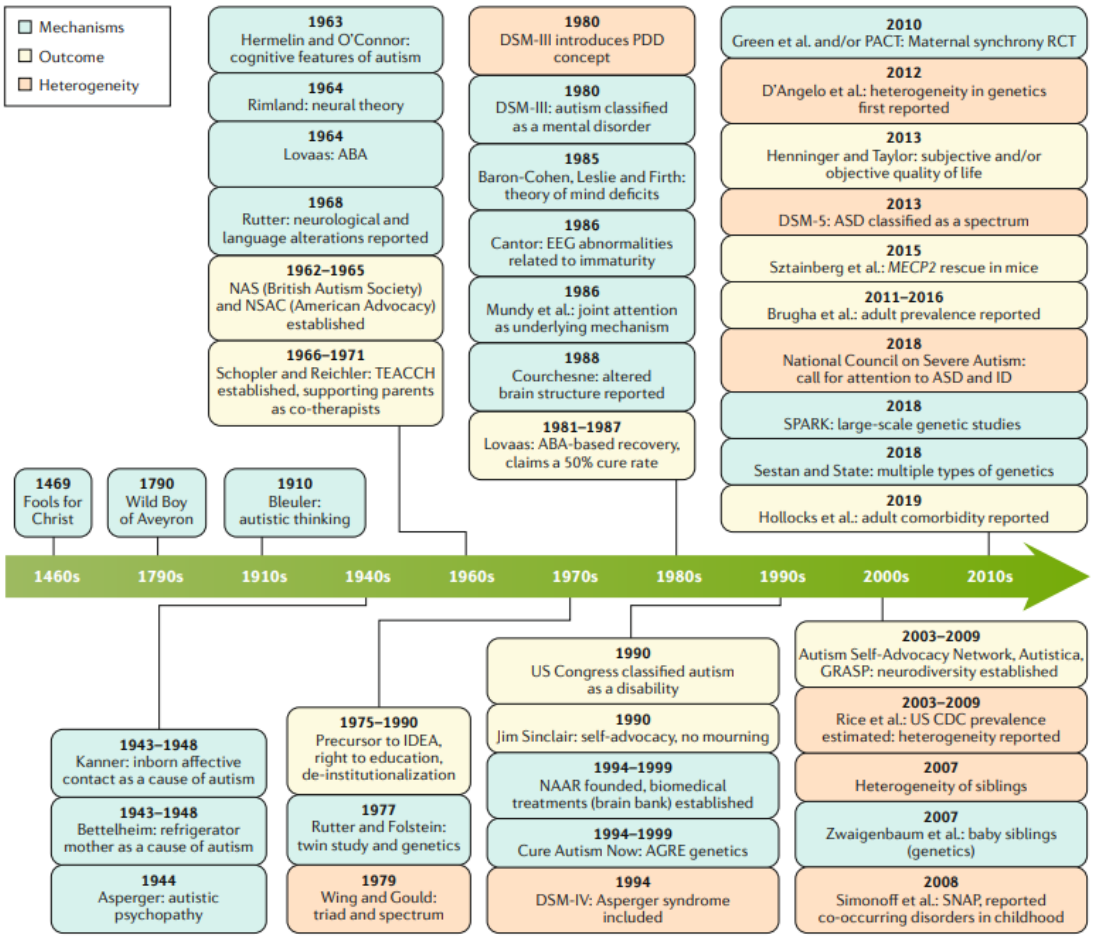


Figura 1. Línea del tiempo describiendo la historia de la comprensión del autismo y su etiología tomado de (2).

1.2 Microbiota intestinal

La microbiota humana es el conjunto de microorganismos situados en distintos órganos del cuerpo que interactúan con el mundo exterior demostrando ser extremadamente importantes para dar forma y mantener la salud y el equilibrio del huésped. No solo incluye los microorganismos sino que también sus genes, sus productos y cómo interactúan entre ellos y con su entorno. Este órgano ha sido descrito como "invisible" (8) pesa aproximadamente 200 gramos y el 95% está localizado en el tracto gastrointestinal. El cuerpo humano presenta 1.3 veces más microorganismos que células y en términos genéticos, los genomas de estas bacterias contienen 100 veces más genes que el humano. Este conjunto de microorganismos incluyen: bacterias, hongos, virus y arqueas, siendo las bacterias el grupo más numeroso y diverso.

La microbiota intestinal que habita en el tracto gastrointestinal, desempeña un papel crucial en la modulación y activación del sistema inmunológico, la función metabólica y regulación de la digestión y en la comunicación bidireccional entre el intestino y el cerebro. Mediante la producción de ácidos grasos de cadena corta (SCFA), factores de crecimiento, neurotransmisores, sustancias antimicrobianas y hormonas la microbiota nos mantiene saludables.

Durante la vida de un individuo, la microbiota es capaz de auto modularse frente a eventos estresantes externos de manera de conservar el equilibrio o eubiosis corporal. Al crecer, la microbiota cambia en relación con las diferentes etapas de la vida del individuo. Los tres primeros años de vida y el paso de la edad adulta a la vejez son etapas fundamentales para la adquisición y modificación de la microbiota intestinal (8, 9). La disbiosis de la microbiota se refiere a la alteración en la composición, la función o la cantidad de microorganismos presentes. Este desequilibrio se asocia con una alteración de la mucosa en la barrera intestinal, la cual genera una aumento de la permeabilidad alterando actividades vitales que promueven la salud. Este fenómeno se ha asociado con enfermedades como trastornos gastrointestinales, cardiovasculares, autoinmunes y metabólicos (10).

En el último tiempo, el rol del microbioma se ha estudiado con mayor profundidad en el desarrollo de trastornos neurológicos incluido el trastorno de espectro autista. La relación entre la salud mental, la alimentación y el tracto digestivo está cambiando la forma de entender y atender la salud humana. Estudios del microbioma intestinal están incorporándose cada vez

más en estrategias terapéuticas (11). La capacidad de caracterizar de forma rápida y reproducible el microbioma ofrece una oportunidad de desarrollar biomarcadores de diagnóstico y terapias fundamentalmente nuevos.

1.2.1 Factores que influyen en la microbiota

La microbiota intestinal es una entidad dinámica que evoluciona con nosotros. La modulación de la microbiota comienza desde el embarazo donde se da la transmisión microbiológica de la madre al feto a través del canal prenatal. Luego según el método de parto, natural o cesárea, la composición de bacterias que el recién nacido adquiere también varía (8).

Otros factores que influyen en la composición y diversidad de la microbiota son: el uso de antibióticos, la forma en que el individuo fue alimentado (leche materna o fórmula), actividad física, cultura y etnia, y sobre todo, la dieta. La dieta humana va cambiando a lo largo del tiempo dependiendo de los recursos alimentarios y económicos disponibles y según la geografía y cultura. La microbiota intestinal está en contacto directo con los alimentos que se ingieren por lo que ha tenido que adaptarse rápidamente a las alteraciones inducidas por los alimentos. Los humanos no sólo se alimentan a sí mismos sino que también alimentan su microbiota intestinal. Los alimentos, los aditivos alimentarios y esencialmente cualquier material que se introduce en la boca afectan las comunidades microbianas intestinales en todas las edades (12–14).

La relación entre el autismo y la microbiota intestinal ha sido objeto de estudio desde hace unos años. El interés surge por la alta tasa de problemas gastrointestinales en individuos con TEA los cuales generan disconformidad y empeora los patrones de conducta (15, 16). Sin embargo, es un desafío definir el papel de la microbiota en el TEA debido a la complejidad y heterogeneidad del trastorno. Estos desafíos pueden ser evidentes en los resultados contradictorios publicados sobre el microbioma intestinal y su relación con el TEA donde algunos géneros bacterianos reportados como abundantes en niños con TEA, también se hallan disminuidos (17, 18). La alimentación tiene una influencia muy grande en la composición de la microbiota intestinal y los hábitos alimentarios a largo plazo son la variable más importante para determinar la composición de la microbiota individual. La dieta se ha visto como un factor que potencialmente podría influir en las características de comportamiento de individuos con TEA. El uso de dietas específicas como por ejemplo: la dieta cetogénica, rica en grasas y baja en carbohidratos, promueve la producción de cuerpos cetónicos que pueden afectar la función

neuronal y aliviar los problemas gastrointestinales (19, 20). Sin embargo, se precisan estudios adicionales para comprender esta relación y su impacto en los síntomas del autismo.

1.3 Relación entre la microbiota y el autismo

1.3.1 Eje intestino-cerebro

El eje microbiota-intestinal-cerebro se define como la señalización bioquímica bidireccional entre el intestino y el sistema nervioso central mediante vías nerviosas, hormonas, neurotransmisores y el sistema inmunológico. Esta comunicación se da a través del nervio vago, lo que permite que el cerebro influya en la función digestiva y viceversa. Diversos estudios sugieren que la disbiosis de la microbiota intestinal podría influir con una variedad de enfermedades del neurodesarrollo, neuropsicológicas y neurodegenerativas (21). Por esta razón, es de gran interés explorar la microbiota para el tratamiento de enfermedades y condiciones neurológicas y su efecto.

Estudios experimentales en modelos animales y en humanos han demostrado que la manipulación de la microbiota mediante probióticos, prebióticos o trasplantes de materia fecal (TMF) puede mejorar comportamientos relacionados con el TEA y aliviar los síntomas gastrointestinales, lo que sugiere un potencial terapéutico prometedor (21–23). El uso de cepas probióticas es una nueva estrategia dirigida al microbioma intestinal que ha mostrado resultados prometedores. Shaaban et al. (24). observaron mejoras en la comunicación, sociabilidad y conciencia cognitiva al administrar diariamente, durante 3 meses, una mezcla de probióticos patentada compuesta por cepas de *Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus rhamnosus* y *Bifidobacterium longum* a niños con TEA. Por otro lado, el trasplante de materia fecal (TMF) se ha demostrado como una terapia prometedora para el tratamiento de diversas enfermedades al modular la microbiota intestinal. En la investigación realizada por Li et al. (25), observaron que el TMF fue bien tolerado y eficaz para mejorar los síntomas gastrointestinales y los comportamientos en niños con TEA. Podría promover la colonización de microorganismos donantes y cambiar la comunidad bacteriana hacia la de los controles con neurotípicos. Además, se detectó un cambio significativo en los niveles séricos de neurotransmisores. No obstante, esta terapia no es completamente segura ya que se han reportado casos donde los microorganismos se han vuelto patógenos empeorando las condiciones de los pacientes (26). Es por esta razón que esta terapia no se encuentra aceptada en la clínica aún y continúan los ensayos clínicos hasta comprobar su completa seguridad.

El eje intestino-microbiota-cerebro tiene un gran potencial como nuevo objetivo terapéutico para el tratamiento de los trastornos del sistema nervioso central. Sin embargo, falta evidencia en humanos de que éstas terapias basadas en microorganismos no patógenos mejoren los síntomas de los trastornos neurológicos.

1.3.2 Biomarcadores de salud intestinal

Los biomarcadores son utilizados para diagnosticar una enfermedad identificando individuos con un proceso biológico anormal y para predecir o monitorear la respuesta a una terapia. Los biomarcadores tienen el potencial de utilizarse en varios aspectos de la atención clínica, incluida la promoción del diagnóstico temprano y la selección de tratamientos eficaces (27). Se han identificado varios tipos de bacterias intestinales como biomarcadores asociados al TEA, como *Clostridium spp, Desulfovibrio spp., Bacteroides, Sutterella spp., Ruminococcus gnavus, Lactobacillus spp., Desulfovibrio spp., Fusobacteria, Verrucomicrobia, Bifidobacterium spp, Prevotella, Coprococcus,* entre otros (28).

Múltiples estudios han informado diferencias en la composición de la microbiota y bacterias entéricas específicas en muestras fecales de niños con TEA. La disbiosis microbiana en estos individuos se caracteriza principalmente por alteraciones en la composición de los filos bacterianos primarios: *Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacterias y Actinobacterias*. Además, dentro del filo *Firmicutes*, las especies de *Clostridiaceae* predominan en niños con TEA, lo cual podría estar vinculado con la enfermedad ya que son capaces de sintetizar metabolitos potencialmente tóxicos para los humanos (15, 29). La relación de la abundancia relativa de *Firmicutes/ Bacteroidetes* es comúnmente utilizada para comparar distintos grupos en los estudios de microbioma. Para el TEA los resultados no son concluyentes debido que algunos estudios reportan mayor proporción de *Firmicutes* contra *Bacteroidetes* (15), y otros reportan lo contrario (30).

La aplicación de técnicas moleculares para el estudio del microbioma han permitido la identificación y cuantificación de diferentes bacterias intestinales. Aunque estos métodos, como la hibridación fluorescente *in situ*, electroforesis desnaturalizante en gradiente y bibliotecas de clones del gen ARNr 16S, fueron aplicados exitosamente en el estudio de salud intestinal, el análisis mediante PCR en *tiempo real (qPCR)* utilizando primers específicos que

apuntan a filos o géneros que constituyen la microbiota intestinal, puede impulsar el desarrollo de biomarcadores como nuevas herramientas de predicción, así como de potenciales probióticos (31).

1.3.3 Probióticos

Como se mencionó previamente, la microbiota intestinal tiene un papel fundamental en la función y regulación del sistema nervioso central, el sistema neuroinmune y el sistema neuroendocrino. Los síntomas gastrointestinales en los individuos con TEA están estrechamente relacionados con su composición microbiana intestinal. Varios estudios demostraron que la suplementación con probióticos, un grupo de microorganismos que confiere beneficios para la salud al consumirlos en una cantidad adecuada, influye en la salud mediante la modificación positiva de la microbiota intestinal (32).

Ciertas especies bacterianas se han implementado como probióticos en investigaciones, algunas de ellas incluye; *Lactobacillus rhamnosus, Streptococcus thermophilus, Bifidobacterium infantis y Lactobacillus reuteri.* Tomova et al. (16) investigaron la microbiota intestinal en niños con TEA, sus hermanos sin diagnóstico y niños neurotípicos (control) después de la suplementación diaria de tres cepas de *Lactobacillus sp.* , dos cepas de *Bifidobacterium sp.* y una cepa de *Streptococcus sp.*. Como resultados lograron aumentar la proporción de *Bifidobacterium sp.* y disminuir la proporción de *Desulfovibrio spp.* y normalizar la proporción de *Bacteroidetes/Firmicutes* en los niños con TEA. En el estudio clínico piloto, aleatorizado, doble ciego realizado por Mazzone et al (22), observaron una mejora en las habilidades sociales adaptativas al administrar la cepa *Lactobacillus reuteri* en niños con TEA.

Estos estudios demostraron el papel de bacterias específicas en el tracto gastrointestinal y posiblemente en otras manifestaciones del autismo. Por lo que la intervención probiótica en pacientes con TEA puede ser considerada como un suplemento terapéutico complementario.

1.4 Herramientas de detección de biomarcadores

1.4.1 Tecnología de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fue desarrollada en 1980 por el doctor Kary Mullins y fue una técnica que revolucionó la biología molecular debido a su capacidad de reconocer secuencias de ADN específicas y rápidamente sintetizar un alto número de copias.

Es considerado uno de los descubrimientos científicos más significativos del siglo XX y hasta la fecha una gran variedad de metodologías basadas en el PCR original se han desarrollado como por ejemplo: Real-time PCR (*qPCR*) y reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) (33).

Esta tecnología involucra ciclos repetitivos de calentamiento y enfriamiento de una mezcla contenido ADN molde, la enzima ADN polimerasa, *primers* específicos y nucleótidos. El ADN molde contiene la secuencia *target* que será amplificada por la enzima polimerasa. Para esto, los *primers* o cebadores son fundamentales, ya que, son el punto de partida de la polimerasa para que generen la hebra complementaria al *target*. Los *primers* son secuencias cortas de nucleótidos complementarias del ADN target que se adhieren durante el enfriamiento mediante complementariedad de bases.

1.4.1.1 PCR en tiempo real

La tecnología de PCR en tiempo real (qPCR) es una técnica utilizada para amplificar y cuantificar ADN en tiempo real. La misma fue reportada por primera vez en el año 1992 por Higuchi y colaboradores, y a diferencia de la PCR convencional, que solo indica la presencia o ausencia de una secuencia específica de ADN, la misma permite medir la cantidad exacta de ADN amplificado en cada ciclo del proceso. La cuantificación del producto se produce por la detección de fluoróforos, como el SYBR Green que se intercala en el ADN de forma no específica. A mayor producto de ADN, mayor fluorescencia emitida. La cantidad de amplicón producido es proporcional al número de moléculas de DNA iniciales, por lo que a mayor concentración del gen estudiado, el amplicón fluorescente aparecerá en ciclos anteriores (34, 35). Desde que este método fue introducido, ha sido ampliamente utilizado para la amplificación, detección y cuantificación de *targets* específicos en comunidades microbianas lo que ha resultado en un gran aumento de conocimiento de los microbiomas animales, vegetales y humanos. Una gran ventaja de esta técnica es la posibilidad de diseñar *primers* específicos para detectar filos, géneros o especies predominantes de la microbiota intestinal para el estudio de enfermedades (31).

1.4.2 Secuenciación de tercera generación

1.4.2.1 Secuenciación del ADNr 16S

La secuenciación del gen que codifica a la subunidad menor del ribosomas 16S (ARNr 16S) es la técnica por excelencia para estudiar la biodiversidad microbiana debido a que este gen es altamente conservado entre especies bacterianas. Está compuesto por nueve regiones hipervariables (V1-V9) que permiten la identificación y la caracterización taxonómica de una comunidad bacteriana, logrando llegar hasta el nivel de género y/o especie (Figura 2) (31).

En años recientes, el uso de la tecnología Oxford Nanopore ha revolucionado el campo de la secuenciación debido a sus capacidades de análisis en tiempo real, lecturas largas y accesibilidad de equipo, lo cual permite secuenciar comunidades microbianas de manera rápida y efectiva en estudios tanto ecológicos como clínicos (36). El proceso de generación de una biblioteca para la secuenciación del gen 16S mediante Nanopore comienza con la extracción y cuantificación del ADN de las muestras ambientales o clínicas. Se realiza la amplificación de las regiones específicas del gen 16S mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando primers que flanquean regiones hipervariables. Para la amplificación completa del gen 16S se utilizan primers que abarquen toda la región V1-V9. Como se observa en la Figura 2 los primers 27F y 1492R alcanzan amplificar todo el gen permitiendo mejorar la resolución filogenética. En el estudio por Katiraei et al. (37) donde analizan la amplificación del gen completo (V1-V9) frente a la región V4 para evaluar si afecta el análisis taxonómico, observaron diferencias en abundancia relativa, y alfa y beta diversidad. Mediante alfa diversidad se mide la diversidad de especies dentro de una muestra o comunidad. Es decir, cuántas especies distintas hay y cuán equitativamente están distribuidas en ese lugar. Mientras que con beta diversidad se compara la diversidad entre dos o más muestras, indicando cuán diferentes son entre sí en términos de composición de especies. El ADN amplificado es purificado, adaptado y preparado para la secuenciación en la plataforma Nanopore, donde cada molécula de ADN es pasada a través de un poro y la secuencia es leída en función de los cambios en corriente iónica generados por cada base (38). Este método se utiliza para cuantificar e identificar filogenéticamente la microbiota intestinal y es útil para el análisis de bacterias no cultivables.

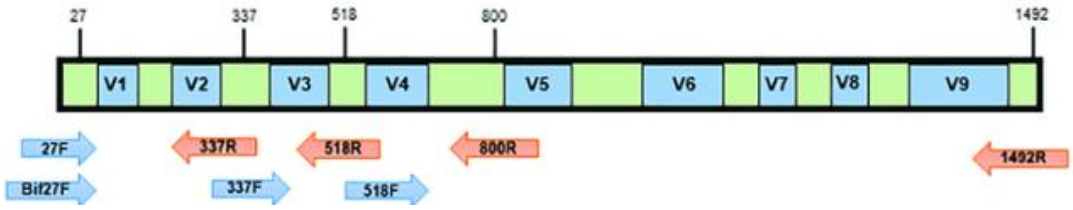


Figura 2. Ilustración del gen ARNr 16S mostrando las regiones hipervariables y conservadas que lo conforman y los diferentes primers utilizados para secuenciar tomado de (39).

1.5 Justificación del proyecto

En este trabajo, se propone optimizar herramientas de detección de biomarcadores intestinales asociados al autismo en una cohorte uruguaya. Diversos estudios han encontrado diferencias significativas en la composición de la microbiota intestinal de individuos con TEA en comparación con controles neurotípicos. Estas diferencias podrían estar relacionadas con síntomas gastrointestinales frecuentes en personas con TEA, como estreñimiento, diarrea y dolor abdominal. El estudio de la composición de la microbiota en pacientes con autismo mediante *real time* PCR puede brindar una estrategia de identificación de biomarcadores menos costosa, más sencilla e igualmente sensible que la secuenciación.

2. Objetivos

2.1 Objetivo general

Identificación y caracterización de estrategias moleculares de detección de biomarcadores bacterianos intestinales en niños con TEA.

2.2 Objetivos específicos

1) Puesta a punto de *primers* mediante *real time* PCR para caracterizar herramientas de detección de biomarcadores intestinales.
2) Identificación de biomarcadores intestinales mediante secuenciación del gen de ARNr 16S en una cohorte piloto de niños con y sin diagnóstico de TEA.
3) Diseño de *primers* propios contra bacterias intestinales de potencial interés.
4) Identificación molecular de aislamientos bacterianos a partir de muestras de materia fecal proveniente de niños con TEA y sus hermanos sin diagnóstico.

3. Metodología

Todos los reactivos, insumos y equipos utilizados durante este trabajo fueron brindados por el Instituto Pasteur de Montevideo en el Laboratorio de Genómica Microbiana. Este proyecto es parte de los objetivos de un Fondo Sectorial de Salud financiado por la Agencia Nacional de Innovación e Investigación (FSS_X_2022_1_172974). A continuación se muestra un esquema de trabajo demostrando las actividades del proyecto (Figura 3).

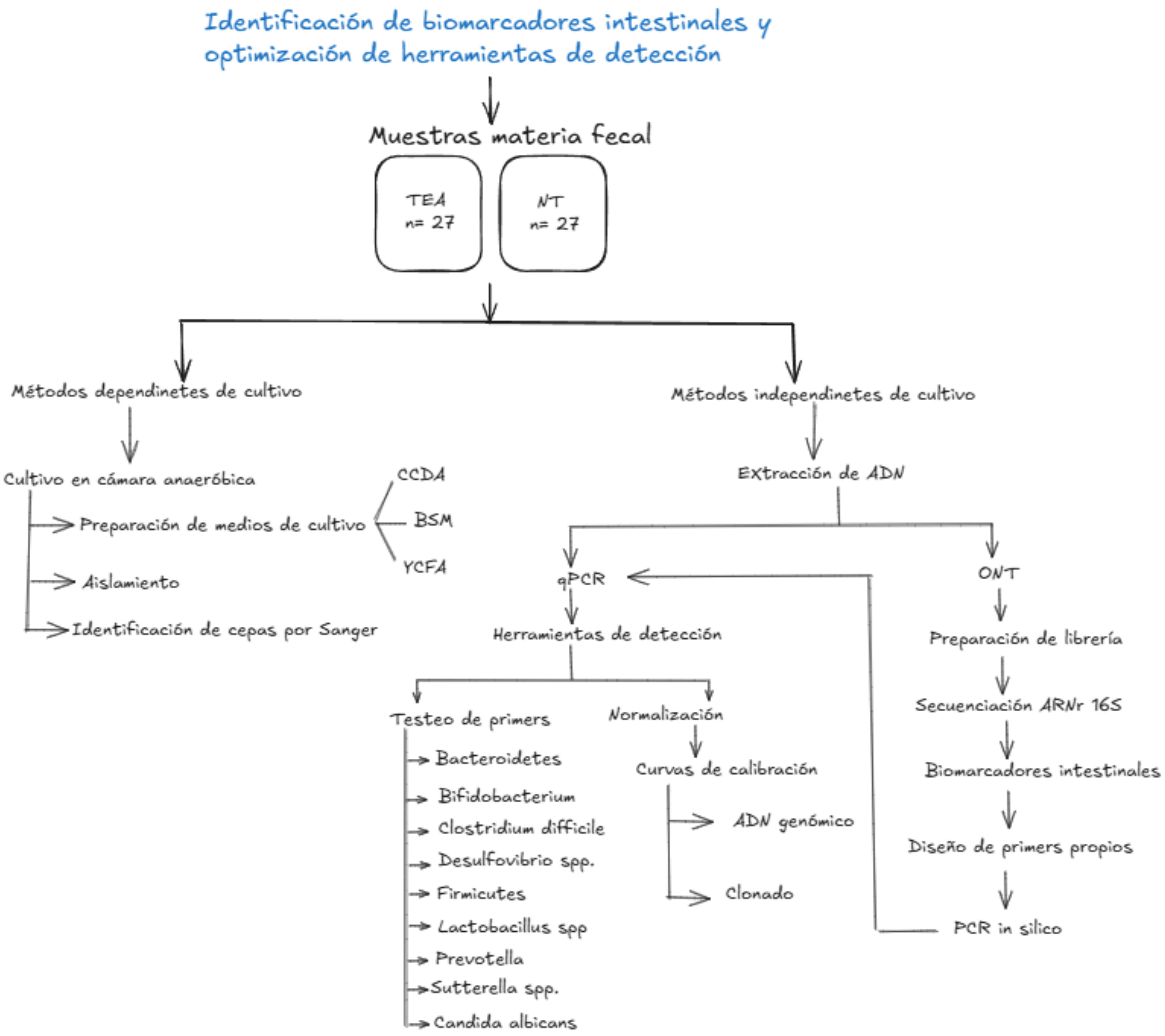


Figura 3. Esquema de trabajo de las actividades realizadas en el proyecto.

3.1 Procesamiento de muestras

Las muestras fecales de pacientes se recibieron en un recipiente estéril en el Laboratorio de Genómica Microbiana del Instituto Pasteur de Montevideo. Bajo condiciones de esterilidad,

las muestras se fraccionaron en tubos eppendorf de 1,5 uL con un peso neto de 0,250 mg aproximadamente. Para pesar el contenido se utilizó una balanza. Las alícuotas fueron rotuladas con el número del paciente y se almacenaron en el freezer de -80°C para la posterior caracterización de la composición de la microbiota. Las muestras fueron registradas en una planilla de datos para tener un seguimiento de los participantes. Allí se registra información relevante sobre el paciente, la fecha en la que se recibió la muestra y las aclaraciones necesarias.

3.2 Métodos independientes de cultivo

3.2.1 Extracción ADN bacteriano de muestras de materia fecal

Para la extracción de ADN se utilizó el kit comercial de extracción: Power Fecal Pro DNA Kit (QIAGEN), siguiendo instrucciones del fabricante. El mismo utiliza la tecnología de membrana de gel de sílice y está optimizado para el aislamiento y purificación de ADN genómico bacteriano procedente de muestras biológicas complejas. El protocolo de extracción de ADN con dicho kit se detalla en el Anexo 1. El ADN extraído se conserva a -4 °C hasta su próximo uso.

Para la cuantificación de ADN de las extracciones realizadas se utiliza el fluorómetro Qubit el cual mide la concentración de ácidos nucleicos (ADN o ARN) utilizando tintes fluorescentes específicos. Este paso es relevante para evaluar la eficiencia de los métodos de extracción y saber la concentración de ADN de la que partimos para la posterior amplificación.

3.2.2 Análisis de calidad del ADN

Para estudiar la calidad del ADN extraído, se realizó electroforesis en gel de agarosa 1% (p/v) con buffer TAE 1X (Anexo 2). En un volumen de 50 mL de agarosa fundida en TAE 1X, se incorporó 1 µL de intercalante GoodView (SBS). Para cargar las muestras de ADN, se utilizó la tinta Loading Dye 10X (BioLabs) diluída en agua destilada. Se utilizó un marcador de peso molecular de rango de 1kb (Quick-Load 1kb Plus DNA Ladder, BioLabs) para estimar el tamaño de los productos. Se espera ver una única banda de 1500 pb. La corrida electroforética se efectuó a 100 V/cm durante 20 minutos y el gel se visualizó en el transiluminador con luz UV.

3.2.3 Análisis de *Real time* PCR para la detección de microorganismos intestinales

Se realizaron ensayos de PCR en tiempo real con *primers* que apuntan al 16S de bacterias que constituyen la microbiota intestinal mostrados en la Tabla 1. Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 20 µL. Se utilizó 10 µL del kit Luna Universal Master Mix 2X (Biolabs), el cual contiene la enzima Taq polimerasa, MgCl2 y dNTPs, 2 µL del par de *primers*, 1 µL del ADN molde y 7 µL de agua ultrapura estéril. El ciclado se realizó como se describe en la Tabla 2. Para la ampliación mediante *real time* PCR se utilizó el equipo QuantStudio 5 (Applied Biosystems).

Tabla 1. *Primers* puestos a punto mediante *qPCR*.

Sequence (5'-3')	**Amplicon (pb)**	**Target**	**Referencia**
BactF- GGARCATGTGGTTTATTCGATGAT BactR-AGCTGACGACAACCATGCAG	126	*Bacteroidetes (Filo)*	(40)
BifidoF-GGAGYATGTGGTTTAATTCGAAGCA BifidoR-AGCTGACGACAACCATGCAC	243	*Bifidobacterium*	(40)
ClostriF-TTGAGCGATTTACTTCGGTAAAGA ClostriR-TGTACTGGCTCACCTTTGATATTCA	500	*Clostridium difficile*	(40)
DesF-ATACCCTGGTAGTCCACGCT DesR-CCACATACTCCACCGCTTGT	160	*Desulfovibrio spp.*	(40)
FirimiF-GGAGYATGTGGTTTAATTCGAAGCA FirimiR-AGCTGACGACAACCATGCAC	126	*Firmicutes (Filo)*	(40)
LactoF-AGCAGTAGGGAATCTTCCA LactoR-CACCGCTACACATGGAG	341	*Lactobacillus spp*	(40)

PrevoF-CACCAAGGCGACGATCA PrevoR-GGATAACGCCYGGACCT	283	*Prevotella*	(40)
SuttF- CGCGAAAAACCTTACCTAGCC SuttR-GACGTGTGAGGCCCTAGCC	260	*Sutterella spp.*	(40)
C.albF- TTTATCAACTTGTCACACCAGA CalbR- ATCCCGCCTTACCACTACCG	300	*Candida albicans*	(41)

A continuación, en la Figura 4 se representa el gen ARNr 16S con sus regiones hipervariables V1-V9 y la ubicación de los *primers* específicos para la amplificación mediante qPCR (42). De esta manera podemos evaluar qué regiones del gen 16S rRNA son más informativas para la detección de ciertos microorganismos según la posición en la que caen los *primers*.

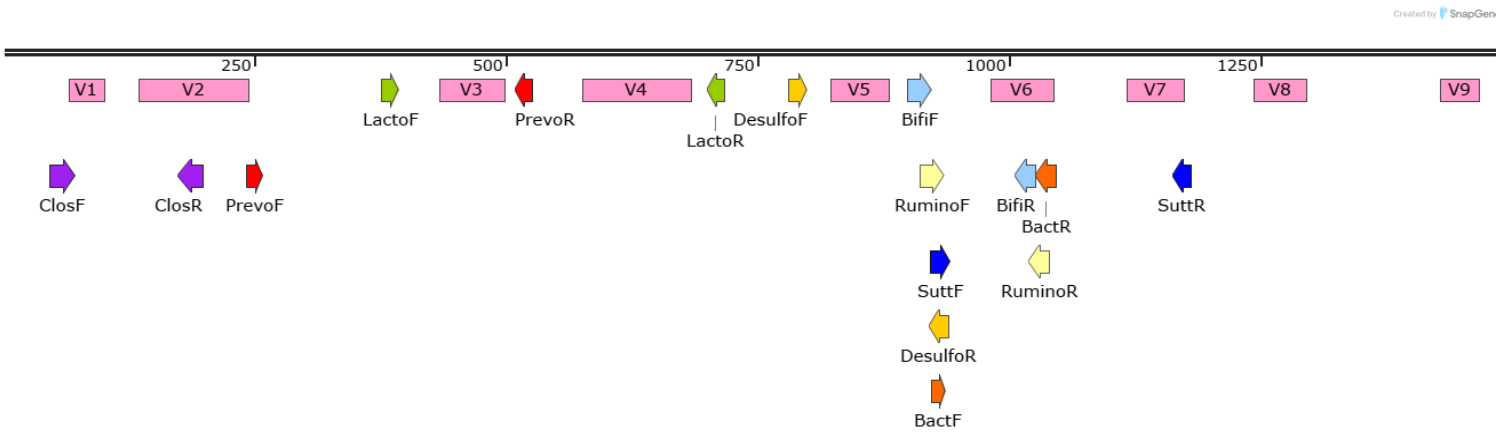


Figura 4. Ilustración del gen ARNr 16s mostrando las 9 regiones hipervariables (V1-V9) y dónde se encuentran mapeados los primers para los posibles biomarcadores bacterianos para la puesta a punto mediante la técnica *qPCR*.

Tabla 2. Ciclo utilizado para la amplificación por qPCR.

	Temperatura	**Tiempo**	**Ciclo**
Desnaturalización inicial	95°C	10 min	1

Desnaturalización	95°C	30 seg	
Annealing	60 °C	30 seg	40
Extensión	72°C	30 seg	
Hold	4°C	∞	

3.2.4 Curva de calibración para los *primers* de *Bifidobacterium sp.*

Las curvas de calibración se realizan con el objetivo de determinar de manera más precisa la concentración de ADN de las muestras problemas. Para ello se utilizan estándares de ADN de concentración conocida. Se prepara una serie de diluciones seriadas del estándar, que abarcan un rango de concentraciones, y luego se realizan las reacciones de *qPCR*. Los valores de Ct obtenidos se representan gráficamente frente a las concentraciones correspondientes.

Esto se debería realizar para cada conjunto de primers utilizado, sin embargo, en esta investigación solo se realizó para *Bifidobacterium sp.* debido a que no contábamos con ningún otro microorganismos aislado para utilizar el ADNg y después clonarlo. Es por esta razón, que para los métodos dependientes de cultivo, el objetivo de generar una colección de microorganismos aislados fue para poder contar con cepas identificadas que podamos utilizar en un futuro como estándares.

Para normalizar los datos de *Bifidobacterium* se realiza una curva de calibración mediante dos estrategias: concentraciones crecientes del ADN genómico aislado de *Bifidobacterium adolescentis ATCC 1570* y concentraciones crecientes del plásmido *pUC19* con una copia del gen ARNr 16S insertado (Figura 5).

Para la curva con el ADN genómico se realizó una qPCR variando las concentraciones de ADN molde: 0,5 ng, 1 ng, 4 ng, 10 ng y 20 ng. Cada concentración se realizó por triplicado. El protocolo y los reactivos utilizados son los mismos a los detallados en el punto 3.2.3.

Para el clonado, primero se diseñaron los *primers* para la generación del vector utilizando la plataforma de NETBuilder. Se colocó la secuencia del gen a insertar obtenida de la plataforma NCBI, gen del ARNr 16S de *Bifidobacterium adolescentis ATCC 1570,* y del plásmido pUC19. Las secuencias utilizadas se encuentran en el Anexo 3 y los *primers* generados se detallan en la Tabla 3. Los colores de la secuencia representan la región del vector a la que se adhieren, plásmido o inserto. Luego se realizó una PCR con un gradiente de temperaturas de *melting* y mediante una corrida electroforética en el gel de agarosa 1%, se eligió la temperatura óptima a partir de la intensidad de las bandas. Luego se realizó una PCR de volumen final 100 ul para amplificar la mayor cantidad de ADN para el clonado. Se siguió el protocolo detallado en el punto 3.2.3. cambiando la temperatura de *melting* por la seleccionada en el paso anterior. Para comprobar la amplificación del ADN, se realizó una electroforesis en gel de agarosa 1%. Las bandas de 1530 pb correspondientes al gen de las *Bifidobacterium adolescentis ATCC 1570,* fueron recortadas del gel de agarosa con un bisturí para posteriormente purificar el ADN mediante el Spin DNA Gel Extraction Kit (New England Biolabs). De esta manera, se purifican los reactivos remanentes de la PCR para obtener el ADN lo más limpio posible para el clonado. El ADN fue conservado a -20 °C hasta el clonado.

El plásmido que se utilizó es el *pUC19* el cual presenta una concentración de 0,5 pg/ul (New England Biolabs). Para obtener una mayor concentración del plásmido, se transformaron células comerciales *DH5 alfa* (Thermo Fisher Scientific) mediante shock térmico frío-calor y se plaqeuaron en medio LB Agar suplementado con ampicilina (LB-Amp) sabiendo que el plásmido presenta el gen de resistencia a este antibiótico (Figura 5). La placa se dejó en la estufa a 37 °C por 24 horas y luego se aisló una colonia para realizar un precultivo en medio LB-Amp líquido, el cual se dejó creciendo en la estufa a 37°C y en agitación a 180 rpm por 24 horas. Para recuperar el plásmido de las células transformadas se utilizó un kit comercial ZR Plasmid Miniprep-Classic (ZYMO RESEARCH). A continuación, se cortó el plásmido con la enzima EcoRI y se corrió un gel para comprobar que se encuentre en forma lineal (Anexo 4). Esta enzima presenta un único sitio de corte en el plásmido por lo que una vez que corta no puede volver a hacerlo debido a que no tiene las secuencias de unión para cortar. De manera de remover las enzimas y reactivos de la muestra, se purificó el plásmido utilizando el kit GenElute PCR Clean-Up Kit (Sigma-Aldrich).

Para el ensamblado y transformación de células *E. coli* quimiocompetentes se siguió el protocolo Hifi DNA Assembly Chemical Transformation (Biolabs). Las bacterias

transformadas se las creció en placas de LB Ampicilina (1:500) y se las dejó crecer durante 24 horas en la estufa a 37 °C. Luego se picó 1 colonia aislada y se realizó una Colony PCR utilizando los *primers* diseñados para el clonado. Se siguió con una electroforesis en gel de agarosa 1% donde se espera obtener una banda de aproximadamente 1570 pb correspondiente al gen, que presenta un tamaño de 1530 pb, sumado a los 40 pb correspondientes al plásmido donde se hibridan los *primers*. De esta manera, comprobamos la presencia del inserto y la eficiencia de las transformación celular. A continuación, para la recuperación del vector se utilizó el kit ZR Plasmid Miniprep-Classic (ZYMO RESEARCH) y se cuantificó mediante Nanodrop.

Por último, se realizó una *qPCR* variando las concentraciones del vector clonado: 0,5 ng, 1 ng, 4 ng, 10 ng y 20 ng. El protocolo y los reactivos utilizados son los mismos a los detallados en el punto 3.2.3.

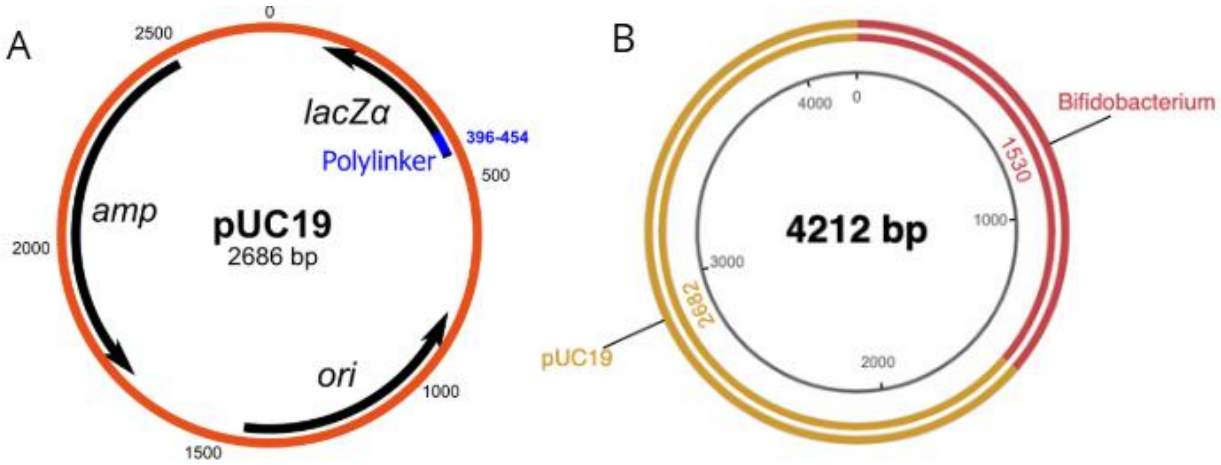


Figura 5. A. Imágen del plásmido puc19 obtenido de SnapGene. **B.**Vector diseñado en NEBuilder con el gen ARNr 16S de *Bifidobacterium adolescentis ATCC 1570* insertado en el plásmido *pUC19.*

Tabla 3. *Primers* diseñados para el clonado.

Nombre	**Secuencia**	**Referencia**
Bifidobacterium_fwd	atccccgggtaccgagctcg**tttgtggagggttcgattc**	Este estudio
Bifidobacterium_rev	ttgtaaaacgacggccagtg**aaaggaggtgatccagcc**	Este estudio

3.2.5 Determinación del perfil taxonómico microbiano mediante secuenciación del gen 16S con ONT

Para la secuenciación del gen ARNr 16S por Nanopore, en primer lugar se deben generar las bibliotecas de secuenciación. Las mismas se llevaron a cabo utilizando el kit de secuenciación por ligación SQK-LSK109 (Oxford Nanopore), siguiendo las instrucciones del fabricante. El kit incluye adaptadores y los *primers forward* y *reverse* de PCR, ambos con el mismo código. El código de barras nos permite multiplexar y secuenciar varias muestras a la vez. Utilizamos el kit EXP-PBC096 (Oxford Nanopore) que cuenta con 96 barcodes distintos.

Se amplificó la región V1-V9 del 16S utilizando los *primers* universales: 27F y 1492R (43), los cuales están flanqueados por secuencias de anclaje que los hacen específicos para su uso con la tecnología Nanopore (Figura 6).

Para la amplificación de las muestras por PCR se utilizó la polimerasa Q5 High-Fidelity (New England Biolabs) y el programa que se utilizó es el mismo al descrito en el punto 3.2.6. Los productos de la PCR son visualizados mediante una corrida electroforética en gel de agarosa al 1 % p/v y revelados bajo luz UV. De esta manera evaluamos la eficiencia de la amplificación y la calidad del ADN.

Se realizó una segunda PCR donde se unen los *barcodes* (barcoding). En este paso se generan amplicones con barcodes con extremos 5´, lo cual es fundamental para la posterior unión de los adaptadores.

Luego se llevó a cabo la purificación del producto de PCR con Ampure *beads* (Beckman Coulter, Brea, CA), siguiendo el protocolo de Oxford Nanopore, para eliminar contaminantes y reactivos de la PCR: dNTP, sales, *primers*, dímeros de *primers*. Mediante Qubit se cuantifica la concentración de ADN purificada.

Posteriormente, se realizó la ligación de los adaptadores de secuenciación con Adapter Mix (AMX) y una purificación con Ampure *beads*. Para la secuenciación de la librería se utilizó una flow cell (FLO-MIN 114) y se secuenció en el equipo GridION.

3.2.6 Análisis de las secuencias

Para el análisis de las muestras amplificadas por *real time* PCR se utilizó el programa de QuantStudio Design & Analysis v2.5 (Applied Biosystems) donde allí se analiza la especificidad de los *primers*, las curvas de amplificación y los valores de Ct. Luego en Rstudio se introdujeron los valores de Ct obtenidos para estudiar la distribución entre las cohortes de estudio.

Para el análisis de los datos de secuenciación en conjunto con Florencia Peñalba se utilizó el software Porefile (44) diseñado previamente en el Laboratorio de Genómica Microbiana utilizando el código descrito en el Anexo 5. Se obtuvieron dos tipos de archivos: COUNTS_polished.tsv y TAXCLA_polished.tsv. El primero provee una tabla de conteos de OTUs (Unidad taxonómica Operativa) para cada muestra, y el segundo, corresponde a una clasificación taxonómica para cada OTU. Para el análisis y visualización de esta información se utilizó el paquete de R phyloseq (45).

Utilizando los datos de las bacterias con abundancia relativa diferencial entre los grupos obtenidos por LeFSE, se diseñaron *primers* utilizando la plataforma BV-BRC Primer Design Service (46) y se los testeo mediante PCR *in silico* (47).

3.3 Métodos dependientes de cultivo

3.3.1 Cultivo de bacterias en cámara anaeróbica

El crecimiento y aislamientos de bacterias se llevó a cabo dentro de una cámara de anaerobiosis (Bactron 300-2). Las placas, medios de cultivo y soluciones utilizadas fueron previamente autoclavadas y se introdujeron en la cámara anaeróbica con 24-48 horas de anticipación para remover el oxígeno disuelto. También se midió el nivel de oxígeno dentro de la cámara utilizando un oxímetro ProSens para corroborar las condiciones anóxicas (0,01-0,04 %O_2).

3.3.2 Medios de cultivo y procesamiento de muestras

Para el aislamiento selectivo de microorganismos se utilizaron 3 medios de cultivo: “Yeast Casitone Fatty Acids” (YCFA), medio selectivo de *Bifidobacterium* (BSM) y medio

selectivo de *Campylobacter* (Campylobacter Blood Free Agar). Los componentes de cada medio se encuentran en el Anexo 6.

Las muestras fecales fueron ingresadas a la cámara anaeróbica para ser diluidas y cultivadas en los diferentes medios para el aislamiento de comunidades bacterianas. Dentro de la cámara se pesó 0,01g en un tubo eppendorf que se resuspendió en 1mL de PBS. Luego de homogeneizar la muestra, se realizaron diluciones en base 10 de PBS en tubos eppendorf hasta alcanzar el orden de 10^{-6}. Se plaquearon las diluciones de 10^{-4}, 10^{-5} y 10^{-6} y se incubaron en la estufa dentro de la cámara a 37° C por 48 hrs .

3.3.3 Selección de colonias

Se procedió a seleccionar diversas colonias de las placas de Petri que habían sido previamente cultivadas con las diluciones correspondientes de las muestras de materia fecal, tras un período de incubación de 48 horas. Las colonias fueron seleccionadas de acuerdo con su morfología y color. Posteriormente, las colonias seleccionadas fueron identificadas e inmediatamente almacenadas a -80 °C. Se picó una colonia por placa y se inocularon tubos Falcon con 2 mL del medio líquido para el re aislamiento en medio líquido. Se procedió a elegir colonias que presentaran diferencias morfológicas visibles a simple vista. Para ello, se consideraron características como el color: blanco, amarilllo anaranjado, y la forma: circular, ovalada o más irregular. Los tubos se dejaron crecer dentro de la estufa a 37°C por 24 horas.

3.3.4 Almacenamiento e identificación de cepas

Se transfirió 1 mL del medio líquido a un criotubo, al cual se le añadió 1 mL de glicerol al 50% (en una proporción 1:1) para su posterior almacenamiento a -80 °C, con el fin de generar una colección de aislamientos y preservar las bacterias aisladas. El volumen restante de 1 mL se destinó para los procedimientos de identificación por biología molecular. El mismo se pasó a un tubo eppendorf de 2 mL y se retiró de la cámara anaeróbica para la posterior extracción del ADN. Los tubos eppendorf se centrifugaron durante 3 minutos a 12000 rpm. Se descartó el sobrenadante y el pellet se diluyó en 100 mL de agua ultrapura. Este paso se repitió 3 veces y en la última resuspensión, se incubó a 95 °C durante 15 minutos para lisar por completo a las bacterias y de esta forma obtener el ADN genómico (ADNg). Por último, se centrifugó y se recuperó el sobrenadante el cual contiene el ADN que se utilizó posteriormente como molde en la posterior preparación de librerías de secuenciación.

3.3.5 Identificación de bacterias aisladas mediante secuenciación del 16S con tecnología Sanger

Para la amplificación por PCR se utilizó la enzima polimerasa Q5 high fidelity (NEB, NewEngland Biolabs), *primers* para el gen 16S (27F y 1492R) y el ciclado descrito en la Tabla 4.

Tabla 4. Protocolo PCR.

	Temperatura	**Tiempo**	**Ciclo**
Desnaturalización inicial	98 °C	30 sec	1
Desnaturalización	98 °C	30 sec	25
Annealing	60 °C	15 sec	
Extensión	72 °C	30 sec	
Hold	4 °C	∞	

Posteriormente, para evaluar la calidad de la amplificación se visualizaron los productos de PCR (aproximadamente 1500 pb) mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 % p/v, con tinción de GoodView bajo luz UV.

Por último, para la identificación de microorganismos, se realizó la secuenciación del ADN con la empresa Macrogen Inc. donde se obtuvo cromatogramas que permitieron analizar la calidad de las secuencias. Mediante NCBI BLAST se determinó la identidad de los microorganismos presentes en las muestras.

3.3.6 Identificación molecular de las bacterias aisladas mediante el gen de 16S

Para el análisis de los aislamientos, se recibieron las secuencias y los cromatogramas de las muestras enviadas a Macrogen Inc.. Para la secuenciación por Sanger se utilizó el primer

337F universal el cual abarca la región V3- V4 del gen ARNr 16S. La secuencia de este primer y los otros utilizados para amplificar el 16S completo se detallan en el Anexo 7. A su vez, en la Figura 6 podemos ver donde se encuentran mapeados en el gen ARNr 16S.

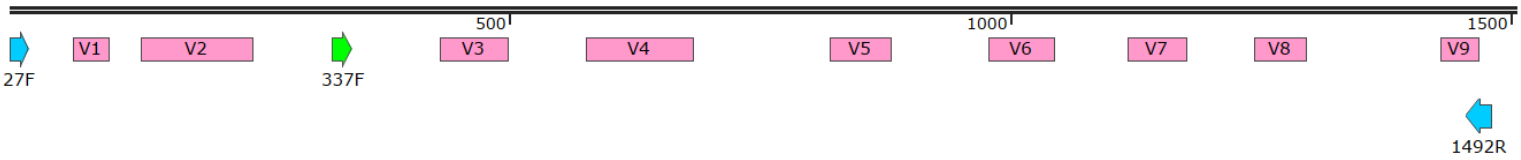


Figura 6. Ilustración del gen ARNr 16s mostrando las 9 regiones hipervariables (V1-V9) y dónde se encuentran mapeados los primers utilizados para Oxford Nanopore (27F y 1492R) y para Sanger (337F).

A partir de los cromatogramas recibidos, se evaluó el rango de secuencia a utilizar en la plataforma NCBI BLAST para la identificación bacteriana utilizando la base de datos del 16S.

4. Resultados y discusión

4.1 Detección molecular de microorganismos intestinales en muestras de materia fecal mediante *qPCR*

4.1.1 Curvas de amplificación

Las curvas de amplificación muestran el aumento de fluorescencia en tiempo real durante cada ciclo de *qPCR*. Refleja cómo se acumula el ADN amplificado en función del número de ciclos de amplificación demostrando la eficiencia de la amplificación (48). Es esperable que en cada ciclo de amplificación se duplique la cantidad de ADN. Una baja amplificación podría deberse a la presencia de inhibidores, a un mal diseño de la mezcla de reacción, a una baja presencia de ADN molde o una alta concentración de ADN molde que provoque inhibición.

En la Figura 7 se pueden observar dos curvas de amplificación que muestran la fluorescencia (ΔRn) en función del número de ciclos. También se observa una línea horizontal

correspondiente al umbral de detección o *threshold* el cual sirve para determinar el valor de Ct de cada muestra. El Ct es el número de ciclo en el que la señal de fluorescencia del ADN amplificado supera el umbral de detección.

Para la Figura 7A se observa una amplificación clara con curvas que ascienden exponencialmente a partir de los primeros ciclos y alcanzan una fase de meseta, lo que es característico de una amplificación adecuada. Sin embargo, para la figura 7B se observan curvas irregulares, sin una fase de crecimiento exponencial ni una meseta definida. Además, la mayoría de las muestras no superan el umbral de detección o *threshold* , y las que lo hacen lo logran en ciclos muy altos, lo que indica ausencia de amplificación. Esta curva corresponde al conjunto de *primers* para la detección de *Clostridium difficile*. La ausencia de amplificación podría indicar presencia de contaminantes como sales o productos inespecíficos que inhiben la reacción o un mal diseño de los *primers*. Para verificar que no haya sido un problema de las muestras, a modo de control, se probaron los *primers* con un una cepa aislada ya caracterizada de *Clostridium difficile* del laboratorio. Tampoco se detectó amplificación por lo que a partir de estos resultados se decidió no proseguir con estos *primers*.

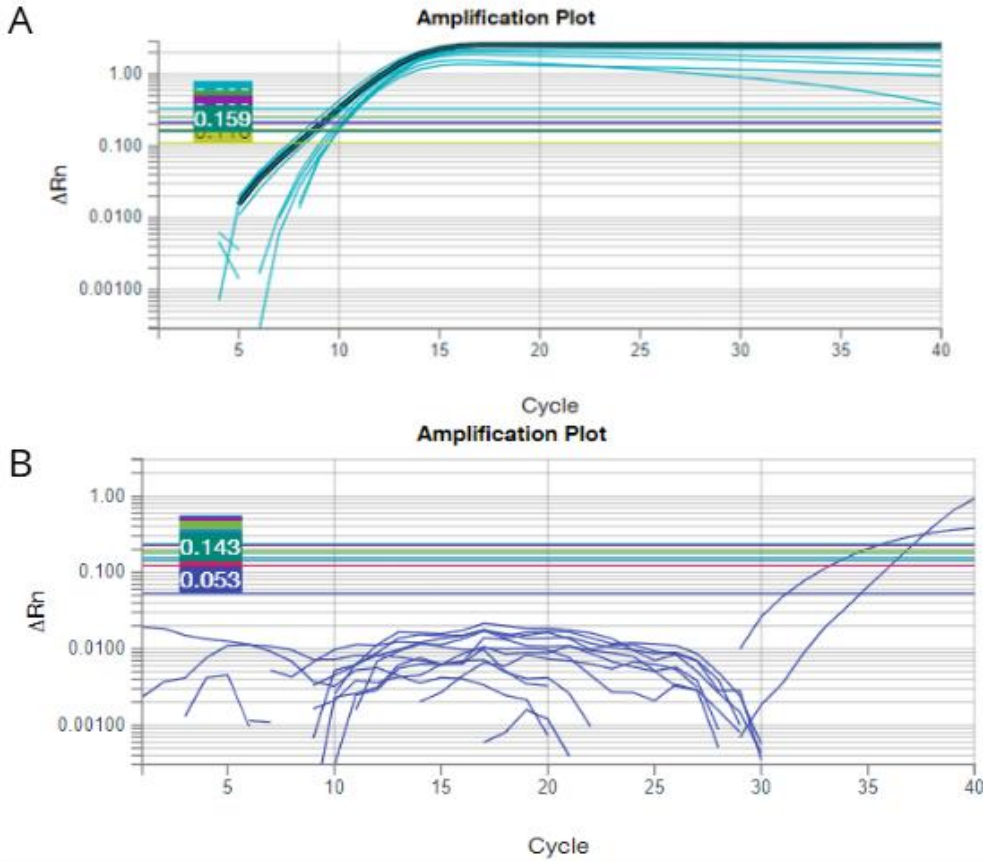


Figura 7. Curvas de amplificación obtenidas del programada Design and Analysis de QuantStudio. **A**. Curva de amplificación del primer *Firmicutes*, **B**. Curva de amplificación del primer *Clostridium difficile.*

4.1.2 Especificidad de los *primers*

Los gráficos de las curvas de *melting* nos permiten evaluar la especificidad de los *primers* para asegurar que las señales de fluorescencia provienen del producto esperado y no de intermediarios o contaminantes, lo que aumenta la confiabilidad del ensayo. El equipo puede detectar solamente un valor de temperatura de *melting* para los límites de detección permitidos. Un único pico sugiere que el equipo detectó un único producto específico y múltiples picos, sugiere la presencia de productos inespecíficos, como dímeros de *primers* o productos de amplificación no deseados. Los dímeros de *primers* suelen tener una Tm más baja que el producto específico y generan picos adicionales en el gráfico. Su detección puede ser de gran ayuda para optimizar las concentraciones de *primers* o la temperatura de *annealing*. Los gráficos se obtienen del programa Design and Analysis de QuantStudio al introducir los datos de cada corrida.

A excepción del primer de *Clostridium difficile*, se observó una alta especificidad para todos los *primers*. En la Figura 8 podemos ver las curvas de *melting* para los *primers* estudiados. Se puede ver cómo cada uno presenta una Tm específica según donde se genera el pico la cual coincide con la Tm teórica reportada para estos *primers.*

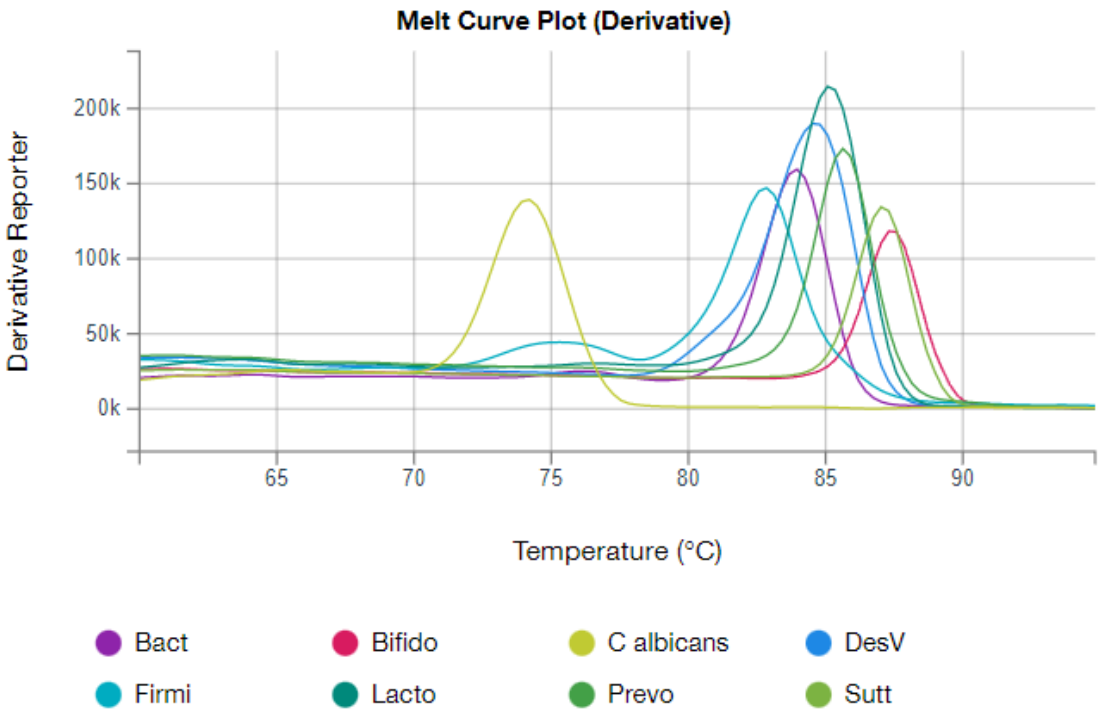


Figura 8. Curvas de *melting* (Tm) para el conjunto de *primers* utilizados para la detección de bacterias específicas mediante *qPCR.* La figura se obtuvo del programa Design and Analysis de QuantStudio.

4.1.3 Curva de calibración: ADNg y vector de clonado

Para la cuantificación absoluta del ADN, se realizaron curvas de calibración mediante dos estrategias distintas. A partir del valor de Ct detectado, se puede cuantificar la cantidad de ADN en la muestra y por lo tanto, tener una visión más exacta sobre la presencia de un género bacteriano en las muestras.

En primer lugar, se realizó una curva de calibración utilizando ADN genómico de una cepa de *Bifidobacterium adolescentis ATCC 1570.* Para esto se realizaron diluciones seriadas hasta llegar a las siguientes concentraciones: 0,5, 1, 4, 10 y 20 ng y se corrió una qPCR donde se obtuvo un valor de Ct correspondiente a cada concentración (Figura 9). A menor concentración de ADN en la muestra, mayor es el valor de Ct detectado. Es un método más simple, pero en el caso de que hayan múltiples copias del gen, no es posible saber cuántas copias amplifica. Esto podría generar un sesgo en los resultados, ya que los resultados no reflejan exactamente la cantidad de ADN en la muestra.

En la Figura 9 se observa la curva de calibración obtenida a partir del ADN genómico de la bacteria a estudiar. De este gráfico se obtuvo una ecuación de la recta y el coeficiente de

determinación (R^2) el cual indica la precisión del ajuste de un modelo a los datos de una curva de calibración. Esta correlación, se representa como un valor entre 0,0 y 1,0. Un valor de 1 o cercano a 1, indica un ajuste perfecto. Como se observa se obtuvo un R^2 de 0,9985 nuestros resultados sugieren un ajuste confiable. Además, para cada valor de la curva se agregó su error considerando la desviación estándar.

A partir de la ecuación de la recta, se pueden introducir los valores de Ct de la muestra problema para interpolar la cantidad de ADN y de esta manera saber con mayor precisión la presencia de *Bifidobacterium adolescentes* en la muestra.

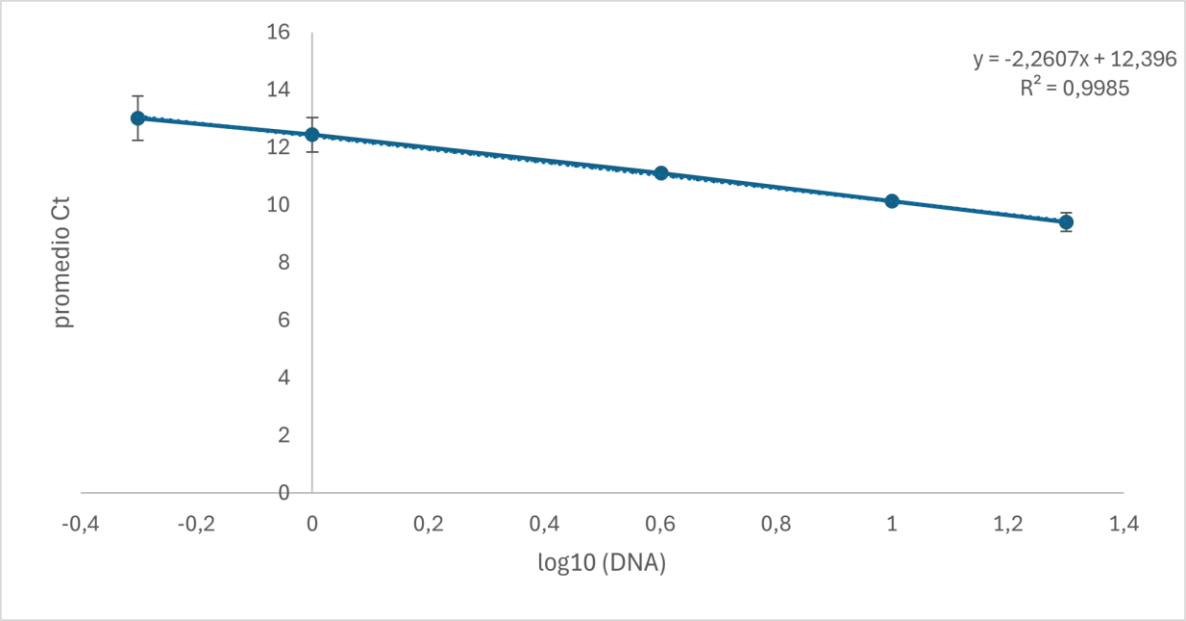


Figura 9. Curva de calibración a partir del ADN genómico de *Bifidobacterium adolescentis ATCC 1570.*

La estrategia de clonado, permite un control más preciso del número de copias del gen. Como el plásmido es una molécula definida donde se sabe cuantas copias el gen diana hay, se puede calcular con mayor precisión la concentración del ADN de interés en la muestra. Sin embargo, es una estrategia más compleja y laboriosa debido a que requiere clonación.

Para la curva de calibración utilizando el vector clonado, se realizaron diluciones seriadas hasta llegar a las mismas concentraciones que para la primera curva: 0,5, 1, 4, 10 y 20 ng y se corrió una *qPCR* donde se obtuvo un valor de Ct correspondiente a cada concentración

(Figura 10). A partir de la curva, se obtiene la ecuación de la recta y el coeficiente de determinación (R^2). Como se mencionó anteriormente, se busca un R^2 lo más cercano a 1 ya que demuestra la confiabilidad del ajuste utilizado. Se obtuvo un valor 0,9701 y además, se agregaron las barras de error para cada valor de la curva considerando la desviación estándar. A diferencia de la primera curva, la longitud de las barras es mucho mayor, lo que demuestra mayor variabilidad e incertidumbre en las muestras.

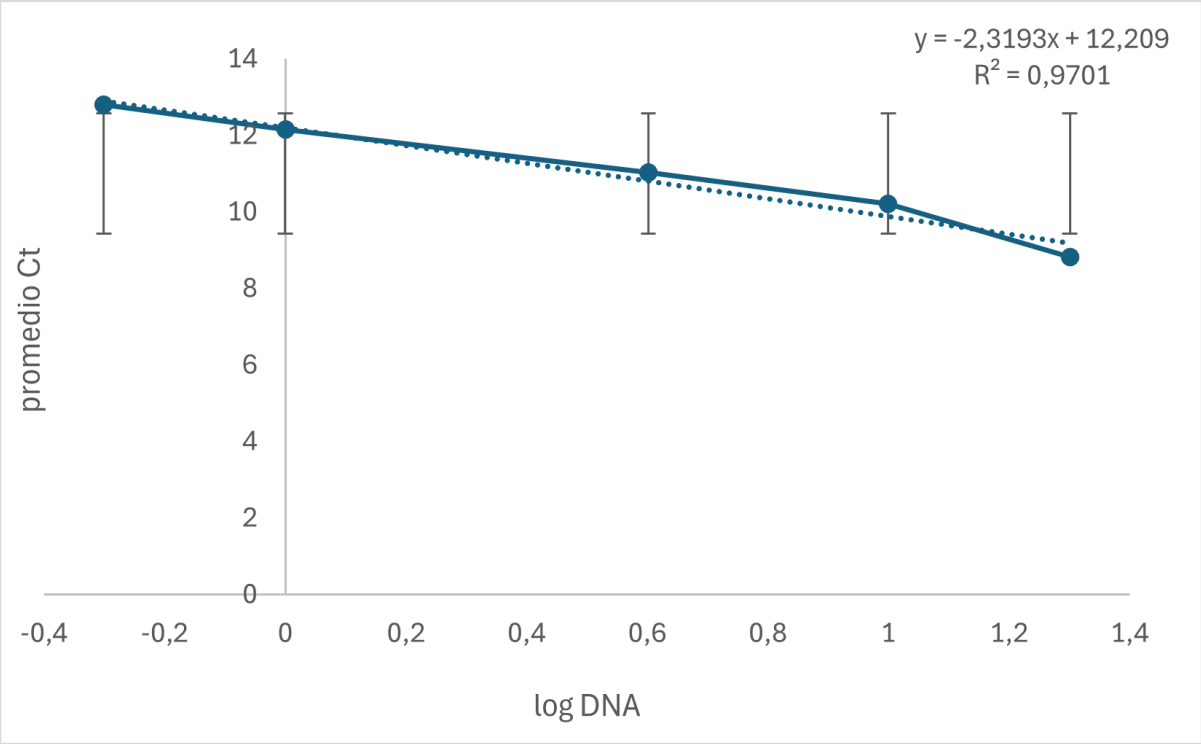


Figura 10. Curva de calibración realizada a partir del plásmido pUC19 y el gen ARNr 16S de *Bifidobacterium adolescentis ATCC 1570* clonado.

Como se mencionó anteriormente, la estrategia de clonación permite un control más preciso de las copias del gen que se están amplificando, en este caso sabemos que el plásmido contiene una copia del gen ARNr 16S de *Bifidobacterium adolescentis ATCC 1570.* Para el caso del ADNg contamos con 3 a 5 copias, por lo que no podemos saber con exactitud cuántas copias está amplificando durante la reacción de *qPCR*. Por lo tanto, extrapolando la concentración de ADN de las curvas de calibración, podemos analizar si detectamos este sesgo en la curva de calibración de ADNg. A partir de los resultados notamos que mediante la estrategia de clonado la concentración de ADN es menor a la obtenida mediante la curva de calibración de ADNg. Esto tiene coherencia según lo mencionado previamente, donde al

utilizar el ADNg para realizar la curva de calibración no podemos saber en cada muestra cuántas copias del gen ARNr 16S está amplificado en la reacción.

Para obtener una cuantificación precisa y consistente entre ambos métodos se debe calcular el número de copias/µl porque permite comparar la cantidad de copias del gen específico que se está midiendo, no sólo la concentración del ADN. Para ello se utiliza la ecuación descrita a continuación donde el tamaño del plásmido es de 4212 pb y el de genoma de *Bifidobacterium adolescentis ATCC 1570.* 2.4 Mpb.

Número de copias/µl = ((ng/ µl)* 6,022x 10^23) / (longitud en pb * 1x10^9 * 650)

Al comparar los resultados se observó que la estrategia de clonado en promedio entre todas las muestras presenta 9,89 x 10^7 número de copias/µl, mientras que la estrategia de ADNg presenta 2,31 x 10^5 número de copias/µl. Esto puede deberse al tamaño del plásmido frente al ADNg. Como el plásmido presenta menor tamaño, por cada nanogramo de ADN hay más moléculas de plásmido en comparación con el ADNg. Además, observando la fórmula, para calcular el número de copias/µl se divide por el tamaño de la molécula, esto hace que el número de copias sea menor para la estrategia de ADNg, ya que el genoma es mucho más grande que el plásmido. Por lo tanto, en la construcción de una curva de calibración de *qPCR*, si se cuantifica el ADN total, es importante saber que esto no refleja con precisión el número de copias del gen de interés.

4.1.4 Análisis de abundancia de microorganismos por qPCR entre TEA y NT

Para el análisis cuantitativo de los microorganismos detectados en los niños con TEA y NT se evaluó la presencia de estos por qPCR y se registraron los valores de Cts detectados. Un valor de Ct bajo indica una mayor cantidad de DNA de la bacteria objetivo, es decir, mayor abundancia del microorganismo diana. Por el contrario, cuanto más alto es el valor Ct detectado, menor abundancia de la bacteria objetivo.

La Figura 11 muestra gráficos de densidad distribución de los valores Ct obtenidos mediante *qPCR* para diferentes grupos bacterianos en muestras fecales de dos grupos de estudio: niños con Trastorno del Espectro Autista (T) y sus hermanos neurotípicos (N).

La Figura 11 nos permite evaluar si hay diferencias en la abundancia relativa de *Bacteroidetes*, *Bifidobacterium*, *Desulfovibrio spp*, *Firmicutes*, *Lactobacillus spp*, *Prevotella*, *Sutterella spp y Candida albicans* entre niños con TEA y sus hermanos neurotípicos. Para todos los *primers* utilizados no se observan diferencias entre grupos de estudio. Se puede observar cómo presentan una distribución muy similar en todos las bacterias detectadas y como las líneas punteadas se encuentran aproximadas.

En algunos casos, como el de *Bifidobacterium*, *Desulfovibrio spp*, *Prevotella* y *Sutterella spp*, no hay distancia entre las líneas punteadas, las medias son casi iguales, lo que indica que la detección de este microorganismo con esta herramienta no varía entre los grupos TEA y NT. Para *Bifidobacterium* se observa una completa superposición en la media de ambos grupos. Esto sugiere que la abundancia de este microorganismo es muy similar entre TEA y NT. *Bifidobacterium* es un género clave en la fermentación de fibras y la producción de SCFAs, que tienen efectos beneficiosos en la salud intestinal y cerebral. Se ha utilizado como probióticos en combinación con otros microorganismos y se han observado mejoras en los problemas gastrointestinales (24). Algunos estudios han encontrado una reducción significativa de *Bifidobacterium* en niños con TEA y sugirió que la restauración de su población con probióticos podría ser beneficiosa (30). En la investigación realizada por Mendive, P. et al. (49), donde estudian la relación de la microbiota intestinal y la dieta en una cohorte uruguaya de niños con TEA y niños sin diagnóstico, observaron un menor abundancia de *Bifidobacterium longum* y *Bifidobacterium adolescentis* en los niños con TEA.

En cuanto a *Prevotella*, se puede observar que la curva amarilla presenta una mayor altura lo que significa que esos valores de Ct son más comunes entre las muestras de estudio. Sin embargo, observando el promedio de los Cts, en comparación con las muestras neurotípicas, se obtiene un valor muy similar demostrando una abundancia de *Prevotella* muy similar entre grupos de estudio. Esto no coincide con otros estudios donde se ha reportado la reducción de *Prevotella* en niños con TEA. Este género bacteriano participa en la fermentación de carbohidratos complejos y producción de ácidos grasos de cadena corta, funciones fundamentales de la microbiota (50).

Analizando a *Sutterella spp* se observa una mayor dispersión de los valores Cts en los individuos con TEA. Wang et al. (51) han detectado una prevalencia significativamente mayor de *Sutterella spp.* en biopsias tomadas del tracto gastrointestinal de niños con TEA con problemas gastrointestinales en comparación con niños neurotípicos. No obstante, esto no se

logra visualizar, la presencia de *Sutterella spp* en las cohortes de estudio es muy similar entre sí.

A su vez, *Desulfovibrio spp* también se observa poco diferenciado entre grupos de estudio. No parece haber una diferencia en la abundancia de este microorganismo. Un estudio realizado por Finegold et al. (52) observó una sobreabundancia de *Desulfovibrio* en las heces de niños con autismo, y sugirieron que estos microorganismos podrían estar implicados en los síntomas gastrointestinales y posiblemente en aspectos neurológicos. Además, es un bacteria sulfato-reductora que produce ácido sulfhídrico (H_2S) como subproducto. En cantidades elevadas, el H_2S es tóxico para las células epiteliales intestinales, pudiendo dañar la barrera intestinal y generar una mayor permeabilidad intestinal.

Para *Bacteroidetes* ambas líneas punteadas están bastante cercanas, aunque la amarilla (TEA) está más hacia la derecha. Esto indica que, en promedio, los niños con TEA tienen valores de Ct ligeramente mayores, lo que podría reflejar una menor abundancia relativa de *Bacteroides* en el grupo TEA. Algunas investigaciones han reportado la disminución de este filo bacteriano en niños con TEA (16, 28). La gran mayoría de las especies de *Bacteroidetes* producen ácidos grasos de cadena corta como productos finales de su metabolismo, los cuales, como se mencionó previamente, son beneficiosos para la salud y para la modulación del metabolismo y otras funciones esenciales (28). Otros estudios reportan resultados opuestos, una mayor presencia de *Bacteroidetes* en niños con TEA (52). Es importante destacar que la microbiota está altamente influenciada por la dieta y la región geográfica, por lo que distintas investigaciones pueden reportar distintos resultados.

Otro filo importante en la microbiota intestinal es F*irmicutes.* Hay una ligera tendencia a valores de Ct más bajos, es decir mayor abundancia relativa, en niños neurotípicos. Sin embargo, la diferencia no parece muy marcada. Estos resultados coinciden con otros estudios donde este filo se reportó más presente en la microbiota de niños sin diagnóstico frente a niños con TEA (28, 30, 52, 53). Dentro de este filo encontramos bacterias beneficiosas productoras de SCFAs, con propiedades antiinflamatorias, reguladoras del sistema inmune, y otras bacterias, como las pertenecientes al género *Clostridium* que son patógenas. La alimentación influye significativamente en la composición de la microbiota y se ha reportado que dietas ricas en fibra suelen favorecer el crecimiento de bacterias beneficiosas del filo *Firmicutes* (8).

Para *Lactobacillus spp* ambas distribuciones tienen una forma similar, pero la media de

Ct en los niños neurotípicos se encuentra más hacia la izquierda. Esto sugiere que *Lactobacillus* podría ser más abundante en neurotípicos que en TEA, aunque la diferencia parece sutil. Algunas especies de *Lactobacillus* han sido utilizadas como probióticos para modular la microbiota intestinal y disminuir los problemas gastrointestinales. Existe evidencia de que ciertas cepas de *Lactobacillus* pueden tener efectos beneficiosos en la modulación de síntomas del TEA y favorecer al equilibrio de la microbiota (54). En la investigación realizada por Mazzone, L., et al. (22) donde se estudió el efecto de la administración de *Lactobacillus reuteri* en niños con TEA, los resultados mostraron que la intervención probiótica mejoró significativamente la comunicación y adaptación social.

Por último, para *Candida albicans*, el único hongo analizado, la línea punteada azul, neurotípicos, está ligeramente a la izquierda de la amarilla, lo que sugiere que los valores de Ct en niños con TEA son un poco más altos, lo que indicaría una posible menor abundancia relativa de *C. albicans*. Estimamos que necesitamos más datos para observar evidencias más claras.

Igualmente los resultados de este análisis no reflejan diferencias significativas por lo que se deben realizar otros ensayos para comprobar las alteraciones en la microbiota intestinal en niños con TEA en comparación con sus hermanos neurotípicos. Además, es importante destacar que, aunque se han identificado patrones comunes en la composición de la microbiota de niños con TEA, hay un alto nivel de variación entre individuos

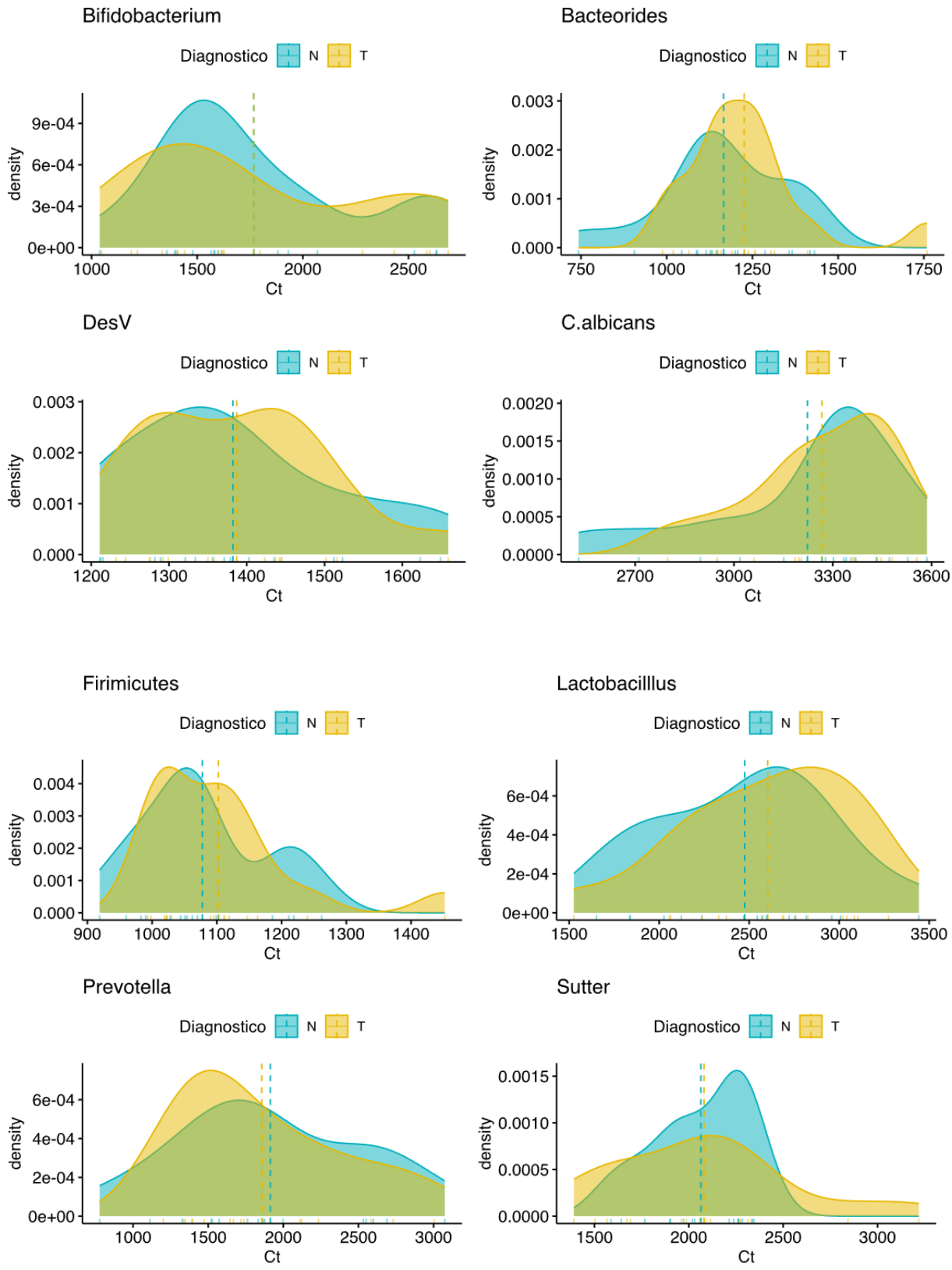


Figura 11. Curvas de densidad de los valores de Ct para distintos microorganismos en muestras de niños con TEA (T, amarillo) y hermanos neurotípicos (N, azul).

4.2 Identificación de biomarcadores intestinales

4.2.1 Secuenciación 16S por Oxford Nanopore Technologies

Para la identificación de biomarcadores de salud intestinal se realizó la secuenciación con la técnica Oxford Nanopore a partir de muestras de ADN genómico de niños con TEA y sus hermanos neurotípicos. Debido a que se utilizaron *primers* que permiten la secuenciación completa del gen de ARNr 16S, en muchos casos se logró llegar a nivel de especie alcanzando una mayor resolución taxonómica. Por este motivo se empleó la tecnología de Oxford Nanopore, un método de secuenciación de tercera generación que permite la lectura de fragmentos de ADN de mayor longitud.

Para la caracterización de la microbiota intestinal con el objetivo de comprender el papel de diferentes especies bacterianas en la causa o prevención de enfermedades, es fundamental que los métodos utilizados sean robustos (39, 42). Durante muchos años, el cultivo bacteriano fue uno de los estándares de oro para la identificación de especies bacterianas. Sin embargo, las técnicas independientes del cultivo han revolucionado el conocimiento de la microbiota intestinal, ya que pueden brindar información más representativa de la microbiota (31). Una de las técnicas más utilizadas para estudiar la diversidad microbiana es la secuenciación del gen ARNr 16S. Este gen está formado por nueve regiones hipervariables las cuales están flanqueadas por secuencias conservadas en la mayoría de las bacterias, lo que permite la amplificación de secuencias objetivo utilizando *primers* universales (42).

No obstante, la falta de estandarización en la metodología utilizada ha dado lugar en algunos casos a resultados contradictorios, con diferencias en la abundancia de algunas bacterias. Tanto el método de extracción de ADN como la elección de los *primers*, y la elección de la región variable (V) del 16S a la que se adhieren, pueden afectar el resultado experimental e introducir sesgos en la diversidad y el análisis taxonómico. En este trabajo se utilizaron los primeros universales, 27F y 1492R, que abarcan casi todo el gen ARNr 16S con el objetivo de obtener una mayor resolución taxonómica. Algunos estudios han reportado la limitación de estos *primers* para detectar algunas bacterias presentes en la muestra. Farris, M.H. y colaboradores (55) demostraron que algunas *Actinobacteria* pueden compartir una similitud de secuencia del 100% con los primeros universales, pero permanecer sin ser detectadas. Otros estudios han optimizado las secuencias de los *primers* para detectar al género *Bifidobacterium* que presenta "*mismatches*" de secuencia con el primer universal 27F (56). En la investigación

por Walker, A. et al. (55), comprobaron que el primer 27F que comúnmente abarca las regiones V1–V3, requieren modificaciones para la recuperación de *Bifidobacterias*. Este primer de inicio, utilizado en varias publicaciones, claramente tiene un sesgo en la amplificación de *Actinobacteria* y, por lo tanto, de *Bifidobacterium*, en comparación con otros géneros bacterianos. Este sesgo también se evidenció en este trabajo donde la detección de *Bifidobacterium* fue nula o muy baja en todas las muestras. Se detectaron 135 géneros bacterianos y *Bifidobacterium* no fue uno de ellos. También con los datos de secuenciación se buscaron clasificación taxonómicas más arriba como familia y orden, *Bifidobacteriaceae* y *Bifidobacteriales*, y no se detectó en ninguna de las muestras bacterias pertenecientes a estos grupos. Por lo tanto, se podría asumir que los *primers* utilizados presentan un sesgo negativo para detectar *Bifidobacterias*. Este género bacteriano tiende a estar más representado en niños neurotípicos y disminuido en niños con TEA por lo que puede ser un potencial biomarcador para el estudio de la microbiota intestinal (10, 25, 27). Estas consideraciones son importantes al momento de analizar los resultados.

El procesamiento de las muestras se realizó en el equipo GridION dentro del CiVE y los datos de secuenciación se analizaron utilizando Porefile. Porefile es una herramienta para el análisis de lecturas de 16S completas obtenidas por ONT con una base Nextflow que incluye un conjunto de software de terceros utilizado para el procesamiento y clasificación de lecturas generadas a partir de la secuenciación del gen ARNr 16S. Esta herramienta realiza el alineamiento de las lecturas contra la base de datos SILVA SSU NR9 (44) una base de datos que permite obtener secuencias de ARN ribosómico alineadas de subunidades pequeñas (16S/18S, SSU) y grandes (23S/28S, LSU) para bacterias, arqueas y eucariotas, de calidad verificada y con actualizaciones periódicamente (57).

La Figura 12 muestra un análisis discriminante lineal a efecto del tamaño (LeFSE) aplicado a especies bacterianas identificadas entre 2 grupos: niños con Trastorno del Espectro Autista (T) y sus hermanos neurotípicos (N). Este análisis permite identificar especies bacterianas enriquecidas en cada grupo, proporcionando información clave sobre los cambios en la microbiota intestinal asociados al TEA. Para la generación del LeFSE se realizó un análisis no paramétrico utilizando el test de Kruskal Wallis, una prueba que se utiliza para corroborar si existen diferencias significativas a nivel estadístico entre dos o más grupos de una variable independiente, en una variable dependiente continua.

En cuanto a las especies más abundantes en el grupo TEA, se observa un enriquecimiento significativo de diversas especies bacterianas incluyendo *Clostridium perfringens, Paeniclostridium sordelii, Parabacteroides distasonis, Peptacetobacter hiranonis, Romboutsia hominis,* entre otras.

Clostridium perfringens es una bacteria potencialmente patógena productora de toxinas que ha sido relacionada con la disbiosis intestinal en niños con TEA. Se ha postulado que la alta incidencia de esta bacteria y sus toxinas podría influir en los problemas gastrointestinales y la severidad del autismo. En la investigación por Maryam K. et al. (58), se observó un enriquecimiento de esta especie en niños con TEA en comparación con el control, e investigando dentro de los individuos con autismo, se observó una mayor abundancia en aquellos con problemas gastrointestinales. La presencia del género *Clostridium spp* se ha reportado en varios estudios en donde se observó una mayor abundancia en niños con TEA en comparación con neurotípicos. Específicamente las especies de *Clostridium boltae, Clostridium perfringens, Clostridium tetani, Clostridium glycolicum y Clostridium difficile* (59). En una investigación regional donde estudian la relación de la microbiota intestinal y el TEA, se observó un enriquecimiento de *C. glycolicum* en niños con TEA frente a niños sin diagnóstico (49). A su vez, el estudio de De Angelis et al. (60) reveló que las especies de *Clostridiaceae* están presentes a un nivel más alto en niños con TEA. Entre los grupos bacterianos primarios, las *Clostridiaceae* son capaces de sintetizar ciertos productos metabólicos que son potencialmente tóxicos para los humanos, como los fenoles, el p-cresol y ciertos derivados del indol. Estos resultados apoyan otras investigaciones de que las especies de *Clostridium* están asociadas con la sintomatología del TEA y que la capacidad de formar esporas es una de las principales preocupaciones relacionadas con la recurrencia de los síntomas del TEA. Este género bacteriano podría ser de gran relevancia para entender la relación microbiota-autismo.

Paeniclostridium sp. ha sido propuesto recientemente como un nuevo género, previamente pertenecientes al género *Clostridium* conformando el grupo cluster XI (61). Las especies como *Paeniclostridium sordellii* y *Paeniclostridium ghonii* han sido poco estudiadas y aun no se han reportado asociaciones con el autismo. Igualmente se ha visto como un potencial patógeno para los humanos con características similares a las bacterias pertenecientes al género *Clostridium* (62).

Parabacteroides distasonis es una bacteria comensal del intestino humano asociado con beneficios metabólicos, el peso y la hiperglucemia y la hiperlipidemia, que también puede convertirse en un patógeno oportunista en algunas circunstancias. Más recientemente, se ha demostrado un rol dual de *P. distasonis* en modelos murinos donde estudiaban la enfermedad inflamatoria intestinal. Se ha visto que tiene efectos tanto proinflamatorios como antiinflamatorios lo que sugiere que la patogenicidad de *P. distasonis* depende del contexto, la susceptibilidad del huésped a la supresión inmunitaria y la promoción de respuestas inflamatorias (63). Esta bacteria pertenece al filo *Bacteroidetes* y varios géneros pertenecientes a este filo, incluyendo *Parabacteroides*, se los han detectado más abundantes en muestras fecales de pacientes con TEA y asociado a la disbiosis intestinal (60, 64). En la investigación realizada por Strati F., et al. (15) también observan un enriquecimiento de esta especie en pacientes con TEA en comparación con pacientes sanos.

Según reclasificaciones filogenéticas, *Clostridium hiranonis* fue reclasificado recientemente como miembro del género *Peptacetobacter*, por lo que su actual nombre completo es *Peptacetobacter hiranonis.* Esta actualización taxonómica no cambia las características funcionales o metabólicas del organismo; en este caso, su actividad metabolizadora de ácidos biliares sigue siendo la misma que se estudió previamente bajo el nombre de *Clostridium hiranonis.* Existen pocos estudios directos que identifiquen la abundancia de *Clostridium hiranoni*s (ahora *Peptacetobacter hiranonis)* en la microbiota intestinal de niños autistas. Sin embargo, investigaciones más generales sobre la microbiota intestinal en poblaciones con TEA mencionan grupos bacterianos relacionados como microbios del género *Clostridium* o taxones relevantes involucradas en el metabolismo de ácidos biliares que sugieren un posible dismetabolismo de los mismos.

Dado los resultados obtenidos para el grupo TEA, se podría decir que el género *Clostridium* está estrechamente vinculado con la sintomatología de esta condición sobre todo con la generación de problemas gastrointestinales e inflamación. Las bacterias de este género producen esporas que juegan un papel crucial en la etiología del autismo. En particular, *Clostridium perfringens*, la especie con mayor abundancia representada en el LeFSE, es una bacteria que produce el gen de la toxina beta 2 y que se ha visto más frecuentemente en niños con TEA en comparación con sujetos de control (58, 65).

El grupo de individuos neurotípicos muestran una mayor presencia de bacterias como *Eubacterium rectale, Fusicatenibacter saccharivorans, Roseburia inulinivorans y Blautia phocaensis.*

El género *Roseburia* forma parte de las bacterias comensales de la microbiota intestinal que producen ácidos grasos de cadena corta (SCFAs), especialmente butirato, al fermentar alimentos ricos en fibra y carbohidratos complejos de digerir. Los SCFAs regulan la fisiología intestinal, la motilidad del colon y el sistema inmune a través de propiedades antiinflamatorias. También contribuyen al mantenimiento de la integridad de la barrera intestinal, reduciendo la permeabilidad intestinal y previniendo la translocación bacteriana. *R. inulinivorans* produce butirato utilizando acetato como sustrato para la conversión metabólica, y hasta el momento, sólo esta especie dentro del género *Roseburia* se ha reportado como productora de propionato, otro SCFA que presenta propiedades antiinflamatorias y contribuye en el proceso de gluconeogénesis (66, 67). El enriquecimiento de esta bacteria en los niños neurotípicos podría ser un indicador de una microbiota saludable y presenta propiedades beneficiosas que promueven la estabilización de la microflora intestinal por lo que podría servir para modular la disbiosis intestinal, y en consecuencia, disminuir los problemas gastrointestinales recurrentes en niños con TEA. Su consideración como probiótico requiere de más investigaciones para determinar su seguridad y eficacia en aplicaciones terapéuticas.

En cuanto a *Eubacterium rectale*, presenta características similares a las mencionadas previamente. Esta bacteria perteneciente al filo *Firimicutes* y género *Eubacterium*, ayuda a mantener la homeostasis de la microbiota intestinal y está asociada con la producción de butirato, un metabolito clave para la salud intestinal, ya que es una fuente de energía para los colonocitos en el intestino grueso humano. Además, se ha visto que al producir butirato previene la inflamación intestinal relacionada con el TNF alfa (68). En la investigación realizada por De Angelis et al. (60) observaron un mayor presencia de bacterias del género *Eubacterium* en niños neurotípicos en comparación con niños con TEA al igual que en los resultados presentados.

Blautia phocaeensis pertenece al género *Blautia* y son bacterias comensales en el tracto gastrointestinal humano sano que representan uno de los 10 géneros más detectados en el microbioma intestinal humano (69). Las especies de B*lautia* desempeñan un papel clave en la degradación de los carbohidratos no digeribles y se ha demostrado que algunas de ellas

producen ácidos grasos de cadena corta y péptidos antimicrobianos (70). Estudios analizando las alteraciones de la microbiota intestinal en pacientes con TEA en comparación con pacientes sin diagnóstico, observaron una mayor abundancia de *Blautia* en pacientes sin diagnóstico. Además, recientemente este género bacteriano ha despertado interés como posible probiótico por su contribución al alivio de enfermedades metabólicas, y por su actividad antimicrobiana contra microorganismos específicos (53, 70).

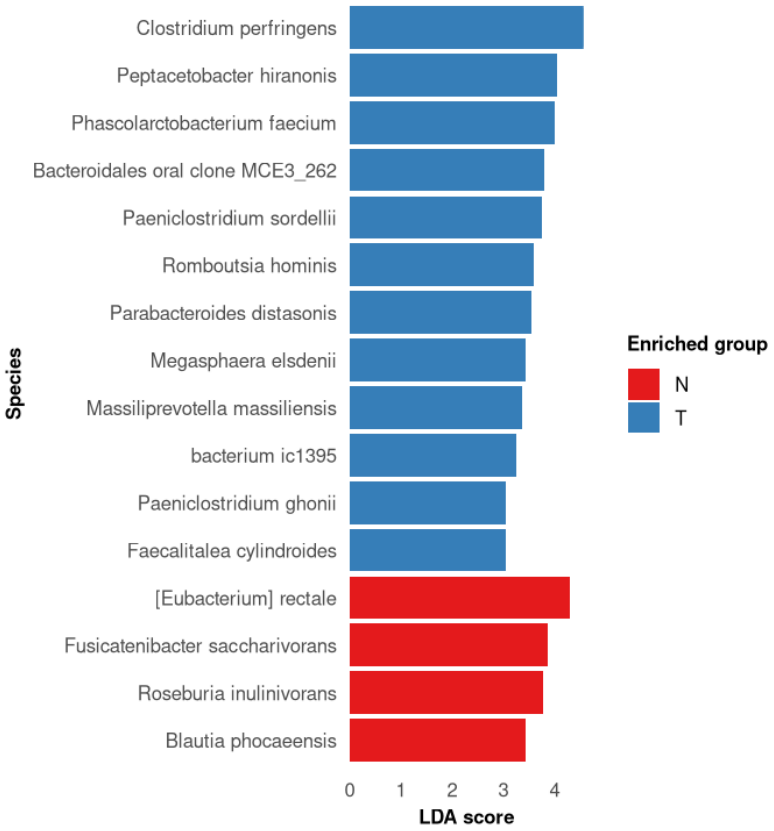


Figura 12. LeFSe (Linear Discriminant Analysis Effect Size) basado en la prueba Kruskal Wallis para la identificación de bacterias que difieren en abundancia entre TEA y NT. Gráfico realizado en R, en el eje vertical las especies bacterianas y en el eje horizontal el LDA "score".

Debido a que *Clostridium perfringens* ha sido reportado en otros estudios como una bacteria diferencial entre TEA y NT, se propuso evaluar específicamente esta especie en las muestras de materia fecal de nuestra cohorte uruguaya para comprobar si mediante *qPCR* logramos detectar estas diferencias entre grupos de estudio. Para esto es necesario diseñar y mandar a sintetizar *primers* contra esta bacteria. Los mismos se diseñaron usando la plataforma BV-BRC Primer Design Service (Tabla 5). Además, como los *primers* contra *Clostridium*

difficile que iban a ser utilizados para los ensayos de *qPCR* no mostraron amplificación, y, se dejaron de utilizar en el resto de la investigación, es de gran utilidad diseñar *primers* propios contra esta especie o género bacteriano que en bibliografía ha demostrado ser un posible biomarcador y estar involucrado con la sintomatología del TEA. Los *primers* diseñados fueron testeados mediante PCR *in silico*, una simulación computacional que permite predecir la amplificación de ADN usando *primers* específicos, previo a realizar el experimento. De manera de comprobar su especificidad contra el genoma de *Clostridium perfringens*, los mismos fueron evaluados contra diferentes genomas bacterianos. Se utilizó como estándar el conjunto de secuencias del gen de ARNr 16S de todas las bacterias presentes en la mock de ZymoBIOMICS Gut Microbiome para seleccionar el cóctel bacteriano (Tabla 6). El conjunto de *primers* no mostró hibridación contra ninguna de las bacterias testeadas, lo que sugiere especificidad contra la bacteria objetivo.

Por otro lado, otra especie que nos pareció de interés fue *Roseburia inulinivorans* un género bacteriano reconocido por su capacidad para fermentar alimentos difíciles de digerir produciendo SCFAs, especialmente butirato y propionato, compuestos esenciales para el mantenimiento de una microbiota saludable. Se siguió el mismo procedimiento detallado previamente, los *primers* se encuentran detallados en el Tabla 5. Mediante la PCR *in silico* se verificó la eficiencia de los *primers* al levantar únicamente la especie de interés.

Tabla 5. *Primers* diseñados contra biomarcadores intestinales de interés.

Sequence (5'-3')	**Amplicon (pb)**	**Target**	**Referencia**
ClosP.F-gccagacagttcttctgagaa ClosP.R-tggttctttgtccatgtagca	~110	*Clostridium perfringens*	Este estudio
RosbI.F-gtcacgcctatcctagctt RosbI.R-cggcggaggtgttaatagta	~250	*Roseburia inulinivorans*	Este estudio

Tabla 6. "Cóctel" bacteriano presentes en ZymoBIOMICS Gut Microbiome evaluados frente a los *primers* diseñados.

NCBI Reference Sequence	**Microorganismo**	**Amplifica**
NR_028961.1	*Faecalibacterium prausnitzii*	No
NR_044091.1	*Veillonella rogosae*	No
NR_042008.1	*Roseburia hominis*	No
NR_074784.2	*Bacteroides fragilis*	No
NR_044627.1	*Prevotella corporis*	No
NR_074412.1	*Fusobacterium nucleatum*	No
NR_104927.1	*Limosilactobacillus fermentum (Lactobacillus fermentum)*	No
NR_112172.1	*Clostridioides difficile*	No
NR_042817.1	*Akkermansia muciniphila*	No
NR_044786.1	*Methanobrevibacter smithii*	No
NR_041696.1	*Salmonella enterica*	No
NR_040789.1	*Enterococcus faecalis*	No
NR_024570.1	*Escherichia coli*	No
NG_070791.1	*Candida albicans*	No
NG_063315.1	*Saccharomyces cerevisiae*	No

4.3 Cultivo anaeróbico

4.3.1 Bacterias aisladas en los medios de cultivo

Como se mencionó previamente, se utilizaron tres medios de cultivo distintos aprovechando las necesidades metabólicas de las bacterias para el aislamiento de microorganismos específicos a partir de muestras de materia fecal: medio de extracto de levadura, casitona y ácido graso (YCFA), medio selectivo *Bifidobacterium* (BSM) y medio selectivo de *Campylobacter* (CCDA).

El medio YCFA es un medio enriquecido y no selectivo diseñado para el aislamiento y cultivo de diversas bacterias anaerobias intestinales. Sus componentes incluyen: extracto de levadura, digerido pancreático de caseína, azúcares, antioxidantes, vitaminas y ácidos grasos específicos para favorecer el desarrollo de microorganismos intestinales con altas exigencias nutricionales (71). Se observó un alto número de colonias y las mismas eran de color blanco mayoritariamente, aunque algunas presentaban un color más amarillo o anaranjado.

Con la finalidad de crecer otros géneros bacterianos, como *Bifidobacterium* y *Campylobacter*, se utilizaron los otros dos medios de cultivo con componentes nutricionales distintos. El medio BSM contiene triptona, peptona y el extracto de levadura y de carne que aportan nutrientes esenciales para el crecimiento. También contiene polisorbato que aporta los ácidos grasos necesarios para la actividad metabólica de las bifidobacterias (72). El CCDA se compone de triptona y extracto de carne que aportan azúcares, ácidos grasos, carbohidratos y vitaminas, carbón activado el cual le da el caracteristico color negro, desoxicolato de sodio el cual inhibe el crecimiento de otros microorganismos, entre otros (73). El número de colonias formadas en estos medios fue mucho menor en comparación con el YCFA. Para el caso de las placas con BSM se observaron colonias amarillas algunas más oscuras que otras, de forma redondeada con superficies lisas. Mientras que para las placas crecidas en CCDA se observó un número aún menor de colonias en comparación con los otros dos medios de cultivo utilizados. Las colonias presentaban una morfología similar a las observadas en los otros dos medios de cultivo. Presentaban una forma redondeada, color grisáceo y superficie lisa. En la Tabla 7 podemos ver el resumen de los medios de cultivo utilizados para cada muestra cultivada.

Tabla 7. Medio de cultivo utilizado en cada muestra.

Muestra	ID	Medio de cultivo
1	N07	YCFA
2	N20	YCFA
3	N22 A	YCFA
4	N22 B	YCFA
5	N14	YCFA

6	N25	YCFA
7	N33	YCFA
8	T29	YCFA
9	N11	YCFA
10	N11	CCDA
11	N33	CCDA
12	N33	BSM
13	N11	BSM
14	T33	YCFA

4.3.2 Identificación molecular de bacterias aisladas por métodos dependientes de cultivo

Con el objetivo de identificar los microorganismos aislados de las muestras fecales de los pacientes con TEA y neurotípicos se enviaron las muestras a secuenciar a Macrogen Inc. mediante la tecnología Sanger. La secuenciación de Sanger es una técnica de secuenciación de ADN ampliamente utilizada para la identificación de microorganismos individuales.

Como resultado de la secuenciación, la compañía envía un cromatograma y la secuencia correspondiente de muestra (Figura 13). El cromatograma generado proporciona una representación visual de la secuencia de nucleótidos de la muestra de ADN. Cada pico de color representa una base nitrogenada específica: Verde: Adenina (A), Azul : Citosina (C), Negro: Guanina (G) y Rojo: Timina (T). Este análisis es importante para evaluar la calidad de la secuencia obtenida y detectar posibles contaminaciones o mezclas de ADN en la muestra. Esto se detecta observando la definición de los picos en el cromatograma lo cual puede afectar la interpretación de la secuencia.

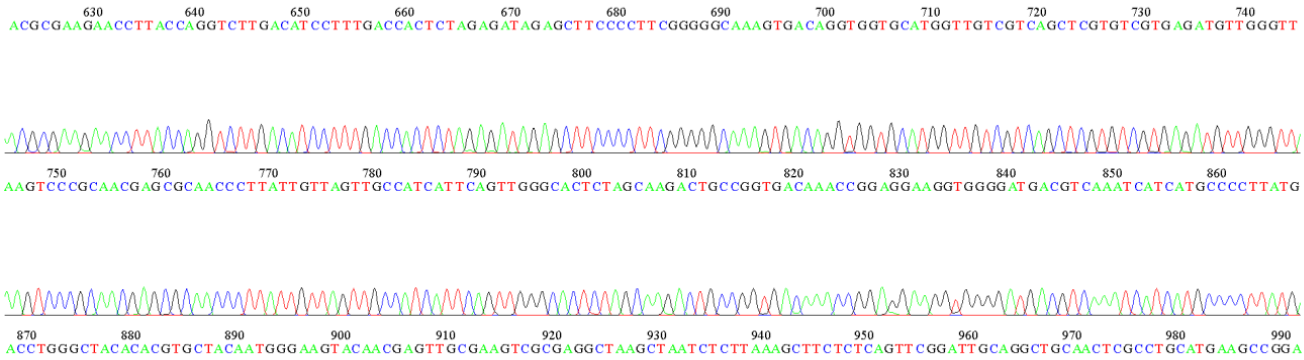


Figura 13. Cromatograma obtenido mediante secuenciación de Sanger de la muestra 2.

Una vez analizada la calidad del cromatograma, para la identificación de especies bacterianas se comparó la secuencia obtenida con la base de datos NCBI BLAST. El largo de la secuencia depende de la calidad del cromatograma pero generalmente en todas las muestras, las primeras 30 bases suelen ser de menor calidad debido a la cercanía con el *primer*, y sobre el final, el ruido de fondo puede aumentar por lo que también se removieron algunas bases del final. En la Tabla 8 se detallan las bacterias identificadas en NCBI BLAST especificando el largo de la lectura utilizado para la búsqueda, el valor esperado (E-value), que indica la probabilidad de encontrar una alineación similar por azar, y, el porcentaje de identidad, una medida de similitud entre la secuencia introducida y secuencias de la base de datos.

Tabla 8. Clasificación de muestras secuenciadas mediante Sanger.

Muestra	**Query length**	**Microorganismo**	**E-value**	**% Identidad**
1	871	*Enterococcus lactis*	0	99.66
2	871	*Enterococcus faecium*	0	99.99
3	301	*Halomonas lutescens*	1E-105	90.70
4	351	*Enterococcus hirae*	8e-122	94.50
5	751	*Enterococcus durans*	0	96.94
6	751	*Enterococcus hulanensis*	0	99.19
7	501	*Enterococcus lactis*	0	99.40
8	711	*Escherichia fergusonii*	0	99.20

9	731	*Escherichia coli*	0	99.32
10	751	*Escherichia coli*	0	99.13
11	731	*Escherichia coli*	0	100
12	311	*Shigella flexneri*	0	97.43
13	711	*Enterococcus faecium*	0	99.73
14	761	*Shigella flexneri*	0	99.97

Como se observa, se encontró una mayor proporción de bacterias pertenecientes a la clase *Bacilli*, orden *Lactobacillales* y familia *Enterococcacea*. *Enterococcaceae* es una familia de bacterias Gram-positivas, anaerobias facultativas que se encuentran comúnmente en el tracto gastrointestinal de humanos y animales. Forman parte de los microorganismos comensales y desempeñan un papel en la fermentación de carbohidratos y la producción de ácido láctico. También tienen la capacidad de modular las respuestas inmunitarias del huésped, promoviendo la función de la barrera epitelial y mediante la prevención de la colonización e invasión de patógenos intestinales (74). Sin embargo, pueden convertirse en patógenos y causar infecciones frente a un desequilibrio de la microbiota intestinal. Además, a lo largo de los años algunas cepas han adquirido resistencia a múltiples antibióticos. Igualmente las infecciones producidas por especies de enterococo son poco frecuentes y, generalmente, son debidas a cepas que no presentan multirresistencia (75).

Dentro de esta familia, el género predominante es *Enterococcus*, bacterias comensales del intestino humano, aunque en menor proporción en comparación con otros grupos como *Bacteroides* o *Actinobacteria*. Sin embargo, en un medio de cultivo pueden superar en crecimiento a otras bacterias más exigentes que dependen de nutrientes o condiciones específicas. Las bacterias del género *Enterococcus* presentan adaptabilidad a diversas condiciones ambientales, incluyendo su capacidad para crecer en un amplio rango de temperaturas y condiciones adversas (76). Se pueden observar diferentes especies: *Enterococcus faecium, Enterococcus durans, Enterococcus hirae, Enterococcus hulanensis, y Enterococcus lactis.*

Por otro lado, se observa una alta proporción de bacterias pertenecientes al filo *Proteobacteria*, filo que también predomina en la microbiota intestinal en humanos. Dentro de

éste filo, la clase *Gammaproteobacteria*, orden *Enterobacteriales* y familia *Enterobacteriaceae* predominan. La familia *Enterobacteriaceae* está conformada por bacterias didermas, según la nueva terminología, anaerobios facultativos, no exigentes en cuanto a nutrientes lo cual les permite crecer con facilidad en medios de cultivo simples. Pueden ser beneficiosas como parte de la microbiota intestinal, pero también transformarse en patógenas y causar infecciones (77). Algunos de los géneros más comunes dentro de esta familia son: *Escherichia, Salmonella, Shigella y Klebsiella.* Como se observa, se logró aislar bacterias pertenecientes al género *Escherichia* y *Shigella.* Dentro del primer género se identificaron 2 especies: mayoritariamente *Escherichia coli*, y en una muestra *Escherichia fergusonii. Escherichia coli,* una de las bacterias más estudiadas y comunes en la microbiota intestinal humana. Es una de las primeras bacterias en colonizar la microbiota y contribuye a la producción de metabolitos al fermentar glucosa y otros azúcares. Sin embargo, se la ha vinculado a enfermedades como **s**índrome de intestino irritable debido a que algunas cepas pueden ser proinflamatorios y contribuir a la disbiosis intestinal (78, 79). A la vez, algunas investigaciones indican que ciertas cepas de *E. coli* pueden tener efectos beneficiosos en la salud humana cuando se utilizan como probióticos, contribuyendo a la modulación del sistema inmune. Se ha reportado que su presencia estimula la producción de péptidos antimicrobianos claves para la protección de la barrera intestinal (80).

E. fergusoniis es menos prevalente en la microbiota intestinal humana en comparación con *E. coli* y su presencia ha sido asociada con diversas infecciones incluyendo diarrea, infecciones del tracto urinario (81) y hasta se la ha vinculado con enfermedades neurológicas como depresión (82). En cuanto al género *Shigella,* únicamente se identificó la especie *Shigella flexneri* una bacteria que causa una infección intestinal caracterizada por diarrea, fiebre y dolor abdominal. Esta bacteria invade las células epiteliales del colon, lo que provoca inflamación y lastima la mucosa intestinal facilitando la translocación bacteriana y aumentando la inflamación. En el estudio por Yang, et al. (83), observaron que la infección por *S. flexneri* en ratones puede influir en la diversidad de la microbiota intestinal, como la disminución de la abundancia de bacterias probióticas como *Lactobacillus* y el aumento de la abundancia de bacterias de la familia *Prevotellaceae*.

Dentro de la clase *Gammaproteobacteria,* también se encuentra *Halomonas lutescens.* Esta bacteria pertenece al filo *Pseudomonadota* y género *Halomonas.* Son bacterias didermas, anaeróbicas facultativas y halófilas, es decir, que son capaces de crecer a altas concentraciones

de sal. El aislamiento de *Halomonas lutescens* en una muestra de microbiota humana es inusual, ya que en otros estudios fue aislada de sedimentos acuáticos por lo que podría ser resultado de una contaminación ambiental (84). Sin embargo, también podría indicar una adaptación de esta bacteria al ambiente microbiano humano. Se deberían realizar estudios adicionales para determinar el papel y la relevancia de *Halomonas lutescens* en la microbiota humana.

No se logró crecer ni aislar bacterias del género *Bifidobacterium y Campylobacter* como se buscaba con los medios BSM y CCDA. Esto se puede explicar porque hubo un sobrecrecimiento de bacterias más adaptables, como bacterias del género *Enterococcus* y Escherichia, las cuales pudieron haber inhibido el crecimiento de *Bifidobacterium* y *Campylobacter*. Para aislar las bacterias de interés, se podrían utilizar agentes selectivos que inhiben competidores sin afectar a las bacterias deseadas. A su vez, éstas bacterias podrían encontrarse en baja proporción en las muestras por lo que es posible que no hayan podido desarrollarse.

Por último, cada muestra secuenciada a su vez fue almacenada en glicerol para la creación de un biobanco de cepas bacterianas identificadas con el objetivo de estudiar de forma individual las bacterias que potencial interés para la generación de curvas de calibración para normalizar los datos de *qPCR*. A futuro, para obtener una mayor diversidad microbiana se podrían modificar algunas condiciones del medio de cultivo, como el pH, o emplear antibióticos de manera de generar un medio selectivo para cepas de interés e inhibir el crecimiento de otras.

5. Conclusiones

Recientemente se ha demostrado el papel crucial de la microbiota intestinal en las funciones del sistema nervioso central, neuroendocrino y neuroinmune. El sistema de comunicación bidireccional entre el intestino y el cerebro, conocido como eje intestino-cerebro, es capaz de influir en el estado de ánimo y funciones neurocognitivas. La modulación de la microbiota es fundamental para influir en los síntomas o progresión de trastornos neurológicos.

La detección de biomarcadores de salud intestinal es una estrategia emergente para estudiar la composición de la microbiota. La reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) con *primers* específicos que apuntan a géneros o filo bacterianos, es una técnica altamente sensible y rápida que permite la detección y cuantificación de biomarcadores. Los resultados obtenidos sugieren la presencia de alteraciones en la microbiota intestinal en niños con TEA, sin embargo, no fue posible cuantificar por *qPCR* diferencias significativas frente a los hermanos sin diagnóstico para los *primers* utilizados.

La caracterización de la microbiota intestinal de niños con TEA y sus hermanos neurotípicos mediante la tecnología de Oxford Nanopore permitió identificar posibles biomarcadores vinculados con el autismo. Algunas especies bacterianas detectadas coinciden con investigaciones anteriores. La identificación de bacterias intestinales específicas tiene un gran potencial para utilizarse en el diagnóstico o tratamiento del TEA. A su vez, permitió el diseño de *primers* propios contra bacterias de interés y su especificidad fue demostrada mediante PCR *in silico*. A futuro, esperamos utilizar estos *primers* diseñados en este estudio en las muestras recolectadas para evaluar las diferencias basados en los resultados de ONT para esta cohorte.

A partir de las técnicas dependientes de cultivo, se identificaron bacterias intestinales en diferentes medios de cultivo. A futuro se podría probar otros medios o suplementos para obtener una mayor diversidad microbiana.

A diferencia de los estudios de secuenciación 16S, que han dominado la literatura sobre la microbiota y el TEA, la secuenciación mediante metagenómica *shotgun* podría proporcionar una visión más completa, ya que permite la secuenciación de múltiples especies microbianas presentes en una muestra compleja, como lo son las muestras de materia fecal, ofreciendo un

análisis más profundo de la diversidad microbiana. Además, permite la identificación de vías metabólicas por lo que provee información funcional de la comunidad microbiana identificada. A futuro, se podrían implementar estudios de metagenómica *shotgun* para validar estos hallazgos y comprender mejor la relación entre la microbiota intestinal y el TEA. El estudio de la metabolómica y transcriptómica, podría brindar información valiosa sobre la interacción entre los microorganismos y el huésped a nivel funcional, al igual que información sobre las vías metabólicas involucradas. La integración de estos enfoques podría brindar un análisis más completo.

A modo de conclusión, en las muestras analizadas hasta el momento no existe un perfil distintivo único de la composición de la microbiota en pacientes con TEA frente a neurotípicos, ya que la misma está influenciada por múltiples factores como la geografía, dieta, cultura, genética, entre otros. Sin embargo, para desarrollar nuevas herramientas clínicas es necesario comprender mejor la composición y función de los componentes del microbioma.

6. Bibliografía

(1) Lord C, Elsabbagh M, Baird G, Veenstra-Vanderweele J. Autism spectrum disorder. The Lancet. 2018;392(10146):508–520. doi:10.1016/S0140-6736(18)31129-2

(2) Lord C, Brugha TS, Charman T, Cusack J, Dumas G, Frazier T, Jones EJH, Jones RM, Pickles A, State MW, et al. Autism spectrum disorder. Nature Reviews Disease Primers. 2020;6(1):1–23. doi:10.1038/s41572-019-0138-4

(3) Mesibov GB, Adams LW, Schopler E. Autism: A Brief History. Psychoanalytic Inquiry. 2000;20(5):637–647. doi:10.1080/07351692009348913

(4) De Angelis M, Piccolo M, Vannini L, Siragusa S, De Giacomo A, Serrazzanetti DI, Cristofori F, Guerzoni ME, Gobbetti M, Francavilla R. Fecal microbiota and metabolome of children with autism and pervasive developmental disorder not otherwise specified. PloS One. 2013;8(10):e76993. doi:10.1371/journal.pone.0076993

(5) Lemay MS, Rieske RD, Farmer LT. Treatments for Autism Spectrum Disorders. In: Matson JL, editor. Handbook of Childhood Psychopathology and Developmental Disabilities Treatment. Cham: Springer International Publishing; 2017. p. 137–157. https://doi.org/10.1007/978-3-319-71210-9_9. doi:10.1007/978-3-319-71210-9_9

(6) Yap CX, Henders AK, Alvares GA, Wood DLA, Krause L, Tyson GW, Restuadi R, Wallace L, McLaren T, Hansell NK, et al. Autism-related dietary preferences mediate autism-gut microbiome associations. Cell. 2021;184(24):5916-5931.e17. doi:10.1016/j.cell.2021.10.015

(7) Herbert MR, Buckley JA. Autism and dietary therapy: case report and review of the literature. Journal of Child Neurology. 2013;28(8):975–982. doi:10.1177/0883073813488668

(8) Di Maio S, Mereta F. Microbiota. The invisible friend of good health al all ages. Gribaudo - IF - Idee editoriali Feltrinelli srl; 2020.

(9) Cai J, Sun L, Gonzalez FJ. Gut microbiota-derived bile acids in intestinal immunity, inflammation, and tumorigenesis. Cell Host & Microbe. 2022;30(3):289–300. doi:10.1016/j.chom.2022.02.004

(10) Al-Ayadhi L, Zayed N, Bhat RS, Moubayed NMS, Al-Muammar MN, El-Ansary A. The use of biomarkers associated with leaky gut as a diagnostic tool for early intervention in autism spectrum disorder: a systematic review. Gut Pathogens. 2021;13(1):54. doi:10.1186/s13099-021-00448-y

(11) De Sales-Millán A, Reyes-Ferreira P, Aguirre-Garrido JF, Corral-Guillé I, Barrientos-Ríos R, Velázquez-Aragón JA. Comprehensive Analysis of Gut Microbiota Composition and Functional Metabolism in Children with Autism Spectrum Disorder and Neurotypical Children: Implications for Sex-Based Differences and Metabolic Dysregulation. International Journal of Molecular Sciences. 2024;25(12):6701. doi:10.3390/ijms25126701

(12) Rosenberg E. Microbiomes. Current Knowledge and Unanswered Questions. Springer; 2021.

(13) Vandenplas Y, Carnielli VP, Ksiazyk J, Luna MS, Migacheva N, Mosselmans JM, Picaud JC, Possner M, Singhal A, Wabitsch M. Factors affecting early-life intestinal microbiota development. Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.). 2020;78:110812. doi:10.1016/j.nut.2020.110812

(14) Fackelmann G, Manghi P, Carlino N, Heidrich V, Piccinno G, Ricci L, Piperni E, Arrè A, Bakker E, Creedon AC, et al. Gut microbiome signatures of vegan, vegetarian and omnivore diets and associated health outcomes across 21,561 individuals. Nature Microbiology. 2025;10(1):41–52. doi:10.1038/s41564-024-01870-z

(15) Strati F, Cavalieri D, Albanese D, De Felice C, Donati C, Hayek J, Jousson O, Leoncini S, Renzi D, Calabrò A, et al. New evidences on the altered gut microbiota in autism spectrum disorders. Microbiome. 2017;5(1):24. doi:10.1186/s40168-017-0242-1

(16) Tomova A, Husarova V, Lakatosova S, Bakos J, Vlkova B, Babinska K, Ostatnikova D. Gastrointestinal microbiota in children with autism in Slovakia. Physiology & Behavior. 2015;138:179–187. doi:10.1016/j.physbeh.2014.10.033

(17) Fouquier J, Moreno Huizar N, Donnelly J, Glickman C, Kang D-W, Maldonado J, Jones RA, Johnson K, Adams JB, Krajmalnik-Brown R, et al. The Gut Microbiome in Autism: Study-Site Effects and Longitudinal Analysis of Behavior Change. mSystems. 2021;6(2):10.1128/msystems.00848-20. doi:10.1128/msystems.00848-20

(18) Krajmalnik-Brown R, Lozupone C, Kang D-W, Adams JB. Gut bacteria in children with autism spectrum disorders: challenges and promise of studying how a complex community influences a complex disease. Microbial Ecology in Health and Disease. 2015;26(1):26914. doi:10.3402/mehd.v26.26914

(19) García Peñas JJ. Trastornos del espectro autista y epilepsia: el papel de la dieta cetogénica. Revista de Neurología. 2016;62(S01):73. doi:10.33588/rn.62S01.2015525

(20) Evangeliou A, Vlachonikolis I, Mihailidou H, Spilioti M, Skarpalezou A, Makaronas N, Prokopiou A, Christodoulou P, Liapi-Adamidou G, Helidonis E, et al. Application of a ketogenic diet in children with autistic behavior: pilot study. Journal of Child Neurology. 2003;18(2):113–118. doi:10.1177/08830738030180020501

(21) Yang Y, Tian J, Yang B. Targeting gut microbiome: A novel and potential therapy for autism. Life Sciences. 2018;194:111–119. doi:10.1016/j.lfs.2017.12.027

(22) Mazzone L, Dooling SW, Volpe E, Uljarević M, Waters JL, Sabatini A, Arturi L, Abate R, Riccioni A, Siracusano M, et al. Precision microbial intervention improves social behavior but not autism severity: A pilot double-blind randomized placebo-controlled trial. Cell Host & Microbe. 2024;32(1):106-116.e6. doi:10.1016/j.chom.2023.11.021

(23) Sgritta M, Dooling SW, Buffington SA, Momin EN, Francis MB, Britton RA, Costa-Mattioli M. Mechanisms Underlying Microbial-Mediated Changes in Social Behavior in Mouse Models of Autism Spectrum Disorder. Neuron. 2019;101(2):246-259.e6. doi:10.1016/j.neuron.2018.11.018

(24) Shaaban SY, El Gendy YG, Mehanna NS, El-Senousy WM, El-Feki HSA, Saad K, El-Asheer OM. The role of probiotics in children with autism spectrum disorder: A prospective, open-label study. Nutritional Neuroscience. 2018;21(9):676–681. doi:10.1080/1028415X.2017.1347746

(25) Li N, Chen H, Cheng Y, Xu F, Ruan G, Ying S, Tang W, Chen L, Chen M, Lv L, et al. Fecal Microbiota Transplantation Relieves Gastrointestinal and Autism Symptoms by Improving the Gut Microbiota in an Open-Label Study. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. 2021 (accessed 2025 Mar 7);11. https://www.frontiersin.org/journals/cellular-and-infection-microbiology/articles/10.3389/fcimb.2021.759435/full. doi:10.3389/fcimb.2021.759435

(26) Wang S, Xu M, Wang W, Cao X, Piao M, Khan S, Yan F, Cao H, Wang B. Systematic Review: Adverse Events of Fecal Microbiota Transplantation. PLOS ONE. 2016;11(8):e0161174. doi:10.1371/journal.pone.0161174

(27) Frye RE, Vassall S, Kaur G, Lewis C, Karim M, Rossignol D. Emerging biomarkers in autism spectrum disorder: a systematic review. Annals of Translational Medicine. 2019;7(23):792. doi:10.21037/atm.2019.11.53

(28) Li N, Yang J, Zhang J, Liang C, Wang Y, Chen B, Zhao C, Wang J, Zhang G, Zhao D, et al. Correlation of Gut Microbiome Between ASD Children and Mothers and Potential Biomarkers for Risk Assessment. Genomics, Proteomics & Bioinformatics. 2019;17(1):26–38. doi:10.1016/j.gpb.2019.01.002

(29) Zhao Y, Wang Y, Meng F, Chen X, Chang T, Huang H, He F, Zheng Y. Altered Gut Microbiota as Potential Biomarkers for Autism Spectrum Disorder in Early Childhood. Neuroscience. 2023;523:118–131. doi:10.1016/j.neuroscience.2023.04.029

(30) De Angelis M, Piccolo M, Vannini L, Siragusa S, De Giacomo A, Serrazzanetti DI, Cristofori F, Guerzoni ME, Gobbetti M, Francavilla R. Fecal microbiota and metabolome of children with autism and pervasive developmental disorder not otherwise specified. PloS One. 2013;8(10):e76993. doi:10.1371/journal.pone.0076993

(31) Fraher MH, O'Toole PW, Quigley EMM. Techniques used to characterize the gut microbiota: a guide for the clinician. Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology. 2012;9(6):312–322. doi:10.1038/nrgastro.2012.44

(32) Sivamaruthi BS, Suganthy N, Kesika P, Chaiyasut C. The Role of Microbiome, Dietary Supplements, and Probiotics in Autism Spectrum Disorder. International Journal of Environmental Research and Public Health. 2020;17(8):2647. doi:10.3390/ijerph17082647

(33) Jalali M, Zaborowska J, Jalali M. Chapter 1 - The Polymerase Chain Reaction: PCR, qPCR, and RT-PCR. In: Jalali M, Saldanha FYL, Jalali M, editors. Basic Science Methods for Clinical Researchers. Boston: Academic Press; 2017. p. 1–18. https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128030776000011. doi:10.1016/B978-0-12-803077-6.00001-1

(34) Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. Bio/Technology (Nature Publishing Company). 1993;11(9):1026–1030. doi:10.1038/nbt0993-1026

(35) Adams G. A beginner's guide to RT-PCR, qPCR and RT-qPCR. The Biochemist. 2020;42(3):48–53. doi:10.1042/BIO20200034

(36) Kai S, Matsuo Y, Nakagawa S, Kryukov K, Matsukawa S, Tanaka H, Iwai T, Imanishi T, Hirota K. Rapid bacterial identification by direct PCR amplification of 16S rRNA genes using the MinION™ nanopore sequencer. FEBS Open Bio. 2019;9(3):548–557. doi:10.1002/2211-5463.12590

(37) Katiraei S, Anvar Y, Hoving L, Berbée JFP, van Harmelen V, Willems van Dijk K. Evaluation of Full-Length Versus V4-Region 16S rRNA Sequencing for Phylogenetic Analysis of Mouse Intestinal Microbiota After a Dietary Intervention. Current Microbiology. 2022;79(9):276. doi:10.1007/s00284-022-02956-9

(38) Muhamad Rizal NS, Neoh H, Ramli R, A/L K Periyasamy P@ R, Hanafiah A, Abdul Samat MN, Tan TL, Wong KK, Nathan S, Chieng S, et al. Advantages and Limitations of

16S rRNA Next-Generation Sequencing for Pathogen Identification in the Diagnostic Microbiology Laboratory: Perspectives from a Middle-Income Country. Diagnostics. 2020;10(10):816. doi:10.3390/diagnostics10100816

(39) (PDF) Comparison of 16S rRNA Gene Based Microbial Profiling Using Five Next-Generation Sequencers and Various Primers. ResearchGate. 2024 Oct 22 (accessed 2025 Mar 6). https://www.researchgate.net/publication/355207047_Comparison_of_16S_rRNA_Gene_Based_Microbial_Profiling_Using_Five_Next-Generation_Sequencers_and_Various_Primers. doi:10.3389/fmicb.2021.715500

(40) Ahmed SA, Elhefnawy AM, Azouz HG, Roshdy YS, Ashry MH, Ibrahim AE, Meheissen MA. Study of the gut Microbiome Profile in Children with Autism Spectrum Disorder: a Single Tertiary Hospital Experience. Journal of molecular neuroscience: MN. 2020;70(6):887–896. doi:10.1007/s12031-020-01500-3

(41) Zhang J, Hung G-C, Nagamine K, Li B, Tsai S, Lo S-C. Development of Candida-Specific Real-Time PCR Assays for the Detection and Identification of Eight Medically Important Candida Species. Microbiology Insights. 2016;9:21–28. doi:10.4137/MBI.S38517

(42) Chakravorty S, Helb D, Burday M, Connell N, Alland D. A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. Journal of microbiological methods. 2007;69(2):330–339. doi:10.1016/j.mimet.2007.02.005

(43) Lane DJ. Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics. 16S/23S rRNA Sequencing. E. Stackebrandt and M. Goodfellow. John Wiley & Sons, Ltd; 1991. https://www.scirp.org/reference/referencespapers?referenceid=1870033

(44) microgenlab/porefile. 2024 (accessed 2025 Mar 5). https://github.com/microgenlab/porefile

(45) McMurdie PJ, Holmes S. phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data Watson M, editor. PLoS ONE. 2013;8(4):e61217. doi:10.1371/journal.pone.0061217

(46) Primer Design Service | BV-BRC. (accessed 2025 Mar 19). https://www.bv-brc.org/docs/quick_references/services/primer_design_service.html

(47) in silico PCR tool. (accessed 2025 Mar 19). https://primerdigital.com/tools/epcr.html

(48) Yuan JS, Reed A, Chen F, Stewart CN. Statistical analysis of real-time PCR data. BMC Bioinformatics. 2006;7(1):85. doi:10.1186/1471-2105-7-85

(49) Mendive Dubourdieu P, Guerendiain M. Understanding the link between gut microbiota, dietary intake, and nutritional status in children with autism and typical development. Frontiers in Nutrition. 2023 (accessed 2025 Mar 26);10. https://www.frontiersin.org/journals/nutrition/articles/10.3389/fnut.2023.1202948/full. doi:10.3389/fnut.2023.1202948

(50) Precup G, Vodnar D-C. Gut Prevotella as a possible biomarker of diet and its eubiotic versus dysbiotic roles: a comprehensive literature review. The British Journal of Nutrition. 2019;122(2):131–140. doi:10.1017/S0007114519000680

(51) Wang L, Christophersen CT, Sorich MJ, Gerber JP, Angley MT, Conlon MA. Increased abundance of Sutterella spp. and Ruminococcus torques in feces of children with

autism spectrum disorder. Molecular Autism. 2013;4(1):42. doi:10.1186/2040-2392-4-42

(52) Finegold SM, Dowd SE, Gontcharova V, Liu C, Henley KE, Wolcott RD, Youn E, Summanen PH, Granpeesheh D, Dixon D, et al. Pyrosequencing study of fecal microflora of autistic and control children. Anaerobe. 2010;16(4):444–453. doi:10.1016/j.anaerobe.2010.06.008

(53) Liu F, Li J, Wu F, Zheng H, Peng Q, Zhou H. Altered composition and function of intestinal microbiota in autism spectrum disorders: a systematic review. Translational Psychiatry. 2019;9(1):43. doi:10.1038/s41398-019-0389-6

(54) Gerritsen J, Smidt H, Rijkers GT, de Vos WM. Intestinal microbiota in human health and disease: the impact of probiotics. Genes & Nutrition. 2011;6(3):209–240. doi:10.1007/s12263-011-0229-7

(55) Farris MH, Olson JB. Detection of Actinobacteria cultivated from environmental samples reveals bias in universal primers. Letters in Applied Microbiology. 2007;45(4):376–381. doi:10.1111/j.1472-765X.2007.02198.x

(56) Hill JE, Fernando WMU, Zello GA, Tyler RT, Dahl WJ, Van Kessel AG. Improvement of the representation of bifidobacteria in fecal microbiota metagenomic libraries by application of the cpn60 universal primer cocktail. Applied and Environmental Microbiology. 2010;76(13):4550–4552. doi:10.1128/AEM.01510-09

(57) Silva. (accessed 2025 Mar 5). https://www.arb-silva.de/

(58) Alshammari MK, AlKhulaifi MM, Al Farraj DA, Somily AM, Albarrag AM. Incidence of *Clostridium perfringens* and its toxin genes in the gut of children with autism spectrum disorder. Anaerobe. 2020;61:102114. doi:10.1016/j.anaerobe.2019.102114

(59) Kandeel WA, Meguid NA, Bjørklund G, Eid EM, Farid M, Mohamed SK, Wakeel KE, Chirumbolo S, Elsaeid A, Hammad DY. Impact of Clostridium Bacteria in Children with Autism Spectrum Disorder and Their Anthropometric Measurements. Journal of Molecular Neuroscience. 2020;70(6):897–907. doi:10.1007/s12031-020-01482-2

(60) De Angelis M, Francavilla R, Piccolo M, De Giacomo A, Gobbetti M. Autism spectrum disorders and intestinal microbiota. Gut Microbes. 2015;6(3):207–213. doi:10.1080/19490976.2015.1035855

(61) Kim JY, Kim YB, Song HS, Chung W-H, Lee C, Ahn SW, Lee SH, Jung MY, Kim T-W, Nam Y-D, et al. Genomic Analysis of a Pathogenic Bacterium, Paeniclostridium sordellii CBA7122 Containing the Highest Number of rRNA Operons, Isolated from a Human Stool Sample. Frontiers in Pharmacology. 2017 (accessed 2025 Mar 22);8. https://www.frontiersin.org/journals/pharmacology/articles/10.3389/fphar.2017.00840/full. doi:10.3389/fphar.2017.00840

(62) Zerrouki H, Rebiahi S-A, Elhabiri Y, Fatmi A, Baron SA, Pagnier I, Diene SM, Rolain J-M. Prevalence and Antimicrobial Resistance of Paeniclostridium sordellii in Hospital Settings. Antibiotics. 2021;11(1):38. doi:10.3390/antibiotics11010038

(63) Ezeji JC, Sarikonda DK, Hopperton A, Erkkila HL, Cohen DE, Martinez SP, Cominelli F, Kuwahara T, Dichosa AEK, Good CE, et al. Parabacteroides distasonis: intriguing aerotolerant gut anaerobe with emerging antimicrobial resistance and pathogenic and probiotic roles in human health. Gut Microbes. 2021;13(1):1922241. doi:10.1080/19490976.2021.1922241

(64) Yang C, Xiao H, Zhu H, Du Y, Wang L. Revealing the gut microbiome mystery: A meta-analysis revealing differences between individuals with autism spectrum disorder and neurotypical children. BioScience Trends. 2024;18(3):233–249. doi:10.5582/bst.2024.01123

(65) Finegold SM. Therapy and epidemiology of autism–clostridial spores as key elements. Medical Hypotheses. 2008;70(3):508–511. doi:10.1016/j.mehy.2007.07.019

(66) Tamanai-Shacoori Z, Smida I, Bousarghin L, Loreal O, Meuric V, Fong SB, Bonnaure-Mallet M, Jolivet-Gougeon A. Roseburia spp.: a marker of health? Future Microbiology. 2017;12:157–170. doi:10.2217/fmb-2016-0130

(67) Louis P, Flint HJ. Formation of propionate and butyrate by the human colonic microbiota. Environmental Microbiology. 2017;19(1):29–41. doi:10.1111/1462-2920.13589

(68) Lu H, Xu X, Fu D, Gu Y, Fan R, Yi H, He X, Wang C, Ouyang B, Zhao P, et al. Butyrate-producing Eubacterium rectale suppresses lymphomagenesis by alleviating the TNF-induced TLR4/MyD88/NF-κB axis. Cell Host & Microbe. 2022;30(8):1139-1150.e7. doi:10.1016/j.chom.2022.07.003

(69) Maturana JL, Cárdenas JP. Insights on the Evolutionary Genomics of the Blautia Genus: Potential New Species and Genetic Content Among Lineages. Frontiers in Microbiology. 2021 (accessed 2025 Feb 24);12. https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2021.660920/full. doi:10.3389/fmicb.2021.660920

(70) Liu X, Mao B, Gu J, Wu J, Cui S, Wang G, Zhao J, Zhang H, Chen W. Blautia-a new functional genus with potential probiotic properties? Gut Microbes. 2021;13(1):1–21. doi:10.1080/19490976.2021.1875796

(71) Tidjani Alou M, Naud S, Khelaifia S, Bonnet M, Lagier J-C, Raoult D. State of the Art in the Culture of the Human Microbiota: New Interests and Strategies. Clinical Microbiology Reviews. 2020;34(1):10.1128/cmr.00129-19. doi:10.1128/cmr.00129-19

(72) Bifidobacterium Broth. (accessed 2025 Mar 9). https://www.himedialabs.com/us/m1395-bifidobacterium-broth.html

(73) Campylobacter Blood Free CCDA. E & O Laboratories Ltd. (accessed 2025 Mar 9). https://www.eolabs.com/product/pp0130-campylobacter-blood-free-ccda-agar/

(74) Regulation of Central Carbon Metabolism in Enterococcus faecalis - ProQuest. (accessed 2025 Mar 9). https://www.proquest.com/openview/b3731408a9af1706d8a17e5bed7b6da8/1?pq-origsite=gscholar&cbl=18750&diss=y

(75) Cercenado E. Enterococcus: resistencias fenotípicas y genotípicas y epidemiología en España. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 2011;29:59–65. doi:10.1016/S0213-005X(11)70045-3

(76) García-Solache M, Rice LB. The Enterococcus: a Model of Adaptability to Its Environment. Clinical Microbiology Reviews. 2019;32(2):e00058-18. doi:10.1128/CMR.00058-18

(77) Janda JM, Abbott SL. The Changing Face of the Family Enterobacteriaceae (Order: “Enterobacterales”): New Members, Taxonomic Issues, Geographic Expansion, and New Diseases and Disease Syndromes. Clinical Microbiology Reviews.

2021;34(2):10.1128/cmr.00174-20. doi:10.1128/cmr.00174-20

(78) Martinson JNV, Walk ST. Escherichia coli Residency in the Gut of Healthy Human Adults. EcoSal Plus. 2020;9(1):10.1128/ecosalplus.ESP-0003–2020. doi:10.1128/ecosalplus.esp-0003-2020

(79) Conway T, Cohen PS. Commensal and Pathogenic Escherichia coli Metabolism in the Gut. In: Metabolism and Bacterial Pathogenesis. John Wiley & Sons, Ltd; 2015. p. 343–362. https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1128/9781555818883.ch16. doi:10.1128/9781555818883.ch16

(80) Möndel M, Schroeder BO, Zimmermann K, Huber H, Nuding S, Beisner J, Fellermann K, Stange EF, Wehkamp J. Probiotic E. coli treatment mediates antimicrobial human beta-defensin synthesis and fecal excretion in humans. Mucosal Immunology. 2009;2(2):166–172. doi:10.1038/mi.2008.77

(81) Okuno M, Tsuru N, Yoshino S, Gotoh Y, Yamamoto T, Hayashi T, Ogura Y. Isolation and Genomic Characterization of a Heat-Labile Enterotoxin 1-Producing Escherichia fergusonii Strain from a Human. Microbiology Spectrum. 2023;11(4):e00491-23. doi:10.1128/spectrum.00491-23

(82) Ma X, Park H-S, Shin Y-J, Kim J-K, Hong JK, Han S-W, Yoon I-Y, Kim D-H. The extracellular vesicle of depressive patient-derived Escherichia fergusonii induces vagus nerve-mediated neuroinflammation in mice. Journal of Neuroinflammation. 2024;21(1):224. doi:10.1186/s12974-024-03211-7

(83) Yang J, Chen W, Xia P, Zhang W. Dynamic comparison of gut microbiota of mice infected with Shigella flexneri via two different infective routes. Experimental and Therapeutic Medicine. 2020;19(3):2273–2281. doi:10.3892/etm.2020.8469

(84) Wang T, Wei X, Xin Y, Zhuang J, Shan S, Zhang J. Halomonas lutescens sp. nov., a halophilic bacterium isolated from a lake sediment. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2016;66(11):4697–4704. doi:10.1099/ijsem.0.001413

(85) Macrogen Standard Primers. https://dna.macrogen.com/#

7. Anexos

Anexo 1.

Kit comercial para la extracción de ADN genómico de las muestras de materia fecal: Protocol PowerFecal Pro Qiagen.

1. Spin the PowerBead Pro Tube briefly to ensure that the beads have settled at the bottom. Add up to 250 mg of stool and 800 µl of Solution CD1. A step is added to the protocol, which consists of adding 100 µl of PCI (Phenol-Chloroform-Isoamyl Alcohol) that helps eliminate impurities.
2. Vortex briefly to mix.
3. Homogenize samples using one of the following methods: A. Secure the PowerBead Pro Tube horizontally on a Vortex Adapter for 1.5–2 ml tubes (cat. no. 13000-V1-24). Vortex at maximum speed for 10 min.
4. Centrifuge the PowerBead Pro Tube at 15,000 x g for 1 min.
5. 4. Transfer the supernatant to a clean 2 ml Microcentrifuge Tube (provided). Note: Expect 500–600 µl. The supernatant may still contain some stool particles.
6. Add 200 µl of Solution CD2 and vortex for 5 s.
7. 6. Centrifuge at 15,000 x g for 1 min. Avoiding the pellet, transfer up to 700 µl of supernatant to a clean 2 ml Microcentrifuge Tube (provided).
8. Add 600 µl of Solution CD3 and vortex for 5 s.
9. Load 650 µl of the lysate onto an MB Spin Column and centrifuge at 15,000 x g for 1 min.
10. Discard the flow-through and repeat step 8 to ensure that all of the lysate has passed through the MB Spin Column.
11. Carefully place the MB Spin Column into a clean 2 ml Collection Tube (provided). Avoid splashing any flow-through onto the MB Spin Column.
12. Add 500 µl of Solution EA to the MB Spin Column. Centrifuge at 15,000 x g for 1 min.
13. Discard the flow-through and place the MB Spin Column back into the same 2 ml Collection Tube.
14. Add 500 µl of Solution C5 to the MB Spin Column. Centrifuge at 15,000 x g for 1 min.
15. Discard the flow-through and place the MB Spin Column into a new 2 ml Collection Tube (provided).

Anexo 2.

Composición buffer TAE:

- Tris-acetato: 0.04 M (40 mM)
- EDTA: 1 mM
- pH: alrededor de 8.3

Para preparar TAE 1X, se diluye un buffer TAE concentrado, como TAE 50X, con agua desionizada. Se mezclan 1 parte de TAE 50X con 49 partes de agua desionizada.

Anexo 3.

Secuencias utilizadas para el clonado:

>NC_008618.1:c1989911-1988382 *Bifidobacterium adolescentis ATCC 15703*, complete sequence

TTTGTGGAGGGTTCGATTCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAA
GTCGAACGGGATCGGCTGGAGCTTGCTCCGGCCGTGAGAGTGGCGAACGGGTGAGTAAT
GCGTGACCGACCTGCCCCATACACCGGAATAGCTCCTGGAAACGGGTGGTAATGCCGGA
TGCTCCAGTTGGATGCATGTCCTTCTGGGAAAGATTCTATCGGTATGGGATGGGGTCGCG
TCCTATCAGCTTGATGGCGGGGTAACGGCCCACCATGGCTTCGACGGGTAGCCGGCCTGA
GAGGGCGACCGGCCACATTGGGACTGAGATACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAG
TGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGCGGGATGACG
GCCTTCGGGTTGTAAACCGCTTTTGACTGGGAGCAAGCCCTTCGGGGTGAGTGTACCTTT
CGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCAAGCGT
TATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGTAGGCGGTTCGTCGCGTCCGGTGTGAAAGT
CCATCGCTTAACGGTGGATCCGCGCCGGGTACGGGCGGGCTTGAGTGCGGTAGGGGAGA
CTGGAATTCCCGGTGTAACGGTGGAATGTGTAGATATCGGGAAGAACACCAATGGCGAA
GGCAGGTCTCTGGGCCGTCACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGAT
TAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGGTGGATGCTGGATGTGGGGACCATTCCAC
GGTCTCCGTGTCGGAGCCAACGCGTTAAGCATCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGC
TAAAACTCAAAGAAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGCGGATTAATTCG
ATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGGCTTGACATGTTCCCGACAGCCCCAGAGATGGGG
CCTCCCTTCGGGGCGGGTTCACAGGTGGTGCATGGTCGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGAT
GTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGCCCTGTGTTGCCAGCACGTCGTGGTG
GGAACTCACGGGGGACCGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAGATC
ATCATGCCCCTTACGTCCAGGGCTTCACGCATGCTACAATGGCCGGTACAACGGGATGCG
ACCTCGTGAGGGGGAGCGGATCCCTTAAAACCGGTCTCAGTTCGGATTGGAGTCTGCAA
CCCGACTCCATGAAGGCGGAGTCGCTAGTAATCGCGGATCAGCAACGCCGCGGTGAATG
CGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCAAGTCATGAAAGTGGGTAGCACCCGAAGC

CGGTGGCCCAACCTTTTTGGGGGGAGCCGTCTAAGGTGAGACTCGTGATTGGGACTAAGT
CGTAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGCGGCTGGATCACCTCCTTT

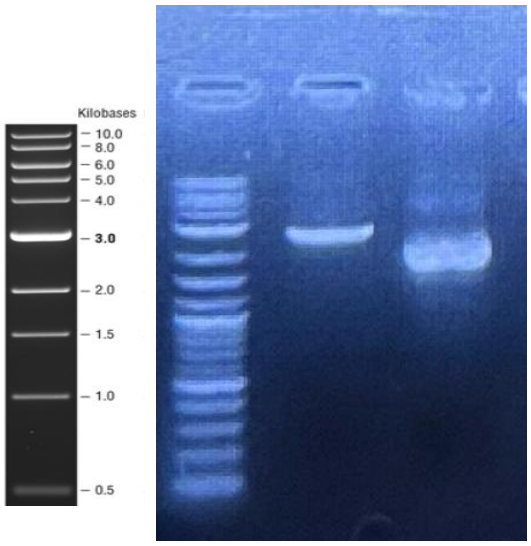
>M77789.2 Cloning vector pUC19, complete sequence

GCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTCATTAATGCAGCTGGCA
CGACAGGTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGC
TCACTCATTAGGCACCCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAAT
TGTGAGCGGATAACAATTTCACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTTG
CATGCCTGCAGGTCGACTCTAGAGGATCCCCGGGTACCGAGCTCGAATTCACTGGCCGTC
GTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCTGGCGTTACCCAACTTAATCGCCTTGCAGCA
CATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAA
CAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGCGCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTG
TGCGGTATTTCACACCGCATATGGTGCACTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAG
TTAAGCCAGCCCCGACACCCGCCAACACCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTC
CCGGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGGTTT
TCACCGTCATCACCGAAACGCGCGAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTTATAG
GTTAATGTCATGATAATAATGGTTTCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTG
CGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGAC
AATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACAT
TTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTTGCGGCATTTTGCCTTCCTGTTTTTGCTCACCCAGA
AACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCG
AACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAA
TGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGC
AAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAG
TCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATA
ACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGA
GCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACTCGCCTTGATCGTTGGGAACC
GGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGG
CAACAACGTTGCGCAAACTATTAACTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAAT
TAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCG
GCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTG
CAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGT
CAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAA
GCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAACTTCATT
TTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTT
AACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTT

GAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAAACCACCGCTACCAG
CGGTGGTTTGTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACTGGCTTCA
GCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCA
AGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTG
CCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAG
GCGCAGCGGTCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGAC
CTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAG
GGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAG
GGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTG
ACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCA
GCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTCCT
GCGTTACCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTC
GCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGA

Anexo 4.

Gel de agarosa 1% donde se corrió el plásmido digerido enzimáticamente para evaluar si se linealizó correctamente y como control se utilizó el plásmido sin digerir el cual mantiene su forma circular el cual se espera que quede más abajo en el gel.. Carril 1: PM (New England Biolabs), Carril 2: plásmido digerido, Carril 3: plásmidos sin digerir.



Anexo 5.

Código utilizado para correr Porefile:

```
runporefile.sh
nextflow run microgenlab/porefile
-r master
--fq 'fastq_pass/single_files/*.fastq'
--outdir OUTporefile/ -profile nagual
--isDemultiplexed
--silvaFasta "SILVA_138.2_SSURef_NR99_tax_silva.fasta.gz"
--silvaTaxNcbiSp "tax_ncbi-species_ssu_ref_nr99_138.2.txt.gz"
--silvaTaxmap "taxmap_slv_ssu_ref_nr_138.2.txt.gz"
(-resume)
```

Anexo 6.

Medios de cultivo utilizados:

Medio YCFA:

- Triptona 5.0g
- Extracto de Levadura 1.25g
- $NaHCO_3$ 2.0g
- (D)+Glucosa 1.0g
- (D)+Maltosa 1.0g
- (D)+Celobiosa 1.0g L-cisteína 0.5g
- Solución Mineral I 75ml
    - K_2HPO_4 3g
    - H_2O 1L
- Solución Mineral II 75ml
    - $KH_2PO_4$3g
    - $(NH_4)2SO_4$ 6g
    - NaCl 6g
    - $MgSO_4$ 0.6g
    - $CaCl_2$ (dry) 0.6g
    - H2O 1L
- Solución de Resazurina 0.5ml
    - Resazurina 0,1 g

    - H2O hasta 100 mL
- Solución de Hemina 5ml
    - KOH 0,28 g
    - Etanol 95% 25 mL
    - Heamina 0,1 g
    - H_2O hasta 100 mL
- Solución de Vitamínica I 0.5ml
    - Biotina 5 mg
    - Cobalamina (Vitamina B12) 5 mg
    - Ácido 4-aminobenzoico 15 mg
    - Ácido fólico 25 mg
    - Piridoxina 75 mg
    - H_2O hasta 500 mL
- Mix de ácidos grasos volátiles 3.1ml
    - Ácido acético 17 mL
    - Ácido propiónico 6 mL
    - Ácido valérico 1 mL
    - Ácido isovalérico 1 mL
    - Ácido isobutírico 1 mL
    - NaOH para ajustar el pH hasta 7.45

- Después de autoclavar Solución vitamínica II 0.5ml
    - Clorhidrato de tiamina 25 mg
    - Riboflavina 25 mg
    - H_2O hasta 500 mL

***Bifidobacterium* selective Broth (BSM):**

- Triptona 2 g
- Peptona 1 g
- Extracto de levadura 1g
- Extracto de carne 1g
- Jugo de tomate 1,65 g
- Dextrosa (Glucosa) 2g
- Polisorbato 80 (Tween 80) 0,2 g

- pH 6,6-7

***Campylobacter* Blood Free Agar (CCDA):**

- Peptona 24,5 g/L
- Cloruro de sodio 5,0 g/L
- Desoxicolato de sodio 1,0 g/L
- Sulfato de ferroso 0,25 g/L
- Piruvato de sodio 0,25 g/L
- Carbón 4,0 g/L
- Agar 13,0 g/L

Anexo 7.

Secuencias de los *primers* universales con adaptación a Oxford Nanopore (27F y 1942R) y el utilizado para secuenciación por Sanger (337F).

Sequence (5'-3')	**Referencia**
337F- GACTCCTACGGGAGGCWGCAG	(85)
27F-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	(43)
1492R-TACGGYTACCTTGTTACGACTT	(43)