

SECUENCIACIÓN DEL MICROBIOMA Y DESAFÍOS METODOLÓGICOS: IMPLICACIONES PARA LA NUTRICIÓN Y LA MEDICINA PERSONALIZADAS

AUTORES:

María del Rosario Taussig ¹, Andrea Liliana Millán ², Rodrigo Peralta ^{1,3}, Josefina Arcagni ¹, María Constanza Pautasso ², Kyle McClary ⁵, Yap Chew ⁵, Jeffrey Koble ⁶, Gustavo Daniel Frechtel ^{2,4}, Juan Pablo Bustamante ^{1,3}

1. Laboratorio de Investigación, Desarrollo y Transferencia de la Universidad Austral (LIDTUA-CIC). Facultad de Ingeniería de la Universidad Austral. Pilar, Argentina.
2. Laboratorio de Diabetes y Metabolismo. Instituto de Inmunología, Genética y Metabolismo (INIGEM), UBA-CONICET, Buenos Aires, Argentina.
3. Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de Entre Ríos (FI-UNER), Oro Verde, Entre Ríos, Argentina.
4. Hospital de Clínicas, cátedra de Nutrición, Facultad de medicina. Universidad de Buenos Aires, Argentina.
5. Zymo Research Corporation, Irvine, CA, EE. UU.
6. Illumina, San Diego, CA, EE. UU.
7. Correspondencia: jbustamante@austral.edu.ar

doi.org/10.55634/3.3.6

RESUMEN:

Este estudio investiga el impacto de las metodologías de secuenciación en la composición microbiana y la dinámica funcional en el contexto de los patrones dietéticos. Al analizar las mismas muestras de heces utilizando tanto el ARNr 16S como la metagenómica shotgun, descubrimos discrepancias significativas en la resolución taxonómica, ya que la metagenómica shotgun identificó una gama más amplia de microorganismos, incluidos 22 filos y 1489 especies, en comparación con los 15 filos y 509 especies identificados por el ARNr 16S. Nuestros resultados resaltan la dependencia de las abundancias microbianas en la metodología de secuenciación, lo que genera inquietudes sobre la generalización de las asociaciones informadas en la literatura. En particular, a pesar de los patrones dietéticos seleccionados aquí, basados en plantas y occidentales, los géneros y filos clave mostraron abundancias relativas marcadamente diferentes, lo que ilustra la complejidad y variabilidad inherentes a la investigación del microbioma. Además, empleamos la metatranscriptómica para diferenciar entre vías metabólicas potenciales y activas, revelando que no todas las vías detectadas a nivel de ADN se expresan activamente, lo que subraya la necesidad de enfoques multiómicos en futuros estudios. El tamaño limitado de la muestra en nuestro análisis limita las comparaciones exhaustivas entre grupos dietéticos, lo que subraya la necesidad de estudios de cohorte más amplios. Este trabajo exige protocolos estandarizados en la investigación del microbioma y destaca la importancia de abordar los sesgos metodológicos de secuenciación, que pueden afectar críticamente las interpretaciones y aplicaciones que buscan el desarrollo de estrategias prácticas para la nutrición personalizada y futuras intervenciones de salud.

PALABRAS CLAVE: *microbiota intestinal, microbioma intestinal, dieta, ARNr 16S, metagenómica shotgun, metatranscriptómica, metodologías de secuenciación*

INTRODUCCIÓN:

El estudio de la microbiota intestinal humana ha cobrado creciente importancia en los últimos años debido a su papel crucial en el mantenimiento de la salud y su potencial para modular estados patológicos ¹⁻³. Las publicaciones sobre este tema son cada vez más numerosas, lo que denota un notable interés en la investigación y aplicación, específicamente en el equilibrio entre la salud y la enfermedad, de los

microorganismos que habitan el cuerpo humano, en particular, en el intestino ⁴. Como es bien sabido, la mayor parte de la microbiota humana reside en el colon ⁵. La microbiota intestinal presenta un alto grado de redundancia funcional ^{6,7}. Absorción de energía del metabolismo de nutrientes del huésped tomados de los componentes de los alimentos ⁸, digestión de fibras insolubles de origen vegetal ⁸, mantenimiento de la integridad estructural de la barrera mucosa intestinal ^{9,10},

regular el almacenamiento de grasa del huésped y modificar la densidad mineral ósea ¹¹, colaborar en el equilibrio de las hormonas grelina y leptina ⁸, sintetizar vitamina K y B12 ¹¹, ayudar a proteger contra daños o entrada de patógenos y estimular la angiogénesis intestinal ¹¹, madurar los sistemas inmunológicos, regulando la respuesta y la inflamación por ejemplo a través de la producción de aminoácidos aromáticos derivados ¹⁰, producir ácidos grasos de cadena corta (SCFA) ^{9,10}, regular los ácidos biliares a través de la síntesis de metabolitos derivados del colesterol ¹⁰, y el nivel de síntesis de fosfolípidos con el metabolismo anaeróbico de la colina ¹⁰ son algunas funciones clave de nuestra microbiota intestinal. Entre todos los factores que modulan la microbiota, la dieta juega un rol diario predominante ¹². Por lo tanto, es importante para el avance de la ciencia y la nutrición personalizada identificar alimentos que promueven o perjudican la salud en los patrones dietéticos, entendiendo su impacto en la microbiota intestinal, minimizando el sesgo metodológico. En particular, dos de los enfoques dietéticos más referenciados a nivel mundial ¹²⁻¹⁴, las dietas occidentales y las basadas en plantas, se consideran aquí como ejemplos de cuán diversos pueden ser los resultados independientemente de las dietas elegidas. La evidencia que vincula la microbiota intestinal con la ingesta de alimentos y diversos estados de salud aumenta constantemente; sin embargo, el conocimiento sobre su composición y variación sigue siendo incompleto y carece de consenso.

El uso de diversas metodologías para analizar la microbiota ha obstaculizado el acuerdo global tanto sobre su composición como sobre sus asociaciones con diferentes enfermedades.

A medida que avanzan las tecnologías de secuenciación, los investigadores han adoptado una variedad de metodologías para explorar la composición y las capacidades funcionales de la microbiota intestinal. Entre estas, la secuenciación del gen ARNr 16S y la metagenómica shotgun son dos de los enfoques más utilizados. Sin embargo, ambos métodos tienen ventajas y limitaciones distintivas, que pueden llevar a resultados diferentes al interpretar los datos del microbioma ^{15,16}. La secuenciación del ARNr 16S se emplea a menudo por su rentabilidad y su capacidad para proporcionar una resolución taxonómica de las comunidades bacterianas a nivel de género ¹⁷. Por el contrario, la metagenómica shotgun ofrece una visión más completa de la microbiota, lo que permite la identificación a nivel de especie y conocimientos funcionales mediante la

secuenciación de todo el genoma microbiano ¹⁸. A pesar de la riqueza de los datos que puede proporcionar la metagenómica shotgun, también requiere más recursos y es más exigente desde el punto de vista computacional. Este estudio busca evaluar cómo estas dos metodologías influyen en el análisis de la microbiota intestinal en individuos con dietas omnívoras y basadas en plantas. Al comparar los resultados taxonómicos y funcionales derivados de ambos métodos, buscamos destacar los sesgos metodológicos que pueden influir en nuestra comprensión de las interacciones entre la dieta y la microbiota.

MÉTODOS:

RECLUTAMIENTO DE INDIVIDUOS Y RECOLECCIÓN DE MUESTRAS

Para este estudio se utilizaron datos de cuarenta y ocho participantes del ensayo clínico MicrobiAr: "Caracterización y seguimiento del microbioma e indicadores de salud en cohortes de obesos, prediabetes y diabetes tipo 2 sometidos a una intervención de dieta y estilo de vida a base de plantas". MicrobiAr fue aprobado en 2021 por el Comité de Ética del Hospital de Clínicas y la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires. También está registrado en los Institutos Nacionales de Salud (NIH) de Estados Unidos con el ID NCT05372445. Los cuarenta y ocho participantes firmaron los consentimientos informados correspondientes; 24 de ellos siguen un patrón dietético occidental y 24 un patrón dietético a base de plantas.

Los participantes recolectaron muestras fecales según los usos detallados en el kit Bunny Wipe de Zymo Research Corporation. Este kit contiene un tubo colector donde cada persona debe recolectar su propia muestra y depositarla en un tubo que contiene el reactivo DNA/RNA Shield™. Este reactivo es una solución estabilizadora de ácidos nucleicos en cualquier muestra biológica. Preserva la integridad genética y los perfiles de expresión de las muestras a temperatura ambiente e inactiva completamente otros agentes biológicos, manteniendo la muestra tal como fue extraída. Esta exclusiva solución estabilizadora de ADN y ARN también previene la degradación por ciclos de congelación y descongelación. Una vez que el paciente extrae y entrega la muestra, debe completar un formulario con la información relacionada.

EXTRACCIÓN DE ADN/ARN

A partir de alícuotas del tubo estabilizado, se extraen los ácidos nucleicos. Para la extracción de ADN, se utilizó el kit ZymoBIOMICS™ DNA Miniprep, mientras que para el ARN, se utilizó el kit RNeasy PowerMicrobiome® de Qiagen. La concentración de los ácidos nucleicos extraídos se determinó con Qubit® 4.0. Tanto para el ADN como para el ARN, se utilizaron kits de detección de alta sensibilidad de Invitrogen; uno específico para ADN y otro para ARN, respectivamente. La integridad del ADN y del ARN se verificó en un gel electroforético con el marcador de peso molecular lambda/ HindIII. El ADN y el ARN extraídos se almacenaron a -80 °C.

PREPARACIÓN Y SECUENCIACIÓN DE BIBLIOTECAS DIRIGIDAS AL ARN 16S

Las muestras de ADN se prepararon para la secuenciación dirigida con el kit de preparación de bibliotecas NGS Quick-16S™ (Zymo Research, Irvine, CA) utilizando el conjunto de cebadores V1-V2. Estos cebadores fueron diseñados a medida por Zymo Research para proporcionar la mejor cobertura del gen 16S manteniendo una alta sensibilidad. La biblioteca de secuenciación se preparó utilizando un innovador proceso de preparación de bibliotecas en el que las reacciones de PCR se realizaron en máquinas de PCR en tiempo real para controlar los ciclos y, por lo tanto, limitar la formación de quimeras de PCR. Los productos finales de PCR se cuantificaron con lecturas de fluorescencia de qPCR y se agruparon en función de la misma molaridad. La biblioteca agrupada final se limpió con Select-a-Size DNA Clean & Concentrator™ (Zymo Research, Irvine, CA) y luego se cuantificó con TapeStation® (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) y Qubit® (Thermo Fisher Scientific, Waltham, WA). La biblioteca final se secuenció en Illumina® NextSeq 2000™ con un kit de reactivos P1 (600 ciclos) (Illumina, San Diego, CA). La secuenciación se realizó con un 25 % de PhiX como aditivo.

MUESTRAS DE CONTROL

El estándar de comunidad microbiana ZymoBIOMICS® (Zymo Research, Irvine, CA) se utilizó como control positivo para cada extracción de ADN, si se realizó. El estándar de ADN de la comunidad microbiana ZymoBIOMICS® (Zymo Research, Irvine, CA) se utilizó como control positivo para cada preparación de biblioteca específica. Se incluyeron controles negativos (es decir, control de extracción en blanco y control de preparación de biblioteca en blanco) para evaluar el nivel

de carga biológica transportado por el proceso de laboratorio.

Procedimientos metagenómicos de escopeta

Una vez eluido y analizado el ADN, se prepararon las bibliotecas metagenómicas siguiendo el protocolo Illumina DNA Prep de Illumina Inc. Todos los procedimientos se realizaron en condiciones estériles para evitar la contaminación. Como control de referencia para la diversidad del microbioma fecal, se utilizó el estándar de referencia para el microbioma intestinal de Zymo Research (datos no mostrados). Una vez finalizadas las bibliotecas, se cuantificaron individualmente utilizando Qubit® 4.0 y los kits de alta sensibilidad, como se describió previamente en la sección de extracción de ADN/ARN. La agrupación se realizó y midió en un Bioanalyzer 2100 con el kit de alta sensibilidad para el ADN. La secuenciación del ADN se realizó en el sistema NovaSeq 6000 de Illumina.

PROCEDIMIENTOS DE METATRANSCRIPTÓMICA

Una vez eluido y comprobado el ARN, las bibliotecas se prepararon según el protocolo Illumina Stranded Total RNA Prep de Illumina Inc. Todos los procedimientos se realizaron en condiciones estériles para evitar la contaminación. Una vez finalizadas las bibliotecas, se cuantificaron individualmente, como ya se explicó para la metagenómica shotgun, y la agrupación se midió de la misma forma para la metagenómica shotgun. La secuenciación se realizó en el sistema NovaSeq 6000 de Illumina.

ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO

Tras obtener los datos de secuenciación de las secuencias de amplicones, las lecturas sin procesar de extremos emparejados (profundidad de secuenciación promedio: 234 120 ± 39 883 lecturas) se agruparon según sus secuencias de código de barras (demultiplexación) mediante la opción de demultiplexación de cutadapt¹⁹, que también eliminó los códigos de barras y los cebadores. La calidad de la secuencia y los cambios tras el preprocesamiento se visualizaron con fastp²⁰-Deblur²¹. Se utilizó para seleccionar secuencias representativas, que sirvieron como indicadores de especies, basándose en la eliminación de ruido en ASV. Posteriormente, se generó una tabla de características (tabla ASV) cuantificando la frecuencia de cada secuencia característica en cada muestra. Simultáneamente, las secuencias características obtenidas en este paso se utilizaron para la asignación taxonómica a nivel de filo,

género y especie, ofreciendo una perspectiva de reducción de la dimensionalidad en la microbiota. Esto se realizó comparando las secuencias características con las secuencias de amplicones de referencia almacenadas en la base de datos SILVA ²²(v138.2), utilizando VSEARCH ²³clasificador de taxonomía.

El control de calidad de las secuencias metagenómicas shotgun (profundidad de secuenciación promedio: 33 169 156 lecturas $\pm$ 10 378 603 lecturas) y metatranscriptómica (profundidad de secuenciación promedio: 30 816 243 lecturas $\pm$ 20 782 514 lecturas) se realizó con Trimmomatic ²⁴—Las secuencias de ADN humano se extrajeron con Kneaddata (<https://bitbucket.org/biobakery/kneaddata/wiki/Home>), utilizando el genoma humano GRCh38 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/guide/human/>) como referencia. Al igual que en el análisis de amplicones, la calidad de la secuencia se visualizó con fastp.

El perfil taxonómico se generó utilizando MetaPhlAn4 ²⁵, que alinea las lecturas metagenómicas con una base de datos predefinida de genes marcadores (mpa_vJan21_CHOCOPhAnSGB_202103) para una clasificación taxonómica precisa. Humann3 ²⁶Se utilizó para obtener el perfil funcional, lo que permitió explorar la diversidad contributiva dentro y entre muestras y revelar las contribuciones de especies individuales a funciones específicas.

La evaluación de diferencias estadísticamente significativas entre las técnicas de metagenómica 16S rRNA y shotgun se realizó mediante la prueba de Wilcoxon (valor $p < 0,05$) implementada en el Scipy ²⁷módulo de Python.

La visualización de datos se realizó con módulos de Python : pandas ²⁸, matplotlib ²⁹y seaborn ³⁰.

RESULTADOS

DIFERENCIAS EN LA RESOLUCIÓN TAXONÓMICA ENTRE EL ARNr 16S Y LA METAGENÓMICA SHOTGUN

Las mismas muestras se procesaron mediante ambos métodos, ARNr 16S y metagenómica shotgun, para explorar cómo estas diferencias metodológicas en los enfoques de secuenciación podrían contribuir a las variaciones observadas. Nuestro análisis reveló diferencias sustanciales en los perfiles taxonómicos generados por la secuenciación con ARNr 16S y metagenómica shotgun (véanse las Figuras 1 y 2). El enfoque con ARNr 16S proporcionó una visión completa a nivel de género, pero tuvo dificultades para resolver las

diferencias a nivel de especie. Por el contrario, la metagenómica shotgun permitió una resolución taxonómica más detallada, identificando especies que no fueron detectadas por la secuenciación con ARNr 16S.

Como se esperaba, la secuenciación metagenómica shotgun identifica más taxones en todos los niveles taxonómicos que examinan las bacterias. Se identificaron un total de 15 filos, 250 géneros y 509 especies según el ARNr 16S, mientras que 22 filos, 783 géneros y 1489 especies mediante metagenómica shotgun. A nivel de género, de 897 géneros identificados en todas las muestras, solo 136 géneros (15%) se identificaron con secuenciación metagenómica de amplicones y shotgun. La secuenciación de amplicones del gen ARNr 16S identificó 114 géneros no encontrados mediante el perfil metagenómico, mientras que solo 647 géneros se encontraron de forma única utilizando la secuenciación metagenómica shotgun . A nivel de filo, de 26 filos identificados en todas las muestras, solo 11 filos (42%) se identificaron con secuenciación metagenómica de amplicones y shotgun. La secuenciación de amplicones del gen ARNr 16S identificó 4 filos que no se encontraron mediante el perfil metagenómico , mientras que solo 11 filos se encontraron de forma única mediante la secuenciación metagenómica shotgun .

Las abundancias relativas de filos (Figura 1) y géneros (Figura 2) de los microbios más abundantes procesados mediante metagenómica shotgun y ARNr 16S se muestran en azul y naranja, respectivamente, para personas de dos grupos: uno (grupo A) con una dieta occidental (Figura 1.A, Figura 2.A) y el otro (grupo B) con una dieta basada en plantas (Figura 1.B, Figura 2.B). Para ambos grupos, los filos más abundantes son Firmicutes , Bacteroidetes , Proteobacteria , Actinobacteria y Fusobacteria. y Verrucomicrobia . Las diferencias entre ambos métodos de secuenciación se evaluaron mediante la prueba de Wilcoxon. Para los grupos A y B, se observaron diferencias significativas relacionadas con el método de secuenciación elegido, con una amplia variación en las abundancias de Actinobacteria , Bacteroidetes y Firmicutes . y Proteobacteria . Estos resultados respaldan el hecho de que, especialmente para la mayoría de los filos reportados en la literatura sobre el intestino humano (proporción Firmicutes / Bacteroidetes , Actinobacteria y Proteobacteria), las abundancias relativas dependen en gran medida de la metodología elegida, independientemente del patrón dietético de las personas.

género y especie, ofreciendo una perspectiva de reducción de la dimensionalidad en la microbiota. Esto se realizó comparando las secuencias características con las secuencias de amplicones de referencia almacenadas en la base de datos SILVA ²²(v138.2), utilizando VSEARCH ²³clasificador de taxonomía.

El control de calidad de las secuencias metagenómicas shotgun (profundidad de secuenciación promedio: 33 169 156 lecturas $\pm$ 10 378 603 lecturas) y metatranscriptómica (profundidad de secuenciación promedio: 30 816 243 lecturas $\pm$ 20 782 514 lecturas) se realizó con Trimmomatic ²⁴—Las secuencias de ADN humano se extrajeron con Kneaddata (<https://bitbucket.org/biobakery/kneaddata/wiki/Home>), utilizando el genoma humano GRCh38 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/guide/human/>) como referencia. Al igual que en el análisis de amplicones, la calidad de la secuencia se visualizó con fastp.

El perfil taxonómico se generó utilizando MetaPhlAn4 ²⁵, que alinea las lecturas metagenómicas con una base de datos predefinida de genes marcadores (mpa_vJan21_CHOCOPhAnSGB_202103) para una clasificación taxonómica precisa. Humann3 ²⁶Se utilizó para obtener el perfil funcional, lo que permitió explorar la diversidad contributiva dentro y entre muestras y revelar las contribuciones de especies individuales a funciones específicas.

La evaluación de diferencias estadísticamente significativas entre las técnicas de metagenómica 16S rRNA y shotgun se realizó mediante la prueba de Wilcoxon (valor $p < 0,05$) implementada en el Scipy ²⁷módulo de Python.

La visualización de datos se realizó con módulos de Python: pandas ²⁸, matplotlib ²⁹y seaborn ³⁰.

RESULTADOS

DIFERENCIAS EN LA RESOLUCIÓN TAXONÓMICA ENTRE EL ARNr 16S Y LA METAGENÓMICA SHOTGUN

Las mismas muestras se procesaron mediante ambos métodos, ARNr 16S y metagenómica shotgun, para explorar cómo estas diferencias metodológicas en los enfoques de secuenciación podrían contribuir a las variaciones observadas. Nuestro análisis reveló diferencias sustanciales en los perfiles taxonómicos generados por la secuenciación con ARNr 16S y metagenómica shotgun (véanse las Figuras 1 y 2). El enfoque con ARNr 16S proporcionó una visión completa a nivel de género, pero tuvo dificultades para resolver las

diferencias a nivel de especie. Por el contrario, la metagenómica shotgun permitió una resolución taxonómica más detallada, identificando especies que no fueron detectadas por la secuenciación con ARNr 16S.

Como se esperaba, la secuenciación metagenómica shotgun identifica más taxones en todos los niveles taxonómicos que examinan las bacterias. Se identificaron un total de 15 filos, 250 géneros y 509 especies según el ARNr 16S, mientras que 22 filos, 783 géneros y 1489 especies mediante metagenómica shotgun. A nivel de género, de 897 géneros identificados en todas las muestras, solo 136 géneros (15%) se identificaron con secuenciación metagenómica de amplicones y shotgun. La secuenciación de amplicones del gen ARNr 16S identificó 114 géneros no encontrados mediante el perfil metagenómico, mientras que solo 647 géneros se encontraron de forma única utilizando la secuenciación metagenómica shotgun. A nivel de filo, de 26 filos identificados en todas las muestras, solo 11 filos (42%) se identificaron con secuenciación metagenómica de amplicones y shotgun. La secuenciación de amplicones del gen ARNr 16S identificó 4 filos que no se encontraron mediante el perfil metagenómico, mientras que solo 11 filos se encontraron de forma única mediante la secuenciación metagenómica shotgun.

Las abundancias relativas de filos (Figura 1) y géneros (Figura 2) de los microbios más abundantes procesados mediante metagenómica shotgun y ARNr 16S se muestran en azul y naranja, respectivamente, para personas de dos grupos: uno (grupo A) con una dieta occidental (Figura 1.A, Figura 2.A) y el otro (grupo B) con una dieta basada en plantas (Figura 1.B, Figura 2.B). Para ambos grupos, los filos más abundantes son Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria, Actinobacteria y Fusobacteria. y Verrucomicrobia. Las diferencias entre ambos métodos de secuenciación se evaluaron mediante la prueba de Wilcoxon. Para los grupos A y B, se observaron diferencias significativas relacionadas con el método de secuenciación elegido, con una amplia variación en las abundancias de Actinobacteria, Bacteroidetes y Firmicutes, y Proteobacteria. Estos resultados respaldan el hecho de que, especialmente para la mayoría de los filos reportados en la literatura sobre el intestino humano (proporción Firmicutes / Bacteroidetes, Actinobacteria y Proteobacteria), las abundancias relativas dependen en gran medida de la metodología elegida, independientemente del patrón dietético de las personas.

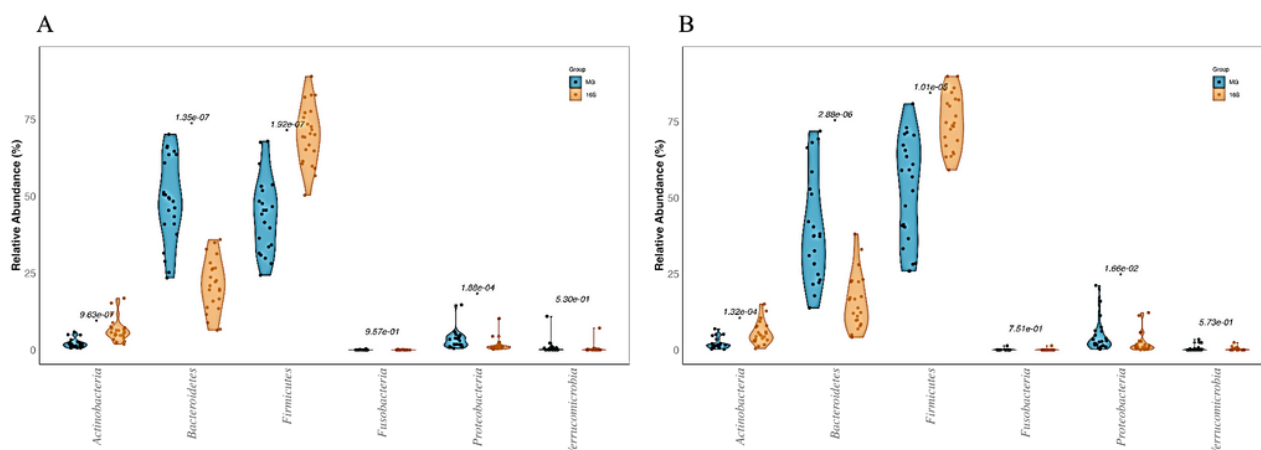


FIGURA 1. GRÁFICOS DE VIOLÍN PARA LOS FILOS MÁS ABUNDANTES EN MUESTRAS DE (A) PERSONAS QUE SIGUEN UN PATRÓN ALIMENTARIO OCCIDENTAL Y (B) PERSONAS QUE SIGUEN UN PATRÓN ALIMENTARIO BASADO EN PLANTAS, MEDIDOS A TRAVÉS DE METAGENÓMICA SHOTGUN (AZUL) Y SECUENCIACIÓN DE ARNR 16S (NARANJA), N = 24. LOS VALORES P INFERIORES A 0,05 SE MUESTRAN CON UN ASTERISCO.

En cuanto al género (Figura 2), los más abundantes que se muestran en el gráfico son *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Blautia*, *Faecalibacterium*, *Lactobacillus* y *Prevotella*. Las diferencias evaluadas mediante la prueba de Wilcoxon muestran resultados significativamente diferentes para el grupo A en *Bacteroides* y *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*, mientras que para el grupo B, sólo *Lactobacillus* muestra diferencias significativas. Como se observa, ciertos géneros reportados aquí, como *Faecalibacterium* (Figura 2), no mostró diferencias significativas según el método de secuenciación, a pesar de pertenecer a un filo que sí exhibió una variación notable, como Firmicutes. (Figura 1). Este escenario destaca que dentro de los Firmicutes filo, hay microbios, a nivel de género, con marcadas diferencias en las abundancias relativas medidas, dependiendo de la metodología de secuenciación empleada.

A nivel de especie (Figura 3), se muestran los 10 microbios más abundantes identificados por cada método de secuenciación. Cabe destacar que ninguna de estas especies se superpone entre ambos métodos, y ninguna especie se encuentra entre los 10 primeros, independientemente de la dieta de los individuos.

ANÁLISIS DE GRUPOS FUNCIONALES POTENCIALES Y ACTIVOS

Las mismas muestras también se analizaron utilizando metatranscriptómica. En el Grupo A (dieta occidental), se identificaron 552 vías metabólicas potenciales a través de metagenómica shotgun, mientras que se detectaron

En cuanto al género (Figura 2), los más abundantes que se muestran en el gráfico son *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Blautia*, *Faecalibacterium*, *Lactobacillus* y *Prevotella*. Las diferencias evaluadas mediante la prueba de Wilcoxon muestran resultados significativamente diferentes para el grupo A en *Bacteroides* y *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*, mientras que para el grupo B, sólo *Lactobacillus* muestra diferencias significativas. 432 vías activas a través de metatranscriptómica. De manera similar, en el Grupo B (dieta basada en plantas), se encontraron 515 vías putativas a través de metagenómica shotgun, en comparación con 389 detectadas a través de metatranscriptómica. Estos hallazgos se alinean con la observación bien establecida de que no todas las vías metabólicas identificadas a nivel de ADN se transcriben activamente en ARN, lo que subraya la diferencia entre las funciones potenciales y las que se expresan realmente. La Figura 4 destaca 9 vías metabólicas seleccionadas para ilustrar las discrepancias entre los genes identificados como funciones potenciales (a través de metagenómica shotgun, MG) y los expresados activamente, medidos por metatranscriptómica (MT), para individuos que siguen una dieta occidental (A) o basada en plantas (B). Los resultados se presentan como mapas de calor, mostrando diferencias significativas en los valores reportados utilizando una escala de color graduada, según los enfoques metodológicos elegidos, MG y MT. En general, la mayoría de las vías metabólicas están activas en ambos grupos, independientemente de la abundancia relativa observada de los genes

correspondientes, indicada por el método MG, o incluso independientemente de los patrones dietéticos. Existen vías identificadas como potenciales con base en datos de MG que se muestran inactivas al analizarse mediante MT, como se ilustra en la Figura 4. Las transiciones de cian a azul o incluso a negro indican el cambio de MG a MT, respectivamente. Curiosamente, también hay casos donde se observa una abundancia relativa muy baja en MG, pero se detecta una alta expresión en MT, como lo muestran las transiciones de negro a rojo.

DISCUSIÓN

Los hallazgos presentados en este estudio resaltan discrepancias significativas entre la abundancia microbiana observada en muestras de heces, lo cual podría tener un gran impacto al buscar asociaciones según los patrones dietéticos al procesarse mediante diferentes metodologías de secuenciación (como en este estudio para el ARNr 16S y la metagenómica shotgun). Nuestros resultados subrayan la complejidad y variabilidad inherentes a la investigación del microbioma, lo que plantea importantes consideraciones para futuros estudios que buscan vincular la ingesta dietética con la composición y función microbiana intestinal, con el objetivo final de fundamentar estrategias prácticas para la nutrición y la medicina personalizadas.

SESGOS METODOLÓGICOS Y SUS IMPLICACIONES

Al seleccionar la metodología de secuenciación, es importante tener en cuenta que existe una diferencia de costos tres veces mayor entre optar por el ARNr 16S y la metagenómica shotgun. Esta diferencia de costos puede llevar a los investigadores a optar por la opción más económica, pero es crucial comprender el alcance y las limitaciones, especialmente cuando se busca obtener información práctica para el avance de la medicina personalizada.

Una de las observaciones más impactantes en nuestro análisis es la profunda influencia de la metodología de secuenciación elegida en los perfiles microbianos resultantes. Como se demuestra en las Figuras 1 y 2, las mismas muestras procesadas mediante secuenciación de amplicones de ARNr 16S y metagenómica shotgun produjeron identificaciones taxonómicas marcadamente diferentes en todos los niveles (filo, género y especie). Mientras que la secuenciación de ARNr 16S capturó

menos taxones en general, la metagenómica shotgun descubrió una gama más amplia de microorganismos, identificando más géneros y especies, muchos de los cuales no fueron detectados por la secuenciación de 16S. Esto concuerda con informes previos que enfatizan las limitaciones de los métodos basados en amplicones, que a menudo no detectan ciertos taxones y brindan información funcional menos completa en comparación con la metagenómica shotgun³¹⁻³³.

Las discrepancias metodológicas observadas tienen consecuencias prácticas para la reproducibilidad y comparabilidad de la investigación sobre el microbioma. Como se observó en nuestro estudio, algunos géneros clave, como *Lactobacillus*, y varios filos, como Actinobacteria, Bacteroidetes y Firmicutes, y Proteobacterias Se demostraron abundancias relativas significativamente diferentes según el método de secuenciación utilizado. Esta variabilidad dificulta el establecimiento de asociaciones claras entre los patrones dietéticos y los perfiles microbianos, lo que ilustra cómo las decisiones metodológicas pueden influir en la interpretación de la composición de la comunidad microbiana^{34,35}. Estos hallazgos sugieren que los resultados de diferentes estudios que utilizan diversos métodos pueden no ser siempre directamente comparables, incluso cuando se investigan los mismos microbios³⁴. Por lo tanto, se necesita un consenso metodológico claro para garantizar la coherencia en futuros estudios.

PATRONES DIETÉTICOS Y ABUNDANCIA MICROBIANA

La asociación entre la dieta y la composición microbiana sigue siendo un área de investigación activa. En nuestro análisis, ambos estudios de caso de dietas basadas en plantas y occidentales demostraron una dependencia de las abundancias microbianas en la metodología de secuenciación, lo que plantea preguntas sobre la generalización de las asociaciones potenciales realizadas en la literatura a través de los patrones dietéticos. Debido a que las revisiones sistemáticas y los metaanálisis constituyen la parte superior de la jerarquía de la evidencia, informar el consenso sobre la ingesta de alimentos según los patrones dietéticos y su impacto en el microbioma intestinal es crucial³⁶. Con el creciente cuerpo de evidencia de que la dieta impacta el intestino humano^{12,14}, su relación con la salud humana, se necesitan estudios de alimentación controlados para identificar sus efectos en la microbiota intestinal^{13,37},

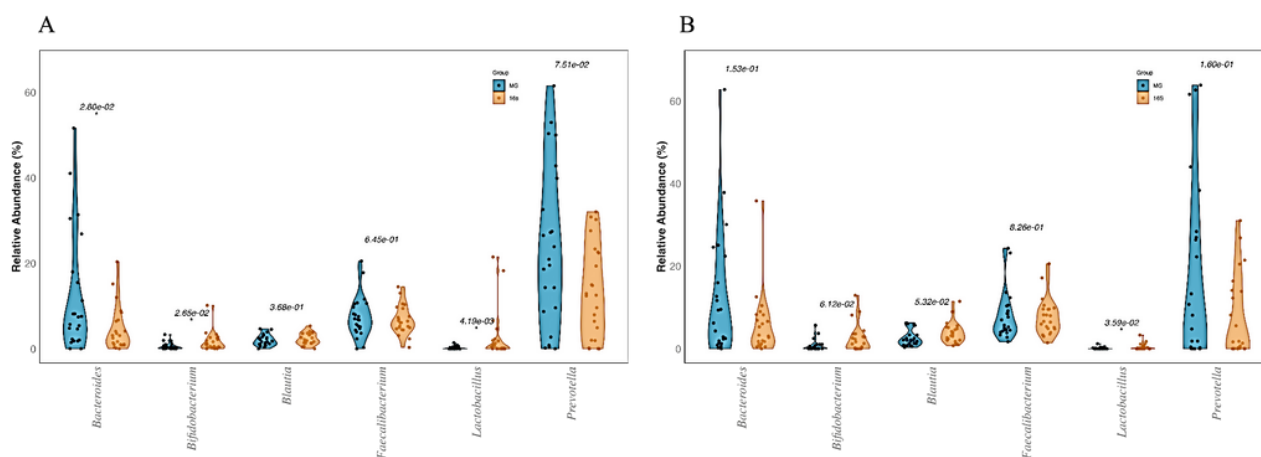


FIGURA 2. GRÁFICOS DE VIOLÍN PARA LOS GÉNEROS MÁS ABUNDANTES EN MUESTRAS DE (A) PERSONAS QUE SIGUEN UN PATRÓN DIETÉTICO OCCIDENTAL Y (B) PERSONAS QUE SIGUEN UN PATRÓN DIETÉTICO BASADO EN PLANTAS MEDIDO A TRAVÉS DE METAGENÓMICA SHOTGUN (AZUL) Y SECUENCIACIÓN DE ARNR 16S (NARANJA), N = 24. LOS VALORES P MENORES DE 0,05 SE MUESTRAN CON UN ASTERISCO.

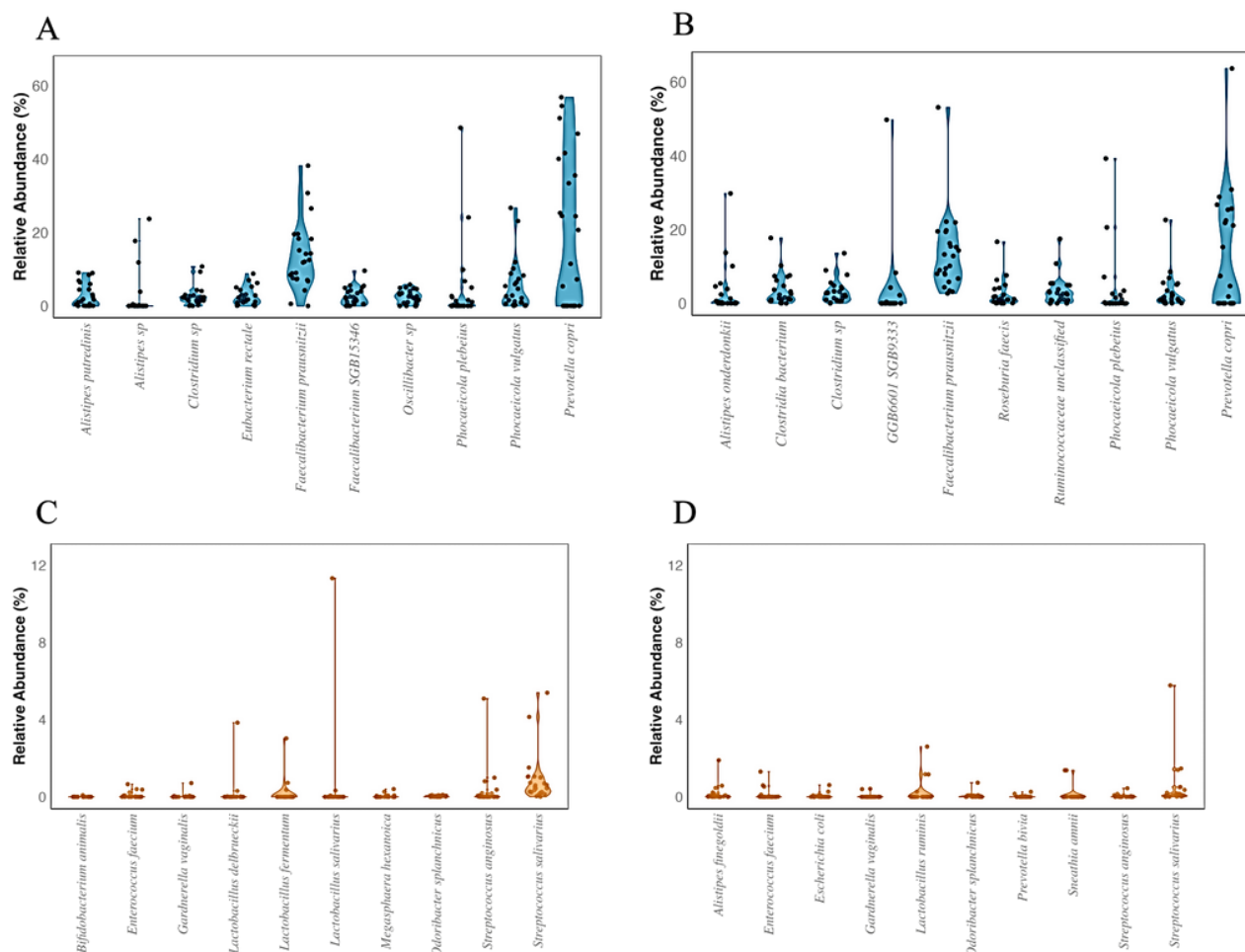


FIGURA 3. GRÁFICOS DE VIOLÍN QUE REPRESENTAN LAS 10 ESPECIES MÁS ABUNDANTES EN MUESTRAS DE INDIVIDUOS QUE SIGUEN UNA DIETA OCCIDENTAL (A, C) Y UNA DIETA BASADA EN PLANTAS (B, D), MEDIDAS MEDIANTE METAGENÓMICA DE ESCOPETA (AZUL) Y SECUENCIACIÓN DE ARNR 16S (NARANJA), N = 24.

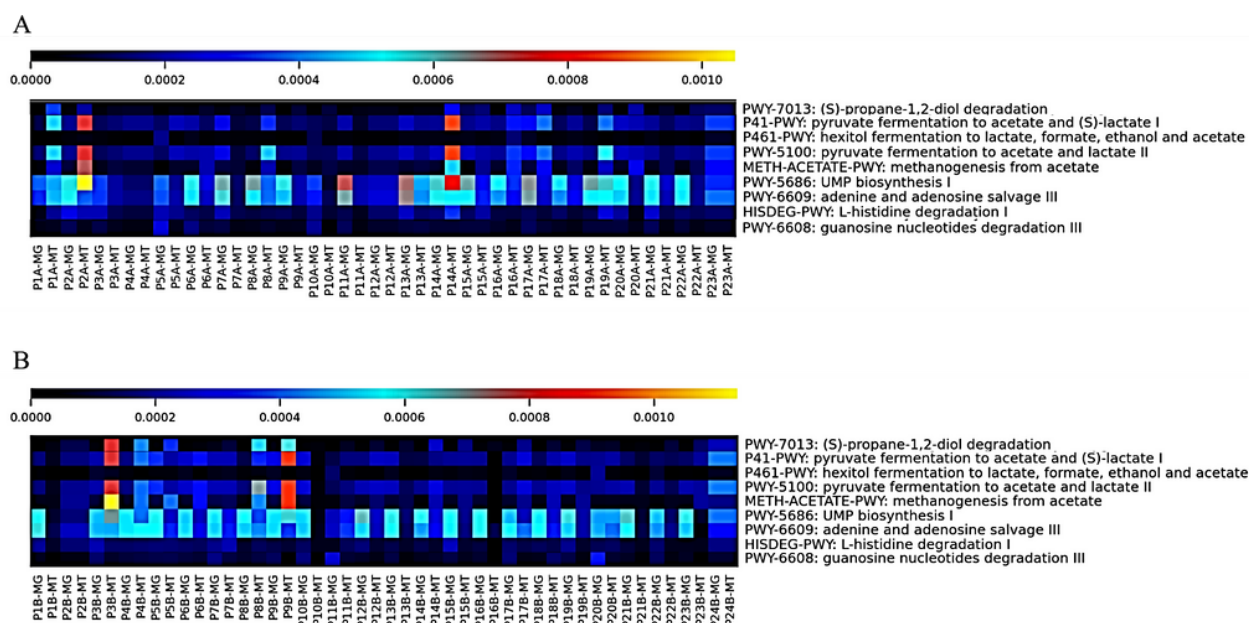


FIGURA 4. MAPAS DE CALOR QUE MUESTRAN NUEVE VÍAS METABÓLICAS OBSERVADAS POR LOS GENES CORRESPONDIENTES COMO FUNCIONES POTENCIALES (MEDIANTE METAGENÓMICA SHOTGUN, MG) Y LAS REALMENTE EXPRESADAS, MEDIDAS MEDIANTE METATRANSCRIPTÓMICA (MT), PARA INDIVIDUOS CON UNA DIETA OCCIDENTAL (A) Y UNA DIETA BASADA EN PLANTAS (B). SE MUESTRAN MUESTRAS DE PARTICIPANTES CON UNA DIETA OCCIDENTAL (A) Y UNA DIETA BASADA EN PLANTAS (B). EL EJE X MUESTRA LOS RESULTADOS DE CADA INDIVIDUO, ETIQUETADOS PARA MG Y MT EN FORMATO INTERCALADO.

teniendo en cuenta estos sesgos metodológicos presentados aquí. El tamaño limitado de la muestra en este estudio restringe nuestra capacidad para realizar un análisis exhaustivo de las diferencias en la composición microbiana entre los dos grupos dietéticos, lo que dificulta sacar conclusiones definitivas con respecto a sus efectos comparativos. Para abordar esta limitación, los estudios futuros deberían aumentar el tamaño de la muestra y centrarse en las contribuciones y relaciones de microbios específicos con los patrones dietéticos investigados.

PERSPECTIVAS FUNCIONALES: METAGENÓMICA SHOTGUN FRENTE A METATRANSCRIPTÓMICA

Si bien la metagenómica shotgun proporciona una visión integral de las capacidades metabólicas potenciales del microbioma intestinal, son los datos metatranscriptómicos los que ofrecen información sobre las vías metabólicas activas. Nuestros hallazgos muestran una clara distinción entre el potencial funcional de la microbiota, detectado por la metagenómica shotgun, y la expresión real de esas funciones, revelada por la metatranscriptómica. En ambos grupos de dieta, un subconjunto de vías metabólicas parecía inactivo a nivel

genómico, pero estaban activos cuando se analizaron a través de transcripciones de ARN, lo que subraya la importancia de incorporar la metatranscriptómica funcional en la investigación del microbioma.³⁸ Por ejemplo, las vías asociadas con la producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) fueron prevalentes tanto en las dietas occidentales como en las basadas en plantas, pero solo una parte de estas vías consideradas aquí se transcribieron activamente. Esto enfatiza la importancia de evaluar tanto las funciones potenciales como las expresadas en el microbioma intestinal, ya que las discrepancias funcionales podrían llevar a interpretaciones erróneas si solo se utilizan métodos basados en ADN. Además, las pronunciadas diferencias en la expresión observadas en vías metabólicas clave resaltan la necesidad de integrar enfoques multiómicos para obtener una comprensión más completa de las contribuciones funcionales del microbioma a la salud humana.^{39,40}

LIMITACIONES Y DIRECCIONES FUTURAS

Si bien este estudio proporciona un análisis exhaustivo de los desafíos de la secuenciación metodológica en la investigación del microbioma, existen varias limitaciones

que deben considerarse. En primer lugar, el tamaño de nuestra muestra, si bien suficiente para revelar sesgos metodológicos de secuenciación, sigue siendo relativamente pequeño. En este sentido, se necesitan estudios de cohorte más amplios para evaluar el impacto de la dieta en los perfiles microbianos, así como otros factores como la genética del huésped, el estilo de vida y las influencias ambientales que no se consideraron en este estudio, pero que se sabe que influyen en la configuración de la microbiota intestinal.

En el futuro, será esencial establecer protocolos estandarizados para el muestreo, la secuenciación y el análisis de datos del microbioma. Esto permitirá obtener resultados más consistentes, comparables y reproducibles en todos los estudios, lo que facilitará el desarrollo de biomarcadores robustos para intervenciones personalizadas en nutrición y salud. Además, ampliar el uso de enfoques multiómicos, en particular la metatranscriptómica, mejorará nuestra comprensión de la dinámica funcional del microbioma. Si bien es posible que estos métodos no produzcan actualmente datos procesables inmediatos para aplicaciones clínicas y nutricionales, allanarán el camino para futuros conocimientos. Alcanzar este objetivo requiere abordar los sesgos metodológicos y profundizar nuestra comprensión de la microbiota, su entorno, las influencias dietéticas y la relación entre el huésped y el microbioma.

CONCLUSIÓN

Este estudio refuerza la importancia de considerar los sesgos metodológicos en la investigación del microbioma y destaca la necesidad crucial de protocolos estandarizados. Las diferencias significativas en la abundancia microbiana observadas entre el ARNr 16S y la metagenómica shotgun enfatizan los desafíos de comparar estudios que emplean diferentes métodos. Además, nuestros hallazgos subrayan el potencial de los enfoques multiómicos para descubrir información funcional que podría pasar desapercibida mediante análisis genómicos por sí solos. A medida que la investigación continúa explorando la relación entre la dieta y el microbioma intestinal, la integración de estas metodologías avanzadas será clave para obtener resultados más precisos y prácticos para una nutrición y salud personalizadas.

AGRADECIMIENTOS

Estamos profundamente agradecidos a los colegas y a la comunidad de MicrobiAr (ClinicalTrials.gov ID NCT05372445) por su colaboración y contribuciones esenciales.

También queremos expresar nuestro sincero agradecimiento a Zymo Research Corporation y a Illumina, Inc. por su invaluable apoyo en este estudio, proporcionándonos kits de procesamiento y secuenciación, esenciales para el desarrollo de nuestra investigación. Estas colaboraciones han sido clave para profundizar nuestra comprensión de las interacciones entre la microbiota y los métodos de secuenciación, y su impacto en la investigación científica.

Este trabajo se realizó con Rodrigo Peralta como beneficiario del Centro de Investigaciones Beca de doctorado Científicas (CIC)

BIBLIOGRAFÍA

1. Yue, Y.-Y. et al. Bibliometric analysis of subject trends and knowledge structures of gut microbiota. *World J. Clin. Cases* 8, 2817–2832 (2020).
2. Lu, G. et al. Global Trends in Research of Pain-Gut-Microbiota Relationship and How Nutrition Can Modulate This Link. *Nutrients* 15, 3704 (2023).
3. Zhang, B. et al. Global research trends on the links between the gut microbiota and diabetes between 2001 and 2021: A bibliometrics and visualized study. *Front. Microbiol.* 13, 1011050 (2022).
4. Cani, P. D. Human gut microbiome: hopes, threats and promises. *Gut* 67, 1716–1725 (2018).
5. Ojo, O., Ojo, O. O., Zand, N. & Wang, X. The Effect of Dietary Fibre on Gut Microbiota, Lipid Profile, and Inflammatory Markers in Patients with Type 2 Diabetes: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomised Controlled Trials. *Nutrients* 13, 1805 (2021).
6. Thursby, E. & Juge, N. Introduction to the human gut microbiota. *Biochem. J.* 474, 1823–1836 (2017).
7. The Human Microbiome Project Consortium. Structure, Function and Diversity of the Healthy Human Microbiome. *Nature* 486, 207–214 (2012).
8. Ley, R. E., Lozupone, C. A., Hamady, M., Knight, R. & Gordon, J. I. Worlds within worlds: evolution of the vertebrate gut microbiota. *Nat. Rev. Microbiol.* 6, 776–788 (2008).
9. Medawar, E., Huhn, S., Villringer, A. & Veronica Witte, A. The effects of plant-based diets on the body and the brain: a systematic review. *Transl. Psychiatry* 9, 226 (2019).
10. Krishnan, S., Alden, N. & Lee, K. Pathways and functions of gut microbiota metabolism impacting host physiology. *Curr. Opin. Biotechnol.* 36, 137–145 (2015).
11. Moreno-del Castillo, M. C., Valladares-García, J. & Halabe-Cherem, J. Microbioma humano. *Rev. Fac. Med. Univ. Nac. Autónoma México* 61, 7–19 (2018).
12. Beam, A., Clinger, E. & Hao, L. Effect of Diet and Dietary Components on the Composition of the Gut Microbiota. *Nutrients* 13, 2795 (2021).
13. David, L. A. et al. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature* 505, 559–563 (2014).
14. Hills, R. D. et al. Gut Microbiome: Profound Implications for Diet and Disease. *Nutrients* 11, 1613 (2019).
15. Laudadio, I. et al. Quantitative Assessment of Shotgun Metagenomics and 16S rDNA Amplicon Sequencing in the Study of Human Gut Microbiome. *Omics J. Integr. Biol.* 22, 248–254 (2018).
16. Ranjan, R., Rani, A., Metwally, A., McGee, H. S. & Perkins, D. L. Analysis of the microbiome: Advantages of whole genome shotgun versus 16S amplicon sequencing. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 469, 967–977 (2016).
17. Kuczynski, J. et al. Experimental and analytical tools for studying the human microbiome. *Nat. Rev. Genet.* 13, 47–58 (2011).
18. Peterson, D. et al. Comparative Analysis of 16S rRNA Gene and Metagenome Sequencing in Pediatric Gut Microbiomes. *Front. Microbiol.* 12, (2021).
19. Martin, M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.journal* 17, 10–12 (2011).
20. Chen, S., Zhou, Y., Chen, Y. & Gu, J. fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 34, (2018).
21. Amir, A. et al. Deblur Rapidly Resolves Single-Nucleotide Community Sequence Patterns. *mSystems* 2, e00191-16 (2017).
22. Quast, C. et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* 41, D590–D596 (2013).
23. Rognes, T., Flouri, T., Nichols, B., Quince, C. & Mahé, F. VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ* 4, e2584 (2016).
24. Bolger, A. M., Lohse, M. & Usadel, B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 30, 2114–2120 (2014).

25. Blanco-Míguez, A. et al. Extending and improving metagenomic taxonomic profiling with uncharacterized species using MetaPhlAn 4. *Nat. Biotechnol.* 41, 1633–1644 (2023).
26. Beghini, F. et al. Integrating taxonomic, functional, and strain-level profiling of diverse microbial communities with bioBakery 3. *eLife* 10, e65088 (2021).
27. SciPy -. <https://scipy.org/>.
28. pandas - Python Data Analysis Library. <https://pandas.pydata.org/>.
29. Matplotlib — Visualization with Python. <https://matplotlib.org/>.
30. Waskom, M. seaborn: statistical data visualization. *J. Open Source Softw.* 6, 3021 (2021).
31. Durazzi, F. et al. Comparison between 16S rRNA and shotgun sequencing data for the taxonomic characterization of the gut microbiota. *Sci. Rep.* 11, 3030 (2021).
32. Campanaro, S., Treu, L., Kougias, P., Zhu, X. & Angelidaki, I. Taxonomy of anaerobic digestion microbiome reveals biases associated with the applied high throughput sequencing strategies. *Sci. Rep.* 8, (2018).
33. Bikel, S. et al. Combining metagenomics, metatranscriptomics and viromics to explore novel microbial interactions: towards a systems-level understanding of human microbiome. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 13, 390–401 (2015).
34. Pollock, J., Glendinning, L., Wisedchanwet, T. & Watson, M. The Madness of Microbiome: Attempting To Find Consensus “Best Practice” for 16S Microbiome Studies. *Appl. Environ. Microbiol.* 84, e02627-17 (2018).
35. Quince, C., Walker, A. W., Simpson, J. T., Loman, N. J. & Segata, N. Shotgun metagenomics, from sampling to analysis. *Nat. Biotechnol.* 35, 833–844 (2017).
36. Blake, P., Durão, S., Naude, C. E. & Bero, L. An analysis of methods used to synthesize evidence and grade recommendations in food-based dietary guidelines. *Nutr. Rev.* 76, 290–300 (2018).
37. Kaczmarek, J. L. et al. Broccoli consumption affects the human gastrointestinal microbiota. *J. Nutr. Biochem.* 63, 27–34 (2019).