

Universidad Católica de Santa María

Escuela de Postgrado

Doctorado en Ciencias de la Salud



**IDENTIFICACIÓN DE LA MICROBIOTA INTESTINAL DE NIÑOS
MENORES DE 10 AÑOS CON ANEMIA FERROPÉNICA
MEDIANTE NEXT GENERATION SEQUENCING**

Tesis presentada por el Maestro

Díaz Rodríguez, Karla Fiorella

Para optar el Grado Académico de

Doctora en Ciencias de la Salud

Asesor (a):

Dra. Pacheco Aranibar, Jani

Arequipa- Perú

2022

DICTAMEN APROBATORIO

UCSM-ERP

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA
ESCUELA DE POSTGRADO
DICTAMEN APROBACIÓN DE BORRADOR DE TESIS

Arequipa, 15 de Julio del 2022

Dictamen: 000050-C-EPG-2022

Visto el borrador del expediente 000050, presentado por:

2019000062 - DIAZ RODRIGUEZ KARLA FIORELLA

Titulado:

**IDENTIFICACIÓN DE LA MICROBIOTA INTESTINAL DE NIÑOS MENORES DE 10 AÑOS CON
ANEMIA FERROPÉNICA MEDIANTE NEXT GENERATION SEQUENCING**

Nuestro dictamen es:

APROBADO

**0913 - GUTIERREZ ARANIBAR ROXANA JACQUELINE
DICTAMINADOR**



1051 - VILLANUEVA SALAS JOSE ANTONIO DICTAMINADOR



**1058 - DAVILA DEL CARPIO GONZALO HERMILIO
DICTAMINADOR**



1072 - BERNABE ORTIZ JULIO CESAR DICTAMINADOR



**6998 - VILLEGAS LLERENA CLAUDIO NICOLAS
DICTAMINADOR**



Dedicatoria

Dedico mi tesis Doctoral en primer lugar a Dios, por ser el ser más importante en mi vida. A mis amados padres, Luisa y Victor por todo su amor, sacrificio y apoyo incondicional, por ser los mejores padres que pudo haberme regalado la vida. A Emerson, por su cariño y compañía, gracias por tus palabras de aliento y ser mi soporte.



Agradecimiento

Esta investigación ha sido financiada por el Proyecto Concytec - Banco Mundial “Mejoramiento y ampliación de los servicios del Sistema Nacional de Ciencia Tecnología e Innovación Tecnológica” 8682-PE, a través de su unidad ejecutora ProCiencia, proyecto “Doctorados en Ciencias de la Salud”, con código 09-2018-FONDECYT-BM en convenio con la Universidad Católica de Santa María como Institución Ejecutora.

Agradezco de manera especial al Dr. Julio Cesar Bernabé Ortiz, a la Dra. Jani Pacheco Aranibar y al Dr. José Villanueva Salas.

Agradezco a mis familiares y amigos su cariño.

RESUMEN

La microbiota intestinal tiene la presencia de microorganismos que son responsables de ciertas funciones metabólicas en nuestro organismo. Asociada a distintas enfermedades, esta puede verse alterada, lo que supone efectos negativos en los roles que estos cumplen. Una de las afecciones más preocupantes en nuestro país es la anemia por deficiencia de hierro (IDA), principalmente los niños están más propensos a esta afección debido a una variedad de factores, la adherencia, genética, falta de alimentos ricos en hierro, entre otros. La IDA involucra una proliferación en cierto tipo de microorganismos en el tracto gastrointestinal y la disminución de ciertas especies.

En el presente estudio se busca la identificación de la microbiota intestinal en niños con IDA en las regiones de Arequipa y Tacna, para lo cual se realizó un proceso de extracción de ADN microbiano en muestras de heces, para luego ser amplificadas por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del gen 16S rRNA y finalmente ser secuenciadas mediante la tecnología Next Generation Sequencing (NGS), siguiendo los protocolos de bioseguridad y respetando las consideraciones éticas del trato al paciente. En el presente estudio se determinó mayor presencia del phylum *Proteobacteria* y *Actinobacteriota* en niños con anemia, así como la disminución del phylum *Firmicutes*, adicionalmente se evidencia que el taxón de bacterias con cambio estadísticamente significativo ($p < 0,05$) en niños con anemia presenta la familia de *Rikenellaceae*, en los niños control se encuentra el género *Agathobacter* y la especie *Eubacterium rectale*, por último en los niños recuperados de anemia se encuentra el género *Alloprevotella* y la especie *Prevotella melaninogenica*.

Palabras claves:

Anemia por deficiencia de hierro, Microbiota gastrointestinal, Next Generation Sequencing



ABSTRACT

The intestinal microbiota has the presence of microorganisms that are responsible for certain metabolic functions in our body. Associated with different diseases, this can be altered, which has negative effects on the roles they play. One of the most worrying conditions in our country is iron deficiency anemia (IDA), mainly children are more prone to this condition due to a variety of factors, adherence, genetics, lack of iron-rich foods, among others. The IDA involves a proliferation in certain types of microorganisms in the gastrointestinal tract and the decrease of certain species.

In the present study, the identification of the intestinal microbiota in children with IDA in the regions of Arequipa and Tacna is sought, for which a microbial DNA extraction process was carried out in stool samples, to be later amplified by Polymerase Chain Reaction (PCR) of the 16S rRNA gene and finally be sequenced using Next Generation Sequencing (NGS) technology, following biosafety protocols and respecting the ethical considerations of patient treatment. In the present study, a greater presence of the phylum *Proteobacteria* and *Actinobacteriota* was determined in anemic children, as well as the decrease of the phylum *Firmicutes*, additionally it is evidenced that the taxon of bacteria with statistically significant change ($p < 0.05$) in anemic children presents the family of *Rikenellaceae*, in the control children the genus *Agathobacter* and the species *Eubacterium rectale* are found, finally in the children recovered from anemia the genus *Alloprevotella* and the species *Prevotella melaninogenica* are found.

Key words:

Iron deficiency anemia, Gastrointestinal microbiota, Next Generation Sequencing

INDICE

DICTAMEN APROBATORIO

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTO

RESUMEN

ABSTRACT

INTRODUCCIÓN

HIPÓTESIS

OBJETIVOS

CAPÍTULO I..... 5

MARCO TEÓRICO..... 5

1. Microbioma humano..... 6

1.1. Funciones del microbioma en el cuerpo humano 6

1.2. Distribución del microbioma en el cuerpo 7

1.3. Microbioma intestinal..... 8

1.4. Gen 16s rRNA 9

2. Anemia..... 10

2.1. Clasificación de la anemia..... 11

2.2. Anemia por deficiencia de hierro 12

2.3. Metabolismo del hierro en el cuerpo humano 14

2.4. Epidemiología de la anemia en el Perú 15

3. Asociación del microbioma intestinal y la anemia 15

4. Técnicas moleculares..... 16

4.1. Extracción de ADN bacteriano..... 17

4.2. Secuenciamiento de siguiente generación 18

4.3. Bioinformática y estadística 19

CAPÍTULO II..... 22

METODOLOGÍA..... 22

2.1. Pacientes y muestreo 23

2.2. Extracción de ADN microbiano 25

2.3. Amplificación por PCR 29

2.4. Secuenciamiento por NGS 30

2.4.1. Requerimiento de calidad de muestras de DNA 30

2.4.2. Construcción de bibliotecas, control de calidad y secuenciación 30

2.5. Análisis de información.....	31
2.5.1. Procesamiento de datos de secuenciación.....	31
2.5.2. Clúster OTU y anotación taxonómica.....	32
2.5.3. Diversidad alfa	33
2.5.4. Diversidad beta.....	33
CAPÍTULO III	36
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	36
3.1. Datos clínicos y bioquímicos.....	37
3.2. Amplificación del gen 16S rRNA	37
3.2. Control de calidad estadístico.....	38
3.3. Análisis OTU y anotación taxonómica.....	41
3.3.1. Identificación de OTU y anotación taxonómica	41
a. Resumen de la anotación.....	41
b. Pantalla GraPhlAn.....	43
c. Árbol taxonómico	43
d. KRONA	46
3.3.2. Composición del análisis de la comunidad microbiana	46
a. Abundancia relativa	46
b. Mapa de calor del clúster de abundancia taxonómica.....	48
c. Ternary plot.....	52
d. El árbol evolutivo en género.	53
3.4. Índices de diversidad alfa.....	54
3.4.2. Curvas de biodiversidad.....	55
3.4.3. Diagrama de Venn and flower	57
3.4.4. Diferencia de índices de diversidad alfa entre grupos	60
3.5. Diversidad Beta	60
3.5.2. Mapa de calor de diversidad beta.....	60
3.5.3. La diferencia de los índices de Diversidad Beta entre grupos	61
3.5.4. Análisis de coordenadas principales (PCoA).....	63
3.5.5. Análisis de componentes principales (PCA).....	64
3.5.6. Escalamiento multidimensional no métrico (NMDS).....	64
3.5.7. Método de grupos de pares no ponderados con media aritmética (UPGMA)	65
3.5.8. Análisis de diferencias comunitarias.....	67
a. Análisis de Similitud (Anosim).....	67
b. Análisis de procedimiento de permutación de respuesta múltiple (MRPP).....	69
3.5.9. Análisis de especies de variación entre grupos	70

a. Prueba T	70
b. Análisis LEfSe	71
CONCLUSIONES	75
RECOMENDACIONES	76
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77
ANEXOS.....	92



INDICE DE FIGURAS

Figura 1 Influencia de factores sobre el microbioma intestinal... Error! Bookmark not defined.	
Figura 2 Metodología ómicas para el estudio de microbiota intestinal en niños con IDA.....	17
Figura 3 Tecnología NGS por Illumina.....	19
Figura 4 Regiones hipervariables del gen 16S rRNA y primer universales.....	20
Figura 5 Esquema de extracción de DNA a partir de muestras de heces.	26
Figura 6 Esquema de electroforesis para evidenciar presencia de bandas.	28
Figura 7 Flujiograma para la construcción de la librería.	31
Figura 8 Amplificación del gen 16S rRNA. (A) Muestra A1-A12. (B) Muestra A13-A18.....	39
Figura 9 Resumen de las etiquetas y número de OTU de cada muestra.	42
Figura 10 Diagrama GraPhlAn de niños con anemia.	44
Figura 11 Árbol taxonómico.	45
Figura 12 Abundancia relativa en phylum.	47
Figura 13 Abundancia relativa en phylum por grupos.	48
Figura 14 Mapa de calor del conglomerado de abundancia taxonómica (A) muestras A1-A18. (B) grupos AA, C, RA.	50
Figura 15 Ternary Plot.....	53
Figura 16 El árbol evolutivo en género.	54
Figura 17 Curvas de rarefacción.	56
Figura 18 Curvas de abundancia de rango.....	57
Figura 19 (A) Diagrama Venn y Flower para C. (B) Diagrama Venn y Flower para RA (C)Diagrama de Flower para AA.	58
Figura 20 Caja de bigotes (A) especies observadas. (B) shanon.....	59
Figura 21 Mapa de calor de diversidad beta.....	61
Figura 22 Diagrama de caja basado en la distancia Unifrac. (A) No ponderada (B) Ponderada.....	62
Figura 23 Análisis de Componentes Principales (PoCA).....	63
Figura 24 PCA de muestras de estudio.....	64
Figura 25 NMDS.	65
Figura 26 Árbol de clústeres UPGMA basado en la distancia Unifrac ponderada.	66
Figura 27 Árbol de clústeres UPGMA basado en la distancia Unifrac no ponderada.	67
Figura 28 Resultado de anosim.	68
Figura 29 Análisis de prueba T entre grupos.....	70
Figura 30 Histograma de puntuaciones LDA.....	72
Figura 31 Cladograma.	73
Figura 32 Muestras de niños con anemia A1,A4,A5,A6,A10,A11,A13,A16,A17,A18	95
Figura 33 Cont. Muestras de niños con anemia A1,A4,A5,A6,A10,A11,A13,A16,A17,A18....	96
Figura 34 Muestras de niños control A2,A3,A7,A12.....	97
Figura 35 Muestras de niños recuperados de anemia A8,A9,A14,A15	98

INDICE DE TABLAS

Tabla 1 Clasificación de la anemia.....	12
Tabla 2 Distribución de Muestras según los grupos de pacientes en estudio	24
Tabla 3 Datos clínicos de los pacientes en estudio.....	37
Tabla 4 Datos bioquímicos de pacientes en estudio	38
Tabla 5 Control de calidad estadístico.	40
Tabla 6 Índices de diversidad alfa.....	55
Tabla 7 Resultados de Anosim.....	67
Tabla 8 Resultado MRPP	69



LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Niños con anemia
A#	Número de muestra
C	Niños control del estudio
GI	Tracto Gastrointestinal
ID	Deficiencia de hierro
IDA	Anemia por deficiencia de hierro
INEI	Instituto Nacional de Estadística e Informática
NGS	Next Generation Sequencing
OTU	Unidad Taxonómicas Operativa
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
QIIME	Quantitative Insights Into Microbial Ecology
RA	Niños recuperados de anemia

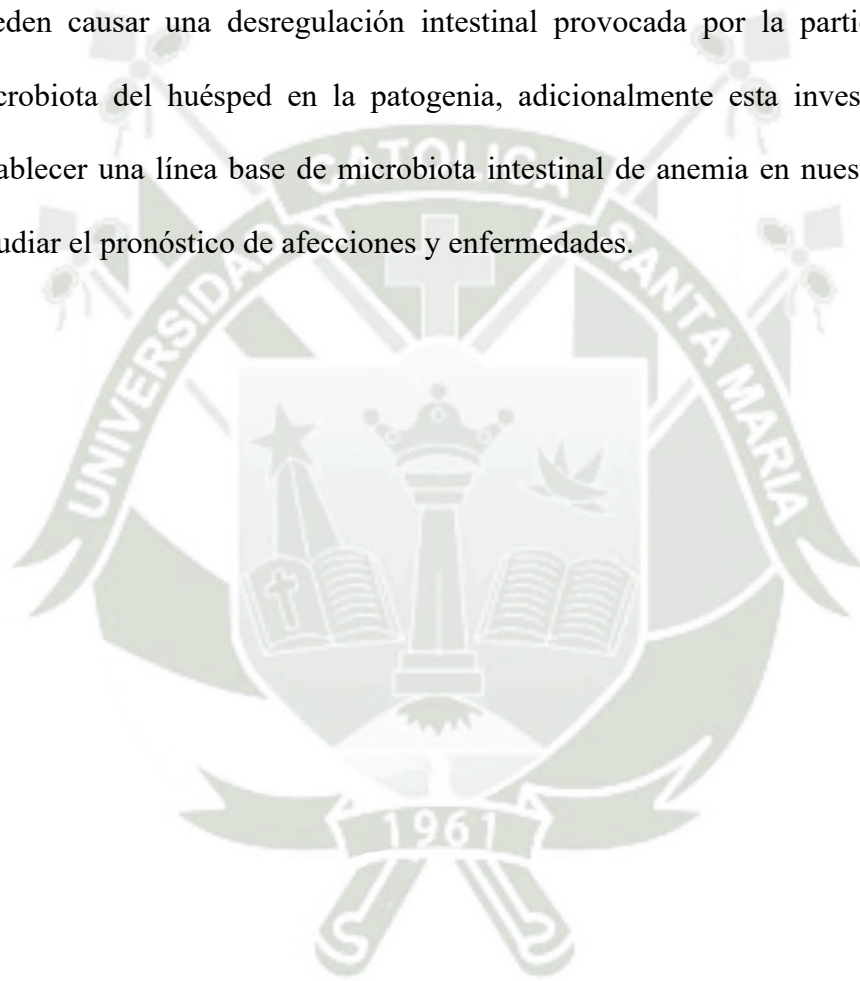
INTRODUCCIÓN

Dentro de nuestro cuerpo vive una comunidad de microorganismos denominada microbiota, existe una población microbiana diversa y abundante dentro del intestino, a esta población se le conoce como microbiota intestinal, alberga aproximadamente 100 mil millones de microbios (Sebastián-Domingo & Sánchez-Sánchez, 2018). La tecnología NGS, se utiliza principalmente para identificar la microbiota intestinal; durante las últimas dos décadas, este método se ha utilizado ampliamente en estudios de investigación, centrándose particularmente en la microbiota humana, su asociación con la salud y distintas enfermedades (Boers et al., 2019).

En nuestro país una de las afecciones más relevantes en salud pública es la anemia, en todo el mundo alrededor de la mitad de casos puede ser causado por la deficiencia de hierro (ID), a nivel nacional, según el último censo del Instituto Nacional de Estadística e Informática (INEI) en el año 2017, la prevalencia de anemia fue de 43.6% en niños menores de 3 años (MINSA, 2017) (Ministerio de Desarrollo e Inclusión Social, 2018). El hierro puede influir en la variedad y cantidad de la microbiota intestinal, este micronutriente es un componente esencial en las células del cuerpo, fundamental para la síntesis de hemoglobina trabajando en el transporte de oxígeno y mioglobina, su deficiencia puede causar anemia lo que puede desembocar en diferentes síntomas como fatiga, taquicardia, o afectar el desarrollo intelectual de los niños que en un futuro puede causar una repercusión en la productividad de todo un país (DeLoughery, 2017). Este micronutriente es abundante en el medio ambiente y está presente en abundantes procesos biológicos como la respiración, la producción de

hidrógeno, y la biosíntesis de ADN. De vital importancia es la disponibilidad de hierro para muchos organismos vivos, especialmente microorganismos y seres humanos (Wang, 2016).

En este trabajo de investigación se dará a conocer la identificación de la microbiota intestinal en niños con IDA, su importancia radica puesto que ciertos microorganismos pueden causar una desregulación intestinal provocada por la participación de la microbiota del huésped en la patogenia, adicionalmente esta investigación busca establecer una línea base de microbiota intestinal de anemia en nuestra región para estudiar el pronóstico de afecciones y enfermedades.



HIPÓTESIS

Debido a que la anemia por deficiencia de hierro es un problema de salud pública que puede causar un cambio en la homeostasis microbiana intestinal es probable que se logre caracterizar molecularmente la microbiota de niños con anemia por deficiencia de hierro.



OBJETIVOS

Objetivo General

Identificar el microbioma de niños con anemia por deficiencia de hierro mediante Next Generation Sequencing.

Objetivos Específicos

1. Caracterizar molecularmente las bacterias que conforman el microbioma de niños con anemia ferropénica.
2. Obtener la filogenia del microbioma de niños con anemia ferropénica.
3. Comparar la diversidad microbiana en los grupos de niños con anemia, recuperados de anemia y control.



CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1. Microbioma humano

El ser humano y los microorganismos que con él conviven conforman el microbioma humano, tiene gran relación con aspectos fisiológicos y regula la homeostasis metabólica, el sistema inmune y el funcionamiento del sistema nervioso central, es necesario para, síntesis de nutrientes, digestión de alimentos y prevención de gran cantidad de enfermedades, algunos factores influyen sobre el microbioma humano como humedad, presencia de nutrientes, temperatura, entre otros (Sommer & Bäckhed, 2013).

Según la revisión de Suárez Moya (2017) 100 billones de microorganismos están contenidos en el microbioma intestinal, con más de 1000 especies diferentes, y más de 3 millones de genes. aproximadamente un tercio de la microbiota intestinal es común para la gran parte de la población, sin embargo existe una proporción de microorganismos que son específicos de cada persona (Suárez Moya, 2017).

La composición bacteriana inicial del bebé dependerá del tipo de parto, alimentación, uso de antibióticos y del entorno donde se desarrollara el crecimiento, un bebé alimentado con leche materna predomina en su composición por *Bacteroides*, *Clostridios* y *Enterobacterias*, al comenzar la alimentación con sólidos se produce una población microbiana compleja y estable (Barko et al., 2018).

1.1. Funciones del microbioma en el cuerpo humano

Existen varias funciones esenciales que son atribuidas al microbioma intestinal en el huésped humano, como la fermentación de ciertos componentes alimenticios de tipo

no digerible en metabolitos de tipo absorbible, la eliminación de compuestos tóxicos, la síntesis de algunas vitaminas esenciales, la competencia con los patógenos, la regulación del sistema inmune y el fortalecimiento de la barrera intestinal (Heintz-Buschart & Wilmes, 2018).

Tiene un rol importante en el desarrollo de células “T” y perfiles de citoquinas, además protección contra patógenos, procesamiento de nutrientes, simulación de angiogénesis, además los microorganismos producen vitaminas que no son sintetizadas (Dostal et al., 2015) (Shetty et al., 2013).

El microbioma está ampliamente relacionado con diversas enfermedades, por ejemplo en diabetes, a la vez la reducción de butirato y el estrés oxidativo y la anorexia (Duranti et al., 2017) (Koleva et al., 2015).

La obesidad, enfermedades inflamatorias (IBD) y enfermedades Celiacas (CED), también son relacionadas con el microbioma (Zuo & Ng, 2018) (Cenit et al., 2015).

La alteración de la microbiota intestinal conocida como disbiosis está relacionada también a la hepatitis, la enfermedad inflamatoria del hígado, el cáncer, desnutrición, entre otras afecciones crónicas (Barko et al., 2018).

1.2. Distribución del microbioma en el cuerpo

El cuerpo humano alberga a un gran número de microorganismos, que se encuentran distribuidos en piel, boca, nariz, orejas y demás (Gupta et al., 2017) (Peñalver Bernabé et al., 2018).

Existen distintos tipos de microbioma según la ubicación en el cuerpo humano.

a. Microbioma en el tracto respiratorio superior: existencia de nichos ecológicos donde se encuentra gran cantidad de flora microbioma y donde se ha encontrado una

conexión ente microbioma aberrante, alergias y asma (Hanshew et al., 2017).

b. Microbioma de la cavidad oral: Este microbioma compone alrededor del 25% del microbioma humano, en el “Human Oral Microbiome Database” se señala 700 especies procariotas, en individuos sin caries se ha visto la presencia de *Streptococcus dentisanni*, *Streptococcus*, *Granulicatella* y *Veillonella* (Sharma et al., 2018) (Bik, 2009).

c. Microbiota del esófago y estómago: Muy similar al microbioma oral, pero en el estómago hay poca cantidad de bacterias debido al ácido como por lo que se sugiere una flora completamente distinta, cabe mencionar que el esófago puede contener individuos que estén presentes en alimentos (Wurm et al., 2018).

d. Microbioma intestinal: Es el responsable de algunas funciones fisiológicas y que el intestino delgado no ha sido capaz de digerir por si mismo, vitamina B y K que el organismo puede sintetizar y de colaboración con el sistema inmune, 1/3 del microbioma intestinal es común en la mayoría de la población, anaerobios son producidos en el ileon terminal y en el colon, aquí está el mayor contenido de microorganismos, se dice que el microbioma intestinal se produce luego del destete, además si el nacimiento es por parto natural el feto será colonizado por microorganismos (Suárez Moya, 2017).

e. Microbiota piel: Se encuentra principalmente Actinobacteria (Binda et al., 2018), Firmicutes (Walker, 2016) y Proteobacteria (Bik, 2009). La microbiota de piel se divide en dos grupos, microorganismos residentes y microorganismos transitorios (Dréno et al., 2016).

1.3. Microbioma intestinal

Dice Lakshminarayanan et al. (2014) que la colonización microbiana en el intestino humano comienza inmediatamente después del nacimiento del bebé, siendo una composición inestable, al ser adulto la composición se vuelve estable (Lakshminarayanan et al., 2014).

El tracto gastrointestinal (GI) contiene aproximadamente 70% del total de los microbios en el cuerpo, es uno de los sitios preferidos por los microorganismos debido a la temperatura y riqueza de moléculas que actúan como nutrientes, últimos estudios señalan que la ID (Camaschella, 2017) y la IDA (Stelle et al., 2019) causan cambios desfavorables en el microbioma intestinal, existe una gran relación entre microorganismos del intestino delgado y los seres vivos comenzando en el nacimiento y continuando en toda la vida (Arrieta et al., 2014) (Meropol & Edwards, 2015).

La investigación sobre el microbioma intestinal es muy amplia y está progresando a través de varios pasos que reflejan los de otros campos en otros sistemas biológicos: (1) recolección de listas de partes, (2) asociación del sistema o sus componentes a factores externos, (3) conocimiento funcional y (4) traducción de ese conocimiento en aplicaciones (Schmidt et al., 2018).

La Figura 1 muestra algunos factores importantes que pueden influir en la microbiota intestinal, siendo estos la herencia, el estilo de vida, el tipo de nacimiento, la edad, la ubicación geográfica y la alimentación.

1.4. Gen 16s rRNA

La secuencia del gen 16S rRNA fue utilizada por primera vez en el año 1985

para análisis filogenético, contiene regiones altamente conservadas para el diseño del cebador o primer y regiones hipervariables para identificar las características filogenéticas de los microorganismos, la secuencia del gen 16S rRNA se convirtió en el gen marcador más utilizado para perfilar comunidades bacterianas (B. Yang et al., 2016). La diversidad de secuencias, varía según el gen 16S rRNA, estas darán a conocer la diferenciación entre especies bacterianas, , se han identificado nueve regiones del gen 16S rRNA de alta variabilidad de secuencia (denominadas regiones hipervariables V1-V9 (Graspeuntner et al., 2018) (Chaudhary et al., 2015), éstas regiones tienen longitudes y conservación variables y, por lo tanto, densidad de información, lo que resulta en una capacidad diferente para distinguir entre bacterias (Watts et al., 2017).

Los primeros estudios microbianos humanos se basaron en técnicas de reconocimiento de huellas dactilares, que viene a ser la separación física de los genes 16S rRNA mediante el análisis de polimorfismo de la longitud del fragmento de restricción terminal y la electroforesis en gel de gradiente desnaturizante (Grice & Segre, 2012). Actualmente, se cuenta con tecnología para caracterizar de manera rápida y precisa las poblaciones microbianas, actualmente muchos investigadores trabajan con plataforma de pirosecuenciación Roche/454 (Hirai et al., 2017) e Illumina (Bronner & Quail, 2019). Para seleccionar una plataforma deben considerar muchos errores asociados al estudio de bacterias. Aunque las tecnologías de secuenciamiento de siguiente generación eliminan los sesgos de clonación asociados con la secuenciación de Sanger (Arnold et al., 2016).

2. Anemia

La anemia es definida como una condición en la cual el cuerpo humano tiene una porción reducida de eritrocitos o glóbulos rojos, también puede ser definida como una disminución en la cantidad de hemoglobina comparada con controles en cuanto a edad estos valores normales definidos con un 95% de confianza (Vieth & Lane, 2017).

La anemia puede causar un efecto adverso en la actividad motora y el desarrollo cognitivo de los infantes, afectar la productividad en adultos lo que puede causar una tendencia negativa en el desarrollo socioeconómico de un país (Jablonka et al., 2018)

La anemia es definida como un problema presente en la salud pública, puede aparecer en cualquiera de las fases de la vida sin embargo con mayor incidencia en niños de 24 meses a 12 años y en embarazadas (Barragan et al., 2015).

Muleviciene et al. (2018) la anemia es una afección distribuida en todo el mundo, aproximadamente el 50% de los casos, son causados por ID, siendo los niños los más vulnerables por sus requerimientos en el crecimiento (Muleviciene et al., 2018).

Existen algunos factores que juegan un papel resaltante en cuanto a las causas de anemia como infecciones parasitarias, por bacterias o virus, así como deficiencia en micronutrientes y otras patologías (Vieth & Lane, 2017).

2.1. Clasificación de la anemia

Se clasifica la anemia como aguda o crónica, siendo la anemia aguda causada por hemorragia, ruptura de aneurisma, pérdida de sangre gastrointestinal y ruptura de embarazo ectópico, a diferencia de la anemia crónica que no es causada por la pérdida de glóbulos rojos y aquí se encuentra una clasificación más amplia, la primera se basa en observaciones de Wintrobe de que la dimensión de los glóbulos rojos puede

distinguir las posibles etiologías de la anemia, como microcítica, normocítica y macrocítica (Vieth & Lane, 2014) (Cascio & DeLoughery, 2017).

En la Tabla 1 se puede observar la clasificación de anemia como lo describen diferentes autores de forma más detallada (Wang, 2016) (Vieth & Lane, 2014) (Cascio & DeLoughery, 2017) .

2.2. Anemia por deficiencia de hierro

Según describe Yilmaz & Li (2018), existen diferentes tipos de anemia, siendo la más prevalente la IDA o anemia ferropénica (B. Yilmaz & Li, 2018).(Ver Tabla 1)

Tabla 1 Clasificación de la anemia

Tamaño		
Microcítica (Cappellini et al., 2020)	○	Deficiencia de hierro
	○	Talasemia
	○	Anemia sideroblástica
	○	Anemia de la inflamación
Macrocítica (Moore & Adil, 2022)	Redondo	○ Anemia aplásica
		○ Hipotiroidismo
		○ Enfermedad del hígado
		○ Enfermedad renal
		○ Reticulocitosis
		○ Enfermedad de tiroides
	Ovalado	○ Deficiencia de vitamina B12 y folato(Moore & Adil, 2022)
		○ quimioterapia
		○ Síndrome mielodisplásico
Normocítica (G. Yilmaz & Shaikh, 2021)	○	Anemia de la inflamación
	○	Hemólisis de inicio agudo o pérdida de sangre.
	○	Enfermedad renal
Mecanismo		
Pérdida creciente	○	Hemorragia
	○	Hemólisis (defectos inmunitarios, microangiopáticos, intrínsecos de glóbulos rojos)
Producción disminuida	○	Células madre (síndrome mielodisplásico, leucemia aguda)
	○	Nutricional (hierro, vitamina B12, ácido fólico, cobre)
	○	Toxina / droga

- Falta de factores de crecimiento (enfermedad renal, anemia de enfermedad crónica)
- Proceso mielofísico (cáncer metastásico, infección, fibrosis)

Fuente: Elaboración propia. Tomado de (Cappellini et al., 2020) (Moore & Adil, 2022) (G. Yilmaz & Shaikh, 2021)

En los primeros 6 meses de vida, los bebés utilizan el hierro acumulado en su etapa fetal, generalmente se necesitan fuentes externas de hierro debido a que este micronutriente no es suficiente en la leche materna, adicionalmente la deficiencia de hierro puede generar una serie de inconvenientes puesto que puede afectar el cerebro, así como al desarrollo neurológicos, y psicomotor, debido a que este es un componente de las enzimas necesarias para los neurotransmisores (Cerdó et al., 2019).

La ID durante los últimos períodos prenatales y postnatales tempranos es un factor de riesgo para anomalías a largo plazo del desarrollo neurológico (Cusick et al., 2018).

La deficiencia de hierro causa diferentes problemas en el cerebro disminuyendo el coeficiente intelectual, problemas cardíacos o desarrollo de músculos, a la vez causa problemas cognitivos y de desarrollo social – emocional, de esta manera teniendo consecuencias económicas desfavorables (Gulec et al., 2014).

El hierro es vital para microorganismos y tiene un impacto directo en la interacción huésped-microbiota, funciona como un cofactor universal de proteínas como la hemoglobina y para enzimas involucradas con transporte de oxígeno, respiración mitocondrial, crecimiento y diferenciación celular, una mala absorción de hierro causa problemas en las respuestas inmunitarias de la mucosa del huésped (B. Yilmaz & Li, 2018).

En el mundo existen diferentes tratamientos para combatir la anemia, fortificación y suplementación de hierro con diversos micronutrientes (Tanja Jaeggi et al., 2014).

2.3. Metabolismo del hierro en el cuerpo humano

El Hierro se encuentra en dos formas, inorgánico Fe (III), deberá reducirse a Fe (II) por las ferriductasas, hierro hemo (de la carne, disponible del 5-10% de hierro, más fácil absorción); y también la ferritina, sin embargo no está bien identificada, sugiriendo que el hierro se libera y entra en una vía común en el enterocito como hierro inorgánico (B. Yilmaz & Li, 2018).

El vaso, el hígado y médula ósea mantienen una fracción transitoria del hierro mientras que dentro de la ferritina (Yévenes, 2017), se acumula el exceso de hierro, el hierro tiene un papel en las reacciones enzimáticas que implica transferencia de electrones la captación de hierro se da en el duodeno y yeyuno superior (B. Yilmaz & Li, 2018).

Para que el hierro pase a nivel celular se produce a través de los enterocitos y se exporta por la ferroportina (Drakesmith et al., 2015), a través de un mecanismo dependiente de la oxidación de hierro por un enlace de membrana hephaestina oxidasa multicobre que permite la unión entre transferrina plasmática y el hierro (B. Yilmaz & Li, 2018).

El hierro principalmente resulta por su reciclaje, diariamente la absorción diaria es entre 1 – 3 mg; niveles bajos de hierro controlan la inhibición de la expresión de hepcidina y su aumento en el transportador ferroportina, el hierro llega al destino en forma ferrosa, en el intestino delgado hay un aumento de pH y el hierro férrico soluble disminuye, la oxidación del hierro aumenta, el 15% del hierro se absorbe en el duodeno, el resto pasa al colon (B. Yilmaz & Li, 2018)

El pH y el oxígeno afectan la solubilidad del hierro sin embargo también el fitato, polifenoles y taninos afectan negativamente a la absorción del hierro al unirse

fuertemente, la vitamina C eleva la absorción del hierro no Hemo (Lynch & Cook, 1980), la eficiencia de absorción del hierro es alrededor del 14% con respecto a la del duodeno (B. Yilmaz & Li, 2018).

2.4. Epidemiología de la anemia en el Perú

Una de las problemáticas de salud pública más importantes en el Perú es la anemia, afectó alrededor de 43,6% de niñas y niños menores de 3 años a nivel nacional según el INEI 2017, su prevalencia en las áreas rurales del territorio nacional es más alta (53,3%), mientras que en zonas urbanas es de alrededor de un 40% (Ministerio de Desarrollo e Inclusión Social, 2018).

En el 2019, la prevalencia de la anemia fue mayor en la Sierra con 48,8% y la Selva que presentó un 44,6%, en la Costa con 33,9% en los niños y niñas menores de 36 meses (INEI; & Ministerio de Economía y Finanzas, 2020).

3. Asociación del microbioma intestinal y la anemia

La anemia puede surgir por varias razones, siendo la mas frecuente la causada por la deficiencia de hierro. El hierro y el microbioma están ampliamente relacionados, debido a excesos de hierro puede resultar tóxico; la absorción de hierro y suplementos o fortificantes es baja, típicamente menos del 20% se absorbe, en África por ejemplo los niveles de absorción de hierro se redujeron debido a problemas inflamatorios o infecciones a pesar de existir dietas ricas en hierro, si está en exceso, pasara sin absorber por el colon, los tipos de bacterias encontradas en el ser humano son abundantes, sin embargo existen 4 phylas distribuidas con mayor incidencia,

Bacteroidetes (16 - 23%), *Firmicutes* (49 - 76%), *Actinobacteria* (menor al 5%), *Proteobacteria* (menor al 10%) (Johnson et al., 2017) (Haakensen et al., 2008) (Binda et al., 2018) (Shin et al., 2015).

Muleviciene et al. (2018), identificó la microbiota de 10 niños con IDA y 10 niños control, donde los niños con IDA mostraron un aumento de *Bacteroidetes* y *Proteobacteria*, y una menor cantidad de *Actinobacteria* y *Verrucomicrobia* a diferencia de los niños control (Muleviciene et al., 2018).

McClorry et al. (2018), identificó la presencia del microbioma de niños con anemia de la selva peruana, y se encontró presencia de *Firmicutes* (*Coprococcus*, *Dorea*, *Roseburia*), *Bacteroidetes* (*Barnesiellaceae*, *Odoribacteraceae*), y *Proteobacteria* (*Desulfovibrio*), a diferencia de niños sin anemia (McClorry et al., 2018)

4. Técnicas moleculares

Las técnicas moleculares para el estudio de la microbiota gastrointestinal son imprescindible para lograr la identificación de especies microbianas. Los avances más importantes en el estudio de la microbiota intestinal y su relación con el huésped surgen con diferentes enfoques de las “Ómicas”. Ver Figura 2.

La metagenómica busca identificar el genoma colectivo de una comunidad microbiana determinada, para la microbiota gastrointestinal principalmente se utiliza tecnología NGS o Shotgun; en el caso de la metatranscriptómica, identificará la expresión génica de comunidades microbianas, proporcionando una amplia gama de genes que se transcriben en determinadas condiciones experimentales.

Las investigaciones en el metaboloma intestinal tienen como objetivo identificar y cuantificar el conjunto de metabolitos presentes en muestras biológicas y, más relevante aún, investigar las diferencias en los metabolitos representativos y su

relación con los cambios en la actividad de las vías metabólicas, por último la metaproteómica transmite la identificación de proteínas, su asignación a taxones específicos y la descripción de cómo estas proteínas interactúan con el huésped humano (Blanco-Miguez et al., 2017).

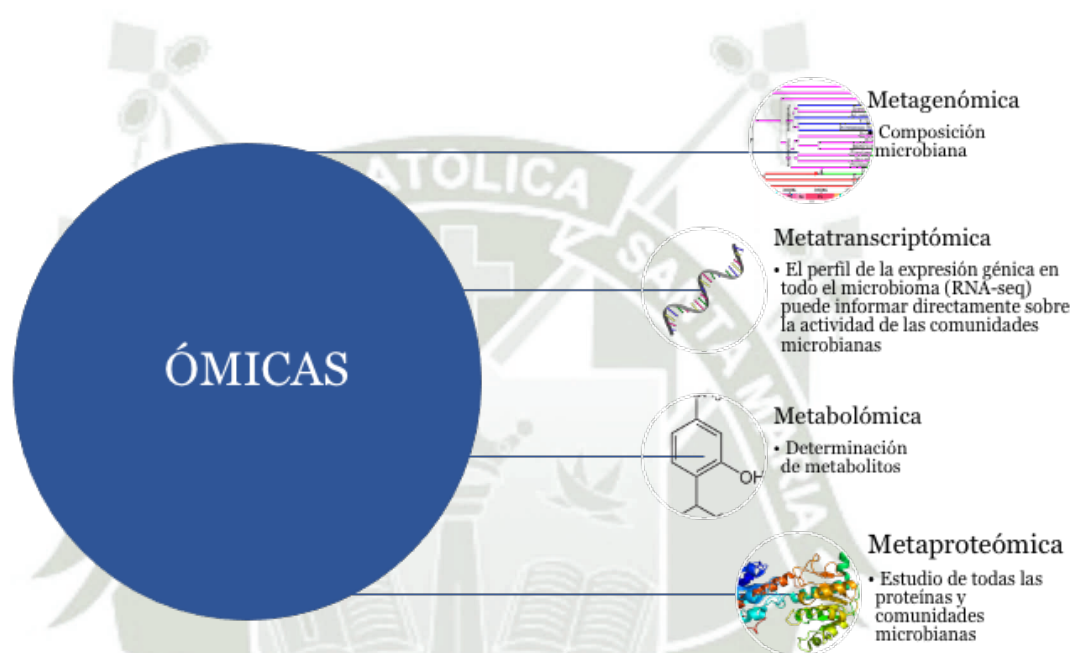


Figura 2 Metodología ómicas para el estudio de microbiota intestinal en niños con IDA
Fuente: Elaboración propia

4.1. Extracción de ADN bacteriano

La microbiota que está presente en la muestra de heces, representa según la bibliografía, a todas las comunidades bacterianas que viven en el tracto gastrointestinal, debido a este motivo, suele ser la muestra elegida para la mayoría de las investigaciones, siendo otra de sus bondades presentar fácil recolección y no es invasiva (Lim et al., 2017). Para elucidar su rol en la salud y las enfermedades, la caracterización de este ecosistema es el primer paso, el proyecto “MyNewGut”

financiado por la Unión Europea ha tenido como objetivo investigar la relación de la microbiota intestinal en la salud y en el bienestar (Contijoch et al., 2019).

Se sabe que las diferencias en los protocolos de extracción de ADN microbiano afectan a la comunidad microbiana estudiada, causando la representación excesiva o insuficiente en algunos grupos microbianos (Velásquez-Mejía et al., 2018)

Diferentes extracciones de ADN bacteriano en los kits de extracción generarán diferentes resultados en términos de cantidad y calidad de ADN extraído, inhibidores de reacciones de PCR e influencias en la composición de la comunidad bacteriana (Gerasimidis et al., 2016)

4.2. Secuenciamiento de siguiente generación

Los métodos de secuenciación de siguiente generación o Next Generation Sequencing (NGS), pueden proporcionar un análisis cualitativo y cuantitativo completo de las secuencias de ADN o ARN dentro de una muestra en una sola prueba, de esta manera se mejora el rendimiento diagnóstico (Hardwick et al., 2017).

La secuenciación de Sanger únicamente es capaz de producir una secuencia para una plantilla por reacción, a diferencia de la tecnología NGS, que se caracteriza por realizar entre millones y miles de millones de reacciones de secuenciación individuales de manera simultánea en un proceso denominado secuenciación masiva en paralelo (Kumar et al., 2019).

Los métodos de NGS se agrupan en secuenciación por hibridación y secuenciación por síntesis (Slatko et al., 2018) (Levy & Myers, 2016).

En la Figura 3 se muestra la tecnología como se realiza la tecnología NGS por Illumina, en primer lugar el ADN es fragmentado y en un proceso de hibridación con

los adaptadores da como resultado las librerías, a continuación un proceso de amplificación dará como resultado DNA sobre la celda de flujo que tiene primers adheridos, por una amplificación de puente dará como resultado los cluster, el conjunto de estos dará secuencias resultantes conocidas como reads.

4.3. Bioinformática y estadística

La lectura de datos sin procesar de cualquier equipo, debe someterse a una serie de procesos bioinformáticos, estos incluyen demultiplexación, análisis de calidad, resecuenciación o mapeo de las lecturas a un genoma de referencia, e identificación a las variantes de anotación (Yohe & Thyagarajan, 2017).

El gen 16S rRNA y los genes espaciadores transcritos internos (ITS), contienen regiones hipervariables que pueden cambiar en un breve período de tiempo e incluso pueden diferir dentro de una sola célula, los taxones individuales pueden compartir secuencias genéticas idénticas (por ejemplo, *Escherichia* y *Shigella*), lo que complica la definición de una secuencia única y la diferenciación de taxones individuales, cada gen individual se amplifica con PCR y cada producto de PCR se secuencia una sola vez, lo que genera múltiples oportunidades de errores que pueden afectar la identificación de una secuencia única (Galloway-Peña & Hanson, 2020).

Para perfilar comunidades bacterianas por PCR, la secuencia del gen 16S rRNA es el marcador más utilizado, debido a que contiene regiones altamente conservadas para

el diseño de cebadores y regiones hipervariables para identificar las características filogenéticas de los microorganismos (J. Yang et al., 2016).

El gen de 16S rRNA está compuesto por 9 regiones hipervariables (V1, V2, V3, V4, V5, V6, V7, V8 y V9), que están flanqueadas por tramos conservados de ADN, lo que permite la amplificación por PCR de las regiones deseadas utilizando cebadores universales, cada una de ellas tiene una ubicación de inicio, V1 empieza en 68pb, V2 en 136 pb, V3 en 433 pb, V4 en 576 pb, V5 en 821pb, V6 en 980 pb, V7 en 1117 pb, V8 en 1243 pb y V9 en 1435 pb. Para la amplificación en el termociclador se necesita un juego de primers universales, algunos de ellos son los forward 8F, 27F, 63F, 341F, 357F y 533F, y los reverse 518R, 1100rR, 1392R y 1492R. (Figura 4).

Esto ha llevado a la adopción de unidades taxonómicas operativas (OTU) (Lladó Fernández et al., 2019), un método para agrupar secuencias utilizando un umbral de divergencia con mayor frecuencia 97% (Nguyen et al., 2016)

Normalmente, sin embargo, los datos se analizan utilizando información taxonómica y se puede asignar a través de métodos de aprendizaje automático como el clasificador RDP (Balvočiute & Huson, 2017), Greengenes (Can, 2019)y SILVA (P. Yilmaz et al., 2014).

Los paquetes estándar de análisis de microbiomas, como Mothur (López-García et al., 2018) , Quantitative Insights Into Microbial Ecology (QIIME) (Bolyen et al., 2019) (Lawley & Tannock, 2017)y DADA2 (Callahan et al., 2016), proporcionan una interfaz para la asignación taxonómica.





CAPÍTULO II

METODOLOGÍA

2.1. Pacientes y muestreo

El presente estudio tiene un enfoque mixto, es decir es cualitativo y cuantitativo, con un alcance de tipo correlacional, el tipo de muestreo fue no probabilístico, por conveniencia.

La población de estudio son niños del sur del Perú provenientes de Arequipa y Tacna, menores a 10 años, que presenten anemia, hayan tenido anemia y estén recuperados en el momento de la toma de muestra y finalmente niños sin anemia, con seguimiento clínico en centros u hospitales desde su nacimiento.

Los datos clínicos y el hemograma completo, fueron evaluados por el personal de salud, que verificó la presencia o ausencia de anemia en los pacientes. La revisión de historias clínicas mostró que los niños con anemia recibieron tratamiento con suplemento oral de hierro administrado por los padres o apoderados, sin embargo no hubo recuperación de los niños, evidenciado hasta en 2 tamizajes y al momento de la toma de muestra. Los niños control o sin anemia fueron aquellos que no presentaron anemia previamente o al momento de la toma de muestra, esto evidenciado por la revisión de historias clínicas (Ver Tabla 2).

El estudio incluyó 18 niños menores a 10 años provenientes del sur del Perú, de Arequipa y Tacna provenientes del Hospital Carlos Alberto Segura Escobedo de EsSalud, del Hospital Nacional Hipólito Unzué de Tacna y de diferentes Centros de Salud del Ministerio de Salud. Se dividió los pacientes en 3 grupos, 10 niños con anemia (AA), cuyos valores de hemoglobina fueron menor a 11 g/dL, en adelante A1, A4, A5, A6, A10, A11, A13, A16, A17 y A18, 4 niños recuperados de anemia (RA) cuyo valor de hemoglobina fueron mayores a 11 g/dL sin embargo que en el tamizaje anterior fueron diagnosticados con anemia, en adelante A8, A9, A14, A15 y 4 niños

control (C), en adelante A2, A3, A7, A12 , se obtuvo consentimiento informado firmado por los padres antes de la inclusión, aprobado por el comité de ética de la Universidad Católica de Santa María (ANEXO 1).

Tabla 2 Distribución de Muestras según los grupos de pacientes en estudio

Grupo	Parámetro	Muestras
AA, niños con anemia ferropénica	10 niños con anemia (AA), cuyos valores de hemoglobina fueron menor a 11 g/dL	A1, A4, A5, A6, A10, A11, A13, A16, A17 y A18
RA, niños recuperados de anemia	4 niños recuperados de anemia (RA) cuyo valor de hemoglobina fueron mayores a 11 g/dL sin embargo que en el tamizaje anterior fueron diagnosticados con anemia	A8, A9, A14, A15
C, niños recuperados de anemia	4 niños control (C)	A2, A3, A7, A12

Se recolectó muestras de heces de niños con anemia ferropénica en un recipiente especial de polipropileno para muestras de heces de 27 mL, transparente tapa azul con cuchara fija y etiqueta impresa (Medical Wire & Equipment Co., UK). En primer lugar las muestras fueron recolectadas dentro de un cooler de 4.5 L (Pinnacle, India) que contenía cuatro ice pack de capacidad de 150 mL (Klimber, Chile) previamente congelados, estas muestras fueron conservadas con glicerol al 5% a -20°C en un congelador hasta realizar los procedimientos experimentales en el laboratorio F-403 de la Universidad Católica de Santa María en Arequipa.

2.2. Extracción de ADN microbiano

El proceso de extracción de ADN se dividió en dos etapas, un proceso de purificación y un proceso de extracción.

Para la purificación se suspendió 1 000 mg de muestra en 3 ml de NaCl 0,9% en un tubo falcon de 15 mL y se sometió a vórtex (Eurolab, España) durante 30 segundos, a continuación se llevó a un shaker de rodillos (JP Selecta, España) durante 10 minutos, se continuó con la centrifugación a 1087 x g durante 2 minutos (Premiere-XC-2450, EEUU), en donde se conservó el sobrenadante en tubos de microcentrífuga (EppendorfTM, España).

En una microcentrífuga (Dlab Scientific, China), se centrifugó a 6760 x g durante 1 minuto y se conservó el pellet, a este se le agregó 1 mL de Buffer fosfato salino (PBS) y se procedió a centrifugar a 605 x g por 2 minutos donde se conservó el sobrenadante, que luego fue centrifugado a 6760 x g durante 1 minuto, finalmente se conservó el pellet resultante. Para la extracción, a partir del pellet resultante se añadió 500 µL de Buffer de lisis (500 mM NaCl, 50mM Tris-HCl pH 8, 50 mM EDTA, 4% SDS) y 100 µg de perlas (perlas de vidrio de 3 mm y perlas de zirconio de 0.1 mm relación 1:1), esta suspensión fue sometida a vórtex durante 10 segundos. Se adicionó 2 µL de proteinasa K (Analitik Jena AG, Alemania) durante 10 minutos a 37°C y 2 µL de RNAsa durante 30 minutos a 60°C en un Thermoblock (Biobase, China).



A continuación, se centrifugó 9677 x g por 5 minutos y se colectó el sobrenadante, a este se añadió Fenol cloroformo alcohol isoamílico (25:24:1) hasta enrasar a 1,5 mL dentro de un tubo de microcentrífuga, y se centrifugó a 6720 x g durante 5 minutos. Este procedimiento se realizó 2 veces. Se conservó el sobrenadante y se añadió 0,6 volúmenes de isopropanol, se sometió a -4°C durante 30 minutos, se centrifugó a 9677 x g durante 5 minutos y se conservó pellet, se añadió 300 µL de etanol absoluto, se centrifugó a 9677 x g durante 5 minutos y se procedió a desechar el sobrenadante con ayuda de una micropipeta, cuando quedaban restos en el interior del tubo de microcentrífuga se calentó a 37°C hasta desaparecer completamente los residuos de etanol, al pellet resultante se añadió 100µL de H₂O grado molecular (Figura 5)

Para la electroforesis se preparó un gel de agarosa (1%, p/v) con TAE 1X, se debe evitar la ebullición de la solución y verificar que no quede agarosa sin diluir, una vez frío agregar de Syber Green para teñir el gel. La cámara electroforética fue llenada con buffer TAE 0,5X, este buffer deberá cubrir el gel por completo. A continuación, se procedió a llenar los pozos del gel con 8 µL de DNA previamente extraído y 2 µL de loading buffer, en uno de los pozos se utilizó marcador de peso molecular 100 bp DNA Ladder 0.1 µg/µL (Invitrogen, EEUU), se procedió a correr la muestra a 100 voltios durante 20 minutos (Figura 6).

Para determinar la concentración y la pureza de las muestras de ADN se utilizó la técnica de la espectrofotometría, para aplicarla se utilizó el equipo Nanophotometer™ (Implen, Madrid) donde se colocó 1µL de muestra de ADN se programó el equipo para medir longitudes de onda de 260/280 y 260/230.



2.3. Amplificación por PCR

Para comprobar la presencia de DNA bacteriano, se procedió a la amplificación del gen 16S rRNA por PCR, se colocó dentro de un tubo de PCR de 100 μ L, Supermix (Applied Biological Materials Inc., Canadá), DNA, primer forward y primer reverse. Para elegir la cantidad de ADN necesaria, se observó las bandas en el gel de agarosa, para las bandas bien definidas se tomará 1 μ L de ADN y para bandas tenues 2 μ L de ADN, a continuación, se añadió 22 o 23 μ L Supermix 1X según corresponda, de acuerdo con la cantidad usada de ADN. Finalmente se añadió 1 μ L de los primer forward y reverse a 10 μ M, cuya concentración final fue de 0.4 μ M. Forward 27F (5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3'), Reverse 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'). La PCR tuvo un control negativo que consideraba 24 μ L de Supermix 1X y 1 μ L de primer. La configuración del termociclador (BIOER-LifeECO, China) fue, desnaturalización inicial 94°C durante 3 minutos, desnaturalización 94°C durante 30 segundos, hibridación 45°C durante 30 segundos, extensión 72°C durante 2 minutos, extensión final 72°C durante 5 minutos y 4°C durante tiempo indefinido, se utilizó 30 ciclos en los pasos de desnaturalización, hibridación y extensión.

Los amplicones se verificaron mediante electroforesis en gel de agarosa (2%, p/v) con buffer TAE 1X, se añadió 1 μ L de Syber Green para teñir el gel. La cámara electroforética fue llenada con buffer TAE 0.5 x, este buffer deberá cubrir el gel por completo. A continuación se procedió a llenar los pozos del gel con las muestras amplificadas, en uno de los pozos se corrió el marcador de peso molecular 100 bp DNA Ladder 0.1 μ g/ μ L (Invitrogen, EEUU), se procedió a correr la muestra a 90 voltios durante 30 minutos.

2.4. Secuenciamiento por NGS

2.4.1. Requerimiento de calidad de muestras de DNA

Para realizar el NGS, las muestras de DNA debieron cumplir condiciones de calidad siguientes, cantidad de DNA ≥ 200 ng, volumen ≥ 20 μ L, concentración ≥ 10 ng/ μ L, pureza A260/280 = 1.8-2.0, de acuerdo con Novogene Co., Ltd, industria elegida para realizar el NGS.

2.4.2. Construcción de bibliotecas, control de calidad y secuenciación

La amplificación por PCR de las regiones objetivo se realizó mediante el uso de cebadores específicos que se conectan con códigos de barras. Los productos de PCR con el tamaño adecuado se seleccionaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%. La misma cantidad de productos de PCR de cada muestra se agruparon, se repararon en los extremos, se unieron en cola A y se ligaron más con adaptadores Illumina.

Las bibliotecas de secuenciación se generaron utilizando el kit de biblioteca de ADN de ADN NebNext® Ultra TM para Illumina, siguiendo las recomendaciones del fabricante y se agregaron códigos de índice. La calidad de la biblioteca se evaluó utilizando el fluorómetro Qitby® 2.0 (Thermo Scientific, Massachusetts, EE. UU.) Y el sistema Agilent Bioanalyzer 2100. Finalmente, la biblioteca se secuenció en una plataforma Illumina, y se generaron lecturas de extremo emparejado de 250 pb, el mínimo de lecturas por muestra fue de 100 000.

Los procedimientos experimentales de preparación de la biblioteca de ADN se muestran a continuación en la Figura 4.

Figura 7 Flujoograma para la construcción de la librería. Fuente: Elaboración propia

La biblioteca se verificó con Qubit y PCR en tiempo real para la cuantificación y bioanalizador para detección de distribución de tamaño. Las bibliotecas cuantificadas se agruparon y secuenciaron en plataformas Illumina, de acuerdo con la concentración efectiva de la biblioteca y la cantidad de datos requerida.

2.5. Análisis de información

El análisis bioinformático, así como el QC (quality control/de-multiplexing del RAW data del secuenciamiento, se realizó en colaboración con Novogene Co., Ltd.

2.5.1. Procesamiento de datos de secuenciación

Los paired-end o lecturas emparejadas se asignaron a las muestras en función a sus códigos de barras únicos y se truncaron cortando el código de barras y las secuencias del cebador.

Las lecturas emparejadas se fusionaron usando FLASH (V1.2.7), plataforma precisa y rápida, diseñada con la finalidad de fusionar lecturas emparejadas.

Aquellas lecturas de extremo pareado se unieron utilizando el software FLASH (V1.2.7), dentro de las ventajas de esta herramienta es que es muy precisa y veloz, FLASH fue creada para unir lecturas paired-end, cuando al menos algunas de las

lecturas se superponen a la lectura generada desde el extremo opuesto del mismo fragmento de ADN, a las secuencias de empalme se les denominó etiquetas en bruto. Para obtener etiquetas (tag) limpias de calidad alta, se realizó el filtrado específico de calidad según el control de calidad de Quiime.

Las etiquetas se contrastaron con la base de datos SILVA 138 también llamada base de datos de referencia, donde se utilizó el algoritmo UCHIME donde se detectó secuencias quimeras, posteriormente eliminadas, de esta forma se obtuvieron las etiquetas efectivas.

2.5.2. Clúster OTU y anotación taxonómica

Uparse fue el software utilizado para el análisis de secuencias, donde se utilizó todas las etiquetas efectivas. Aquellas secuencias con un porcentaje mayor o igual al 97 % de similitud se asignaron a las mismas Unidades Operativas Taxonómicas (OTU). Se examinó la secuencia representativa de cada OTU para realizar más anotaciones.

Quiime y el método Mothur se utilizaron para cada secuencia representativa, en contraste a la base de datos SSUrRNA de SILVA138 para la anotación de especies en los rangos taxonómicos (umbral de 0,8 a 1) como el reino, phylum, clase, orden, familia, género, especie.

Se realizó una alineación de secuencias múltiples utilizando el software MUSCLE, para estudiar la relación filogenética de diferentes OTU y la diferencia de las especies dominantes en diferentes muestras, una de las ventajas de utilizar MUSCLE es que puede comparar múltiples secuencias velozmente (Edgar, 2004).

Se normalizó la información de abundancia de OTU utilizando secuencias estándar correspondientes a la muestra con menos secuencias. Todos los análisis posteriores (diversidad alfa y diversidad beta) se desarrollaron basándose en estos datos normalizados de salida.

2.5.3. Diversidad alfa

La diversidad alfa se relaciona a la comunidad microbiana de una muestra con respecto a tres factores, su riqueza, uniformidad y diversidad. La riqueza es el número de especies o unidades diferentes que se encuentran presentes en una comunidad; la uniformidad se refiere a las variaciones en la abundancia de especies, y la diversidad tiene en cuenta tanto la riqueza como la uniformidad; algunas medidas de diversidad como es el caso del índice de diversidad de Simpson, pueden dar más peso a los miembros dominantes de la comunidad, asimismo los índices de diversidad de Shannon y Simpson son formas habituales de evaluar la diversidad dentro de una muestra determinada (Maltez Thomas et al., 2018).

2.5.4. Diversidad beta

Esta Diversidad, se refiere a las diferencias de la microbiota entre muestras o grupos, por lo general se utiliza para saber si esta diferencia es significativa, para hallar la diversidad beta se pueden utilizar índices como Bray-Curtis y la distancia Unifrac, esta última puede ponderarse o no ponderarse y estima las diferencias entre muestras

o grupos en función de la distancia filogenética. La distancia UniFrac no ponderada tiene en cuenta la ausencia y presencia de taxones, es sensible para detectar cambios de riqueza en especies raras, pero ignora la información de abundancia en el cálculo. La distancia UniFrac ponderada incorpora la información de abundancia y reduce la contribución de especies raras (Qian et al., 2020).

El software QIIME (versión 1.7.0) se utilizó para calcular la diversidad beta en Unifrac ponderada y no ponderada.

Se utilizó el software R (V 2.15.3) con el paquete FactoMineR y ggplot2 para el análisis de componentes principales (PCA), y de conglomerados.

Se realizó un análisis de coordenadas principales (PCoA) con la finalidad de conseguir las coordenadas principales y poder observar data multidimensional compleja. Un nuevo conjunto de ejes ortogonales se construyó a partir de Unifrac ponderada o no ponderada, por lo que el máximo factor de variación se demuestra en la primera coordenada principal, y en la segunda coordenada principal, el segundo máximo y así en lo sucesivo.

PCoA se construyó utilizando el paquete WGCNA, stat y ggplot2 en el software R.

En la construcción del método de grupos de pares no ponderados con medias aritméticas (UPGMA), se realizó la agrupación como un tipo de método de unión jerárquica para la interpretación de Unifrac utilizando la relación promedio mediante el software QIIME.

LEfSe se realizó con el software LEfSe. El valor P se calculó mediante el método de la prueba de permutación, mientras que el valor q se calculó mediante el método de Benjamini y Hochberg False Discovery Rate.

Anosim, MRPP y Adonis se realizaron con el software R (paquete vegano: función anosim, función mrpp y función adonis).

AMOVA fue calculado por mothur utilizando la función amova. T_test y el dibujo fueron realizados por el software R.





CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Datos clínicos y bioquímicos

En la Tabla 3 se muestra la presencia de los datos clínicos de los pacientes en estudio, se muestra un 67% en pacientes menores a 59 meses, así como el 72% de pacientes fueron del sexo femenino y el 56% procedentes de Arequipa.

En la Tabla 4 se evidencia los datos bioquímicos de los pacientes en estudio. En niños con anemia, se observa valores debajo de lo normal en hemoglobina, hematocrito, hematíes, C.C.M.H.B, y mayor presencia de linfocitos y monocitos; mientras que en niños recuperados de anemia mayor presencia de eosinófilos, en niños sanos se muestra mayor presencia de segmentados.

Tabla 3 Datos clínicos de los pacientes en estudio

	Parámetro	Número de participantes
Grupo de edad	0 a 59 meses	12
	60 meses a 120 meses	6
Sexo	Femenino	13
	Masculino	5
Procedencia	Arequipa	10
	Tacna	8

3.2. Amplificación del gen 16S rRNA

Para la determinación del gen 16S rRNA se utilizó la amplificación por PCR, la alternancia de regiones conservadas y variables dentro del gen 16S rRNA detecta e identifica cualquier bacteria presente en una muestra clínica, independientemente de su afiliación de especie (Bador et al., 2020).

Tabla 4 Datos bioquímicos de pacientes en estudio

Parámetro	Niños con anemia		Niños recuperados de anemia		Niños sanos	
	Promedio	DS (%)	Promedio	DS (%)	Promedio	DS (%)
Hemoglobina (g/dL)	10.12	0.54	11.20	0.24	12.38	0.56
Hematocrito (%)	33.90	1.98	38.10	1.64	39.88	2.25
Hematíes (millones/mm ³)	4.35	0.27	4.99	0.56	4.56	0.37
V.C.M. (f/L)	77.56	4.59	77.05	8.02	87.68	2.38
HB.C.M. (pg)	24.69	2.47	23.75	2.11	27.23	1.62
C.C.M.HB. (g/dL)	30.54	2.64	30.85	0.65	31.05	1.22
Leucocitos (mil/mm ³)	7.99	2.33	7.19	2.37	6.05	2.31
Linfocitos (%)	51.98	18.63	51.38	12.99	33.35	3.85
Segmentados	40.63	18.44	39.98	9.75	60.55	4.51
Monocitos	2.19	1.65	2.03	1.67	1.65	1.04
Eosinófilos	4.38	2.57	5.53	4.83	3.83	2.99
Basófilos	0.71	0.42	1.10	0.81	0.63	0.13
Recuento de plaquetas	363.00	67.66	359.50	103.49	378.00	132.43

En la Figura 8 se evidencia la amplificación de las 18 muestras de heces en la muestra de estudio, el amplicon del gen 16S rRNA presenta un tamaño alrededor de 1500pb, en la muestra A10 y A15 se evidencia una amplificación muy tenue.

3.2. Control de calidad estadístico

Una vez que se tengan los datos generados por NGS, se debe realizar un control de calidad de los datos, aunque este paso no genera directamente conocimientos biológicos, es esencial y debe ser llevado a cabo con sumo cuidado para evitar resultados sin sentido o incluso erróneos en pasos posteriores y el consumo innecesario de tiempo y recursos bioinformáticos (Blokberg, 2008).



Figura 8 Amplificación del gen 16S rRNA. (A) Muestra A1-A12. (B) Muestra A13-A18. Fuente: Elaboración propia

El amplicón de secuenciación en la plataforma de extremos emparejados de Illumina para generar lecturas sin procesar de extremos emparejados de 250 pb (PE sin procesar), se fusionó y se pretrató para obtener etiquetas limpias. Las secuencias quiméricas en etiquetas limpias se detectaron y eliminaron para obtener etiquetas efectivas que se utilizaron para análisis posteriores. Los resúmenes obtenidos en cada paso del procesamiento de datos se observan en la Tabla 5. El porcentaje más alto de etiquetas efectivas en Raw PE es de 80.00, 74.37 y 73.38 % para las muestras A6, A7 y A8 respectivamente.

Tabla 5 Control de calidad estadístico.

Sample Name	Raw PE(#)	Raw Tags(#)	Clean Tags(#)	Effective Tags(#)	Base(nt)	AvgLen(nt)	Q20	Q30	GC%	Effective%
A1	185048.00	169627.00	167511.00	124860.00	51407150.00	412.00	98.12	94.05	53.40	67.47
A2	179727.00	155324.00	152858.00	105521.00	43840606.00	415.00	97.95	93.68	51.31	58.71
A3	172706.00	156365.00	154289.00	94633.00	39070715.00	413.00	98.06	93.92	52.48	54.79
A4	182255.00	162289.00	159771.00	101526.00	42432751.00	418.00	97.99	93.75	53.21	55.71
A5	170184.00	148723.00	146475.00	110019.00	45661462.00	415.00	98.00	93.80	51.89	64.65
A6	174527.00	156949.00	154359.00	139628.00	57731988.00	413.00	97.62	92.84	59.11	80.00
A7	180006.00	155608.00	152906.00	133879.00	56347078.00	421.00	97.74	93.16	57.99	74.37
A8	171006.00	155721.00	153539.00	125481.00	51864587.00	413.00	98.06	93.97	52.28	73.38
A9	170796.00	145868.00	142891.00	110577.00	46174369.00	418.00	97.65	93.08	52.42	64.74
A10	189166.00	166143.00	163857.00	137792.00	56782167.00	412.00	98.03	93.81	51.85	72.84
A11	174658.00	151459.00	148700.00	122562.00	50856362.00	415.00	97.72	93.22	52.31	70.17
A12	174709.00	152060.00	149352.00	118702.00	49038808.00	413.00	97.72	93.24	52.89	67.94
A13	187388.00	162503.00	159235.00	118035.00	48967042.00	415.00	97.64	93.06	51.05	62.99
A14	189903.00	169086.00	166592.00	129344.00	53621550.00	415.00	98.01	93.86	52.18	68.11
A15	181760.00	163542.00	161174.00	124626.00	51539148.00	414.00	98.00	93.85	52.48	68.57
A16	179296.00	158791.00	155955.00	128160.00	53319017.00	416.00	97.80	93.31	51.81	71.48
A17	179079.00	158142.00	155271.00	115933.00	47875071.00	413.00	97.73	93.25	52.31	64.74
A18	184733.00	159881.00	156746.00	130409.00	54370257.00	417.00	97.69	93.18	52.30	70.59

Fuente: Elaboración propia

PE: Pair-end

Raw PE representa las lecturas de PE originales después de la secuenciación;

Raw Tags representa etiquetas fusionadas de lecturas de PE;

Clean Tags representa las etiquetas después del filtrado;

Effective Tags representan etiquetas después de filtrar la quimera y finalmente se pueden usar para análisis posteriores;

Base (nt) es el número de bases de las Etiquetas Efectivas;

AvgLen (nt) representa la longitud promedio de las etiquetas efectivas;

Q20 y Q30 son los porcentajes de bases cuyo valor de calidad en Etiquetas Efectivas es superior a 20 (tasa de error de secuenciación inferior al 1%) y 30 (tasa de error de secuenciación inferior al 0,1%);

GC (%) representa el porcentaje de GC en etiquetas efectivas;

Effective (%) representa el porcentaje de etiquetas efectivas en Raw PE.

3.2. Análisis OTU y anotación taxonómica

Para el estudio de la composición microbiana en cada muestra, se obtuvieron Unidades Taxonómicas Operativas (OTU) agrupando con 97% de identidad en las Etiquetas Efectivas de todas las muestras, y luego se identificaron.

Las OTU son una unidad de diversidad microbiana común utilizada en metagenómica que puede representar una especie o un grupo de especies, las OTU se agrupan en función de la información de la secuencia de ADN únicamente (Bloksberg, 2008).

3.2.1. Identificación de OTU y anotación taxonómica

a. Resumen de la anotación

En el proceso de construcción de las OTU, se compiló datos de etiquetas efectivas, de etiquetas de baja frecuencia y de anotación de etiquetas. El resumen se muestra de la siguiente manera en la Figura 9, donde el eje Y1 titulado "Número de etiquetas" significa el número de etiquetas; donde las etiquetas totales se evidencian en barras rojas, estas también significan el número de etiquetas efectivas; las barras de color azul son las "Etiquetas taxón", es decir el número de etiquetas anotadas; de color verde se representa las "Etiquetas sin clasificar" también llamadas como el número de etiquetas sin anotar; en color naranja se ven las "Etiquetas únicas", es decir el número de etiquetas con una frecuencia de 1 y solo ocurre en una muestra.

Figura 9 Resumen de las etiquetas y número de OTU de cada muestra. Fuente: Elaboración propia



Finalmente el eje Y2 titulado "Números de OTU" que se muestra como OTU en barras de color morado. Se tiene un promedio de 120649 de etiquetas totales, cuyo promedio de OTUs en las 18 muestras fue de 789.

b. Pantalla GraPhlAn

Para comprender mejor la información OTU, se usó GraPhlAn para construir un diagrama de árbol de anotaciones OTU del grupo de niños anémicos se representa en la Figura 10. Los diferentes rangos taxonómicos varían de adentro hacia afuera. La abundancia de especies está representada por el tamaño de los círculos.

Diferentes colores representan diferentes phylum, rojo está representado por *Actinobacteriota*, verde *Bacteroidota*, morado *Firmicutes* y celeste *Proteobacteria*. Los círculos sólidos representan las 40 especies más abundantes, en el extremo izquierdo de la figura se encuentra la nomenclatura de especies.

c. Árbol taxonómico

La composición taxonómica se usa a través de la secuenciación de amplicón de 16s rRNA (Di Segni et al., 2018).

En la Figura 11, se muestran los 10 géneros más representativos con abundancia relativa alta en todos los pacientes en estudio, estos son *Bifidobacterium*, *Collinsella*, *Bacteroides*, *Prevotella*, *Alistipes*, *Asteroleplasma*, *Erysipelatoclostridium*, *CAG-352*, *Faecalibacterium*, *Succinivibrio*; adicionalmente se evidencia 3 colores, rojo que corresponde a AA, azul que corresponde a C y verde que corresponde a RA.



Figura 10 Diagrama GraPhlAn de niños con anemia. Fuente: Elaboración propia

La abundancia relativa de especies está representada por el tamaño de los círculos, el porcentaje en todo el taxón es representado por el primer número que se encuentra debajo del nombre taxonómico, mientras que el número en posición segunda evidencia el porcentaje en el taxón seleccionado, del 100% de taxones presentes en todas las muestras, 9.38% corresponde a las *Actinobacteriotas*, siendo AA los pacientes que muestran una mayor abundancia de este phylum, .47.36% corresponde al phylum *Bacteroidota*, aparentemente existe una abundancia similar entre AA, RA y C,



El 41.01% pertenece al phylum *Firmicutes*, que presenta mayor abundancia en el grupo C, a continuación RA y finalmente en AA, el 2.24% pertenece al phylum *Proteobacteria* donde hay mayor presencia del phylum en las muestras AA. En un estudio realizado en el sur de Texas, se reportó que, en niños de 2 a 5 años de etnia hispana en condiciones normales, hubo abundancia en *Bacteroides plebius*, a diferencia del presente estudio donde se reporta mayor abundancia en AA (Hollister et al., 2018).

d. KRONA

KRONA muestra visualmente el resultado del análisis de la anotación taxonómica. Los círculos de adentro hacia afuera representan diferentes rangos taxonómicos, y el área del sector significa la proporción respectiva de diferentes resultados de anotación de OTU (ANEXO 2).

3.3.2. Composición del análisis de la comunidad microbiana

a. Abundancia relativa

De acuerdo con los resultados de la anotación taxonómica, en la Figura 12, se observa los 10 taxones principales de cada muestra para conformar el histograma de la distribución de abundancia relativa de taxones (phylum), la figura muestra los taxones con mayor abundancia relativa y su proporción en los diferentes niveles de clasificación de cada muestra. El eje de las ordenadas representa la abundancia relativa y el eje de las abscisas muestra la codificación de las muestras.

En la Figura 13, se visualiza los tres grupos analizados; AA, C y RA, donde la mayor abundancia relativa en las muestras se da en *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Bacteroidota*,

Proteobacteria, *Verrucomicrobiota*, *Acidobacteriota*, *Cyanobacteria*, *Fusobacteriota*, *Synergistota*, *Chloroflexi* y otros que representa una abundancia relativa total del resto de phyla además de los 10 phyla principales.

El grupo AA muestra mayor abundancia de Actinobacteriota, mientras que C de Firmicutes y RA de Bacteroidota, alrededor de un 90% de la composición microbiana en los 3 grupos es de Firmicutes, Actinobacteriota y Bacteroidota.

El grupo C muestra mayor cantidad del phylum *Firmicutes*, mientras que AA presenta menor abundancia relativa. resultado similar al de un estudio en Kenya reveló diferencias significativas en los taxones entre los lactantes anémicos y no anémicos, los lactantes no anémicos albergaron menores abundancias de *Prevotella* (2,0 % frente a 4,5 %, $p=0,014$), género perteneciente al phylum *Bacteroidetes*, mientras que mostraron mayores abundancias de *Actinomycetales* (0,14 % frente a 0,09 %, $p=0,004$) perteneciente al phylum *Actinobacteria* y *Streptococcus* (6,3 % frente a 3,9 %). , $p=0,023$) perteneciente al phylum *Firmicutes* (T Jaeggi et al., 2014a). De igual manera, en otro estudio realizado por (McClorry et al., 2018), se identificó la presencia del microbioma de niños con anemia de la selva peruana, y se encontró presencia de *Firmicutes* (*Coproccoccus*, *Dorea*, *Roseburia*), *Bacteroidetes* (*Barnesiellaceae*, *Odoribacteraceae*), y *Proteobacteria* (*Desulfovibrio*), a diferencia de niños sin anemia. A diferencia del phylum *Actinobacteriota*, donde AA presenta mayor abundancia relativa, y RA menor abundancia relativa. A diferencia de nuestro estudio, en un estudio realizado por (Muleviciene et al., 2018), se identificó la microbiota de

10 niños con IDA y 10 niños control, donde los niños con IDA mostraron un aumento de *Bacteroidetes* y *Proteobacteria*, y una menor cantidad de *Actinobacteria* y *Verrucomicrobia* a diferencia de los niños control. Resultado similar el estudio de (T Jaeggi et al., 2014b). El phylum *Proteobacteria* es menos abundante en C que en AA y RA, al igual que en el estudio realizado en la India en niños la mayoría anémicos, se encuentra mayor abundancia del phylum *Proteobacteria*, una gran abundancia de este phylum sugiere mostrar un comportamiento como marcador de disbiosis (desequilibrio microbiano intestinal), y se ha asociado con resultados negativos a la salud (Huey et al., 2020).

Adicionalmente en AA se presenta *Chloroflexi*, esta phylum estuvo presente en la microbiota intestinal de niños no occidentalizados en un estudio realizado en México a través del secuenciamiento del gen 16S rRNA (Sánchez-Quinto et al., 2020). *Verrucomicrobiota* está presente en AA y RA, en un estudio en niños de Canadá con presencia en sangre de Selenio (Se), mostró alta abundancia relativa de Verucomicrobiota, esta phylum es ubicua en el intestino humano y puede vivir en asociación con eucariotas (Shen et al., 2022). Finalmente en RA se presenta *Cyanobacteria*. Un estudio realizado en Champaign-Urbana, Estados Unidos en niños de 4 a 8 años con ingesta caracterizada por cereales, lácteos y legumbres, frutos secos y semillas, a diferencia de otro grupo que recibió ingesta de pescado, carbohidratos refinados, alimentos proteicos, frutas, vegetales, jugos y bebidas azucaradas, mostró alta abundancia de *Cyanobacteria* (Berding et al., 2018).

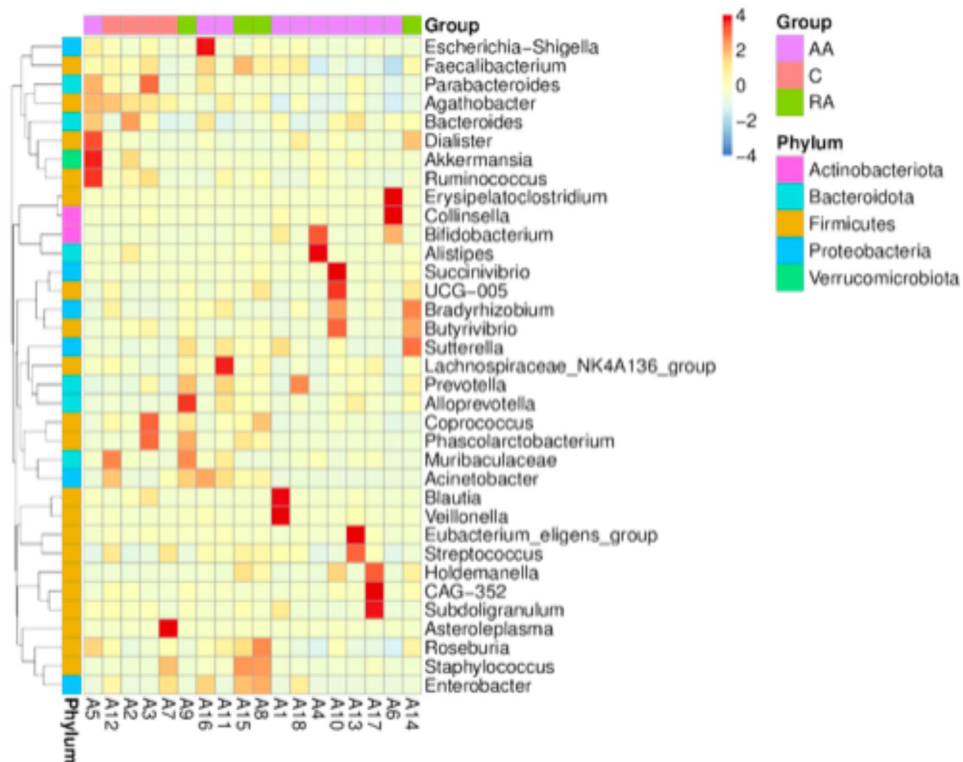
b. Mapa de calor del clúster de abundancia taxonómica

Con la información de abundancia de los 35 géneros principales de todas las muestras, se dibujó el mapa de calor presente en la Figura 14, este sirve para verificar si las

muestras con un procesamiento similar están agrupadas o no, y también se puede observar la similitud y la diferencia de las muestras, y entre los grupos.



A



B

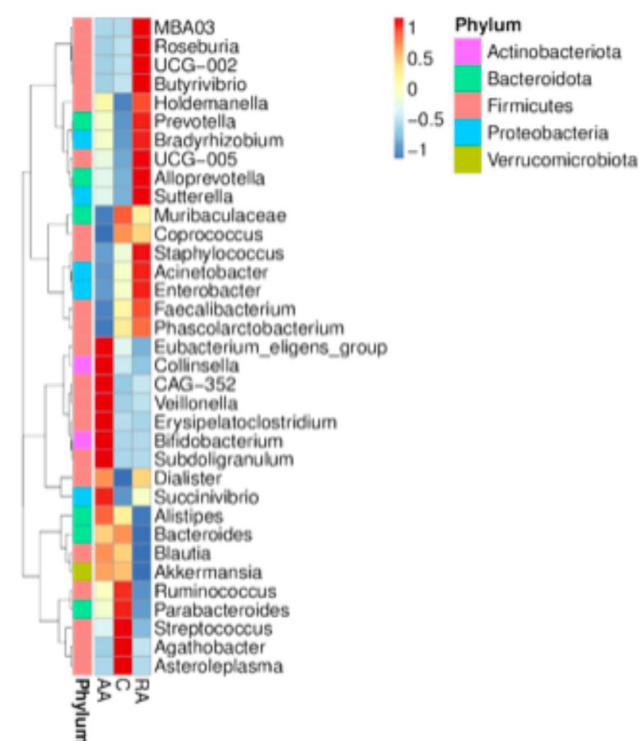


Figura 14 Mapa de calor del conglomerado de abundancia taxonómica (A) muestras A1-A18. (B) grupos AA, C, RA. Fuente: Elaboración propia

En la Figura 14 (A) se observa en el eje X las muestras de los pacientes en estudio, mientras que en Y se observa el género, el valor absoluto en z representa la distancia entre la media de la desviación estándar y la puntuación bruta, el valor z tiene signo negativo cuando la puntuación bruta está por debajo de la media y el valor z es tiene signo positivo cuando la puntuación bruta está por encima de la media.

En el grupo C (representado de color rosa) se observa 4 muestras, A12, A2, A3 y A7, donde A12 muestra un significativo aumento en 3 géneros *Agathobacter*, *Muribaculaceae* y *Acinetobacter*, al igual que en A2, con aumento en *Agathobacter*, *Bacteroides* y *Akkermansia*, en A3 se evidencia un aumento significativo en *Parabacteroides*, *Coprococcus* y *Phascolarctobacterium*, finalmente en A7 se muestra un aumento significativo en *Agathobacter*, *Streptococcus*, *Asteroleplasma*, *Staphylococcus* y *Enterobacter*. En el grupo AA (representado de color cioleta) se observa 10 muestras, A1, A4, A5, A6, A10, A11, A13, A16, A17 y A18. A continuación se observa un aumento significativo como se describe a continuación, en A1 en *Blautia* y *Veillonella*, en A4 se observa *Alistipes* y *Bifidobacterium*, en A5 se observa *Ruminococcus*, *Akkermansia* y *Dialister*, en A6 *Erysipelatoclostridium* y *Collinsella*, en A10 se observa *Succinivibrio*, *UCG-005* y *Butyrivibrio*.

En A11 en *Lachnospiraceae_NK4A13*, en A13 se observa *Eubacteriumeligens* y *Streptococcus*, en A16 se observa *Escherichia-Shiguelia*, cabe decir que para este tipo de bacterias gramnegativas la adquisición de hierro juega un rol fundamental en la virulencia y la colonización(Zimmermann et al., 2010)

En A17 *Subdoligranulum*, *CAG-352*, *Holdemanella* y A18 presencia de *Prevotella*. En el grupo RA están presentes las muestras A8, A9, A14 y A15. En A8 se evidencia un aumento en *Roseburia*. *Staphylococcus* y *Enterobacter*, en A9 se observa un aumento significativo en *Alloprevotella*, en A14 se observa un incremento en

Bradyrhizobium, y *Sulterella*, y en A15 un aumento en *Faecalibacterium* y *Staphylococcus*.

En la Figura 14(B) se observa en el eje X los grupos AA, C y RA, y en el eje Y, los 35 principales géneros presentes en las muestras. En AA se observa un aumento en *Eubacterium eligens*, *Colinsella*, *CAG-352*, *Veillonella*, *Erysipelatoclostridium*, *Bifidobacterium*, *Subdoligranulum* y *Succinivibrio*. En C se muestra un aumento en *Ruminococcus*, *Parabacteroides*, *Streptococcus*, *Agathobacter* y *Asteroleplasma*. En RA se muestra un aumento significativo en *MBA03*, *Roseburia*, *UCG-002*, *Butyrivibrio*, *Prevotella*, *Bradyrhizobium*, *UCG-005*, *Alloprevotella*, *Sulterella*, *Staphylococcus*, *Acinetobacter* y *Enterobacter*

c. Ternary plot

En la Figura 15 se observa el diagrama Ternary Plot, se evidencia tres vértices que representan a los tres grupos, en la parte inferior izquierda se encuentra el grupo C, en la parte superior se encuentra RA, y en la parte inferior derecha está AA, se observa un círculo de color plomo, que es el más grande, representando al phylum *Firmicutes*, este es uno de los taxones dominantes.

El tamaño del círculo es proporcional a la abundancia, el círculo color verde de tamaño mediano, y equivale a *Bacteroidota*, este muestra mayor representatividad en AA, al igual que *Proteobacteria* de color azul y *Actinobacteriota*, ambos con tamaños pequeños, esta última especie está más cercana a AA que a C que se encuentra en segundo lugar. De los phylum, el más representativo es el *Firmicutes*, y la muestra C es la que tiene mayor abundancia, este phylum está dentro del intestino, es el más predominante productor de ácidos grasos de cadena corta (SCFA) y ha demostrado

tener propiedades antiinflamatorias (Finlayson-Trick et al., 2020), *Firmicutes* también fue el phylum más representativo en la microbiota intestinal de niños sanos en un estudio realizado en Bangladesh (Monira et al., 2011).



d. El árbol evolutivo en género.

En la Figura 16 se observa el árbol evolutivo en género, el cual sirve para estudiar más a fondo la relación filogenética del género, se seleccionaron los 100 géneros principales y se dibujó el árbol evolutivo utilizando las secuencias representativas alineadas, en el círculo se muestra los diferentes colores de las ramas representando diferentes phylum, fuera del círculo, se muestra la abundancia relativa de cada género y los diferentes colores representan diferentes grupos, de color rojo AA, amarillo C y verde RA.

Figura 16 El árbol evolutivo en género. Fuente: Elaboración propia

En el árbol se observa gran presencia del género *Faecalibacterium*, correspondiente al phylum *Firmicutes*, principalmente se observa presencia en el grupo C y en el grupo RA, del mismo phylum resalta la presencia de *Agathobacter* con mayor presencia en el grupo C, en el phylum Bacteroidetes se observa la presencia de *Bacteroides*, este muestra mayor abundancia en C y AA, asimismo se encuentra el género *Prevotella* con mayor presencia en RA, en el phylum *Tenericutes* se ve presencia del género *Asteroleplasma* principalmente en C. El grupo AA muestra presencia de *Collinsella* y *Bifidobacteria*, ambos géneros pertenecientes al phylum *Actinobacteria*.

3.4. Índices de diversidad alfa

Para evaluar los índices de la diversidad alfa, las OTU generadas se consideran homólogas en especies con una identidad de secuencia del 97%. En la Tabla 6, el número de lecturas elegidas para normalizar evidencia un límite de 88659. En las especies observadas se observa más de mil especies en A7 y A15, mientras que en A1, A3 y A5 se encuentra el menor número de especies observadas alrededor de 500. Con respecto al índice chao1 se conoce como un estimador basado en la abundancia, se denomina chao1 al límite inferior correspondiente de la riqueza de especies, ACE es el índice de estimadores de cobertura basados en abundancia, métrica de diversidad que implica un umbral de abundancia arbitrario como el número de taxones abundantes como el número de taxones raros, este valor incrementará el número de taxones raros y taxones con abundancia (Chao & Chiu, 2016).

Las curvas de rarefacción y las curvas de abundancia de rango se utilizan ampliamente para indicar la biodiversidad en las muestras.

Nombre de muestra	Especies observadas	shannon	simpson	chao1	ACE	Cobertura buena	PD_whole_tree
A1	489	4.687	0.926	521.094	539.201	0.999	47.892
A2	916	5.658	0.948	950.231	959.256	0.999	73.782
A3	507	5.246	0.935	834.353	594.161	0.999	49.776
A4	549	4.454	0.861	574.431	578.291	0.999	43.637
A5	514	4.89	0.932	539.904	551.275	0.999	45.869
A6	256	2.688	0.738	309.333	311.447	0.999	35.663
A7	1086	4.257	0.754	1166.694	1212.709	0.998	109.111
A8	904	6.584	0.972	968.51	998.374	0.998	154.248
A9	733	6.383	0.971	788.812	791.851	0.999	90.231
A10	785	5.636	0.928	912.866	912.075	0.998	126.242
A11	710	6.18	0.963	741.509	757.972	0.999	90.203
A12	763	6.367	0.961	811.614	817.492	0.999	72.484
A13	706	5.721	0.935	776.139	768.1	0.999	86.111
A14	992	6.479	0.971	1072	1103.739	0.998	145.009
A15	1085	6.332	0.941	1148.124	1185.463	0.998	140.552
A16	657	5.93	0.94	687.052	713.648	0.999	88.664
A17	708	5.833	0.93	765.342	761.506	0.999	59.379
A18	755	5.658	0.926	810.528	824.419	0.999	102.742

En la Figura 14 se detalla la curva de rarefacción, esta se crea seleccionando aleatoriamente cierta cantidad de datos de secuenciación de las muestras y luego contando el número de especies que representan (es decir, el número de OTU).

3.4.2. Curvas de biodiversidad

Las curvas de rarefacción pueden reflejar directamente la racionalidad del volumen de datos de secuenciación e indirectamente la riqueza de la comunidad microbiana en las muestras.

Tabla 6 Índices de diversidad alfa

Fuente: Elaboración propia

En la Figura 17 el eje de las ordenadas muestra el número de especies observadas, y el eje de abscisas muestra el número de secuencias, cada muestra desde A1 hasta A18, se representan con un color diferente, la curva sugiere que las bibliotecas de las muestras incluidas en este estudio fueron suficientes para capturar la mayor parte de la diversidad bacteriana.

La muestra A15, A14 (niños recuperados de anemia) presentan curva pronunciada, que sugiere que en estas muestras quedan especies por descubrir. La muestra A6 y A1 (muestras de niños con anemia), representan las muestras donde las curvas se vuelven más planas, que sugiere que se ha tomado una porción aceptable de muestras, indicando que únicamente queda por muestrear las especies escasas.

Figura 17 Curvas de rarefacción. Fuente: Elaboración propia

En la Figura 18, se detalla la curva de abundancia de rango, que consiste en clasificar las OTU en la muestra por la abundancia relativa, de mayor a menor para obtener el número de clasificación correspondiente, y luego usar el número de clasificación de las OTU como la abscisa, la abundancia relativa en las OTU (también el porcentaje relativo del número de secuencias en la SALIDA) se pueden usar como ordenadas, se conectó estos puntos con polilíneas para obtener la curva de abundancia de rango, que puede reflejar directamente la riqueza y la uniformidad de las especies en las muestras. Como se observa en la Figura 15, todas las curvas son planas al final lo que refleja una distribución uniforme

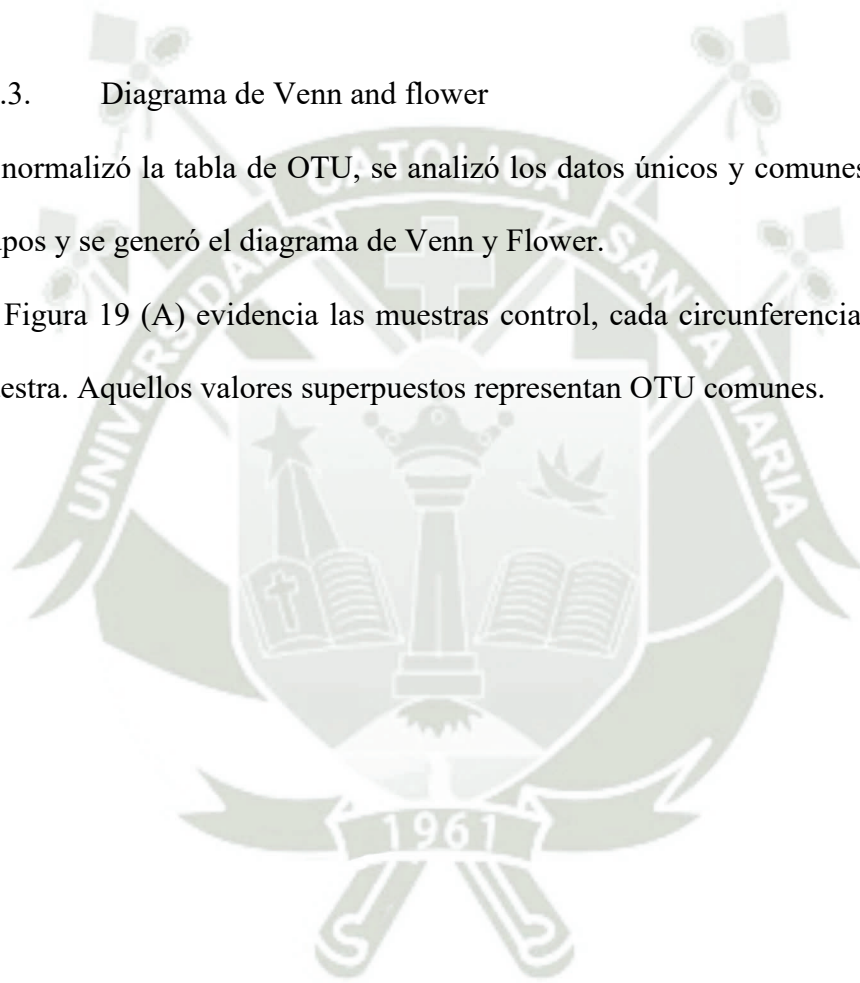
de las especies, A15, A7 y A14 oscilaron mas alto en el eje X lo que indicó una mayor abundancia en estas muestras.

Figura 18 Curvas de abundancia de rango. Fuente: Elaboración propia

3.4.3. Diagrama de Venn and flower

Se normalizó la tabla de OTU, se analizó los datos únicos y comunes para distintos grupos y se generó el diagrama de Venn y Flower.

La Figura 19 (A) evidencia las muestras control, cada circunferencia evidencia una muestra. Aquellos valores superpuestos representan OTU comunes.



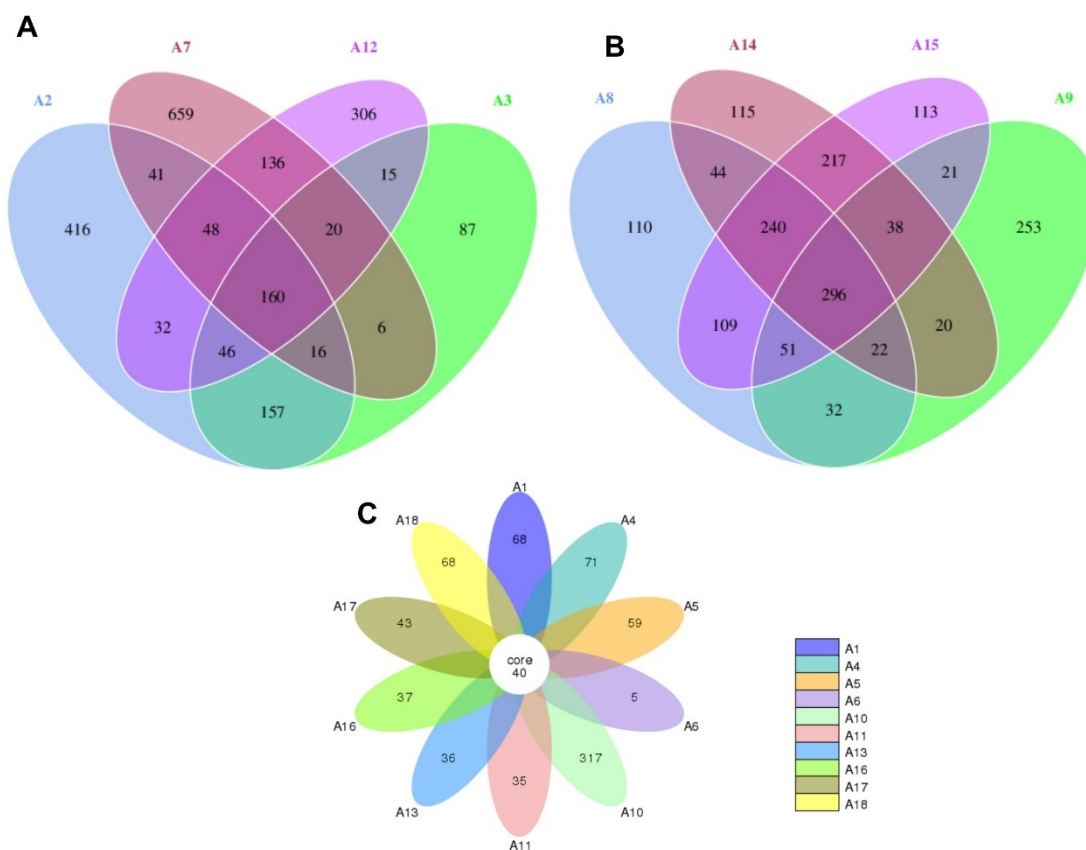


Figura 19 (A) Diagrama Venn y Flower para C. (B) Diagrama Venn y Flower para RA (C) Diagrama de Flower para AA. Fuente: Elaboración propia

Los otros son OTU específicos en cada muestra, en A2 se tiene 416 OTU únicos, en A7 se observa 659 OTU únicos, en A12 se evidencia 306 OTU únicos y en A3 se visualiza 87 OTU únicos, existe una similitud de 160 OTUs en las 4 muestras control. La Figura 19(B) evidencia las muestras de niños recuperados, una muestra es representada por cada círculo. Los valores superpuestos muestran OTU comunes, los otros OTU individuales son específicos en cada muestra, en A8 se tiene 110 OTU únicos, en A14 se observa 115 OTU únicos, en A15 se evidencia 113 OTU únicos y en A9 se visualiza 253 OTU únicos, existe una similitud de 296 OTUs en las 4 muestras de niños recuperados.



En la Figura 19(C), se representa las muestras de los niños con anemia ferrópenica, cada pétalo en el diagrama de flores representa una muestra, con diferentes colores para diferentes muestras. El número central de 40 ubicado en el centro es para el número de OTU presentes en todas las muestras, mientras que el número en los pétalos es para los OTU únicos que solo se muestran en cada muestra.

3.4.4. Diferencia de índices de diversidad alfa entre grupos

Se formaron diagramas de caja para analizar la diferencia de los índices de diversidad alfa entre los grupos. Las pruebas T, Wilcoxon y Tukey (las pruebas T y Wilcoxon son para 2 grupos, mientras que las pruebas Wilcoxon y Tukey son para más de 2 grupos) se realizan para el análisis de la importancia de la diferencia entre grupos. Los diagramas de caja basados en índices de Shannon y especies observadas se muestran en la Figura 20 (A) y (B).

3.5. Diversidad Beta

3.5.2. Mapa de calor de diversidad beta

Se seleccionaron la distancia Unifrac ponderada y Unifrac no ponderada de esta manera se pudo ponderar el coeficiente de disimilitud entre muestras por pares, en donde se evidencia como medición filogenética, principalmente en proyectos de secuenciamiento de comunidades microbianas.

En la Figura 21 se observa el mapa de calor, este está basado en las distancias Unifrac ponderada y Unifrac no ponderada., cada cuadrícula representa el coeficiente de disimilitud entre muestras por pares, en donde arriba se observa la distancia Unifrac ponderada y a la inversa de Unifrac no ponderada.

Figura 21 Mapa de calor de diversidad beta. Fuente: Elaboración propia

3.5.3. La diferencia de los índices de Diversidad Beta entre grupos

En la Figura 22 (A), se generó un diagrama de caja utilizando datos de UNIFRAC ponderado, mientras que en la Figura 22 (B) se utilizó datos UNIFRAC no ponderado, ambas muestran la diferencia de los índices de diversidad beta entre los grupos AA, RA y C usando las pruebas T, wilcox y Tukey (las pruebas T y wilcox son para 2 grupos, mientras que las pruebas wilcox y Tukey son para grupos de más de 2) se realizan para el análisis de la diferencia significativa entre grupos. En la Figura 22 (A) y 22 (B) se evidencia que el grupo C presenta la mayor mediana de los 3 grupos, además existe diferencias entre la diversidad beta de los 3 grupos, sin embargo AA presenta la mayor distribución.

Figura 22 Diagrama de caja basado en la distancia Unifrac. (A) No ponderada (B) Ponderada. Fuente: Elaboración propia



3.5.4. Análisis de coordenadas principales (PCoA)

PCoA es una técnica de ordenación que recoge los principales elementos y estructuras de series de datos multidimensionales reducidas de valores propios.



La técnica tiene la ventaja sobre PCA de que se puede investigar cada distancia ecológica. Unifrac ponderado (Figura 23A) y Unifrac no ponderado (Figura 23B) se calculan para ayudar en el análisis de PCoA.

Cada punto representa una muestra, graficada por un componente principal en el eje X y otro componente principal en el eje Y, fue coloreado, rojo AA, verde C, y azul RA. El porcentaje en cada eje indica el valor de la contribución a la discrepancia entre muestras.

3.5.5. Análisis de componentes principales (PCA)

PCA es un procedimiento estadístico, que sirve para extraer los componentes principales y las estructuras de los datos mediante la transformación ortogonal y la reducción de las dimensionalidades de los datos.

Extrae los primeros dos ejes que reflejan la diferencia de las muestras en la mayor medida, por lo que puede reflejar la variación de los datos de alta dimensión en un gráfico bidimensional, lo que revela el principio simple que se incrusta en los datos complejos. Mientras mayor similitud presente la composición de la comunidad de microorganismos entre las muestras, más cerca estará la distancia de sus puntos de datos correspondientes en PCA. El resultado del análisis PCA basado en OTU se muestra en la Figura 24, donde cada punto representa una muestra, trazada por el segundo componente principal en el eje Y y el primer componente principal en el eje X, que fue coloreado por grupo, donde AA esta coloreado en rojo, control en verde y recuperados en azul.

3.5.6. Escalamiento multidimensional no métrico (NMDS)

El análisis NMDS, es un modelo no lineal diseñado para una mejor representación de la estructura de datos biológicos no lineales con el objetivo de superar las fallas en los métodos basados en modelos lineales, incluidos PCA y PCoA. El resultado del análisis NMDS basado en OTU se muestra en la Figura 25, donde cada punto de datos en el gráfico representa una muestra. La distancia entre los puntos de datos refleja el grado de variación. Las muestras que pertenecen al mismo grupo están en el mismo color. Cuando el valor del factor de estrés es inferior a 0,2, se considera que NMDS es fiable hasta cierto punto.

Figura 25 NMDS. Fuente: Elaboración propia

3.5.7. Método de grupos de pares no ponderados con media aritmética (UPGMA)

Para comprender la semejanza entre diferentes muestras, se utilizó el análisis de conglomerados para construir un árbol de conglomerados. UPGMA es un método de agrupamiento jerárquico, muy usado en ecología bajo la clasificación de diferentes muestras. La UPGMA primero, evidencia que para formar un nuevo nodo, las muestras con una distancia más cercana se agrupan. Su punto de ramificación está a 1/2 de distancia de las dos muestras originales.

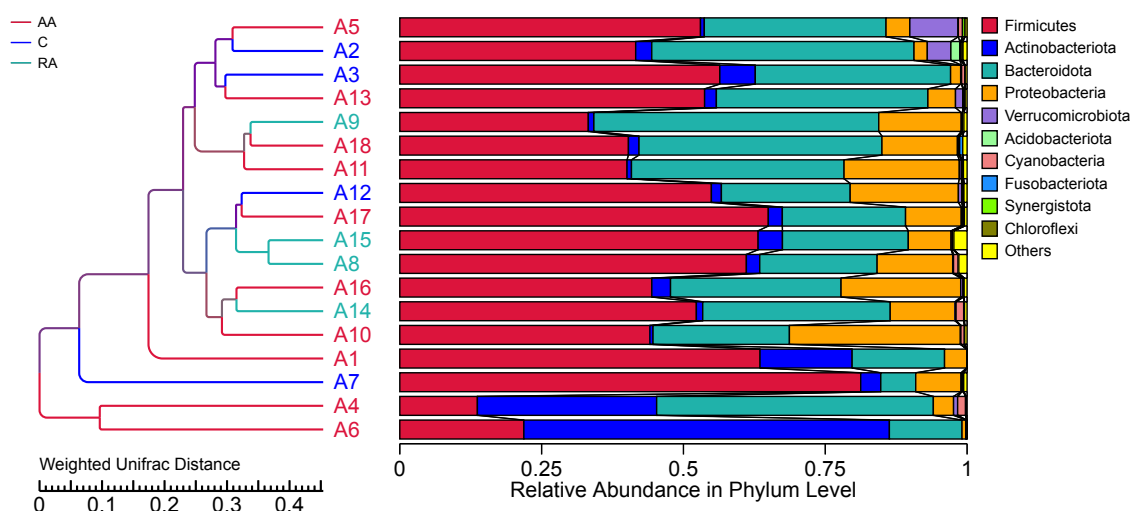


Figura 26 Árbol de clústeres UPGMA basado en la distancia Unifrac ponderada.

Fuente: Elaboración propia

A continuación, se calculó la distancia media entre aquella muestra recientemente creada y otras muestras, adicionalmente las 2 muestras más cercanas se pueden encontrar nuevamente para repetir los pasos anteriores. Hasta que todas las muestras estén agrupadas, se podría obtener un árbol de agrupamiento completo.

Antes de usarse para el análisis de conglomerados UPGMA, la matriz de distancia Unifrac ponderada y Unifrac no ponderada fue calculada. Se mostraron con la integración de los resultados de agrupamiento y la abundancia relativa de cada muestra por filo en la Figura 26 y 27. En las Figuras, se ve el trazado con el árbol UPGMA a la izquierda y la abundancia relativa en el mapa de phylum a la derecha.

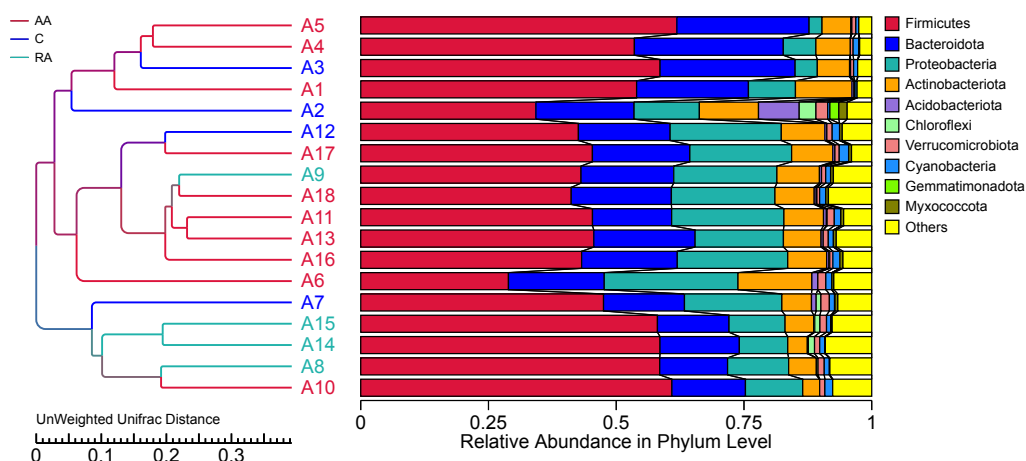


Figura 27 Árbol de clústeres UPGMA basado en la distancia Unifrac no ponderada.

Fuente: Elaboración propia

3.5.8. Análisis de diferencias comunitarias

a. Análisis de Similitud (Anosim)

El análisis de Anosim es una prueba no paramétrica para evaluar si la diferencia entre grupos es significativamente mayor que la disimilitud dentro de los grupos, lo que ayuda a evaluar la razonabilidad de la división de grupos.

Tabla 7 Resultados de Anosim

Group	R-value	P-value
AA-RA	-0.1539	0.782
C-RA	0.2812	0.081
C-AA	-0.1451	0.775

Fuente: Elaboración propia

AA: Niños anémicos

RA: Niños recuperados

C: Control

En la Tabla 7 se observa que el valor R está entre -1 y 1. El valor R positivo de C-RA significa que la variación entre C y RA se considera significativa, mientras que en AA-RA y C-AA sugiere que la variación dentro de los grupos es mayor que la variación entre grupos, por lo tanto, no es diferente significativamente. Adicionalmente en la Tabla se muestra el grado de confianza representado por el valor P, en todos los grupos este valor supera al 0.05 lo que indica una no significancia estadística.

Para la presente investigación es importante ver la diferencia en términos estadísticos de la muestra de niños con anemia y los niños recuperados de anemia, para evidenciar



Figura 28 Resultado de anosim. Fuente: Elaboración propia

La Figura 28 evidencia en el eje de la abcisa las muestras AA, RA y además el análisis entre estos grupos, mientras que la ordenada representa la distancia Unifrac no ponderado. R presenta un valor de -0.154 lo que demuestra que la diferencia entre grupos es mayor que la diferentes dentro de los grupos: adicionalmente al analizar el valor p, se determinó 0.782 al ser una diferencia en la microbiota antes y después de la enfermedad, por esta razón se evaluó el grafico ANOSIM entre estos grupos. mayor a 0.05 indica que las estadísticas no son significativas.

b. Análisis de procedimiento de permutación de respuesta múltiple (MRPP)

MRPP es similar a Anosim, sin embargo, no usa rangos, esto significa que MRPP puede detectar diferencias en la media así como en la dispersión, además que los sesgos en la métrica de distancia serán más pronunciados que en ANOSIM. En resumen, MRPP busca determinar si la diferencia de estructura de la comunidad microbiana entre los grupos es significativa. Por lo general, se aplica con métodos de reducción de dimensiones como PCA, PCoA y NMDS.

Tabla 8 Resultado MRPP

Group	A	observed-delta	expected-delta	Significance
AA-RA	0.03478	0.6796	0.7041	0.02
C-RA	0.05279	0.5939	0.627	0.055
AA-C	0.004309	0.7264	0.7233	0.564

Fuente: Elaboración propia

Un valor pequeño en la columna titulada observe-delta indica que la variación del grupo interno es pequeña, mientras que uno grande en la columna de delta esperado significa

que la variación entre grupos es grande. Un valor A positivo como se representa en la evaluación de los grupos AA-RA, C-RA y AA-C sugiere que la diferencia entre grupos es mayor que dentro de los grupos, sin embargo estos valores no son estadísticamente significativos (Tabla 8).

3.5.9. Análisis de especies de variación entre grupos

a. Prueba T

La prueba T se realiza para determinar las especies con una variación significativa entre grupos (valor de $p < 0,05$) en varios rangos de taxón, incluidos el phylum, la clase, el orden, la familia, el género y la especie.

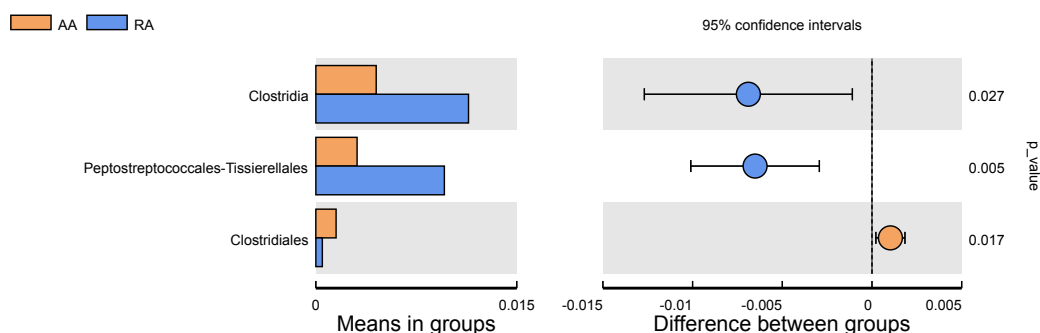


Figura 29 Análisis de prueba T entre grupos. Fuente: Elaboración propia

La prueba T fue realizada para determinar especies con variación significativa entre los grupos AA y RA., es importante conocer que especies están presentes con la enfermedad y en ausencia de ella, se conoce que un valor $P < 0.05$, se considera significativa. La representación de la izquierda muestra diferencia de especies dentro de los grupos, mientras que en la derecha se observa el intervalo de confianza de variación entre los grupos. De color naranja se encuentra el grupo AA, y el color azul el grupo RA, la clase

Clostridia muestra diferencia significativa dentro de cada uno de los grupos, siendo más significativa dentro del grupo AA, similar resultado con el orden *Peptostreptococcales-Tissierellales*, a diferencia del orden *Clostridiales* cuya significancia es mayor dentro del grupo RA que en AA. En la figura de la derecha, el círculo en el centro designa la diferencia del valor medio.

En la Figura 29 la figura izquierda es la abundancia de especies que muestra una diferencia significativa entre los AA y RA de anemia, en la clase *Clostridia*, orden *Peptostreptococcales-Tissierellales* y orden *Clostridiales*, cada barra representa la media de la abundancia en cada grupo de la especie mostrando una diferencia significativa entre grupos. La figura de la derecha es el intervalo de confianza de variación entre grupos, al lado izquierdo de cada círculo la línea muestra el límite inferior del intervalo de confianza que en este caso fue del 95 %, mientras que la línea de su derecha se encuentra el límite superior. El color del círculo (azul RA y naranja AA) está de acuerdo con el grupo cuyo valor medio es mayor. En el eje de las ordenadas se encuentra el valor p de la prueba de significancia de la variación entre grupos.

b. Análisis LEfSe

Se utilizó LEfSe (análisis discriminante lineal (LDA) tamaño del efecto) para analizar y detectar biomarcadores. LEfSe es un software diseñado para descubrir biomarcadores de alta dimensión y revelar características metagenómicas (incluidos genes, metabolitos o taxones), por lo que puede usarse para distinguir dos o más clases biológicas. Enfatiza la importancia estadística, la consistencia biológica y la correlación de efectos, y permite a los investigadores identificar características de abundancia y clases relacionadas. El

resultado se compuso del histograma de puntajes LDA y el Cladograma de biomarcadores estadísticamente diferentes entre grupos. Los resultados son los siguientes:

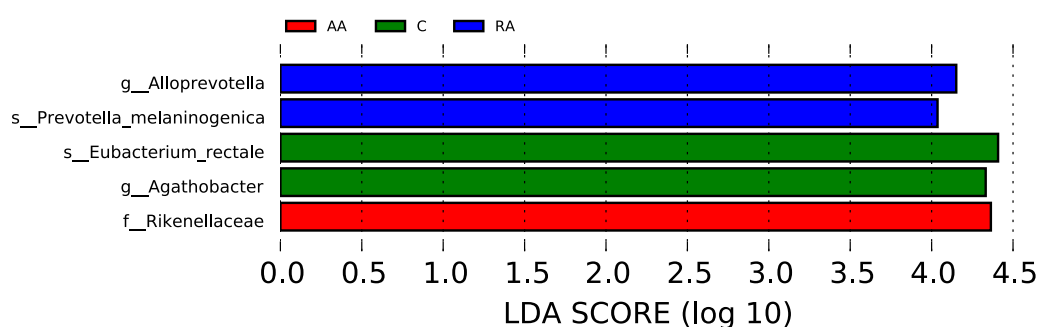


Figura 30 Histograma de puntuaciones LDA. Fuente: Elaboración propia

En la Figura 30, de los gráficos del tamaño del efecto (LEfSe) del análisis discriminante lineal (LDA) para AA, C y RA. LDA es mostrado en escala logarítmica. Cada grupo es identificado por el color en la parte superior. No se observa alteraciones pronunciadas en la taxa de ninguno de los 3 grupos, siendo las puntuaciones similares y positivas. Las barras horizontales representan el tamaño del efecto para cada taxón. La longitud de la barra representa la puntuación LDA transformada $\log_{10}$, indicada por líneas de puntos verticales. AA se indica en rojo, C en verde y RA en azul. El taxón de bacterias con cambio estadísticamente significativo ($p < 0,05$) en la abundancia relativa se escribe a lo largo de las líneas horizontales. El nombre del nivel taxonómico se abrevia como p-phylum; clase c; o-orden; familia f y género g. AA presenta la familia de *Rikenellaceae*,

en C se encuentra el género *Agathobacter* y la especie *Eubacterium rectale*, por último en RA se encuentra el género *Alloprevotella* y la especie *Prevotella melaninogenica*.

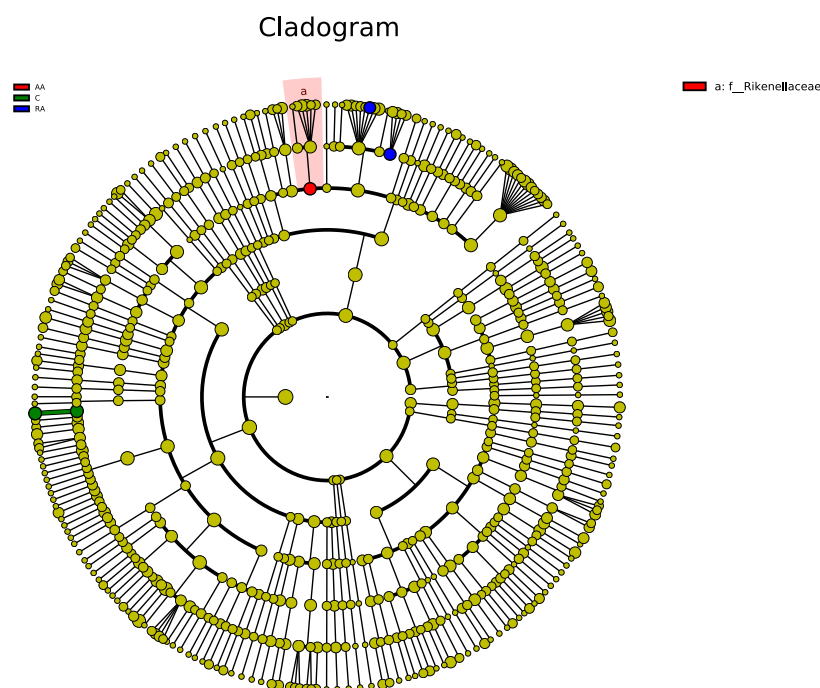


Figura 31 Cladograma. Fuente: Elaboración propia

La Figura 31, muestra el cladograma, se muestran resultados del análisis LEfSe para la evaluación de biomarcadores con diferencias estadísticas entre grupos. El histograma a partir de las puntuaciones LDA evidencian especies cuya abundancia muestra diferencias significativas entre grupos. El criterio de selección es que las puntuaciones LDA sean mayores que el umbral establecido (cuatro establecidos de forma predeterminada). La longitud de cada intervalo, es decir, la puntuación LDA, representa el tamaño del efecto, es decir la medida en la que un biomarcador puede mostrar los fenotipos diferenciadores entre grupos.

En el cladograma, los círculos que se extienden desde el lado interior al lado exterior representan el rango taxonómico desde el phylum hasta el género (especie). Cada círculo

representa un taxón distinto en el rango taxonómico correspondiente. El diámetro de cada círculo representa proporcionalmente la abundancia relativa de cada taxón. El amarillo representa taxones con diferencias no significativas. Los taxones (biomarcadores) con diferencias significativas se colorean según el color del grupo correspondiente. Los nódulos rojos significan que esta microbiota contribuye mucho en el grupo cubierto por el color rojo, al igual que los nódulos verdes. Las letras sobre los círculos y las especies correspondientes están anotadas en el lado derecho.

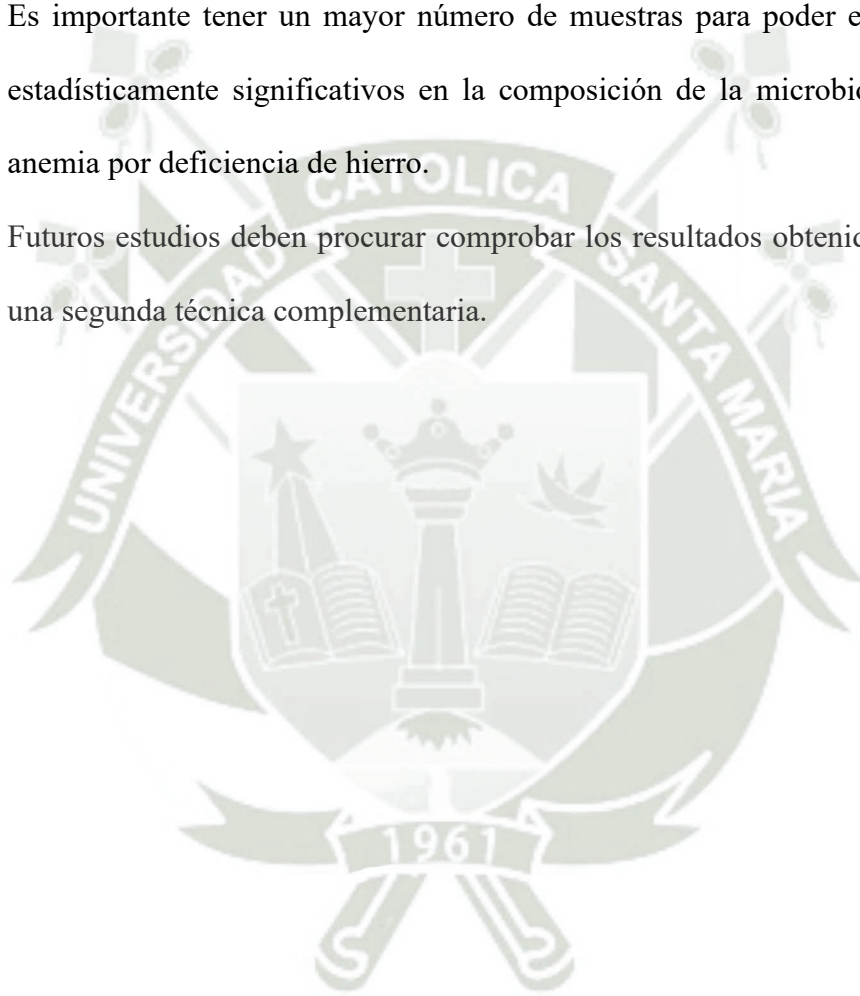


CONCLUSIONES

1. Se caracterizó molecularmente las bacterias que conforman el microbioma de niños con anemia ferropénica, mostrando presencia de *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Firmicutes* y *Chloroflexi*.
2. Se obtuvo la filogenia del microbioma de niños con anemia ferropénica, mediante un árbol taxonómico donde se evidencio mayor presencia de *Actinobacteriota*
3. Se comparó mediante un análisis de diversidad beta la diversidad microbiana en los grupos de niños con anemia, recuperados de anemia y control, la variación entre C y RA se considera significativa, la evaluación de los grupos AA-RA, C-RA y AA-C sugiere que la variación entre grupos es mayor que la variación dentro de los grupos, sin embargo, estos valores no son estadísticamente significativos según el p valor.
4. El taxón de bacterias con cambio estadísticamente significativo ($p < 0,05$) en AA presenta la familia de *Rikenellaceae*, en C se encuentra el género *Agathobacter* y la especie *Eubacterium rectale*, por último en RA se encuentra el género *Alloprevotella* y la especie *Prevotella melaninogenica*.

RECOMENDACIONES

1. Este estudio surge como línea base para futuras investigaciones por lo que se recomienda continuar con las investigaciones en microbiota.
2. Es importante tener un mayor número de muestras para poder establecer valores estadísticamente significativos en la composición de la microbiota de niños con anemia por deficiencia de hierro.
3. Futuros estudios deben procurar comprobar los resultados obtenidos por NGS con una segunda técnica complementaria.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arnold, J. W., Roach, J., & Azcarate-Peril, M. A. (2016). Emerging Technologies for Gut Microbiome Research. *Trends in Microbiology*, 24(11), 887–901.
<https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.06.008>
- Arrieta, M. C., Stiemsma, L. T., Amenyogbe, N., Brown, E., & Finlay, B. (2014). The intestinal microbiome in early life: Health and disease. *Frontiers in Immunology*, 5(AUG), 1–19. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00427>
- Bador, J., Nicolas, B., Chapuis, A., Varin, V., Dullier-Taillefumier, N., de Curraize, C., Amoureux, L., Putot, A., & Neuwirth, C. (2020). 16S rRNA PCR on clinical specimens: Impact on diagnosis and therapeutic management. *Medecine et Maladies Infectieuses*, 50(1), 63–73. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2019.09.014>
- Balvočiute, M., & Huson, D. H. (2017). SILVA, RDP, Greengenes, NCBI and OTT - how do these taxonomies compare? *BMC Genomics*, 18(Suppl 2), 1–8.
<https://doi.org/10.1186/s12864-017-3501-4>
- Barko, P. C., McMichael, M. A., Swanson, K. S., & Williams, D. A. (2018). The Gastrointestinal Microbiome: A Review. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 32(1), 9–25. <https://doi.org/10.1111/jvim.14875>
- Barragan, G., Santoyo, A., & Ramos, C. (2015). Iron deficiency anaemia. *Revista Médica Del Hospital General de México*, 79(2), 88–97.
<https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.hgmx.2015.06.008>
- Berding, K., Holscher, H. D., Arthur, A. E., & Donovan, S. M. (2018). Fecal microbiome composition and stability in 4- to 8-year old children is associated with dietary

patterns and nutrient intake. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 56, 165–174.

<https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2018.01.002>

Bik, E. M. (2009). Composition and function of the human-associated microbiota.

Nutrition Reviews, 67(SUPPL. 2). <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2009.00237.x>

Binda, C., Lopetuso, L. R., Rizzatti, G., Gibiino, G., Cennamo, V., & Gasbarrini, A.

(2018). Actinobacteria: A relevant minority for the maintenance of gut homeostasis.

Digestive and Liver Disease, 50(5), 421–428.

<https://doi.org/10.1016/j.dld.2018.02.012>

Biorender.com.

Blanco-Miguez, A., Fdez-Riverola, F., Sanchez, B., & Lourenço, A. (2017). Resources and

tools for the high-throughput, multi-omic study of intestinal microbiota. *Briefings in*

Bioinformatics, 20(3), 1032–1056. <https://doi.org/10.1093/bib/bbx156>

Bloksberg, L. N. (2008). Next-Generation Sequence Data Analysis. In *Next Generation*

Genome Sequencing: Towards Personalized Medicine.

<https://doi.org/10.1002/9783527625130.ch6>

Boers, S. A., Jansen, R., & Hays, J. P. (2019). Understanding and overcoming the pitfalls

and biases of next-generation sequencing (NGS) methods for use in the routine

clinical microbiological diagnostic laboratory. *European Journal of Clinical*

Microbiology and Infectious Diseases, 38(6), 1059–1070.

<https://doi.org/10.1007/s10096-019-03520-3>

Bolyen, E., Rideout, J. R., Dillon, M. R., Bokulich, N. A., Abnet, C. C., Al-Ghalith, G. A.,

Alexander, H., Alm, E. J., Arumugam, M., Asnicar, F., Bai, Y., Bisanz, J. E.,

Bittinger, K., Brejnrod, A., Brislawn, C. J., Brown, C. T., Callahan, B. J., Caraballo-

- Rodríguez, A. M., Chase, J., ... Caporaso, J. G. (2019). Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature Biotechnology*, 37(8), 852–857. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0209-9>
- Bronner, I. F., & Quail, M. A. (2019). Best Practices for Illumina Library Preparation. *Current Protocols in Human Genetics*, 102(1), 1–48. <https://doi.org/10.1002/cphg.86>
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., & Holmes, S. P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, 13(7), 581–583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>
- Camaschella, C. (2017). New insights into iron deficiency and iron deficiency anemia. *Blood Reviews*, 31(4), 225–233. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2017.02.004>
- Can, M. (2019). Annotation of Bacteria by Greengenes Classifier er Using 16S rRNA Gene Hyper Variable Regions. *Southeast Europe Journal of Soft Computing*, 8(2).
- Cappellini, M. D., Russo, R., Andolfo, I., & Iolascon, A. (2020). Inherited microcytic anemias. *Hematology (United States)*, 20(1), 465–470. <https://doi.org/10.1182/HEMATOLOGY.2020000158>
- Cascio, M. J., & DeLoughery, T. G. (2017). Anemia: Evaluation and Diagnostic Tests. *Medical Clinics of North America*, 101(2), 263–284. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2016.09.003>
- Cenit, M. C., Olivares, M., Codoñer-Franch, P., & Sanz, Y. (2015). Intestinal microbiota and celiac disease: Cause, consequence or co-evolution? *Nutrients*, 7(8), 6900–6923. <https://doi.org/10.3390/nu7085314>
- Cerdó, T., Diéguez, E., & Campoy, C. (2019). Infant growth, neurodevelopment and gut microbiota during infancy: Which nutrients are crucial? *Current Opinion in Clinical*

Nutrition and Metabolic Care, 22(6), 434–441.

<https://doi.org/10.1097/MCO.0000000000000606>

Chao, A., & Chiu, C. (2016). Species Richness: Estimation and Comparison. In *Wiley StatsRef: Statistics Reference Online* (Issue August).

<https://doi.org/10.1002/9781118445112.stat03432.pub2>

Chaudhary, N., Sharma, A. K., Agarwal, P., Gupta, A., & Sharma, V. K. (2015). 16S classifier: A tool for fast and accurate taxonomic classification of 16S rRNA

hypervariable regions in metagenomic datasets. *PLoS ONE*, 10(2), 1–13.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116106>

Contijoch, E. J., Britton, G. J., Yang, C., Mogno, I., Li, Z., Ng, R., Llewellyn, S. R., Hira, S., Johnson, C., Rabinowitz, K. M., Barkan, R., Dotan, I., Hirten, R. P., Fu, S. C., Luo, Y., Yang, N., Luong, T., Labrias, P. R., Lira, S., ... Faith, J. J. (2019). Gut microbiota density influences host physiology and is shaped by host and microbial factors. *ELife*, 8, 1–26. <https://doi.org/10.7554/eLife.40553>

Cusick, S. E., Georgieff, M. K., & Rao, R. (2018). Approaches for Reducing the Risk of Early-Life Iron Deficiency-Induced Brain Dysfunction in Children. *Nutrients*, 10(2). <https://doi.org/10.3390/nu10020227>

DeLoughery, T. G. (2017). Iron Deficiency Anemia. *Medical Clinics of North America*, 101(2), 319–332. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2016.09.004>

Di Segni, A., Braun, T., Benshoshan, M., Barhom, S. F., Saar, E. G., Cesarkas, K., Squires, J. E., Keller, N., & Haberman, Y. (2018). Guided protocol for fecal microbial characterization by 16S rRNA-amplicon sequencing. *Journal of Visualized Experiments*, 2018(133), 1–7. <https://doi.org/10.3791/56845>

- Dostal, A., Lacroix, C., Bircher, L., Pham, V. T., Follador, R., Zimmermann, M. B., & Chassard, C. (2015). Iron modulates butyrate production by a child gut microbiota in vitro. *MBio*, 6(6), 1–12. <https://doi.org/10.1128/mBio.01453-15>
- Drakesmith, H., Nemeth, E., & Ganz, T. (2015). Ironing out Ferroportin. *Cell Metabolism*, 22(5), 777–787. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.09.006>
- Dréno, B., Araviiskaia, E., Berardesca, E., Gontijo, G., Sanchez Viera, M., Xiang, L. F., Martin, R., & Bieber, T. (2016). Microbiome in healthy skin, update for dermatologists. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 30(12), 2038–2047. <https://doi.org/10.1111/jdv.13965>
- Duranti, S., Ferrario, C., van Sinderen, D., Ventura, M., & Turrioni, F. (2017). Obesity and microbiota: An example of an intricate relationship. *Genes and Nutrition*, 12(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s12263-017-0566-2>
- Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, 32(5), 1792–1797. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>
- Finlayson-Trick, E. C., Fischer, J. A., Goldfarb, D. M., & Karakochuk, C. D. (2020). The Effects of Iron Supplementation and Fortification on the Gut Microbiota: A Review. *Gastrointestinal Disorders*, 2(4), 327–340. <https://doi.org/10.3390/gidisord2040030>
- Galloway-Peña, J., & Hanson, B. (2020). Tools for Analysis of the Microbiome. *Digestive Diseases and Sciences*, 65(3), 674–685. <https://doi.org/10.1007/s10620-020-06091-y>
- Gerasimidis, K., Bertz, M., Quince, C., Brunner, K., Bruce, A., Combet, E., Calus, S., Loman, N., & Ijaz, U. Z. (2016). The effect of DNA extraction methodology on gut microbiota research applications. *BMC Research Notes*, 9(1), 1–10.

<https://doi.org/10.1186/s13104-016-2171-7>

Graspeuntner, S., Loeper, N., Künzel, S., Baines, J. F., & Rupp, J. (2018). Selection of validated hypervariable regions is crucial in 16S-based microbiota studies of the female genital tract. *Scientific Reports*, 8(1), 4–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27757-8>

Grice, E. A., & Segre, J. A. (2012). The Human Microbiome: Our Second Genome. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 13(1), 151–170. <https://doi.org/10.1146/annurev-genom-090711-163814>

Gulec, S., Anderson, G. J., & Collins, J. F. (2014). Mechanistic and regulatory aspects of intestinal iron absorption. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 307(4). <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00348.2013>

Gupta, V. K., Paul, S., & Dutta, C. (2017). Geography, ethnicity or subsistence-specific variations in human microbiome composition and diversity. *Frontiers in Microbiology*, 8(JUN). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01162>

Haakensen, M., Dobson, C. M., Deneer, H., & Ziola, B. (2008). Real-time PCR detection of bacteria belonging to the Firmicutes Phylum. *International Journal of Food Microbiology*, 125(3), 236–241. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.04.002>

Hanshew, A., Jetté, M., Rosen, S., & Thibeault, S. (2017). Integrating the microbiota of the respiratory tract with the unified airway model. *HHS Public Access*, 126(1), 68–74. <https://doi.org/doi:10.1016/j.rmed.2017.03.019>

Hardwick, S. A., Deveson, I. W., & Mercer, T. R. (2017). Reference standards for next-generation sequencing. *Nature Reviews Genetics*, 18(8), 473–484. <https://doi.org/10.1038/nrg.2017.44>

Heintz-Buschart, A., & Wilmes, P. (2018). Human Gut Microbiome: Function Matters.

Trends in Microbiology, 26(7), 563–574. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.11.002>

Hirai, J., Nagai, S., & Hidaka, K. (2017). Evaluation of metagenetic community analysis of planktonic copepods using Illumina MiSeq: Comparisons with morphological classification and metagenetic analysis using Roche 454. *PLoS ONE*, 12(7), 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181452>

Hollister, E. B., Foster, B. A., Dahdouli, M., Ramirez, J., & Lai, Z. (2018).

Characterization of the Stool Microbiome in Hispanic Preschool Children by Weight Status and Time. *Childhood Obesity (Print)*, 14(2), 122-130. <https://doi.org/10.1089/chi.2017.0122>

Huey, S., Jiang, L., Fedarko, M., McDonald, D., & et al. (2020). Nutrition and the Gut Microbiota in 10- to 18-Month-Old Children Living in Urban Slums of Mumbai, India. *MSphere*, 5(5), 1–18.

INEI, & Ministerio de Economía y Finanzas. (2020). *Perú: Indicadores de Resultados de los Programas presupuestales 2014-2019*. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>

Jablonka, A., Wetzke, M., Sogkas, G., Dopfer, C., Schmidt, R. E., Behrens, G. M. N., & Happle, C. (2018). Prevalence and Types of Anemia in a Large Refugee Cohort in Western Europe in 2015. *Journal of Immigrant and Minority Health*, 20(6), 1332–1338. <https://doi.org/10.1007/s10903-018-0725-6>

Jaeggi, T, Kortman, G. A. M., Moretti, D., Chassard, C., Holding, P., Dostal, A., Boekhorst, J., Timmerman, H. M., Swinkels, D. W., Tjalsma, H., & al., et. (2014a). Iron fortification adversely affects the gut microbiome, increases pathogen abundance and induces intestinal inflammation in Kenyan infants. *Gut*, 64(5 CC-Infectious

Diseases), 731-742. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2014-307720>

Jaeggi, T, Kortman, G. A. M., Moretti, D., Chassard, C., Holding, P., Dostal, A., Boekhorst, J., Timmerman, H. M., Swinkels, D. W., Tjalsma, H., & al., et. (2014b). Iron fortification adversely affects the gut microbiome, increases pathogen abundance and induces intestinal inflammation in Kenyan infants. *Gut*.
<https://doi.org/10.1136/gutjnl-2014-307720>

Jaeggi, Tanja, Kortman, G. A. M., Moretti, D., Chassard, C., Holding, P., Dostal, A., Boekhorst, J., Timmerman, H. M., Swinkels, D. W., Tjalsma, H., Njenga, J., Mwangi, A., Kvalsvig, J., Lacroix, C., & Zimmermann, M. B. (2014). Iron fortification adversely affects the gut microbiome, increases pathogen abundance and induces intestinal inflammation in Kenyan infants. *Gut*, 64(5), 731–742.
<https://doi.org/10.1136/gutjnl-2014-307720>

Johnson, E. L., Heaver, S. L., Walters, W. A., & Ley, R. E. (2017). Microbiome and metabolic disease: revisiting the bacterial phylum Bacteroidetes. *Journal of Molecular Medicine*, 95(1). <https://doi.org/10.1007/s00109-016-1492-2>

Koleva, P. T., Bridgman, S. L., & Kozyrskyj, A. L. (2015). The infant gut microbiome: Evidence for obesity risk and dietary intervention. *Nutrients*, 7(4), 2237–2260.
<https://doi.org/10.3390/nu7042237>

Kumar, K. R., Cowley, M. J., & Davis, R. L. (2019). Next-Generation Sequencing and Emerging Technologies. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 45(7), 661–673.
<https://doi.org/10.1055/s-0039-1688446>

Lakshminarayanan, B., Stanton, C., O'Toole, P. W., & Ross, R. P. (2014). Compositional dynamics of the human intestinal microbiota with aging: Implications for health. *The Journal of Nutrition, Health & Aging*, 18(9). <https://doi.org/10.1007/s12603-014->

0513-5

- Lawley, B., & Tannock, G. (2017). *Analysis of 16S rRNA Gene Amplicon Sequences Using the QIIME Software Package*. 1537, 153–163. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6685-1>
- Levy, S. E., & Myers, R. M. (2016). Advancements in Next-Generation Sequencing. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 17(1), 95–115. <https://doi.org/10.1146/annurev-genom-083115-022413>
- Lim, M. Y., Song, E. J., Kim, S. H., Lee, J., & Nam, Y. Do. (2017). Comparison of DNA extraction methods for human gut microbial community profiling. *Systematic and Applied Microbiology*, 41(2), 151–157. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2017.11.008>
- Lladó Fernández, S., Větrovský, T., & Baldrian, P. (2019). The concept of operational taxonomic units revisited: genomes of bacteria that are regarded as closely related are often highly dissimilar. *Folia Microbiologica*, 64(1), 19–23. <https://doi.org/10.1007/s12223-018-0627-y>
- López-García, A., Pineda-Quiroga, C., Atxaerandio, R., Pérez, A., Hernández, I., García-Rodríguez, A., & González-Recio, O. (2018). Comparison of mothur and QIIME for the analysis of rumen microbiota composition based on 16S rRNA amplicon sequences. *Frontiers in Microbiology*, 9(DEC). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03010>
- Lynch, S. R., & Cook, J. D. (1980). Interaction of Vitamin C and Iron. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 355(1), 32–44. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1980.tb21325.x>
- Maltez Thomas, A., Prata Lima, F., Maria Silva Moura, L., Maria da Silva, A., Dias-Neto,

- E., & Setubal, J. C. (2018). Comparative metagenomics. *Methods in Molecular Biology*, 1704, 243–260. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7463-4_8
- McClorry, S., Zavaleta, N., Llanos, A., Casapía, M., Lönnardal, B., & Slupsky, C. M. (2018). Anemia in infancy is associated with alterations in systemic metabolism and microbial structure and function in a sex-specific manner: an observational study. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 108(6), 1238–1248. <https://doi.org/10.1093/ajcn/nqy249>
- Meropol, S. B., & Edwards, A. (2015). Development of the infant intestinal microbiome: A bird's eye view of a complex process. *Birth Defects Research Part C - Embryo Today: Reviews*, 105(4), 228–239. <https://doi.org/10.1002/bdrc.21114>
- Ministerio de Desarrollo e Inclusión Social. (2018). Plan Multisectorial de Lucha contra la Anemia. *Gobierno Del Peru*, 34. <http://www.midis.gob.pe/dmdocuments/plan-multisectorial-de-lucha-contra-la-anemia-v3.pdf>
- MINSA. (2017). *Plan Nacional para la reducción y control de la anemia materna Infantil y la Desnutrición Crónica Infantil en el Perú: 2017-2021*. <http://www.minsa.gob.pe/>
- Monira, S., Nakamura, S., Gotoh, K., Izutsu, K., Watanabe, H., Alam, N. H., Endtz, H. P., Cravioto, A., Ali, S. I., Nakaya, T., Horii, T., Iida, T., & Alam, M. (2011). Gut microbiota of healthy and malnourished children in Bangladesh. *Frontiers in Microbiology*, 2(NOV), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00228>
- Moore, C. A., & Adil, A. (2022). *Macrocytic Anemia*. [StatPearls Publishing][Treasure Island (FL)]. <http://europepmc.org/abstract/NBK/NBK459295>
- Muleviciene, A., D'Amico, F., Turrone, S., Candela, M., & Jankauskiene, A. (2018). Iron deficiency anemia-related gut microbiota dysbiosis in infants and young children: A

pilot study. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 65(4), 551–564.

<https://doi.org/10.1556/030.65.2018.045>

Nguyen, N.-P., Warnow, T., Pop, M., & Whie, B. (2016). A perspective on 16S rRNA operational taxonomic unit clustering using sequence similarity. *Biofilms and Microbiomes*. <https://doi.org/10.1038/npjbio>

Peñalver Bernabé, B., Cralle, L., & Gilbert, J. A. (2018). Systems biology of the human microbiome. *Current Opinion in Biotechnology*, 51, 146–153.
<https://doi.org/10.1016/j.copbio.2018.01.018>

Qian, X. B., Chen, T., Xu, Y. P., Chen, L., Sun, F. X., Lu, M. P., & Liu, Y. X. (2020). A guide to human microbiome research: Study design, sample collection, and bioinformatics analysis. *Chinese Medical Journal*, 133(15), 1844–1855.
<https://doi.org/10.1097/CM9.0000000000000871>

Sánchez-Quinto, A., Cerqueda-García, D., Falcón, L. I., Gaona, O., Martínez-Correa, S., Nieto, J., & González-Santoyo, I. (2020). Gut microbiome in children from indigenous and urban communities in México: Different subsistence models, different microbiomes. *Microorganisms*, 8(10), 1–16.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms8101592>

Schmidt, T. S. B., Raes, J., & Bork, P. (2018). The Human Gut Microbiome: From Association to Modulation. *Cell*, 172(6), 1198–1215.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.02.044>

Sebastián-Domingo, J. J., & Sánchez-Sánchez, C. (2018). From the intestinal flora to the microbiome. *Revista Espanola de Enfermedades Digestivas*, 110(1), 51–56.
<https://doi.org/10.17235/reed.2017.4947/2017>

Sharma, N., Bhatia, S., Singh Sodhi, A., & Batra, N. (2018). Oral Microbiome and health.

Microbiology, 4(1), 42–66. <https://doi.org/10.29254/2077-4214-2018-2-144-40-43>

Shen, Y., Laue, H. E., Shrubsole, M. J., Wu, H., Bloomquist, T. R., Larouche, A., Zhao, K., Gao, F., Boivin, A., Prada, D., Hunting, D. J., Gillet, V., Takser, L., & Baccarelli, A. A. (2022). Associations of Childhood and Perinatal Blood Metals with Children's Gut Microbiomes in a Canadian Gestation Cohort. *Environmental Health Perspectives*, 130(1), 17007. <https://doi.org/10.1289/EHP9674>

Shetty, S. A., Marathe, N. P., & Shouche, Y. S. (2013). Opportunities and challenges for gut microbiome studies in the Indian population. *Microbiome*, 1(1), 1. <https://doi.org/10.1186/2049-2618-1-24>

Shin, N. R., Whon, T. W., & Bae, J. W. (2015). Proteobacteria: Microbial signature of dysbiosis in gut microbiota. *Trends in Biotechnology*, 33(9), 496–503. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.06.011>

Slatko, B. E., Gardner, A. F., & Ausubel, F. M. (2018). Overview of Next-Generation Sequencing Technologies. *Current Protocols in Molecular Biology*, 122(1), 1–11. <https://doi.org/10.1002/cpmb.59>

Sommer, F., & Bäckhed, F. (2013). The gut microbiota-masters of host development and physiology. *Nature Reviews Microbiology*, 11(4), 227–238. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2974>

Stelle, I., Kalea, A. Z., & Pereira, D. I. A. (2019). Symposium 1: Competition and bioavailability of dietary components: Iron deficiency anaemia: Experiences and challenges. *Proceedings of the Nutrition Society*, 78(1), 19–26. <https://doi.org/10.1017/S0029665118000460>

Suárez Moya, A. (2017). Microbioma y secuenciación masiva. *Spanish Journal of Chemotherapy*, 30(5), 305–311. www.seq.es

Velásquez-Mejía, E. P., de la Cuesta-Zuluaga, J., & Escobar, J. S. (2018). Impact of DNA extraction, sample dilution, and reagent contamination on 16S rRNA gene sequencing of human feces. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(1), 403–411. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8583-z>

Vieth, J. T., & Lane, D. R. (2014). Anemia. *Emergency Medicine Clinics of North America*, 32(3), 613–628. <https://doi.org/10.1016/j.emc.2014.04.007>

Vieth, J. T., & Lane, D. R. (2017). Anemia. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, 31(6), 1045–1060. <https://doi.org/10.1016/j.hoc.2017.08.008>

Walker, A. W. (2016). *Microbiota of the Human Body*. 902, 5–32. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-31248-4>

Wang, M. (2016). Iron deficiency and other types of anemia in infants and children. *American Family Physician*, 93(4), 270–278.

Watts, G., Youens-Clark, K., Slepian, M., Wolk, D., Oshiro, M., Metzger, G., Dhingra, D., Cranmen, L., & Hurwitz, B. (2017). 16S rRNA gene sequencing on a benchtop sequencer: accuracy for identification of clinically important bacteria. *International Journal of Laboratory Hematology*, 123(6), 1584–1596. <https://doi.org/10.1111/ijlh.12426>

Wurm, P., Dörner, E., Kremer, C., Spranger, J., Maddox, C., Halwachs, B., Harrison, U., Blanchard, T., Haas, R., Högenauer, C., Gorkiewicz, G., & Fricke, W. F. (2018). Qualitative and Quantitative DNA- and RNA-Based Analysis of the Bacterial Stomach Microbiota in Humans, Mice, and Gerbils. *MSystems*, 3(6), 1–17.

<https://doi.org/10.1128/msystems.00262-18>

- Yang, B., Wang, Y., & Qian, P. Y. (2016). Sensitivity and correlation of hypervariable regions in 16S rRNA genes in phylogenetic analysis. *BMC Bioinformatics*, 17(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s12859-016-0992-y>
- Yang, J., Wang, Z.-H., Kaloush, K. E., & Dylla, H. (2016). Effect of pavement thermal properties on mitigating urban heat islands: A multi-scale modeling case study in Phoenix. *Building and Environment*, 108, 110–121. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.buildenv.2016.08.021>
- Yévenes, A. (2017). *The Ferritin Superfamily*. 75–102. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-46503-6>
- Yilmaz, B., & Li, H. (2018). Gut microbiota and iron: The crucial actors in health and disease. *Pharmaceuticals*, 11(4), 1–20. <https://doi.org/10.3390/ph11040098>
- Yilmaz, G., & Shaikh, H. (2021). *Normochromic Normocytic Anemia*. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL). <http://europepmc.org/books/NBK565880>
- Yilmaz, P., Parfrey, L. W., Yarza, P., Gerken, J., Priesse, E., Quast, C., Schweer, T., Peplies, J., Ludwig, W., & Glöckner, F. O. (2014). The SILVA and “all-species Living Tree Project (LTP)” taxonomic frameworks. *Nucleic Acids Research*, 42(D1), 643–648. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1209>
- Yohe, S., & Thyagarajan, B. (2017). Review of clinical next-generation sequencing. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, 141(11), 1544–1557. <https://doi.org/10.5858/arpa.2016-0501-RA>
- Zimmermann, M. B., Chassard, C., Rohner, F., N’Goran, E. K., Nindjin, C., Dostal, A., Utzinger, J., Ghattas, H., Lacroix, C., & Hurrell, R. F. (2010). The effects of iron

fortification on the gut microbiota in African children: A randomized controlled trial in Côte d'Ivoire. *American Journal of Clinical Nutrition*, 92(6), 1406–1415.

<https://doi.org/10.3945/ajcn.110.004564>

Zuo, T., & Ng, S. C. (2018). The Gut Microbiota in the Pathogenesis and Therapeutics of Inflammatory bowel disease. *Frontiers in Microbiology*, 9(SEP).

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02247>



ANEXOS

ANEXO 1

COMITÉ DE ÉTICA INSTITUCIONAL DE INVESTIGACIÓN UCSM



DICTAMEN COMITÉ DE ETICA DE INVESTIGACION UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA

Arequipa, 21 de diciembre 2020

Karla Fiorella Diaz Rodríguez
Investigadora de la Universidad Católica de Santa María
Presente.-

De mi especial consideración.

Me dirijo a usted para hacerle llegar el resultado de la evaluación del proyecto de investigación y dictamen del Comité Institucional de Ética de Investigación.

TÍTULO: El proyecto de tesis denominado " "IDENTIFICACIÓN DE LA MICROBIOTA INTESTINAL DE NIÑOS CON ANEMIA FERROPÉNICA MEDIANTE SECUENCIACIÓN DE ÚLTIMA GENERACIÓN". El estudio está a cargo de la investigadora Karla Fiorella Diaz Rodríguez

DISEÑO: En cuanto al diseño, se trata de un estudio de tipo clínico.

OBJETIVO: El estudio tiene como objetivo: Identificar el microbiota de niños con anemia por deficiencia de hierro mediante secuenciación de última generación

SUJETOS DE ESTUDIO: 50 muestras de heces de niños con anemia ferropénica

En cuanto a la protección de los sujetos de estudio se asegura la confidencialidad de los datos



Los procedimientos no representan riesgos para los participantes ya que se tratan de:
✓ Extracción de ADN se hace una previa purificación de muestras de heces.

COMITÉ DE ÉTICA INSTITUCIONAL DE INVESTIGACIÓN UCSM



DICTAMEN COMITÉ DE ETICA DE INVESTIGACION UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA

- ✓ Amplificación por PCR.
- ✓ Secuenciación del gen 16S rRNA
- ✓ Análisis bioinformático

RIESGO DEL ESTUDIO: Mínimo

RECOMENDACIONES:

La investigadora requiere cumplir con protocolo de bioseguridad tanto para el inicio de estudio, toma de consentimiento informado a los padres, traslado de estas muestras al laboratorio y su procesamiento.

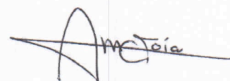
La investigadora debe asegurar la confidencialidad de los datos y deberá informar al Comité resultados finales del estudio y manuscrito previo a una publicación que devenga de este proyecto.

DICTAMEN:

Favorable, procede su ejecución



DICTAMEN 196 - 2020



Agueda Muñoz del Carpio Toia
Comité Institucional de Ética de la
Investigación UCSM

ANEXO 2

A1

A4

A5

A6

A10

A11

Figura 32 Muestras de niños con anemia A1,A4,A5,A6,A10,A11,A13,A16,A17,A18

A13

A16

A17

A18

Figura 33 Cont. Muestras de niños con anemia A1,A4,A5,A6,A10,A11,A13,A16,A17,A18



A2

A3

A7

A12

Figura 34 Muestras de niños control A2,A3,A7,A12



A8

A9

A14

A15



Figura 35 Muestras de niños recuperados de anemia A8,A9,A14,A15

ANEXO 3

Artículo. Journal Children. MDPI.



Article

Intestinal Microbiota in Children with Anemia in Southern Peru through Next-Generation Sequencing Technology

Karla Díaz-Rodríguez ¹, Jani Pacheco-Aranibar ^{1,2,3}, Cecilia Manrique-Sam ¹, Yuma Ita-Balta ¹,
Agueda Muñoz del Carpio-Toia ^{1,4}, Patricia López-Casaperalta ⁴, Teresa Chocano-Rosas ¹, Fernando Fernandez-F ¹,
Jose Villanueva-Salas ¹ and Julio Cesar Bernabe-Ortiz ^{1,2,3,4,*}

¹ Post-Graduate School, Universidad Católica de Santa María, Urb. San José s/n, Umacollo, Arequipa 04013, Peru

² Department of Biology, Universidad Nacional de San Agustín, Santa Catalina Nro. 117, Arequipa 04001, Peru

³ Department of Molecular Biology, Instituto de Biotecnología del ADN Uchumayo, Arequipa 04401, Peru

⁴ Vicerrectorado de Investigación, Universidad Católica de Santa María, Urb. San José s/n, Umacollo, Arequipa 04013, Peru

* Correspondence: jbernabe@ucsm.edu.pe

Abstract: Knowledge of the sequencing of the 16S rRNA gene constitutes a true revolution in understanding the composition of the intestinal microbiota and its implication in health states. This study details microbial composition through next-generation sequencing (NGS) technology in children with anemia. Anemia is the most frequent hematological disorder that affects human beings. In Peru, it is one of the conditions that presents the most significant concern due to the adverse effects that cause it, such as delayed growth and psychomotor development, in addition to a deficiency in cognitive development.

Keywords: 16S rRNA; intestinal microbiota; anemia

Citation: Díaz-Rodríguez, K.; Pacheco-Aranibar, J.; Manrique-Sam, C.; Ita-Balta, Y.; Muñoz del Carpio-Toia, A.; López-Casaperalta, P.; Chocano-Rosas, T.; Fernandez-F, F.; Villanueva-Salas, J.; Bernabe-Ortiz, J.C. Intestinal Microbiota in Children with Anemia in Southern Peru Through Next-Generation Sequencing Technology. *Children* **2022**, *9*, 1615. <https://doi.org/10.3390/children9111615>

Academic Editor: Flavia Indrio

Received: 21 July 2022

Accepted: 22 September 2022

Published: 25 October 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Recent studies indicate that iron deficiency (ID) [1] and iron deficiency anemia (IDA) cause unfavorable changes in the intestinal microbiota [2]. There is an excellent relationship between microorganisms of the small intestine and living beings, beginning at birth and continuing throughout life [3,4].

To prevent anemia, the diet can be supplemented with iron; however, certain bacteria are efficient iron scavengers [5]. Secondly, the amount of iron available in the intestine influences the microbiota of infants, which can be highly mutable [6].

The gastrointestinal tract (GIT) contains approximately 70% of the total microorganisms in the body. Due to its temperature and the amount of nutrients it contains, GIT is one of the preferred sites for the proliferation of microorganisms [1]. Low iron conditions, such as excess iron, show adverse effects, suggesting that there may be an optimal range of iron in the gut that directly affects the amount and variety of gut microbiota [7]. All microorganisms require iron to survive, except for *Lactobacilli* and *Borrelia burgdorferi* [8].

In a study carried out in 2019 by the INEI and the Ministry of Economy and Finance of Peru [9], it was observed that the prevalence of anemia in boys and girls under three years of age was different according to the regions of the country. Thus, the prevalence was high in the Sierra (48.8%) and Selva (44.6%) regions, decreasing to 33.9% in the Coast region.

The diversity of sequences, which provides the differentiation between bacterial species, varies according to the 16S rRNA gene. Nine regions of the 16S rRNA gene of

high sequence variability have been identified (named hypervariable V1–V9 regions [10,11]). The present study seeks to identify intestinal microbiota in children with anemia from south Peru using next-generation sequencing (NGS) technology.

2. Materials and Methods

The cross-sectional study included 18 children from southern Peru under ten years of age. The patients were divided into three groups, two according to the blood hemoglobin level, and a control group. The first group consisted of ten children with anemia (AA) whose hemoglobin value was less than 11 g/dL. The second group consisted of four children who recovered from anemia (RA), and whose hemoglobin values were greater than 11 g/dL. Finally, the control group comprised four children who did not present anemia (C). For all cases, parental consent was obtained before the study, and the research was endorsed by the ethics committee of the Universidad Católica de Santa María (DICTAMEN 196-2020, on 21 December 2020) in Arequipa, Peru. The collection of samples consisted of obtaining feces kept in airtight jars (Medical Wire & Equipment Co., Corsham, UK), keeping them cold for conservation.

2.1. Microbial DNA Extraction

The DNA extraction process was divided into two stages, a purification process and an extraction process. In the purification stage, 1000 mg of the sample was diluted in 3 mL of 0.9% NaCl in a 15 mL falcon tube and vortexed (Eurolab, Madrid, Spain) for 30 s. Next, the solution was transferred to a roller shaker (JP Selecta, Barcelona, Spain) for ten minutes, and, once finished, it was centrifuged at 3000× g rpm for two minutes (Premiere-XC-2450, Philadelphia, USA). Next, the supernatant was kept in microcentrifuge tubes (Eppendorf™, Madrid, Spain) to be centrifuged at 10,000× g rpm for one minute in a microcentrifuge (Dlab Scientific, Beijing, China), keeping the pellet. To the latter, 1 mL of saline phosphate buffer (PBS) was added, centrifuging again at 3000× g rpm for two minutes. The supernatant was centrifuged at 10,000× g rpm for one minute, and the resulting pellet was preserved. Finally, in the extraction stage, the technique of phenol, chloroform, and isoamyl alcohol was used in a 24:25:1 ratio.

2.2. Sequencing of the V3–V4 Region of the 16S rRNA Gene

Sequencing libraries were generated using the NEBNext® Ultra™ DNA Library Pre Kit for Illumina, following the recommendations of the manufacturer, and index codes were added. Library quality was assessed using the Qubit® 2.0 fluorometer (Thermo Scientific, Massachusetts, USA) and the Agilent Bioanalyzer 2100 system. Finally, the library was sequenced on an Illumina platform, and 250 bp paired-end reads were generated.

2.3. Bioinformatic Analysis

The paired-end reads were merged using FLASH v.1.2.7, a fast computational tool able to extend short read lengths generated by NGS technologies. Quality filtering on the raw labels was performed under specific filtering conditions to obtain high-quality clean labels according to the QIIME quality control process. The UCHIME algorithm was used to detect chimeric sequences and remove them. Sequence analysis was performed with the Uparse software. For each representative sequence, the GreenGene database was used to study the phylogenetic relationship of different operational taxonomic units (OTUs) and the difference between the dominant species in different samples (groups). Sequence alignment was performed with the MUSCLE software. Alpha diversity and Beta diversity in weighted and unweighted UniFrac were calculated using QIIME software.

2.4. Statistical Analyses

Statistical analyzes were performed with R software version 2.15.3, using the FactoMineR package and ggplot2 for principal component analysis (PCA) and cluster analysis. Principal coordinate analyses (PCoA) were performed with the WGCNA, stat, and ggplot2 packages included in the R software, using weighted and unweighted UniFrac distances. The linear discriminant analysis effect size was obtained with the LEfSe software. The p -value was calculated using the permutation test method, while the q -value was calculated using the Benjamini and Hochberg false discovery rate method. Anosim, MRPP, and Adonis analyses were performed with the vegan R package. AMOVA was calculated using the open code mothur software with the amova function. Finally, the T-test was conducted with R software.

3. Results

3.1. Predominant Phyla and Genera Identified

Figure 1 shows the OTU annotation circular tree diagram of the group of anemic children. For this purpose, the GraPhlAn software tool was used. This software groups the effective tags of the samples according to the percentage of identity to obtain the OTUs. In this work, the percentage used for the tree diagram is 97% of identity. The phyla present in the group are Actinobacteriota, Bacteroidota, Firmicutes, and Proteobacteria.

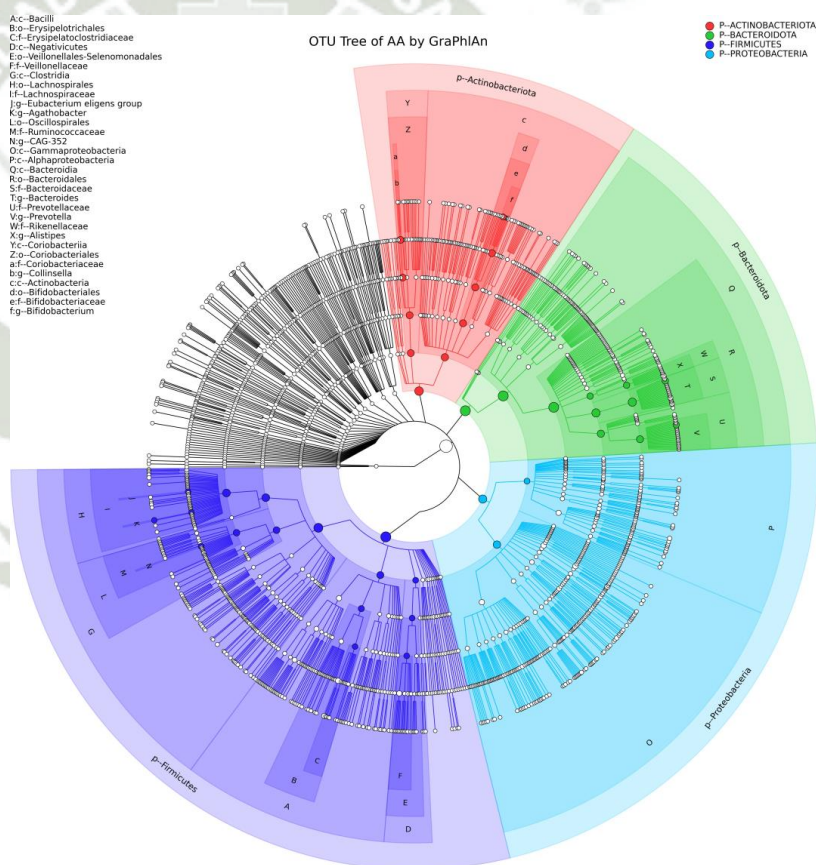


Figure 1. GraPhlAn of the group of children with anemia. The red color represents Actinobacteriota, green Bacteroidota, light blue Proteobacteria, and purple Firmicutes. Firmicutes are the most

representative phylum of the sample of children with anemia. The solid circles represent the 40 most abundant species; on the far left of the figure is the species nomenclature.

3.2. Relative Abundance of the Main Phyla

The samples of the three groups studied (AA, RA, and C) were analyzed to obtain the distribution abundance of the intestinal microbiota. Figure 2 shows the relative abundance of the top ten phyla (*y*-axis) against the sampled groups (*x*-axis). The results show a higher relative abundance of the *Firmicutes*, *Actinobacteriota*, *Bacteroidota*, and *Proteobacteria* phyla. At the same time, representative populations are found for the bacteria *Verrucomicrobiota*, *Acidobacteriota*, *Cyanobacteria*, *Fusobacteriota*, *Synergistota*, and *Chloroflexi*. In addition, other phyla are found that do not show a representative percentage.

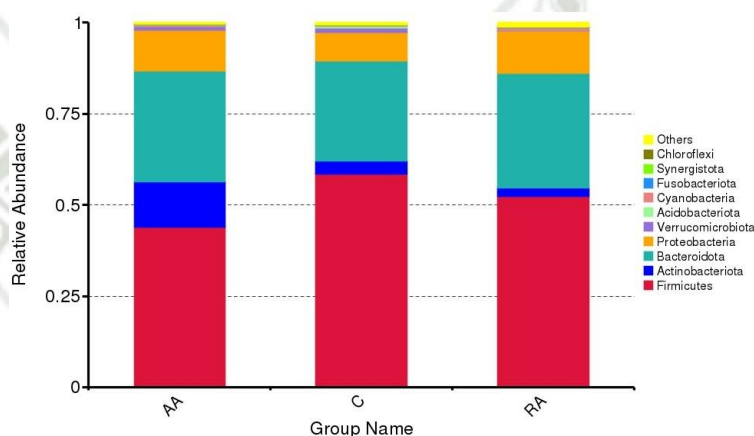


Figure 2. Relative abundance in the groups of children with anemia (AA), children recovered from anemia (RA), and control children (C). Sample AA shows a higher abundance of *Actinobacteriota*, while C shows a higher abundance of *Firmicutes* and RA of *Bacteroidota*. About 90% of the microbial composition in the three groups is *Firmicutes*, *Actinobacteriota*, and *Bacteroidota*.

3.3. Shared and Unique OTUs

According to the analysis results of OTUs grouping and the investigation requirements, the table of the OTUs was normalized. Shared and unique information was analyzed for the different samples (groups) studied, and Venn and Flower diagrams were constructed. Supplementary Figure S1A shows the Venn diagram of the control group. Each circle represents the OTUs obtained in each sample. The values in the overlapping zones represent the common OTUs, while the remaining values are the unique OTUs. Each sample or individual of this group is labeled (A2, A3, A7, and A12). Thus, for A2, 416 unique OTUs are found; for A3, 87; for A7, 659; and for A12, 316 unique OTUs. For the four control samples, 160 common OTUs are found. Figure S1B shows the Venn diagram for the samples of recovered children. For this group, the samples are labeled A8, A9, A14, and A15. The analysis yields the following data for unique OTUs: A8 with 110, A9 with 253, A14 with 115, and A15 with 113. The four samples share 296 OTUs. Figure S1C shows the samples from children with iron deficiency anemia (IDA). Each petal in the flower diagram represents a sample and is differentiated with different colors. The central number (core 40) is for the number of OTUs present in all samples, while the number in the petals is for the unique OTUs found in each sample.

3.4. Significant Difference between AA and RA Groups

Figure 3 compares the groups of children with anemia (AA) and those who recovered (RA). The left panel represents the abundance of the *Clostridia* class and the orders *Peptostreptococcales-Tissierellales* and *Clostridiales*. The average value of the abundance of these taxonomic categories is represented by bars, whose color identifies each group. It can be seen that the *Clostridia* class and *Peptostreptococcales-Tissierellales* order are more abundant in the RA group, while the *Clostridiales* order is more numerous in the AA group. The confidence interval of variation between both groups is represented in the right panel. The lower and upper limits symbolize the 95% confidence interval, while the circle is the mean value. The circle color agrees with the group whose mean value is higher. On the *y*-axis, the *p*-value of the test of significance of group variation is shown.

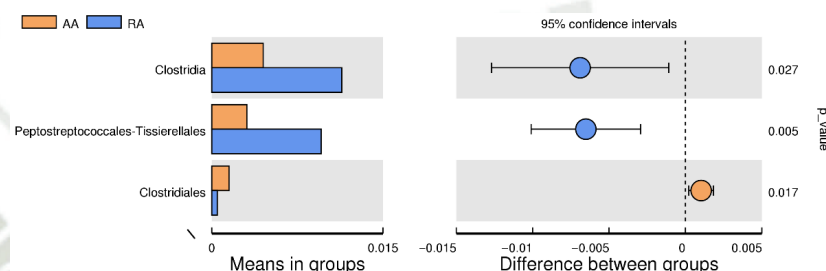


Figure 3. Between-group T-test analysis. The orange color shows the group AA, and the blue color the group R.

3.5. Validity of the Sequencing Data: Rarefaction Curve

Rarefaction curves and rank abundance curves are widely used to indicate the biodiversity of samples. Figure S2 shows the rarefaction curves obtained from all the samples analyzed. These curves are created by randomly selecting a certain amount of sequencing data from the samples, and then counting the number of species they represent (i.e., the number of OTUs). Rarefaction curves can directly reflect the rationality of the sequencing data volume and indirectly reflect the microbial community's richness in the samples. Results show that the A14 and A15 curves (children recovered from anemia) are pronounced, suggesting many species remain to be discovered in these samples. On the other hand, the curves for samples A6 and A1 (children with anemia) become flatter, implying that a credible number of samples have been taken, meaning that only rare species remain to be sampled.

3.6. Alpha Diversity of the Gut Microbiota

Alpha diversity was quantified by the Shannon diversity index, which relates to both OTU richness and uniformity, and by the total number of species observed. Figure 4 shows alpha diversity measures for the AA group and children of the RA group compared to controls (C). It can be observed that there is a more significant number of species in the children recovered from anemia compared to the children with anemia and control. In the same way, greater richness and uniformity are observed in the RA group compared to the AA and C groups. Statistical tests show differences between the species observed ($p_{\text{obs}} = 0.03$) and the diversity of Shannon ($p_{\text{Shan}} = 0.01$). In addition, the Mann–Whitney/Kruskal–Wallis test was performed to evaluate whether the samples originated from the same distribution. Results show differences between the medians for both the observed species ($H_{\text{obs}} = 6.9$) and the Shannon index ($H_{\text{Shan}} = 8.2$).

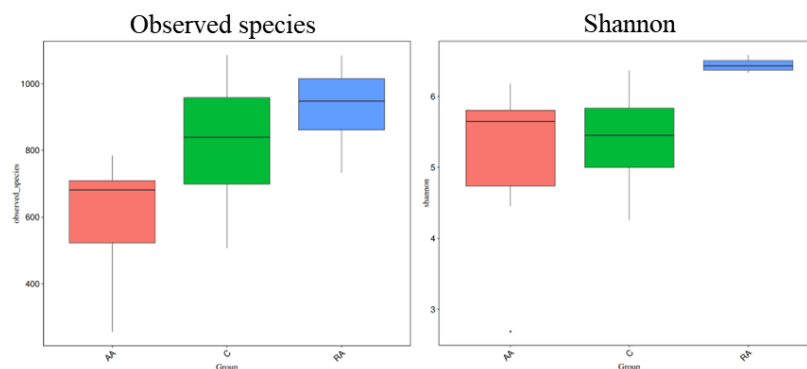


Figure 4. Alpha diversity, as measured by observed species and the Shannon diversity index, is plotted for children with anemia AA (red), children recovered from anemia RA (green), and controls C (blue). The line inside the box represents the median, and the rhombus the mean. The whiskers (vertical lines) represent the lowest and highest values within the interquartile range. Outliers, as well as individual sample values, are shown as dots. Statistical tests show differences for the species observed ($p_{Obs} = 0.03$; $H_{Obs} = 6.9$), as well as for Shannon diversity ($p_{Shan} = 0.01$; $H_{Shan} = 8.2$).

3.7. Beta Diversity of the Gut Microbiota

NMDS and ANOSIM analyses, as rank-based approaches, were applied to test differences in microbial composition between the AA, RA, and C groups. The NMDS results are shown in Figure 5. Children with AA anemia (red squares) are scattered across the quadrant, suggesting no differences in composition, and confirmed by the ANOSIM result ($p_{ANOSIM} = 0.819$). Next, a composition similarity test (ADONIS) was performed to obtain more precise information on whether there are differences between the sample groups. Results do not show significant differences between children with anemia, children who recovered from anemia, and controls ($p_{ADONIS} = 0.154$). A comparison was also made between pairs of groups, in which no significant differences are found for the pairs of groups: AA–RA ($p_{ANOSIM} = 0.782$), C–RA ($p_{ANOSIM} = 0.081$), and C_AA ($p_{ANOSIM} = 0.775$).

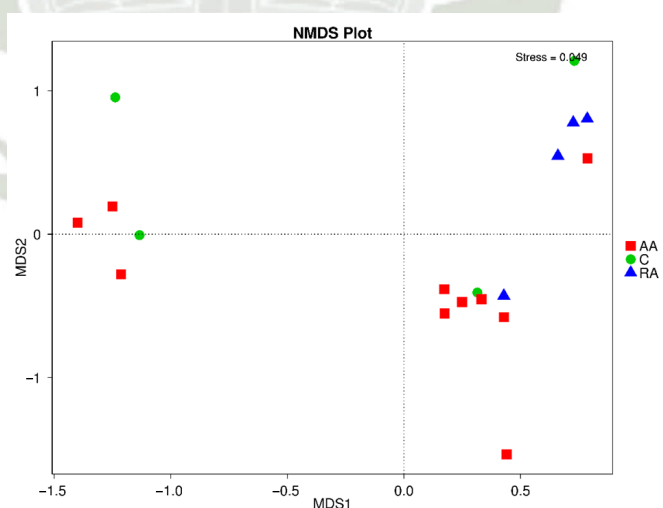


Figure 5. Graph of the non-metric multidimensional scaling (NMDS) analysis performed on the samples of AA, RA, and C groups.

NMDS is an unconstrained distance-based ordination method that was performed with Bray–Curtis dissimilarity. The dots represent samples. Samples that are more similar to each other are sorted closer together. In Figure 5, children with anemia are represented as red squares, children recovered from anemia with blue triangles, and controls as green dots. The groups do not show significant differences in the similarity tested by ANOSIM ($p_{\text{ANOSIM}} = 0.819$) nor by ADONIS ($p_{\text{ADONIS}} = 0.154$).

3.8. LEfSe Test for Biomarkers

The LEfSe test for biomarkers was used to find significantly unbalanced OTUs, which shows the strongest effects for group differentiation (Figure 6). Analysis at the OTU level uncovers one species, *Erysipelatoclostridium ramosum*, associated with the AA group belonging to the genus *Erysipelatoclostridium* (OTU_20, Figure 6A,B). At the genus level, *Agathobacter* and *Coproccoccus* are detected as markers for the control group, and *Alloprevotella*, MBA03, and *Phascolarctobacterium* with high levels for the group of children recovered from anemia (Figure 6B). The family-level analysis shows elevated levels of MBA03 and *Acidaminococcaceae* for the group of children who recovered from anemia (Figure 6C). No significant differences are observed between the AA and control groups. At the phylum level, *Fibrobacterota* and *Synergistota* are detected as markers for the children who recovered from anemia, and no significant differences are observed between the AA and control groups (Figure 6D).

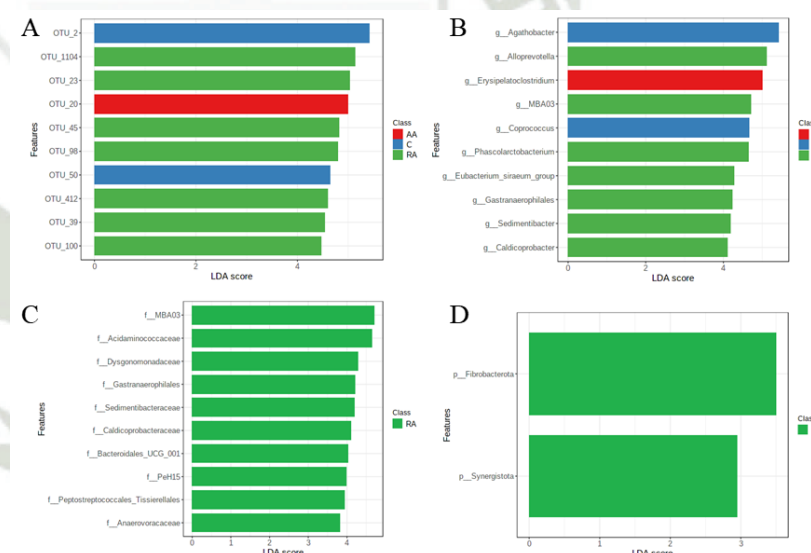


Figure 6. Results of LDA effect size analysis (LEfSe) of children with anemia (AA) and children recovered from anemia (RA) compared with healthy controls (C). The LEfSe analysis finds taxa that are significantly more abundant in a group, the size of the bar representing the effect size of the taxa in the particular group. Children with anemia (AA) are indicated in red, children recovered from anemia (RA) in green, and healthy controls (C) in blue. (A) OTU level (97% similarity), (B) genus level, (C) family level, and (D) phylum level. The threshold p -value is 0.05. The log LDA score threshold for discriminant characteristics is set at 2.0.

4. Discussion

This research presents the difference in microbial diversity in children from southern Peru. Three groups were identified for this study, children with anemia (AA), children who recovered from anemia (RA), and the control group (C). This study aims to find phyla, genera, or bacterial species that identify each study group. These findings are expected to allow us to identify possible biomarkers that can be used to make an early diagnosis of, or prevent, anemia in our children.

The intestinal microbiota fulfills vital functions in different biological processes directly impacting host health. Functions such as metabolism, nutrient absorption, neurocognitive development, and immune system efficiency are just a few examples of their critical role [12–15]. The complex intestinal microbiota–host relationship has made its study very important to understand the implications of its deficiency, especially in the health of children [16].

About 99% of the bacteria in the intestine are anaerobes; however, high densities of aerobic microbes are recorded in the cecum. The most dominant bacterial phyla in the human intestine are *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, and *Proteobacteria* [17]. In addition, *Bacteroides* (year one), *Parabacteroides* (year two), and *Christensenellaceae* (year four) bacteria are found in full-term infants [18].

The results show that when analyzing the relative abundance of the intestinal microbiota, the control group (C) is the group that shows a higher proportion of the *Firmicutes* phylum, with the AA group being the one with the lowest proportion. However, the AA group has a higher abundance in the *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, and *Proteobacteria* phyla, the latter two comparable to the RA group. This result is similar to a study in Kenya, which reveals significant differences in taxa between anemic and non-anemic infants [19]. Non-anemic infants harbor lower abundances of *Prevotella* (2.0% vs. 4.5%, $p = 0.014$), a genus belonging to the phylum *Bacteroidetes*. Instead, they show higher quantities of *Actinomycetales* belonging to the phylum *Actinobacteria* (0.14% vs. 0.09%, $p = 0.004$), and *Streptococcus*, belonging to the phylum *Firmicutes* (6.3% vs. 3.9%, $p = 0.023$). Similarly, in another study by McClorry et al. [20], the microbiome is identified in children with anemia from the Peruvian jungle. In this study, the presence of *Firmicutes* (*Coprococcus*, *Dorea*, *Roseburia*), *Bacteroidetes* (*Barnesiellaceae*, *Odoribacteraceae*), and *Proteobacteria* (*Desulfovibrio*) are found, bacteria not found in children without anemia. These results show that the low bacterial presence of the *Firmicutes* phylum indicates anemia in children, which is in good agreement with other studies [21,22].

Regarding the *Actinobacteria* phylum, this phylum presents a higher relative abundance in the AA group, and lower for the RA group. Contrasting with our study, in research carried out by Muleviciene et al. [23], the microbiota of ten children with IDA and ten control children are identified. Their results show that children with IDA have increased *Bacteroidetes* and *Proteobacteria*, and a lower amount of *Actinobacteria* and *Verrucomicrobia*, unlike control children. These results agree with those found by Jaeggi et al. [19].

The phylum *Proteobacteria* is less abundant in C than in AA and RA. However, as in the study carried out in India in children, most of them anemic, a greater abundance of this bacteria is found [24]. The presence of this phylum is associated with intestinal microbial imbalance (dysbiosis) and harmful health effects. Therefore, several studies propose it could be used as a biomarker for this disorder, or other diseases associated with the gut microbiome [25–27]. Furthermore, the similarity in the number of bacteria of the *Bacteroidetes* and *Proteobacteria* phyla in AA and RA children indicates that the children present an imbalance in the microbiota due to anemic conditions.

On the other hand, regarding the phyla with a lower abundance, our results show that, in the AA group, there is a greater proportion of the *Chloroflexi* phylum. In contrast, in the RA group, it is the *Cyanobacteria* phylum. Furthermore, *chloroflexi* bacterium is present in the intestinal microbiota of non-Westernized children in a study conducted in Mexico through sequencing the 16S rRNA gene [28]. Moreover, the *Verrucomicrobiota*

phylum is present in AA and RA groups. A study in Canadian children with selenium in the blood shows a high relative abundance of *Verrucomicrobiota*. This bacterium is ubiquitous in the human intestine and can live in association with eukaryotes [29]. Finally, in the RA group, *Cyanobacteria* appear. A study conducted in Champaign-Urbana, US, in children aged 4 to 8 years with intake characterized by cereals, dairy, legumes, nuts, and seeds, unlike another group that receive an intake of fish, refined carbohydrates, protein foods, fruits, vegetables, juices, and sugary drinks, shows a high abundance of *Cyanobacteria* [30].

From the analysis of the number of shared OTUs (Figure S1), it is observed that the RA group has the highest percentage of shared OTUs (17.6%), and the lowest is the AA group (5.4%). When analyzing the relative abundance of these two groups, the results show that the *Clostridia* class ($p = 0.027$) and the orders *Peptostreptococcales-Tissierellales* ($p = 0.005$) and *Clostridiales* ($p = 0.017$), belonging to the *Firmicutes* phylum, have significant differences (Figure 3). The *Clostridia* spp. and the *Peptostreptococcales-Tissierellales* order are 2.5 and 3.1 times higher for the RA group, respectively. The increase in these microbiotas indicates recovery pictures in children. In this sense, a study by Lopetuso et al. points out the importance of some species of the *Clostridia* class in human health, especially in the immune system [31]. In particular, the gut commensal *Clostridia* bacteria can represent up to 40% of the total bacteria of the intestinal microbiota. In contrast, the AA group shows a greater abundance of the *Clostridiales* genus (3.2 times higher), which could be interpreted as evidence of anemic symptoms. However, more robust analyzes are necessary to identify the bacterial composition, as there are still several bacterial species to be discovered, as shown by the rarefaction curves (Figure S2).

Our results show that the species *Erysipelatoclostridium ramosum* has a significant taxonomic difference for the AA group. Furthermore, studies show that this bacterium is associated with human metabolic syndrome and mice-induced obesity [32–34]. As for the *Erysipelatoclostridium* genus, studies show that its abundance is significantly higher in down-regulated immune systems [35–37]. Regarding the RA group, the genera that show the greatest taxonomic difference are *Alloprevotella*, *MBA03*, and *Phascolarctobacterium*. In the case of the *Alloprevotella* genus, its high abundance in the intestine is related to the healthy growth and physical health of the host [38,39], as well as to the recovery of metabolism in children with epilepsy [40]. The presence of bacteria of the *Phascolarctobacterium* genus prevents the growth of *Clostridioides difficile* bacteria [41], a highly infective agent in children [42]. In addition, a decrease in its abundance is found in children with chronic pancreatitis. In the case of the *MBA03* genus, there is not much information regarding its presence in the intestinal microbiota [43].

Although our analyzes were performed with a small sample size, we believe that the findings presented in this work will open new perspectives in research on the importance of the gut microbiota in the health of our children. However, further robust and in-depth studies must be conducted to evaluate microbial diversity and understand its impact on anemia and various childhood diseases.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/children9111615/s1>, Figure S1: Venn and Flower diagram of (A) Control children, (B) Recovered children, and (C) Children with anemia; Figure S2: Rarefaction curve.

Author Contributions: Conceptualization, K.D.-R. and T.C.-R.; methodology, K.D.-R., J.P.-A., and A.M.d.C.-T.; software, J.V.-S. and J.C.B.-O.; validation, K.D.-R. and C.M.-S.; formal analysis, K.D.-R. and J.C.B.-O.; investigation, K.D.-R., Y.I.-B., C.M.-S., and J.P.-A.; resources, J.P.-A. and J.C.B.-O.; data curation, A.M.d.C.-T., F.F.-F., and P.L.-C.; writing—original draft preparation, K.D.-R.; writing—review and editing, T.C.-R., F.F.-F., and P.L.-C.; visualization, J.C.B.-O.; supervision, J.V.-S. and J.C.B.-O.; project administration, J.V.-S. and J.C.B.-O.; funding acquisition, J.V.-S. and J.C.B.-O. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the National Council for Science, Technology, and Technological Innovation (CONCYTEC)-World Bank Project 8682-PE, through its executing unit PROCENCIA, the project “Doctorates in Health Sciences”, within the framework of the call E041-01 contract number 09-2018-FONDECYT-BM in agreement with the Catholic University of Santa María.

Institutional Review Board Statement: The research was endorsed by the ethics committee of the Universidad Católica de Santa María (DICTAMEN 196-2020, on 21 December 2020).

Informed Consent Statement: Parental consent was obtained before the study.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: The study was conducted at the Laboratory of Research the Postgraduate school (Catholic University of Santa Maria, Arequipa, Peru).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

1. Camaschella, C. New insights into iron deficiency and iron deficiency anemia. *Blood Rev.* **2017**, *31*, 225–233.
2. Stelle, I.; Kalea, A.Z.; Pereira, D.I. Iron deficiency anaemia: Experiences and challenges. *Proc. Nutr. Soc.* **2019**, *78*, 19–26.
3. Arrieta, M.C.; Stiemsma, L.T.; Amenyogbe, N.; Brown, E.M.; Finlay, B. The intestinal microbiome in early life: Health and disease. *Front. Immunol.* **2014**, *5*, 427.
4. Meropol, S.B.; Edwards, A. Development of the infant intestinal microbiome: A bird’s eye view of a complex process. *Birth Defects Res. Part C Embryo Today Rev.* **2015**, *105*, 228–239.
5. Zmora, N.; Suez, J.; Elinav, E. You are what you eat: Diet, health and the gut microbiota. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2019**, *16*, 35–56.
6. Puga, A.M.; Samaniego-Vaesken MD, L.; Montero-Bravo, A.; Ruperto, M.; Partearroyo, T.; Varela-Moreiras, G. Iron Supplementation at the Crossroads of Nutrition and Gut Microbiota: *State Art. Nutr.* **2022**, *14*, 1926.
7. Lönnnerdal, B. Excess iron intake as a factor in growth, infections, and development of infants and young children. *Am. J. Clin. Nutr.* **2017**, *106* (Suppl. 6), 1681S–1687S.
8. Owolabi, A.J.; Senbanjo, I.O.; Oshikoya, K.A.; Boekhorst, J.; Eijlander, R.T.; Kortman, G.A.; Hageman, J.H.; Samuel, F.; Melse-Boonstra, A.; Schaafsma, A. Multi-nutrient fortified dairy-based drink reduces anaemia without observed adverse effects on gut microbiota in anemic malnourished nigerian toddlers: A randomised dose–response study. *Nutrients* **2021**, *13*, 1566.
9. García Zanabria, J. Perú: Indicadores de Resultados de los Programas presupuestales 2014-2019. *Inst. Nac. Estadística e Inf.* **2020**, *53*, 1–163.
10. Chaudhary, N.; Sharma, A.K.; Agarwal, P.; Gupta, A.; Sharma, V.K. 16S classifier: A tool for fast and accurate taxonomic classification of 16S rRNA hypervariable regions in metagenomic datasets. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0116106.
11. Graspentner, S.; Loeper, N.; Künzel, S.; Baines, J.F.; Rupp, J. Selection of validated hypervariable regions is crucial in 16S-based microbiota studies of the female genital tract. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 9678.
12. Nicholson, J.K.; Holmes, E.; Kinross, J.; Burcelin, R.; Gibson, G.; Jia, W.; Pettersson, S. Host-gut microbiota metabolic interactions. *Science* **2012**, *336*, 1262–1267.
13. Zhao, J.; Zhang, X.; Liu, H.; Brown, M.A.; Qiao, S. Dietary protein and gut microbiota composition and function. *Curr. Protein Pept. Sci.* **2019**, *20*, 145–154.
14. Vogel, S.C.; Brito, N.H.; Callaghan, B.L. Early life stress and the development of the infant gut microbiota: Implications for mental health and neurocognitive development. *Curr. Psychiatry Rep.* **2020**, *22*, 61.
15. Spencer, S.P.; Fragiadakis, G.K.; Sonnenburg, J.L. Pursuing human-relevant gut microbiota-immune interactions. *Immunity* **2019**, *51*, 225–239.
16. Iddrisu, I.; Monteagudo-Mera, A.; Poveda, C.; Pyle, S.; Shahzad, M.; Andrews, S.; Walton, G.E. Malnutrition and gut microbiota in children. *Nutrients* **2021**, *13*, 2727.
17. Gomaa, E.Z. Human gut microbiota/microbiome in health and diseases: A review. *Antonie Van Leeuwenhoek* **2020**, *113*, 2019–2040.
18. Fouhy, F.; Watkins, C.; Hill, C.J.; O’Shea, C.A.; Nagle, B.; Dempsey, E.M.; O’Toole, P.W.; Ross, R.P.; Ryan, C.A.; Stanton, C. Perinatal factors affect the gut microbiota up to four years after birth. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 1517.
19. Jaeggi, T.; Kortman, G.A.; Moretti, D.; Chassard, C.; Holding, P.; Dostal, A.; Boekhorst, J.; Timmerman, H.M.; Swinkels, D.W.; Tjalsma, H.; et al. Iron fortification adversely affects the gut microbiome, increases pathogen abundance and induces intestinal inflammation in Kenyan infants. *Gut* **2015**, *64*, 731–742.
20. McClorry, S.; Zavaleta, N.; Llanos, A.; Casapía, M.; Lönnnerdal, B.; Slupsky, C.M. Anemia in infancy is associated with alterations in systemic metabolism and microbial structure and function in a sex-specific manner: An observational study. *Am. J. Clin. Nutr.* **2018**, *108*, 1238–1248.
21. Ho, T.T.; Kumar, A.; Louis-Jacques, A.F.; Dishaw, L.J.; Yee, A.L.; Groer, M.W. The development of intestinal dysbiosis in anemic preterm infants. *J. Perinatol.* **2020**, *40*, 1066–1074.

22. Paganini, D.; Jaeggi, T.; Cercamondi, C.; Kujinga, P.; Moretti, D.; Zimmermann, M. Anemia and iron status are predictors of gut microbiome composition and metabolites in infants and children in rural Kenya. *FASEB J.* **2016**, *30*, 296–302.
23. Muleviciene, A.; D'Amico, F.; Turrone, S.; Candela, M.; Jankauskiene, A. Iron deficiency anemia-related gut microbiota dysbiosis in infants and young children: A pilot study. *Acta Microbiol. Et Immunol. Hung.* **2018**, *65*, 551–564.
24. Huey, S.L.; Jiang, L.; Fedarko, M.W.; McDonald, D.; Martino, C.; Ali, F.; Russell, D.G.; Udipi, S.A.; Thorat, A.; Thakker, V.; et al. Nutrition and the gut microbiota in 10-to 18-month-old children living in urban slums of Mumbai, India. *Mosphere* **2020**, *5*, e00731-20.
25. Salguero, M.V.; Al-Obaide, M.A.; Singh, R.; Siepmann, T.; Vasylyeva, T.L. Dysbiosis of Gram-negative gut microbiota and the associated serum lipopolysaccharide exacerbates inflammation in type 2 diabetic patients with chronic kidney disease. *Exp. Ther. Med.* **2019**, *18*, 3461–3469.
26. Said, H.S.; Suda, W.; Nakagome, S.; Chinen, H.; Oshima, K.; Kim, S.; Kimura, R.; Ibra, A.; Ishida, H.; Fujita, J.; et al. Dysbiosis of salivary microbiota in inflammatory bowel disease and its association with oral immunological biomarkers. *DNA Res.* **2014**, *21*, 15–25.
27. Liu, F.; Li, J.; Guan, Y.; Lou, Y.; Chen, H.; Xu, M.; Deng, D.; Chen, J.; Ni, B.; Zhao, L.; et al. Dysbiosis of the gut microbiome is associated with tumor biomarkers in lung cancer. *Int. J. Biol. Sci.* **2019**, *15*, 2381.
28. Sánchez-Quinto, A.; Cerqueda-García, D.; Falcón, L.I.; Gaona, O.; Martínez-Correa, S.; Nieto, J.; G-Santoyo, I. Gut microbiome in children from indigenous and urban communities in México: Different subsistence models, different microbiomes. *Microorganisms* **2020**, *8*, 1592.
29. Shen, Y.; Laue, H.E.; Shrubsole, M.J.; Wu, H.; Bloomquist, T.R.; Larouche, A.; Zhao, K.; Gao, F.; Boivin, A.; Prada, D.; et al. Associations of Childhood and Perinatal Blood Metals with Children's Gut Microbiomes in a Canadian Gestation Cohort. *Environ. Health Perspect.* **2022**, *130*, 017007.
30. Berding, K.; Holscher, H.D.; Arthur, A.E.; Donovan, S.M. Fecal microbiome composition and stability in 4-to 8-year old children is associated with dietary patterns and nutrient intake. *J. Nutr. Biochem.* **2018**, *56*, 165–174.
31. Lopetuso, L.R.; Scalfaferrì, F.; Petito, V.; Gasbarrini, A. Commensal Clostridia: Leading players in the maintenance of gut homeostasis. *Gut Pathog.* **2013**, *5*, 23.
32. Smith-Brown, P.; Morrison, M.; Krause, L.; Davies, P.S.W. Dairy and plant based food intakes are associated with altered faecal microbiota in 2 to 3 year old Australian children. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 32385.
33. Chen, G.; Peng, Y.; Huang, Y.; Xie, M.; Dai, Z.; Cai, H.; Dong, W.; Xu, W.; Xie, Z.; Chen, D.; Fan, X. Fluoride Exposure Induced Bloom of *Erysipelatoclostridium ramosum* Mediates the Exacerbation of Obesity in High-Fat-Diet Fed Mice. 2022. Available online: <https://www.researchsquare.com/article/rs-1356629/latest.pdf> (accessed on 03 July 2022).
34. Woting, A.; Pfeiffer, N.; Loh, G.; Klaus, S.; Blaut, M. Clostridium ramosum promotes high-fat diet-induced obesity in gnotobiotic mouse models. *MBio* **2014**, *5*, e01530-14.
35. Liu, Y.; Hu, D.; Dai, C.; Wang, D.; Weihong, S. Characteristics of Intestinal Microbiota and Mother's Reproductive Tract Flora in Children with Down Syndrome. 2021. Available online: <https://www.researchsquare.com/article/rs-922120/latest.pdf> (accessed on 25 July 2022).
36. Liu, C.E.; Pan, Y.M.; Du, Z.L.; Wu, C.; Hong, X.Y.; Sun, Y.H.; Li, H.F.; Liu, J. Composition characteristics of the gut microbiota in infants and young children of under 6 years old between Beijing and Japan. *Transl. Pediatrics* **2021**, *10*, 790.
37. Vänni, P.; Tejesvi, M.V.; Ainonen, S.; Renko, M.; Korpela, K.; Salo, J.; Paalanne, N.; Tapiainen, T. Delivery mode and perinatal antibiotics influence the predicted metabolic pathways of the gut microbiome. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 17483.
38. Liu, M.; Ma, L.; Chen, Q.; Zhang, P.; Chen, C.; Jia, L.; Li, H. Fucoidan alleviates dyslipidemia and modulates gut microbiota in high-fat diet-induced mice. *J. Funct. Foods* **2018**, *48*, 220–227.
39. Tang, S.; Xin, Y.; Ma, Y.; Xu, X.; Zhao, S.; Cao, J. Screening of microbes associated with swine growth and fat deposition traits across the intestinal tract. *Front. Microbiol.* **2020**, *11*, 586776.
40. Gong, X.; Cai, Q.; Liu, X.; An, D.; Zhou, D.; Luo, R.; Peng, R.; Hong, Z. Gut flora and metabolism are altered in epilepsy and partially restored after ketogenic diets. *Microb. Pathog.* **2021**, *155*, 104899.
41. Nagao-Kitamoto, H.; Leslie, J.L.; Kitamoto, S.; Jin, C.; Thomsson, K.A.; Gilliland, M.G.; Kuffa, P.; Goto, Y.; Jenq, R.R.; Ishii, C.; et al. Interleukin-22-mediated host glycosylation prevents Clostridioides difficile infection by modulating the metabolic activity of the gut microbiota. *Nat. Med.* **2020**, *26*, 608–617.
42. Kociolek, L.K.; Burnham, C.A.; Nicholson, M.R.; Zuckerman, J.P. Clostridioides difficile infection in children: Research progress, pitfalls, and priorities. *J. Pediatric Infect. Dis. Soc.* **2021**, *10* (Suppl. 3), S1–S2.
43. González-Sánchez, A.; Reyes-Lagos, J.J.; Peña-Castillo, M.A.; Nirmalkar, K.; García-Mena, J.; Pacheco-López, G. Vaginal Microbiota Is Stable and Mainly Dominated by Lactobacillus at Third Trimester of Pregnancy and Active Childbirth: A Longitudinal Study of Ten Mexican Women. *Curr. Microbiol.* **2022**, *79*, 230.

Poster. Workshop of the German National Academy of Sciences Leopoldina and the Peruvian Academy of Sciences (Academia Nacional de Ciencias, ANC).

ELABORACIÓN DE MAPAS GEOREFERENCIADOS PARA PREDECIR NIVELES DE ANEMIA EN NIÑOS MENORES DE 5 AÑOS, QUE VIVEN POR ENCIMA DE LOS 3,500.00 m s. n. m. EN LA REGIÓN AREQUIPA.

Karla Díaz Rodríguez^{1,2,3,4,5}, Agueda Muñoz del Carpio Toia^{1,2,3,4,5}, Ismael Cornejo Roselló², Sandrine Rojas Pauca², Emerson Machaca Escalante^{1,4}, Christian Málaga^{1,4}, María Cecilia Manrique Sam^{1,2,3,4,5}, Giovanna Reyes Neyra^{1,2,3,4,5}, Sandra Yucra Sevillano^{1,2,3,4,5}

¹Universidad Católica de Santa María, ²Vicerrectorado de Investigación, ³Facultad de Medicina Humana, ⁴Doctorado en Ciencias de la Salud, ⁵Dirección Regional de Salud de Arequipa, ⁶Universidad Nacional de San Agustín, ⁷Facultad de Geología, Geofísica y Minas - Arequipa-Perú.



INTRODUCCIÓN

En el año 2018, en el departamento Arequipa los niveles de anemia se elevaron en un 4%, mostrando mayor incidencia en zonas rurales, la mayoría de casos ubicados por encima de 3500.00 m s. n. m. Arequipa se encuentra en la zona sur oeste del Perú, dividida en 8 provincias y 109 distritos. Georeferenciando los datos de la población muestral se determinará la distribución y clasificación de anemia en las altitudes mayores a 3500.00 m s. n. m. en el departamento de Arequipa.

METODOLOGÍA

Voluntarios: El estudio incluye una población de 1189 niños menores de 5 años. Lugar: El análisis estadístico se da a partir de registros con información secundaria de la Región de salud de Arequipa, los datos corresponden al periodo 2018. Intervención: Un profesional entrenado extrajo una muestra de sangre venosa basal de una vena antecubital de cada niño menor a 5 años de edad, entre las 08:00 y las 11:00 h. Diseño: Se realizó mapas georeferenciados con el software Arc-Gis 10.3.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Por primera vez en el Perú se realiza mapas georeferenciados con la metodología de interpolación respecto a los niveles de anemia en la región Arequipa. Las coordenadas geográficas dan lugar a mapas georeferenciados, designando una ubicación espacial en entidades cartográficas. En los últimos años la utilización de mapas georeferenciados busca brindar información más representativa integrando las ciencias biológicas con las ciencias geográficas, reflejando los niveles de anemia, las zonas de residencia de la población muestral, distribución por edad, sexo, altitud y otras variables de utilidad para el investigador.

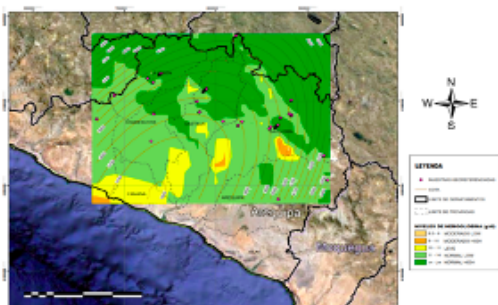


Figura 1 Mapa georeferenciado - niveles de hemoglobina (g. dL⁻¹) -año 2018

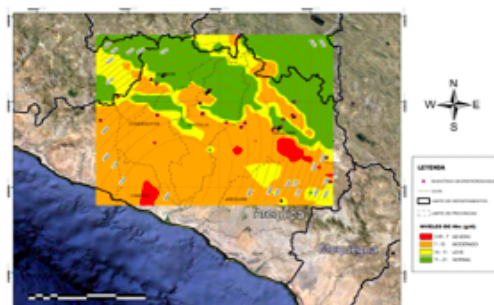


Figura 2 Mapa georeferenciado - niveles de hemoglobina corregida (g. dL⁻¹) -año 2018

Se utilizó el software ArcGis 10.3, haciendo uso de sus herramientas de interpolación, de esta manera se calcula una predicción en una ubicación sin medición. La formula de interpolación utiliza la siguiente ecuación.

$$\hat{Z}(x_0) = \sum_{i=1}^N \lambda_i Z(x_i)$$

donde:

$\hat{Z}(x_0)$ = el valor medido en la ubicación $n^{\circ} i$

λ_i = un peso desconocido para el valor medido en la ubicación $n^{\circ} i$

(x_i) = la ubicación de la predicción

N = el número de valores medido

En las Figuras 1 y 2 se muestran los mapas georeferenciados de hemoglobina y hemoglobina corregida respectivamente, la distribución por provincias y las altitudes (cotas) están delimitadas según sus coordenadas, además los mapas georeferenciados permiten predecir los niveles de anemia, en donde se presume que la distancia o la dirección entre los puntos de muestra reflejan una correlación espacial que puede utilizarse para explicar la variación geográfica de los niveles de hemoglobina. De acuerdo a la corrección que se aplica en los valores de hemoglobina, el mapa georeferenciado de hemoglobina corregida muestra la presencia de anemia moderada y severa a diferencia del mapa de hemoglobina sin corrección, por lo que se sugiere la aplicación de técnicas moleculares para el diagnóstico de anemia debe ser tema prioritario en las políticas de estado, de este modo obtener información veraz con respecto a los niveles de anemia en el país.

BIBLIOGRAFIA

- Barragán-Ibañez G, et al. (2016) Iron deficiency anemia. *Rev Med Hosp Gen. Mex* 1-10.
- Wong, C. (2017) Iron deficiency anemia. *Pediatrics and Child Health* 1-3.
- Corley D, Genuis H, Sporn D. (2017). Starvation, Disasters/Extremities and Anemia: Evidence From Nepal. 1-48.
- González GF, Rubin de Celis V, Baggio J, Del Rosario Hinojosa M, Yucra S, Zavalita-cornejo A, et al. (2018) Correcting the cut-off point of hemoglobin at high altitude favors misclassification of anemia, erythrocytosis and excessive erythrocytosis. *Ann J Hematol* :2031-212-216.
- Hadley J, Hase J. (1989) Hemoglobin correction factors for estimating the prevalence of iron deficiency anemia in pregnant women residing at high altitudes in Bolivia. *Revista Peruana de Salud Pública*
- Schweizer J, Fujikawa, Dewey K, Cheri S. (2005) Anemia, iron deficiency, and iron deficiency anemia in 10-36 mo-old children from low-income families The American Journal of Clinical Nutrition, Volume 12, Issue 6, Pages 1269-1275