



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**“DÉFICIT DE HIERRO Y POSTERIOR REFORZAMIENTO DEL METAL PRODUCEN
CAMBIOS EN LA ESTRUCTURA DE LA MICROBIOTA INTESTINAL DE
Drosophila melanogaster”**

Memoria para optar al Título Profesional de Bioquímico

GABRIEL INGNACIO GÁLVEZ JIMÉNEZ

DIRECTOR DE TESIS:

Mauricio Alejandro Latorre Mora

Instituto de Ciencias de la Ingeniería

Universidad de O'Higgins

PROFESOR PATROCINANTE:

Valentina María Parra Ortiz

Facultad de Ciencias Químicas y

Farmacéuticas

Universidad de Chile

Santiago - Chile

2019

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

“DÉFICIT DE HIERRO Y POSTERIOR REFORZAMIENTO DEL METAL PRODUCEN
CAMBIOS EN LA ESTRUCTURA DEL MICROBIOMA INTESTINAL DE *Drosophila*
melanogaster”

GABRIEL INGNACIO GÁLVEZ JIMÉNEZ

DIRECTOR DE TESIS: Mauricio Alejandro Latorre Mora

PROFESOR PATROCINANTE: Valentina María Parra Ortiz

Laboratorio de Bioingeniería

Instituto de Ciencias de la Ingeniería

Universidad de O'Higgins

Santiago, Chile 2019

FINANCIAMIENTO.

Esta memoria de título se llevó a cabo en el Laboratorio de Bioingeniería, dirigido por el Dr. Mauricio Latorre, el cual pertenece al Instituto de Ciencias de la Ingeniería de la Universidad de O'Higgins, Laboratorio de Bioinformática y Expresión Génica, dirigido por el Doctor Mauricio González y Verónica Cambiazo, Laboratorio de Microbiología y Prebióticos dirigido por la Dra. Angélica Reyes, estos dos últimos ubicados en el INTA de la Universidad de Chile.

Para su realización, este trabajo contó con el apoyo y financiamiento de los siguientes proyectos:

- Proyecto FONDECYT de Iniciación 2015 N°11150679 (ML)
- Proyecto FONDECYT Regular 2019 N°1190742 (ML)
- Proyecto FIC2018 - 6^{ta} región (ML)
- Proyectos FONDECYT Regular 2017 N°1171575 (AR, ML)
- Proyecto MILEAGE N°734931 (ML, MG)
- Proyecto PCI 2017-REDESI170422 (ML)
- Proyecto FONDAP CGR N°15090007 (MG, VC, ML)
- Proyecto Centro Basal N°AFB-170001 (ML)
- Proyecto FONDEQUIP N°EQM140121 (MG, ML)

No hay camino.

Fuera del brillo de la Luz, fuera del alcance de la Oscuridad ...

... ¿qué podría aguardarnos?

Y, sin embargo, buscamos, insaciables ...

Tal es nuestro destino.

AGRADECIMIENTOS.

Primero que todo, agradecer al profesor Mauricio Latorre, muchas gracias por ayudarme a poder realizar este proyecto, y a mucho más, a empezar este gran y desafiante camino que es la ciencia y empezar a convertirme en un mejor profesional, no hay forma en poder agradecer todo lo que me ha enseñado, gracias profe.

Al laboratorio de Bioinformática y Expresión Génica del INTA, a la profesora Verónica Cambiazo, por permitirme desarrollar esta tesis en su laboratorio, a Daniela Quenti, por enseñarme a trabajar con este gran pequeño animal y a Jonathan Maldonado, por enseñarme lo poco y nada que se de lo bello que es la bioinformática.

Al laboratorio de Microbiología y Probióticos de la profesora Angélica Reyes, por permitirme trabajar en sus instalaciones, y con un especial cariño al Leo, por todo lo que me enseñó en microbiología, fue bueno encontrar un amigo en esta travesía.

A mis queridos amigos que no me ayudaron en nada en esta tesis, pero me mantuvieron cuerdo afuera de ella, que camino más imposible de recorrer sin su ayuda, y que camino más entretenido ha sido recórrelo junto a ustedes, crecer con ustedes y ver cómo nos volvemos diferentes, pero seguimos unidos en todas las de la vida, gracias pío querido.

Finalmente, a mi Familia, mi tía, mi abuela que siempre están cuando se necesitan y en especial a mi hermano y mis padres, sin ellos nada de esto habría sido posible, ni nada en la vida tendría sentido y significado, gracias por estar ahí, aun cuando todavía me preguntan qué hago, siempre me apoyan y me mantiene cuerdo, sin ellos la felicidad no sería concebible, muchas gracias familia.

PRESENTACIONES EN REUNIONES CIENTÍFICAS.

La presente memoria ha dado origen a las siguientes actividades de difusión:

1. Gálvez G, Latorre M. Déficit y posterior reforzamiento de hierro afectan la homeostasis de cobre y zinc en *Drosophila melanogaster*. II Jornada de Posters Tesistas, Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos, Santiago, Chile, 2018, *Poster*.
2. Gálvez G, Latorre M. Concentración de hierro intestinal modula las interacciones del microbioma en *Drosophila melanogaster*. III Jornada de Posters Tesistas, Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos, Santiago, Chile, 2019, *Poster*.
3. Gálvez G, Latorre M. Iron deficiency and subsequent reinforcement of the metal produce changes in the structure of the intestinal microbiome of *Drosophila melanogaster*. III International Symposium on Integrative Bioinformatics, Universidad de la Frontera, Pucón, Chile, 2019, *Poster y Presentación Oral*.

TABLA DE CONTENIDO.	
AGRADECIMIENTOS.	v
PRESENTACION EN REUNIONES CIENTIFICAS.	vi
TABLA DE CONTENIDO.	vii
ÍNDICE DE FIGURAS.	ix
ÍNDICE DE TABLAS.	xi
ABREVIATURAS.	xii
RESUMEN.	xiii
ABSTRACT.	xv
1 INTRODUCCIÓN.	1
1.1 El hierro y su importancia como micronutriente.	1
1.2 Microbiota, su importancia y relación con el hierro.	4
1.3 Redes de coocurrencia para el análisis de estructura de comunidades bacterianas.	6
1.4 <i>Drosophila melanogaster</i> un modelo para el estudio del microbioma intestinal.	8
2 HIPÓTESIS.	11
2.1 Objetivo General.	11
2.2 Objetivos Específicos.	11
3 METODOLOGÍA.	12
4 RESULTADOS.	21
4.1 Diseño del protocolo de deficiencia y reforzamiento de hierro para el modelo <i>D. melanogaster</i>.	21

4.2	Determinación de la abundancia y diversidad del microbioma de <i>D. melanogaster</i> durante el protocolo de anemia y reforzamiento con hierro.	28
4.3	Construcción de redes de coocurrencia que representan las interacciones del microbioma de <i>D. melanogaster</i> durante el protocolo de deficiencia y reforzamiento con hierro.	42
5	DISCUSIÓN.	52
5.1	Deficiencia y reforzamiento de hierro en <i>D. melanogaster</i> .	52
5.2	Taxonomía y diversidad en <i>D. melanogaster</i> .	55
5.3	Cambios en las interacciones de la comunidad bacteriana.	59
6	PROYECCIONES.	63
7	CONCLUSIONES FINALES.	65
8	REFERENCIAS.	66

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1: Protocolo de deficiencia y reforzamiento de hierro.	15
Figura 2: Efecto de 2,2 DPD y FeCl₃ en la supervivencia de <i>D. melanogaster</i>.	22
Figura 3: Concentración de Fe intestinal de <i>D. melanogaster</i> sin y con suplemento inicial de Fe dentro de la dieta normal.	25
Figura 4: Concentración de Fe intestinal en <i>D. melanogaster</i> al finalizar cada ETAPA del protocolo en estudio	27
Figura 5: Resultado de electroforesis para la amplificación del fragmento del gen 16S bacteriano.	30
Figura 6: Curvas de rarefacción.	32
Figura 7: Dendrograma de agrupación de muestras por abundancia de OTUs.	34
Figura 8: Abundancia relativa de OTUs identificados a nivel de clase en muestras de intestino de <i>D. melanogaster</i> durante el protocolo de deficiencia y reforzamiento de Fe.	36
Figura 9: Abundancia relativa de OTUs identificados a nivel de orden en muestras de intestino de <i>D. melanogaster</i> durante el protocolo de deficiencia y reforzamiento de Fe.	38

Figura 10: Diversidad de especies presentes en muestras de intestino de	40
<i>D. melanogaster</i> durante el protocolo de deficiencia y reforzamiento de Fe.	
Figura 11: Redes de coocurrencia para cada ETAPA del proceso de	43
deficiencia y reforzamiento de Fe.	

INDICE DE TABLAS.

Tabla 1: Concentraciones de ADN obtenidas en las muestras de intestino de <i>D. melanogaster</i>.	29
Tabla 2: Características topológicas de las redes de coocurrencia.	46
Tabla 3: Índices comparativos entre las subredes comunes presentes por pares de redes de coocurrencia seleccionadas.	48
Tabla 4: OTUs “<i>drivers</i>” obtenidos por cada par de subredes comunes entre las redes de coocurrencias seleccionadas.	50

4 ABREVIATURAS.

2, 2 DPD: 2, 2' Bpiridil

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ARN: Ácido Ribonucleico

dNTP: Deoxyribonucleotides. Desoxirribonucleótidos

EDTA: Ácido Di-amino-etanol-tetraacético

Fe: Hierro

FeCl₃: Cloruro de Hierro

Kb: Kilo bases

min: minuto(s)

OTU: Operational Taxonomic Unit. Unidad Taxonómica Operativa

pb: Pares de bases

PBS: Phosphate buffered saline. Tampón fosfato salino

PCR: Polymerase chain reaction. Reacción de polimerasa en cadena

QIIME: (software) Quantitative Insights Into Microbial Ecology

rADN 16S: Unidad ribosomal 16S

rpm: revoluciones por minuto

s: segundo(s)

Tris: 2-Amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol

RESUMEN.

El hierro es un micronutriente esencial para los seres vivos, presentando una gran variedad de funciones para el organismo. Si bien, estudios previos indican que alteraciones en las concentraciones de hierro inducen cambios en la abundancia de especies de la comunidad microbiana intestinal, a la fecha desconocemos si estos cambios impactan sobre la estructura de las interacciones del microbioma.

En este contexto, el presente trabajo estudió mediante las construcciones de redes de coocurrencia, posibles modificaciones en la estructura de las interacciones del microbioma intestinal de *D. melanogaster* frente a dos eventos de cambio en la disponibilidad de hierro. Para esto, primero se ajustó un protocolo en etapas que permitió generar un escenario de disminución de hierro con un posterior reforzamiento del metal. Nuestra estrategia experimental de déficit logró una disminución de hierro intestinal de un 52%, valor similar al que se encuentra en cuadros de anemias por falta de hierro en humanos. La etapa de reforzamiento de hierro permitió elevar los niveles de hierro en un 100% por sobre el valor control, exceso similar a la dieta de reforzamiento utilizada como luego terapia de reforzamiento de hierro en humanos.

Como segundo objetivo se determinó la abundancia de las especies presentes en el intestino de *D. melanogaster*. Nuestros resultados mostraron una población bacteriana con una riqueza acotada, entre 20 a 8 Unidades Taxonómicas Operativas (OTUs) totales. Dentro del grupo control, un 99% de la abundancia perteneció a las clases *Alphaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria* y *Bacilli*, porcentaje que se mantuvo constante durante todo el protocolo. Producto del déficit de hierro, se observaron cambios importantes en la abundancia de estas clases predominantes, destacando una disminución de la clase *Alphaproteobacteria* de un 81% a un 23% y el aumento de la clase *Gammaproteobacteria* de 13% a un 57%. Posterior al evento de

reforzamiento de hierro, este cambio observado se logró revertir hasta alcanzar valores similares obtenidos en la situación control, dando cuenta de una capacidad de resiliencia de la comunidad microbiana intestinal de *D. melanogaster* frente a cambios en disponibilidad del metal.

Finalmente, con esta información se diseñaron las redes de coocurrencia para visualizar las estructuras de interacciones del microbioma. El modelo de déficit indicó que existe un reordenamiento de la red de interacciones en relación al modelo control, destacando el aumento de interacciones negativas entre nodos de la clase *Alphaproteobacteria* y *Bacilli*, lo que sugiere una posible competencia directa por el nicho, y un aumento en las interacciones positivas entre miembros de las clases *Bacilli* y *Gammaproteobacteria*, las cuales estarían interactuando de forma indirecta, posiblemente compartiendo algún metabolito. El modelo de reforzamiento presentó la misma estructura respecto al control, reforzando la idea de la capacidad de resiliencia del microbioma también a nivel de las interacciones entre los miembros de la comunidad, destacando la presencia de 7 OTUs pertenecientes al filo *Firmicutes* como elementos claves para mantener la estructura de interacciones dentro de las redes.

Como conclusión, nuestro trabajo permite estudiar la estructura de interacciones del microbioma bajo un protocolo de déficit y posterior reforzamiento de hierro, información que puede ser útil para la generación de dietas basadas en probióticos, administrando los organismos claves para las estructura de interacciones, en conjunto con el suplemento en la dieta, sumado a que nuestra estrategia experimental puede aplicarse perfectamente al estudio de otros metales esenciales como zinc y cobre, tanto para estas condiciones como también para tratamientos en la dieta distintos.

ABSTRACT.

Iron is an essential micronutrient for living beings, presenting a great variety of functions for the organism. Although there are studies indicating that alterations in the concentrations of iron induce changes in the abundance of species of the intestinal microbial community, to date we do not know if these changes impact on the structure of the microbiome interactions.

In this context, the present work studied through the construction of co-occurrence networks, possible changes in the structure of the interactions of the intestinal microbiome of *D. melanogaster* under two events of iron availability. To achieve this, a STAGE protocol was adjusted in a first instance, allowing to produce a scenario of iron deficiency and subsequent metal reinforcement. Our strategy allowed the decrease of the intestinal metal by 52%, a similar value to those observed during human anemias due to iron deficiency. On the other hand, the iron reinforcement stage, allowed a Fe raise levels of 100% above control values, an excess similar to the one obtained after the metal reinforcement therapy used in humans.

As a second objective, the abundance of the species present in the intestine of *D. melanogaster* was determined. Our results showed a bacterial population with a limited richness, between 20 to 8 Operational Taxonomic Units (OTUs). Inside the control group, a 99% of the intestinal microbiome abundance belongs to the *Alphaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria* and *Bacilli* classes, iron deficiency promotes a decrease in the *Alphaproteobacteria* class from 81% to 23% and, the increase in the *Gammaproteobacteria* class from 13% to 57%. After the iron reinforcement event, we observed that these species manage to recover their abundance, getting values similar to the control group, realizing a resilience capacity of the intestinal microbial community of *D. melanogaster* against changes in metal availability.

Finally, using this information the co-occurrence of networks were designed to visualize the structures of microbiome interactions. The deficit model showed a rearrangement of the network of interactions in relation to the control model, highlighting the increase in negative interactions between nodes of the *Alphaproteobacteria* and *Bacilli* classes. This suggests a possible direct competition for the niche, and an increase in positive interactions between members of the *Bacilli* and *Gammaproteobacteria* classes, which would be interacting indirectly, possibly through the sharing of some metabolites. The reinforcement model has the same structure in relation to the control model, reinforcing the idea of the capacity of microbiome resilience also at the level of interactions between its community members, highlighting the presence of 7 OTUs belonging to the *Firmicutes* family as key members in the maintaining of the interactions structure within networks.

Our work allowed us to study the structure of microbial interactions under a deficit protocol and subsequent iron reinforcement, information that can be useful for the generation of diets based on probiotics, managing the key organisms for the structure of interactions, together with the supplement in the diet, added to the fact that our experimental strategy can be perfectly applied to the study of other essential metals like zinc and copper both for these conditions and also for different dietary treatments.

1. INTRODUCCIÓN.

1.1 El hierro y su importancia como micronutriente.

El hierro (Fe), es uno de los micronutrientes esenciales para los seres vivos, participa de procesos biológicos vitales tales como: el transporte de oxígeno, formando parte de la hemoglobina; la fosforilación oxidativa, como constituyente de citocromos; el metabolismo de xenobióticos, como miembro de flavonoides y redoxinas (Hentze, Muckenthaler, y Andrews 2004). Además, al ser un metal divalente el cual puede pasar de un estado férrico (+3) a uno ferroso (+2) y viceversa, es un componente fundamental de procesos de transferencia de electrones a través de reacciones de oxidoreducción (Papanikolaou y Pantopoulos 2005). No obstante, un exceso en la concentración del metal puede llegar a producir toxicidad, generando condiciones patológicas graves, principalmente por estrés oxidativo, las cuales pueden conducir a problemas neurodegenerativos (Farina et al. 2013). Al respecto, el aumento en la cantidad de Fe en el cerebro está asociado con distintos desórdenes y enfermedades, como Alzheimer, Parkinson, enfermedad de Huntington, entre otras (Li y Reichmann 2016). A nivel molecular, un exceso en la concentración de Fe favorece el estado ferroso, el cual induce un aumento en especies reactivas de oxígeno (ROS) a través de la reacción de Fenton, donde el metal permite, junto a peróxido de hidrógeno (H_2O_2) la formación del radical hidroxilo (OH^*), el cual genera graves daños a proteínas y ácidos nucleicos (Jomova y Valko 2011).

Esta dualidad del Fe, de micronutriente esencial como también elemento tóxico, explica la presencia de sistemas regulatorios específicos (proteínas principalmente) involucrados en el control de las concentraciones del metal dentro del organismo, proceso denominado homeostasis de Fe. El objetivo de este proceso es mantener los niveles normales del micronutriente dentro del organismo (entre 10 a 30 $\mu\text{mol/L}$ en sangre para personas adultas) (Camaschella 2015), evitando con esto problemas de mal funcionamiento o muerte celular, ya sea por déficit o el exceso del metal.

Tal es la importancia de la regulación del metal, que eventos que puedan alterar la homeostasis de Fe generan un gran número de problemas en el organismo, llegando a provocar

incluso la muerte. En mamíferos y en especial en humanos, se han descrito múltiples enfermedades causadas por alteraciones en la homeostasis de este metal. Asociadas a un exceso en los niveles encontramos la hemocromatosis. Esta enfermedad hereditaria generada por mutaciones en el gen HFE (codifica la síntesis de una molécula de clase I del complejo mayor de histocompatibilidad) (Babitt y Lin 2011), provoca una acumulación excesiva de Fe en diferentes órganos, especialmente en el hígado, lo que conduce a estados graves de toxicidad, cuadros de afección hepática, pancreática y cutánea (Barton 2013).

Por el contrario, enfermedades por deficiencia, son las denominadas anemias de Fe. La anemia de Fe es una de las enfermedades más prevalentes en el mundo (Kassebaum et al. 2014), afectando principalmente a mujeres embarazadas y niños en países subdesarrollados, específicamente países del continente africano (Kassebaum et al. 2014). Según datos de la OMS se estima que aproximadamente un 30% de niños en etapa preescolar en países africanos presentan anemia de Fe (World Health Organization 2017). Dentro de los cuadros descritos, la anemia por Fe provoca graves alteraciones en el desarrollo del cerebro como también problemas cognitivos y motores (Lozoff et al. 2003). En personas adultas, un 25% de las mujeres en países subdesarrollados presentan cuadros que se caracterizan por síntomas de mareo, cansancio y uñas quebradizas, siendo más peligroso en mujeres embarazadas, llegando a provocar el nacimiento prematuro del feto, e incluso la muerte de la madre (World Health Organization 2017).

La principal estrategia para de tratar la deficiencia de Fe es mediante la suplementación directa del metal, tratamiento conocido como reforzamiento. Este tratamiento es llevado a cabo fundamentalmente a través de la administración oral del micronutriente usando preferentemente sales de sulfato ferroso (FeSO_4), las cuales son administradas como suplemento en conjunto con alimento (Camaschella 2015). En casos particulares, cuando la administración oral resulta insuficiente para restaurar los niveles normales de Fe, también se puede realizar la administración del metal de forma intravenosa, la cual solo se realiza en casos específicos debido a la gran capacidad oxidativa antes

presentada, puesto que esta intervención genera síntomas adversos tales como náusea, vómito y dolor abdominal (Litton, Xiao, y Ho 2013).

En Chile, al año 1999, un 30% de niños menores de 2 años desarrollaban anemia ferropriva, producida mayormente por falta de Fe en la dieta. Por esto, el Ministerio de Salud comenzó la entrega de Leche Purita y Leche Purita Cereal Fortificada con Fe a través del Programa Nacional de Alimentación Complementaria (PNAC) (Mujica et al. 2012). El programa entrega a menores de hasta 18 meses de edad leche fortificada con Fe (10 mg de Fe/100 g de leche), ácido ascórbico (70 mg/100 g), zinc (5 mg/100 g) y cobre (0,5 mg/100 g), logrando suplementar la cantidad de Fe diario necesaria (Whittaker 1998). Como resultado, estudios realizados por el Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos (INTA) de la Universidad de Chile, declararon que para el año 2009 la entrega de Leche Purita Fortificada logró disminuir la anemia ferropriva en un 53% en niños de 18 meses de edad de la región metropolitana y la quinta región (Mujica et al. 2012).

Si bien, la implementación de esta medida de reforzamiento ha contribuido enormemente a mejorar la salud y calidad de las personas, debido al alto requerimiento de Fe durante la gestación; la falta de difusión a la totalidad de la población de este problema, ha hecho que actualmente en Chile aún persista cuadros de anemia en mujeres embarazadas y recién nacidos chilenos, siendo un tema de salud relevante para nuestro país y de constante estudio a nivel mundial (Mujica et al. 2012).

Existen diversos trabajos que indican los efectos directos para la salud de las anemias y posterior reforzamiento de Fe. No obstante a la fecha la información sobre los efectos secundarios para el organismo luego de estos eventos de cambios en la concentración del metal es limitada, como por ejemplo, el posible impacto que podrían tener sobre la composición de las comunidades microbianas presentes en el organismo (Ley et al. 2005).

1.2 Microbiota, su importancia y relación con el hierro.

La microbiota o microbioma se define como el conjunto de microorganismos que habitan un área determinada, donde interactúan entre ellos y con el ambiente que los rodea, funcionando en una

relación simbiótica interespecie y/o con el ambiente (por ejemplo: hospedero) del tipo positiva (por ejemplo: mutualismo) o negativa (por ejemplo: parasitismo) (Ley et al. 2005). La microbiota intestinal en particular, es aquella que describe, tal como su nombre lo indica, el conjunto de microorganismos que habitan el intestino de un organismo. En el caso de los seres humanos, la microbiota intestinal puede ser tan grande que contiene 10 veces más bacterias que el número total de células que componen nuestro cuerpo, presentando órdenes de magnitud mayores en cuanto al número de genes en relación al genoma humano (Qin et al. 2010; The Human Microbiome Project 2012). En el intestino, pueden llegar a existir más de 600 géneros de bacterias diferentes (Fodor et al. 2012), donde los filos *Firmicutes* y *Bacteroidetes* son los más abundantes, abarcando cerca del 90% de la abundancia total del microbioma (Huse et al. 2012), siendo estos dos filos, los que tienen la mayor importancia para la correcta interacción microbioma-hospedero, como también su importancia en las diferentes funciones realizadas sobre y para el organismo.

En cuanto a las funciones que realiza la microbiota bacteriana para el hospedero, son de vital importancia: el procesamiento de polisacáridos no digeribles, la síntesis de distintas vitaminas (grupo B, vitamina K), protección contra otros organismos patógenos, los cuales al no poder ocupar el mismo nicho que la microbiota bacteriana intestinal, son incapaces de colonizar al hospedero y causarle daño (Grenham et al. 2011; S. Neish 2014). Además, la microbiota intestinal es capaz de secretar distintas moléculas del tipo neurotransmisores (Cryan et al. 2010) y hormonas gastrointestinales (grelina y leptina) (Dockray 2014; Holzer, Reichmann, y Farzi 2012). A nivel nutricional, algunos estudios han mostrado que ratones condicionados que no presentan microorganismos (GF, del inglés *germ free*), presentan una menor grasa corporal que ratones normales, siendo ambos alimentados en principio con una dieta alta en grasas (Ding et al. 2004). Luego, cuando los ratones GF eran colonizados con la microbiota de los ratones convencionales, éstos logran adoptar el fenotipo de la flora donante, recuperando el peso y cantidades de grasa corporal del ratón normal (Peter et al. 2008). Otros estudios en esta misma línea declaran que modelos de ratones genéticamente obesos, deficientes de leptina (hormona asociada con la saciedad),

presentan un desbalance importante en la proporción de los filos *Firmicutes* y *Bacteroidetes*, resultados que coinciden con estudios tanto clínicos como preclínicos que reportan que un desbalance en estos filos se relaciona con obesidad y síndrome de colon irritable (Claesson et al. 2012; Peter et al. 2008; Sanderson et al. 2006).

Todos los trabajos previamente mencionados, sostienen la importancia del microbioma intestinal y su relación con la salud del organismo, en el cual una pérdida total o parcial de la comunidad bacteriana intestinal puede provocar efectos adversos para el hospedero. En cuanto a la relación entre el microbioma y el Fe, evidencias experimentales declaran que un aumento en la ingesta de este metal conduce a una mayor disponibilidad en el tracto intestinal, pudiendo inducir un crecimiento exacerbado del microbioma, generando diferentes problemas intestinales como enfermedades gastrointestinales e irritabilidad del colon (Motta et al. 2018). Para evitar este escenario, el hospedero como mecanismo de protección, secuestra el Fe disponible a modo de evitar que éste quede a disposición de la microbiota (Skaar 2010). Para ello, el Fe es almacenado en diversas proteínas, disminuyendo la disponibilidad de este metal. A nivel intracelular, células del intestino sintetizan altas concentraciones de ferritina, la cual acumula grandes cantidades de Fe en el citoplasma (Skaar 2010; Theil 2011). A nivel extracelular, la mucosa intestinal secreta altas concentraciones de transferrina, proteína que une Fe permitiendo una disminución en su concentración y con ello una reducción de la disponibilidad del micronutriente para la microbiota (Law 1999).

Estos mecanismos de protección por parte del hospedero han llevado a los microorganismos a adaptarse con el objetivo de obtener las cantidades necesarias de Fe para su correcto funcionamiento. En particular, las bacterias compiten por el secuestro de Fe del hospedero a través de tres métodos diferentes: i) secreción de sideróforos, moléculas que tienen la capacidad de unir Fe con una afinidad elevada, compitiendo con la transferrina del hospedero (Wanderman y Deleplaire 2004; Skaar 2010); ii) la adquisición del grupo hemo, que permite a las bacterias obtener el Fe a través de receptores específicos para este grupo (Wanderman y Deleplaire 2004), iii) síntesis de

receptores para transferrina, con los cuales puede unir esta proteína del hospedero y remover el Fe para ingresarlo al medio intracelular (Cornelissen et al. 1998).

Esta relación de competencia por el Fe entre microorganismos y hospedero, explica la necesidad de ambos de obtener la cantidad adecuada de este micronutriente, por lo que, durante un episodio de déficit de este nutriente, es factible suponer la existencia de cambios en la composición de la microbiota presente en el intestino. Al respecto, estudios en humanos declaran que frente a una deficiencia de Fe, mujeres no embarazadas entre 18 a 25 años presentan una disminución en la población de *Lactobacilos* fecales (Balamurugan et al. 2010). Por otro lado, una fortificación de Fe en la dieta en infantes de 6 meses de vida, provoca un aumento en la población de bacterias patógenas en las heces (M. Tang et al. 2017). Adicionalmente, trabajos realizados con la microbiota presente en heces de rata, indicaron que la privación de Fe genera cambios en la composición de grupos bacterianos, destacándose cambios en los miembros *Bacteroides*, *Enterobacterias* y *Lactobacillus*. En este mismo estudio, un posterior reforzamiento con electrolitos de Fe y sulfato ferroso provocaron una reintegración de algunos de estos grupos de bacterias afectadas, recuperando en parte la riqueza inicial de la flora intestinal (Dostal et al. 2012).

1.3 Redes de coocurrencia para el análisis de estructura de comunidades bacterianas.

Si bien, los trabajos presentados en el punto anterior indican que cambios en la disponibilidad de Fe impactan sobre la diversidad y abundancia de las especies bacterianas que conforman la microbiota intestinal, a la fecha, desconocemos el efecto sobre la estructura de interacciones entre los miembros que forman la comunidad, estas interacciones se definen en el marco ecológico, para indicar qué organismos están presentes en un entorno determinado, en qué números y cómo se relacionan entre sí. En este marco, en este último tiempo, estudios de redes de coocurrencia han permitido identificar, cuáles son los posibles tipos y número de asociaciones que se establecen entre los miembros de un microbioma, dando cuenta de la estructura de la comunidad, tanto de biomas ambientales como las estructuras de interacciones que presentan la microbiota de diferentes

hospederos (Poretsky et al. 2015). Las redes de coocurrencia están compuestas principalmente por las especies que componen el microbioma (Unidades Operacionales Taxonómicas, OTUs), las cuales conforman los nodos en la red, conectadas entre sí de acuerdo a su correlación (positiva o negativa) de abundancia en diferentes muestras o condiciones de estudio.

Las interacciones resultantes, pueden variar en cuanto al tipo y número dependiendo del microbioma en estudio. De igual forma, es posible establecer estructuras, motivos y patrones particulares dentro de la red, lo que permiten identificar especies claves dentro del microbioma, las cuales juegan un rol fundamental en mantener la estructura de la comunidad. Al respecto, un estudio de redes de coocurrencia en humanos (Faust et al. 2012) en diferentes áreas del cuerpo (piel, boca, intestino, área nasal y urogenital), reveló que no solo la diversidad y abundancia varían, sino también, las interacciones son diferentes entre los diferentes microbiomas en estudio, sugiriendo la existencia de un nicho regulado por miembros específicos dentro de la comunidad existente, en los cuales organismos que presentaban una mayor abundancia, también mostraban una mayor cantidad de conexiones, actuando como “*hubs*” o nodos altamente conectados. Ejemplo de esto son las especies de *Streptococcus* en la cavidad oral y *Bacteroides* en el intestino humano.

La construcción de redes de coocurrencia, no solo se limita al estudio de las interacciones de las comunidades en biomas vivos, también permite el análisis de distintos componentes abióticos, y cómo estos afectan la estructura de las comunidades bacterianas. A modo de ejemplo, un trabajo publicado recientemente (Poretsky et al. 2015), a través del uso de redes de coocurrencia, logró identificar correlaciones entre especies bacterianas y distintas variables fisicoquímicas ambientales (pH, cantidad de nutrientes, temperatura, humedad, etc.) presentes en diversos biomas de suelo (tundra, bosque húmedo, bosque conífero, etc.). Los resultados de las redes indicaron que taxones menos representativos presentan un sesgo marcado en su distribución dentro del ambiente, principalmente generado por asociaciones negativas entre sus miembros y el pH del ambiente, dando cuenta que la uniformidad general observada no se ajusta con este grupo de microorganismos y la importancia de esta variable ambiental en la configuración de la estructura de la comunidad.

Hoy en día, todavía falta un entendimiento mayor de la complejidad de los cambios en las estructuras de las interacciones del microbioma, por lo que un mayor estudio con estas redes es necesario para poder elucidar estos patrones, y cómo las interacciones microbianas afectan a la salud del hospedero y el ambiente en donde se encuentran. Para esto, es fundamental contar con una herramienta consistente y confiable para determinar las correlaciones entre las especies de la comunidad. En este contexto, el trabajo liderado por Faust presentado en el año 2015 (Poretsky et al. 2015), presentó una herramienta integral denominada CoNet, de fácil y rápida operación para la construcción mediante redes de coocurrencia y análisis de correlaciones entre bacterias y variables ambientales, perfectamente aplicable para el estudio biomas ambientales, así como para el estudio de microbiomas en el organismo. En relación a esto se abre la posibilidad para realizar este tipo de estudios, convirtiéndose en este último tiempo, en una de las herramientas más citadas para el estudio de la estructura de comunidades microbianas.

En resumen, la importancia del Fe como micronutriente esencial y el desconocimiento actual de sus efectos sobre la estructura del microbioma, sumado a las posibilidades para construir de redes de coocurrencia, abren la posibilidad real para estudiar si cambios en la biodisponibilidad de Fe pueden afectar la estructura de las comunidades bacterianas presentes en el intestino de un organismo.

1.4 *Drosophila melanogaster*: un modelo para el estudio del microbioma intestinal.

Dada la complejidad del estudio en cuanto al tipo y número de variables, tales como las diferentes condiciones de biodisponibilidad de Fe, estudio a nivel de organismo completo (presencia de intestino) y total de especies bacterianas que conforman el microbioma, para establecer una estrategia experimental que considere estas características es necesario disponer de un modelo biológico acorde a estos requerimientos. En consideración a los temas éticos y tiempo que conlleva el trabajo en muestras humanas, sumado a los costos de operación, variabilidad y alto número de réplicas necesarias para establecer consistencia en las muestras a utilizar en la construcción de redes

de coocurrencia, el uso de pacientes o voluntarios humanos para el desarrollo de la presente memoria de tesis se vuelve complejo y poco viable.

Como alternativa, el modelo de la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*, se ha posicionado en este último tiempo como una excelente opción para el estudio de la microbiota intestinal. Dentro de sus características generales se encuentra su fácil manipulación, lo que permite una disección clara de sus órganos, en este caso el intestino. Manipulación simple y completa sobre la dieta, que otorga el control de la alimentación, en este caso los cambios en las concentraciones de Fe suministradas. Presenta un ciclo de vida corto, con 3 etapas de vida marcadas (larva, pupa y mosca adulta) con bajos costos de mantención, genoma secuenciado, diferentes herramientas de biología molecular y una amplia base con cepas y variantes genéticas (Apidianakis y Rahme 2011; Buchon, Broderick, y Lemaitre 2013).

En términos de su microbiota, a la fecha existen más de 200 artículos describiendo comunidades bacterianas presentes en el intestino de *D. melanogaster*. Al respecto, esta mosca presenta una comunidad bacteriana acotada, donde el 97% de los taxones bacterianos pertenece a dos filos, *Firmicutes* y *Proteobacterias* (Nin, Chun y Douglas 2011), siendo las especies dominantes las bacterias *Acetobacter pomurum*, *Acetobacter tropicalis*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus fructivorans* y *Lactovacillus plantarum* (Nin, Chun y Douglas 2011), todas ellas también se encuentran en gran presencia en la microbiota humana (Trinder et al. 2017).

En relación al Fe, existe un amplio conocimiento sobre la homeostasis de este metal en *D. melanogaster*, destacándose la gran cantidad de genes y mecanismos homólogos con los humanos (X. Tang y Zhou 2013b; Trinder et al. 2017), tales como la proteína ferritina, que al igual que su homólogo humano, presenta funciones de absorción de Fe y almacenamiento del metal (Winzerling 2010). Otro ejemplo, la proteína malvolio, homologa a DMT (del inglés *Divalent Metal Transporter*), proteína transportadora de Fe tanto en humanos como en la mosca de la fruta (Bettedi et al. 2011). También se encuentran en *D. melanogaster* las proteínas reguladoras IRP 1-A (del inglés *Iron Regulatory Proteins*), homologa a IRP-1 en humanos, la cual es capaz de unir el mARN de genes de

homeostasis de Fe y así regular la traducción de proteínas involucradas en el control del contenido del metal (Gray et al. 1996; Piccinelli y Samuelsson 2007). Estas evidencias en términos de la homeostasis de Fe y su alta homología con los sistemas humanos, sumado al amplio conocimiento de la microbiota de este organismo, posicionan a *D. melanogaster* como un excelente modelo para utilizar dentro de esta memoria de tesis.

En función de todos estos antecedentes, la presente memoria de tesis busca, determinar si un evento de déficit y posterior reforzamiento del metal Fe, impactan sobre las asociaciones de especies bacterianas que habitan la microbiota de *D. melanogaster*. Para esto, mediante la construcción de redes de coocurrencia esperamos entregar valiosa información sobre la estructura de las comunidades bacterianas y su capacidad para adaptarse frente a cambios en la biodisponibilidad de Fe dentro del organismo.

2 HIPÓTESIS.

“Cambios en la biodisponibilidad de hierro generados por un evento de deficiencia y posterior reforzamiento del metal afectan la estructura de la microbiota de *Drosophila melanogaster*.”.

2.1 Objetivo General.

Analizar mediante la construcción de redes de coocurrencia, el efecto de un evento de déficit y posterior reforzamiento de hierro sobre la estructura de asociaciones de especies bacterianas que conforman la microbiota intestinal de *Drosophila melanogaster*.

2.2 Objetivos Específicos.

1. Diseñar un protocolo de deficiencia y reforzamiento de hierro para el modelo *D. melanogaster*.
2. Determinar la abundancia y diversidad de la microbiota de *D. melanogaster* durante el protocolo de deficiencia y reforzamiento con hierro.
3. Construir redes de coocurrencia que representen las interacciones de la microbiota de *D. melanogaster* durante el protocolo de deficiencia y reforzamiento con hierro.

3 METODOLOGÍA

3.1 Reactivos.

Todos los reactivos utilizados en la presente memoria fueron de acceso y uso comercial. QIAGEN: Kit para la extracción de ADN “DNeasy Blood & Tissue” (incluye buffer AL, AW1, AW2, AE y proteinasa K) (69504). MERK: cloruro férrico hexahidratado (1039430250), etanol absoluto (1070172511). PROMEGA: mix ADN polimera GoTaq® (incluye glicerol 5X Green y 5X Colorless GoTaq® Buffers) (24520109). SIGMA: 2,2'-Bipiridil (D216305-10G), glucosa (G8270), lisozima de huevos de blancos de gallina (L6876-10G). TCL: agar agar, WINKLER: EDTA, Tris pH 8, triton x-100.

3.2 Modelo biológico y mantención.

La especie *Drosophila melanogaster* cepa Canton-S (FlyBase ID FBsn0000274) ocupada en este trabajo fue obtenida por el Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos. La especie *D. melanogaster* fue criada en medio estándar no estéril (maicena comercial 2,7%, azúcar comercial 4,3%, agar 1%, levadura comercial 1,5% y propionato de calcio 0,9%), en tubos de 5 cm, mantenida en una cámara de fotoperiodo a una temperatura de 25 °C, con un ciclo de luz oscuridad de 12 horas cada uno y sin restricción en su reproducción. Las moscas seleccionadas para el experimento de deficiencia y posterior reforzamiento de Fe fueron moscas adultas de un día posterior a la eclosión. Para esto, se sincronizaron las moscas adultas a ocupar, seleccionando las que eclosionaron en una misma noche. Esto se logró vaciando los tubos de comida dejando solo las pupas, seleccionando a la mañana siguiente las moscas adultas que eclosionaron esa noche, de esta forma se obtuvo animales con similar tiempo de vida. Finalmente, se seleccionaron únicamente moscas macho para impedir el ciclo completo de vida de *D. melanogaster*, evitando interferencias con la medición de Fe y el microbioma.

3.3 Viabilidad de *D. melanogaster* en deficiencia y reforzamiento de hierro

Para poder conocer las concentraciones de los suplementos tanto de 2,2'-Bipiridil (2,2 DPD, quelante específico de Fe) como de FeCl₃, se realizaron ensayos de supervivencia. Se buscó determinar la mayor concentración para provocar deficiencia y reforzamiento respectivamente, que además no generara un efecto sobre la viabilidad del animal. Basado en la literatura, se ocuparon concentraciones de 2,2 DPD, 0,25 mM; 0,5 mM y 1 mM, y de FeCl₃, 2,5 mM; 5 mM y 10 mM (Law 1999; Hiel et al. 2012). En este ensayo se ocuparon un total de 100 moscas machos adultas por 5 días (día 1 post eclosión), distribuidas en dos viales con medio control estéril (agar estéril 2,4%; glucosa filtrada 50%, 25 moscar por vial, 4 viales totales), el cual presenta una concentración basal de Fe (10µM). Posterior a este tiempo, se cambiaron a los viales de estudio que contenían medio control estéril y concentraciones de 2,2 DPD o FeCl₃ según el caso. Para el control se siguió utilizando el medio control estéril durante todo el ensayo. Por un periodo de 30 días, se realizó el conteo de las moscas cada día hasta el término del ensayo. Análisis estadísticos se realizaron usando el programa Graphpad Prism 5, calculando el promedio y desviación estándar para cada día con 3 réplicas independientes del ensayo.

3.4 Protocolo de deficiencia y posterior recuperación de hierro.

El protocolo completo se resume en la Figura 1. La ETAPA 1 corresponde tanto a la condición control como experimental. Primero, se realizó la sincronización en el nacimiento del animal, para esto se tomaron un total de 1000 moscas, hembras y machos, distribuidas en 50 tubos (20 moscas por tubo). Las larvas obtenidas se alimentaron por 5 días para generar el microbioma y posteriormente entrar al estado de pupa, el cual tiene una duración de 5 días, dejando al animal un total de 10 días en medio nutritivo no estéril (maicena comercial 2,7%, azúcar comercial 4,3%, agar 1%, levadura 1,5% y propionato de calcio 0,9%). Pasado ese tiempo se traspasó un total de 240 moscas adultas machos a tubos suplementados con medio control estéril o “**dieta normal**” (agar 2,4%; glucosa 50%, FeCl₃ 0,05 mM), 20 moscas por tubos para un total de 12 tubos en total, donde

se mantuvieron por cinco días concluyendo la ETAPA 1. Definido las concentraciones de FeCl_3 y 2,2 DPD en base a los resultados de viabilidad, un total de 120 moscas se traspasaron a un medio estéril limitante de Fe, esto con el fin de reducir la concentración de Fe intestinal, o “**dieta deficiente**” (agar 2,4%; glucosa 50%, 2,2 DPD 0,5 mM), y 120 moscas siguieron alimentándose con dieta normal, donde se mantuvieron por un total de cinco días, período denominado ETAPA 2. Luego, el total de moscas se cambiaron a un medio estéril suplementado con Fe, para poder recuperar los niveles de Fe intestinales, o “**dieta reforzada**” (agar 2,4%; glucosa 50%, FeCl_3 5 mM) dando término a la ETAPA de deficiencia e iniciando el evento de reforzamiento del metal, el cual duró otros cinco días, proceso denominado ETAPA 3. Por su parte, se replicaron los mismos días de cultivo y trasposos para un grupo control, donde las moscas fueron alimentadas con una dieta normal por la totalidad del experimento. Las mediciones de concentración intestinal de Fe total y extracción de ADN intestinal se realizaron al término (último día) en cada una de las ETAPAS (1,2 y 3). El total de este protocolo se realizó 5 veces en eventos independientes.

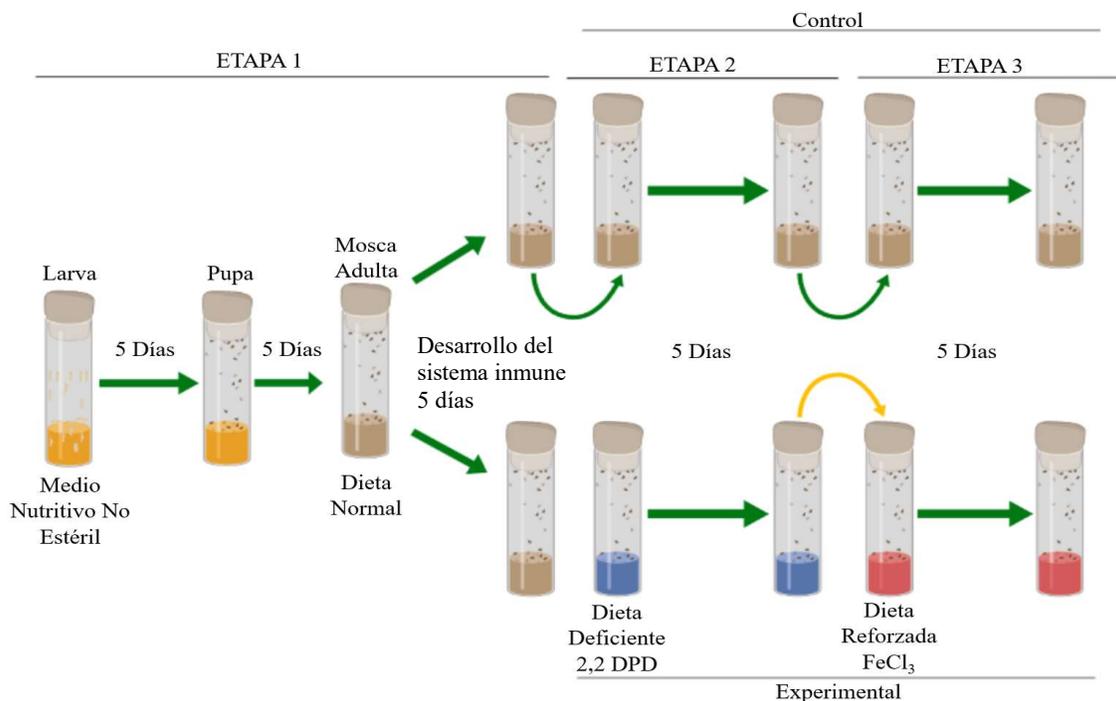


Figura 1. Protocolo de deficiencia y reforzamiento de Fe.

La figura describe el protocolo usado para generar deficiencia y posterior reforzamiento en los niveles de Fe intestinal, utilizando en paralelo un grupo alimentado con la dieta normal (0.05mM de Fe Cl₃) como control del tiempo de vida de las moscas durante el experimento. La dieta deficiente presenta a una concentración de 0,5mM de 2,2 DPD, mientras que la dieta reforzada tiene una concentración de 5 mM de FeCl₃. Las dietas ocupadas como Dieta Normal, Dieta Deficiente y Dieta Reforzada se encontraban estériles. Muestras para cuantificación de Fe y extracción de ADN se realizaron a los días 15 (ETAPA 1), 20 (ETAPA 2) y 25 (ETAPA 3), estos días corresponden al termino de cada ETAPA. Flechas amarillas representan un cambio en la dieta, flechas verdes progreso del protocolo de deficiencia y reforzamiento. Tiempo total del protocolo 25 días.

3.5 Medición de contenido de hierro intestinal.

La disección de los intestinos se llevó a cabo siguiendo el protocolo previamente publicado (Nin, Chun y Douglas 2011). La parte delantera, anterior y posterior de 10 intestinos fueron disectados en etanol absoluto, usando pinzas Dumont n°2. Los intestinos fueron colocados en un tubo eppendorf de 0,6 ml y almacenados a -20 °C. Para la medición de Fe, un “pool” de 10 intestinos fueron digeridas a 60 °C con 50 µL de HNO₃ al 66% (Merck), luego se agregó 40 µL de agua libre de metales y 10 µL de galio (10 mg/L estándar interno). La medición de Fe se realizó a través de la técnica espectroscópica de Fluorescencia de Rayos-X por reflexión Total (TXRF) siguiendo un protocolo previamente publicado (Tapia et al. 2003). Este ensayo se repitió 5 veces, con 2 mediciones para cada repetición, dando un total a 60 muestras (20 ETAPA 1, 10 ETAPA 2 control, 10 ETAPA 3 control, 10 ETAPA 2 experimental, 10 ETAPA 3 experimental).

3.6 Extracción y análisis de ADN bacteriano.

Para la extracción de ADN, la disección de los intestinos se llevó a cabo siguiendo el mismo protocolo descrito en la sección anterior. Un total de 20 intestinos fueron disectados en PBS 1x, usando pinzas Dumont n°2 estériles. Luego, se lavó cada intestino con PBS 1x, para eliminar residuos remanentes de la disección. La extracción de ADN se realizó modificando el protocolo de extracción de ADN *Isolation Kit DNeasy Blood and Tissue Kit* (Cat N°. 69504 de QIAGEN), disectando 20 intestinos y resuspendiéndolos en 1 ml de buffer de lisis en hielo, el cual contiene lisozima fresca (concentración final 20 mg/ml). Se dejó incubar a 37 °C por 35 minutos y se agregó 25 µL de proteinasa K y 200 µL de buffer AL sin etanol, dejando incubar a 70°C hasta que se completó la lisis de los intestinos. Posteriormente, se adicionó 200 µL de etanol 100%, se mezcló en vortex y se colocó la solución en la columna *DNeasy Mini spin* marca QIAGEN. Se centrifugó a 14000 g por un minuto y se descartó el sobrenadante. Se agregaron 500 µL de buffer AW1 a la columna, la cual se centrifugo a 14000 g por un minuto y se descartó el sobrenadante. Se le agregó 500 µL de buffer AW2 para luego centrifugar las columnas a 14000 g por tres minutos descartando el sobrenadante. Finalmente,

se agregó 100 μL de buffer AE a la membrana, se dejó incubar por un minuto y se centrifugó a 14000 g por un minuto. Las muestras fueron almacenadas a -20°C . Este ensayo se repitió 5 veces dando un total a 30 muestras de ADN total (10 ETAPA 1, 5 ETAPA 2 control, 5 ETAPA 3 control, 5 ETAPA 2 experimental, 5 ETAPA 3 experimental).

3.7 Amplificación y secuenciación de ADN bacteriano.

Para comprobar la presencia de ADN bacteriano intestinal luego de la extracción, se realizó un PCR usando los partidores universales de avance 27f (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) 10 μM , reversa 1492r (5'-TACCTTGTTACGACTT), los cuales amplifican específicamente el gen del ARN 16S bacteriano, (Wilsonl, Blitchington, y Greene 1990). Para esto, se ocuparon 10 μL del mix de ADN polimerasa GoTaq®, 0,5 μL de cada partidior (concentración final 0,25 μM), 2 μL de muestra y 7 μL de agua libre de nucleasas. Para la reacción de PCR se usaron las siguientes condiciones: 94 $^{\circ}\text{C}$ por 5 minutos, 28 ciclos de 94 $^{\circ}\text{C}$ por 30 segundos, 28 ciclos de 50 $^{\circ}\text{C}$ por 30 segundos, 28 ciclos de 72 $^{\circ}\text{C}$ por 30 segundos, para terminar 72 $^{\circ}\text{C}$ por 7 minutos. Para determinar que la amplificación fue realizada con éxito, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% (tiempo de migración 40 min). Finalmente, cada muestra se envió a la empresa Zymo Research Corporation, usando el equipo MiSeq de illumina®, para su amplificación y posterior secuenciación del ARN 16S. Este servicio se realizó secuenciando la región de hipervariabilidad V3 y V4 del 16S rARN, región seleccionada siguiendo protocolos previamente descritos (Jehrke et al. 2018). Para la obtención de redes con mayor robustez se decidió realizar 2 secuenciaciones para cada muestra, dando un total de 60 muestras (20 ETAPA 1, 10 ETAPA 2 control, 10 ETAPA 3 control, 10 ETAPA 2 experimental, 10 ETAPA 3 experimental).

3.8 Procesamiento y análisis de secuencias.

Las secuencias fueron procesadas siguiendo protocolos previamente descritos (Handl, Dowd, y Garcia-mazcorro 2011). Las secuencias fueron sobrelapadas y agrupadas por muestras, para

posteriormente eliminar los segmentos “*barcodes*” de las secuencias. Secuencias menores de 150 pb o con asignación ambigua de bases no fueron consideradas para análisis posteriores. Las secuencias aceptadas como válidas fueron agrupadas usando el algoritmo UClust (v2.22) con un 4%, esto para poder eliminar quimeras y grupos con una sola secuencia (*singletons*) (Edgar 2010).

Las secuencias obtenidas, luego de ser procesadas, fueron analizadas con el programa *Quantitative Insights Into Microbial Ecology* (QIIME) (Caporaso et al. 2011), ocupando el protocolo en forma estándar `pick_closed_reference_otus.py`, el cual permite comparar todas las secuencias obtenidas contra secuencias de referencias. En este caso se compararon las secuencias contra bases de datos de Greengenes (McDonald et al. 2011), usando un 97% de similitud, asignando la taxonomía directamente desde la coincidencia más cercana. Para asignar los OTUs se usaron directamente los OTUs entregados por el servicio de secuenciación de la empresa Zymo research. Una vez obtenidos los OTUs, estos se filtraron por un mínimo de 2 *reads* (lecturas) por muestras, eliminando aquellos OTUs identificados de mitocondrias, cloroplastos y no clasificadas dentro de la gama de bacteria. El análisis de rarefacción se realizó basado en protocolos anteriores (Fierer et al. 2012), usando el código “`alpha_rarefaction.py`”, dejando el número de *lecturas* al menor obtenido de las muestras. Se obtuvo la diversidad alfa con el código `alpha_diversity.py` obteniendo el índice de Shannon, el índice de Simpson y también las especies totales. Este protocolo fue realizado para cada una de las muestras de ADN en estudio obteniendo un total de 60 tablas de abundancia.

3.9 Construcción de dendrograma.

Para poder verificar que las réplicas técnicas de secuenciación fuesen reproducibles entre ellas, se realizó un dendrograma (“*cluster*” de similitud). Para esto, se usó la aplicación MeV, disponible como página web (<http://mev.tm4.org>). El programa permitió realizar una construcción del diagrama por agrupación jerárquica, donde se usaron los siguientes parámetros: métrica de distancia de Pearson; algoritmo de criterios de vinculación completos y dimensión de la agrupación en columnas. Para la construcción se usaron las 60 tablas de abundancia obtenidas luego del servicio

de secuenciación.

3.10 Construcción de redes de coocurrencia.

Para poder estudiar la estructura de las comunidades bacterianas y cómo se ven afectadas cuando se producen cambios en la concentración de Fe, se construyó un total de cinco redes de coocurrencia: i) Red ETAPA 1: Se tomaron los datos de abundancia tanto de la serie control como tratamientos para consolidar una red inicial única robusta (total de muestras = 20 por red), ii) Redes ETAPA 2: Se construyeron dos redes, una para la situación control y otra para la situación experimental luego de los cinco días de déficit de Fe (total de muestras = 10 por red), iii) Redes ETAPA 3: Se construyeron dos redes, una para la situación control y otra para la situación experimental luego de los cinco días de reforzamiento de Fe (total de muestras = 10 por red). Todas las redes de la ETAPA 2 y 3 fueron comparadas con la red consolidada de la ETAPA 1.

La construcción y posterior visualización de las redes se llevó a cabo a través del programa Cytoscape (v3.7.1) (Shannon et al. 2003), usando el *plugin* CoNet (Faust y Raes 2016). Las redes fueron construidas con las tablas de abundancia obtenidas en el procesamiento y análisis de secuencias bacterianas, para la construcción de las redes también se incluyeron las concentraciones de Fe obtenidas en el protocolo de deficiencia y reforzamiento del metal. Para evitar ruido provocado por los OTUs con baja presencia, se eliminaron aquellos que tuvieran por sobre dos cero en los datos de las tablas de abundancia (*row_minocc filter* = 8) para las redes de ETAPA 2 y 3, y cuatro valores cero para la red ETAPA 1 (*row_minocc filter* = 16). Posteriormente, se normalizaron los datos para evitar efectos producidos por diferencia en la profundidad de la secuenciación. Para esto, en la construcción de la red se ocuparon cuatro métodos. Para poder obtener las medidas de similitud, se ocuparon dos índices de disimilitud (Bray Curtis y Kullback-Leibler); y dos índices de correlación (Pearson y Spearman). El primer umbral se fijó para generar una red inicial que contenía 100 conectores positivos y 100 conectores negativos, derivados de los puntajes obtenidos en las cuatro medidas de similitud. Para generar la red final se realizó una permutación y *bootstrapping* con 100 iteraciones. Finalmente se ocupó el programa Cytoscape para la visualización de la red, como

también para la obtención de número de nodos, coeficiente de agrupamiento, longitud promedio de la ruta y densidad. Finalmente, las comparaciones entre redes de las ETAPA 2 y 3 control y experimental versus la red de la ETAPA 1, se realizaron mediante el programa Netshift para la plataforma Cytoscape (Kuntal et al. 2019), disponible como página web <https://web.rniapps.net/netshift/>.

4. RESULTADOS.

4.1 Diseño del protocolo de deficiencia y reforzamiento de hierro para el modelo *D. melanogaster*.

Para poder generar el protocolo de deficiencia y reforzamiento de Fe, primero fue necesario definir los suplementos adecuados (concentraciones de Fe) a administrar en la alimentación que pudiesen reproducir los escenarios en estudio para cada ETAPA del protocolo sin afectar la viabilidad de las moscas por un tiempo determinado.

Para el déficit se usaron tres medios con dieta normal, suplementados cada uno con distintas concentraciones de un quelante específico para Fe. En este caso se eligió 2,2 DPD a concentraciones de 0,25 mM (medio deficiente bajo), 0,5 mM (medio deficiente medio) y 1 mM (medio deficiente alto). De igual forma, se usaron tres medios para el reforzamiento, donde la dieta normal fue suplementada con distintas concentraciones de FeCl₃, 2,5 mM (medio de reforzamiento bajo), 5 mM (medio de reforzamiento medio) y 10 mM (medio de reforzamiento alto). Estas concentraciones fueron elegidas para ensayos de viabilidad en base a datos previamente publicados (Law 1999), utilizando la dieta normal como condición control del ensayo (10 μM concentración basal del medio).

La Figura 2 describe los resultados obtenidos. Tanto en el ensayo de deficiencia, como en el de reforzamiento, en animales alimentados con dieta normal (control), a partir del día 17, respecto al inicio del ensayo, se empieza a observar una diferencia significativa en el porcentaje de supervivencia de las moscas. Para el caso del experimento de deficiencia (Figura 2A), se detectaron diferencias significativas a partir del día 10 para el medio deficiente bajo, del día 8 para el deficiente medio y día 7 para el deficiente alto en relación a la dieta normal al mismo día del experimento. En el evento de reforzamiento (Figura 2B), se obtuvo diferencias significativas a partir del día 11 de aplicar el medio de reforzamiento bajo, a partir del día 8 con el deficiente medio y al día 7 con el medio deficiente alto.

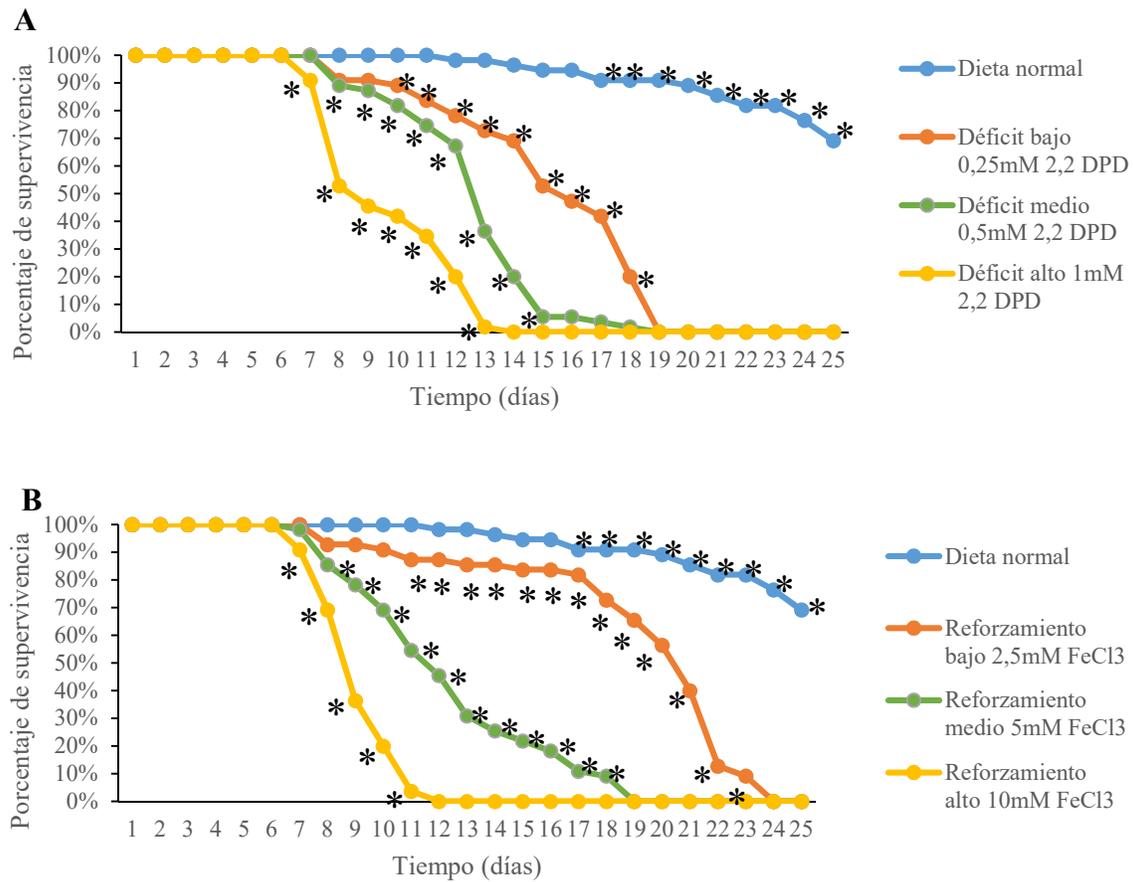


Figura 2. Efecto de 2,2 DPD y FeCl₃ en la supervivencia de *D. melanogaster*.

A. Porcentaje de supervivencia de moscas alimentadas con dietas suplementadas con diferentes concentraciones de quelante 2,2 DPD (0,25; 0,5 y 1 mM). **B.** Porcentaje de supervivencia de moscas alimentadas con dietas suplementadas con diferentes concentraciones de FeCl₃ (2,5; 5 y 10 mM). El inicio del suplemento (2,2 DPD o FeCl₃) tanto para la condición de deficiencia y reforzamiento empezó desde el día 1 del ensayo. El valor de cada punto representa el dato promedio de supervivencia obtenido de 3 experimentos realizados en forma independiente (total de moscas al inicio 100). * Diferencia significativa en relación al conteo inicial de individuos, $p < 0,05$ test múltiple de Bonferroni.

En relación con los resultados obtenidos, debido a que el animal empieza a presentar una disminución significativa en su sobrevivencia a partir del día 17, se decidió desarrollar un protocolo de deficiencia y reforzamiento que estuviera dentro de este intervalo de tiempo, con una duración máxima de 15 días post eclosión del animal, tomando en cuenta: una etapa inicial de 5 días para el desarrollo del sistema inmune y adecuación del microbioma de la mosca alimentada con dieta normal, 5 días como máximo para la etapa de deficiencia y 5 días como máximo para la etapa de reforzamiento.

Con este conocimiento se decidió descartar la dieta deficiente alta (1 mM), y la dieta de reforzamiento alto (10 mM), ya que ambas generaban una disminución significativa en la sobrevivencia a partir del día 7, lo cual se acercaba a los 5 días definidos para producir tanto la deficiencia de Fe, como el reforzamiento del metal. Asimismo, se decidió descartar la dieta deficiente baja (0,25 mM), y la dieta de reforzamiento bajo (2,5 mM). Si bien, ambas permitían trabajar dentro de los 5 días definidos para generar la deficiencia y el reforzamiento del metal, estas dietas no representan la concentración posible más alta a ocupar de 2,2 DPD y FeCl_3 . Por lo tanto, finalmente se decidió usar una concentración de 0,5 mM para el 2,2 DPD y de 5 mM para el FeCl_3 (condiciones medias de exposición), ya que ambas concentraciones máximas permitían trabajar en un intervalo de tiempo similar manejable (8 días) sin generar una diferencia significativa en la sobrevivencia del animal. Estos resultados nos permitieron finalmente definir las concentraciones máximas de 2,2 DPD, para poder generar el evento de deficiencia, como también las concentraciones máximas de FeCl_3 , para generar el reforzamiento del metal.

Establecidas las concentraciones y tiempos de experimentación para cada condición, se definió el protocolo de estudio basado en 3 etapas (Figura 1). En base a literatura (Hiel et al. 2012), la ETAPA 1 busca principalmente entregar el tiempo y condiciones necesarias para asentar el microbioma dentro de los intestinos de las moscas. Para esto, se inicia con moscas en ETAPA de larva, correspondiente al intervalo de tiempo de un día posterior a la eclosión de la pupa hasta terminar su desarrollo completo, periodo dividido en dos sub-ETAPAS. La primera tiene una duración

de 10 días, en la cual se eligió un medio nutritivo no estéril (maicena, azúcar, agar y levadura) para que el animal se pudiera reproducir, y principalmente para que las larvas se pudieran alimentar y generar su microbioma. Cuando las pupas eclosionaban (segunda sub-ETAPA), se separaban las moscas adultas, y se colocaron en una dieta normal (agar y glucosa) por 5 días, para permitir el completo desarrollo de la mosca, presentando la ETAPA 1 una duración total de 15 días. La ETAPA 2 tiene por finalidad provocar la disminución en los niveles de Fe, para esto se cambió la dieta normal por una dieta deficiente por 5 días, esperando generar la mayor disminución en los niveles de Fe, sin impactar sobre la sobrevivencia del animal. Finalmente, la ETAPA 3 buscaba recuperar los niveles normales en la concentración de Fe, para esto se cambió la dieta deficiente por una dieta reforzada, por un tiempo de 5 días, tiempos definidos en base a los resultados de viabilidad.

El siguiente paso fue determinar las concentraciones de Fe en los intestinos de las moscas bajo estos escenarios de alimentación. En función del protocolo, se extrajeron 10 intestinos de *D. melanogaster* al finalizar las ETAPAS 1-3 para su posterior cuantificación total de Fe. La Figura 3 describe los resultados obtenidos solo para la dieta normal. Los valores obtenidos de concentración basal de Fe en los intestinos para esta dieta presentaron una gran diferencia entre ellos, ubicándose muy cerca del límite inferior de detección del equipo (barras en el gráfico para dieta normal sin Fe). Considerando, además, que posteriormente se quiere reducir esta cantidad por efecto de la adición del quelante, la dieta normal en su estado actual no contiene una cantidad suficiente de Fe basal. Por lo tanto, fue necesario suplementar a la dieta normal con una pequeña cantidad de Fe (0,05 mM), concentración que está a un orden de magnitud bajo la cantidad seleccionada para adicionar en el protocolo de reforzamiento. Esta suplementación extra permitió al menos duplicar los contenidos de Fe intestinal (barras en el gráfico para dieta normal con Fe) y disminuir la variabilidad dentro del protocolo, otorgando un margen de operación dentro de los límites de detección de la técnica de medición (segundo set de datos).

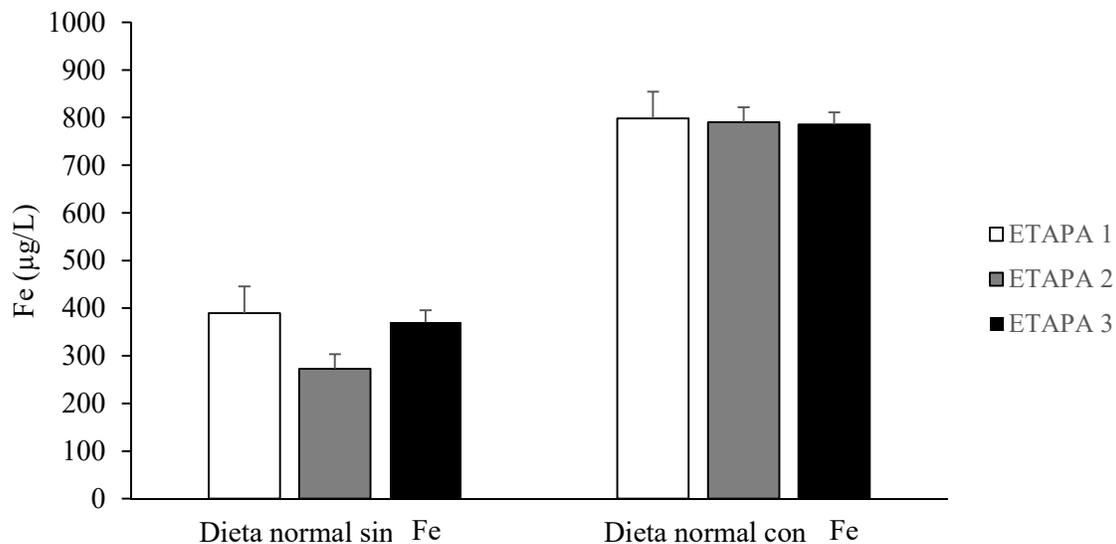


Figura 3. Concentración de Fe intestinal de *D. melanogaster* sin y con suplemento inicial de Fe dentro de la dieta normal.

Las mediciones declaran la concentración de Fe intestinal cuantificadas por TXRF. El primer set de datos corresponde a la concentración de Fe intestinal de *D. melanogaster* alimentadas con una dieta normal sin la adición extra de Fe (dieta normal sin Fe). El segundo set de datos corresponde a la concentración de Fe intestinal cuando se ajusta la dieta normal a una concentración de 0,05 mM de FeCl_3 (dieta normal con Fe). El valor de cada columna representa el promedio de 3 experimentos independientes, en cada uno de ellos se utilizó un conjunto de 10 intestinos de *D. melanogaster*.

Definida y ajustada la condición control para todas las ETAPAS, el siguiente paso fue medir las concentraciones intestinales de Fe al finalizar cada ETAPA del protocolo en las situaciones experimentales de deficiencia y reforzamiento. La Figura 4 muestra que terminada la ETAPA 1, no existen diferencias en los niveles de Fe entre el grupo control y el grupo experimental, reafirmando la correcta elección de la condición control y la reproducibilidad obtenida en la Figura 3.

Al término de la ETAPA 2, la dieta deficiente provocó una disminución significativa de un 52% en los niveles de Fe intestinal, mientras que la dieta reforzada provocó un aumento del 100% sobre las concentraciones de Fe al finalizar la ETAPA 3, en comparación de ambos casos con los valores de la dieta control. Con esto se logró una disminución significativa de Fe seguido por un aumento de los niveles del metal sobre los valores iniciales, logrando instaurar un protocolo que integra un escenario de deficiencia y posterior reforzamiento de Fe para *D. melanogaster*.

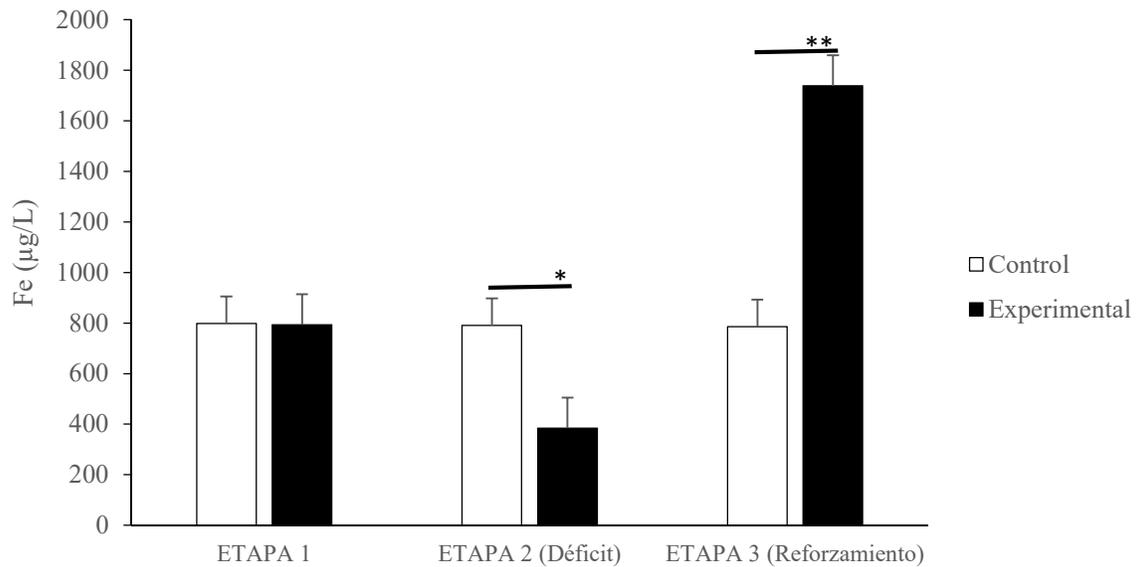


Figura 4. Concentración de Fe intestinal en *D. melanogaster* al finalizar cada ETAPA del protocolo en estudio.

Las mediciones corresponden a las concentraciones de Fe intestinal en intestino de *D. melanogaster* obtenidas al finalizar cada etapa del protocolo. La ETAPA 1 corresponde a la alimentación del animal en la dieta normal, la ETAPA 2 a la dieta de deficiencia de Fe y la ETAPA 3 a los niveles del metal luego de una dieta reforzada. Se realizaron 5 experimentos independientes, cada medición constó de un conjunto de 10 intestinos de *D. melanogaster* con 2 réplicas técnicas de medición por TXRF por cada experimento. *Diferencia significativa entre la situación control y experimental, $p < 0,05$, ** $p < 0,001$, test múltiple de Bonferroni.

4.2 Determinación de la abundancia y diversidad del microbioma de *D. melanogaster* durante el protocolo de deficiencia y reforzamiento con hierro.

Una vez instaurado el protocolo de deficiencia y reforzamiento, el siguiente paso fue determinar la abundancia y diversidad del microbioma intestinal de *D. melanogaster* al momento de finalizar cada una de las ETAPAS del protocolo. Para esto, se extrajeron 20 intestinos de mosca por cada una de las 3 ETAPAS, tanto para la situación experimental como el control, los cuales finalmente se juntaron dando un *pool* de intestinos en cada ETAPA (6 *pool* en total). Este ensayo se repitió 5 veces dando un total de 30 muestras. La Tabla 1 indica el resultado de la cuantificación de ADN. En todos los casos la cantidad obtenida supera los requerimientos mínimos solicitados por el servicio de secuenciación (1 ng/ μ L aconsejables), permitiendo continuar con los protocolos de verificación de especificidad de amplificación.

Para este objetivo de verificación, se realizó un ensayo de PCR y posterior electroforesis utilizando una pareja de partidores para amplificar el gen del ARN ribosomal 16S (tamaño esperado 1500 pb.), gen conservado universalmente en todas las bacterias de uso estándar en el análisis de microbiomas. Para efectos prácticos de espacio, la Figura 5 solo muestra el resultado de la amplificación de tres muestras (8, 14, 26) elegidas de forma aleatoria, una muestra control positiva de ADN genómico bacteriano (*Enterococcus faecalis*, disponible en el laboratorio), como muestra control negativa 1 ADN genómico de *D. melanogaster* (disponible en el laboratorio) y control negativo 2 se reemplazó la muestra por un volumen equivalente de agua (control de contaminación). Como se observa en la fotografía del gel, las tres muestras seleccionadas presentaron una migración similar, específica (presencia de una sola banda) y del tamaño esperado, sumado a la no amplificación en los controles negativos. Este resultado permitió identificar la presencia de ADN bacteriano en la extracción.

Tabla 1. Concentraciones de ADN obtenidas en las muestras de intestino de *D. melanogaster*.

N° de muestra	ETAPA	Condición	Concentración ADN (ng/μL)
1	1	control	7,9
2	1	control	3,3
3	1	control	2,1
4	1	control	2,1
5	1	control	2,9
6	1	experimental	2,4
7	1	experimental	2,5
8	1	experimental	3,1
9	1	experimental	3,1
10	1	experimental	3,9
11	2	control	3,7
12	2	control	3,2
13	2	control	3,7
14	2	control	7,3
15	2	control	3,9
16	2	experimental	4,7
17	2	experimental	5,5
18	2	experimental	4,2
19	2	experimental	4,9
20	2	experimental	4,8
21	3	control	3,7
22	3	control	3,3
23	3	control	5,3
24	3	control	3,9
25	3	control	3,9
26	3	experimental	3,9
27	3	experimental	4,8
28	3	experimental	4,5
29	3	experimental	4,0
30	3	experimental	3,0

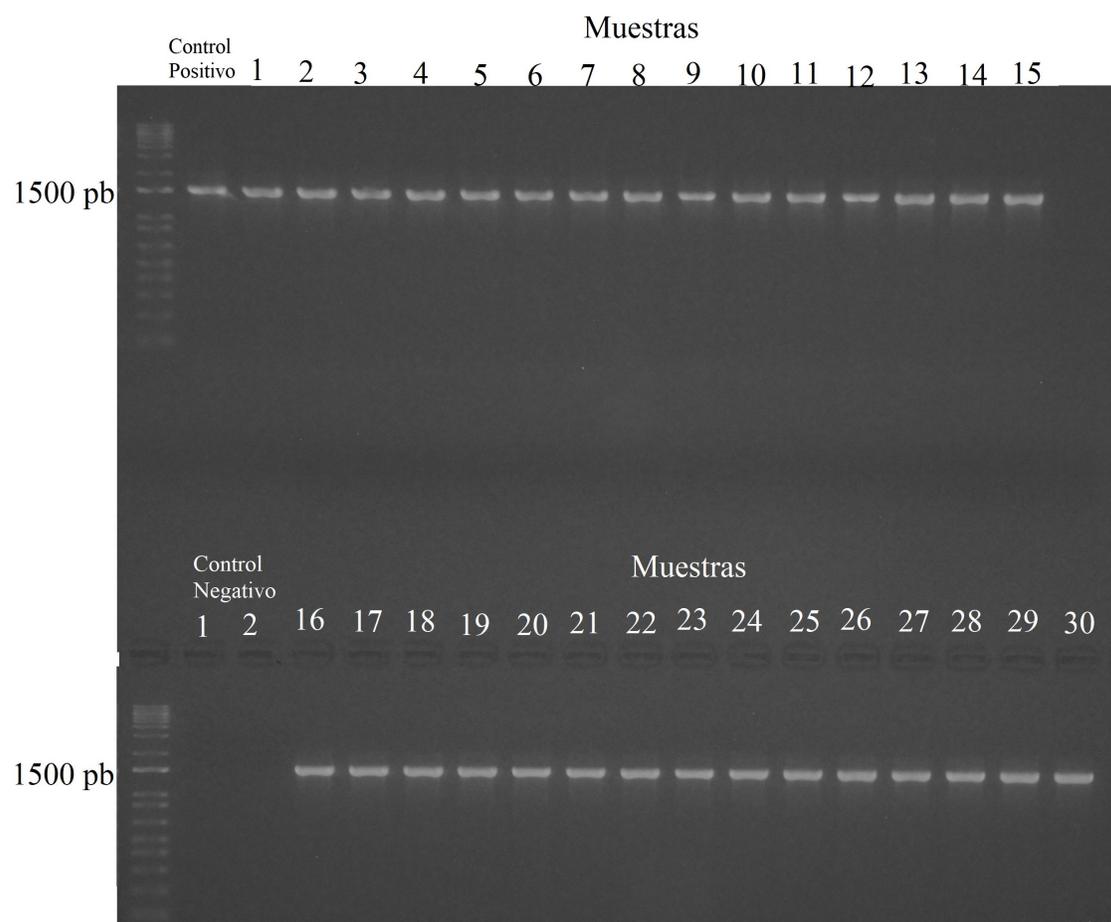


Figura 5. Resultado de electroforesis para la amplificación del fragmento del gen 16S bacteriano.

Migración de los fragmentos amplificados con partidores del gen 16S ribosomal de todas las muestras, como control positivo se ocupó ADN genómico de *E. faecalis*, como muestra control negativa 1 ADN genómico de *D. melanogaster* y control negativo 2 se reemplazó la muestra por un volumen equivalente de agua. El primer carril muestra la migración del estándar de peso molecular 1 KB.

Finalmente, las 30 muestras fueron enviadas a la empresa ZymoBIOMICS®, la cual prestó el servicio de secuenciación. Se solicitaron dos réplicas técnicas por cada muestra dando un total de 60 muestras totales para los próximos análisis. De acá en adelante, la nomenclatura de cada muestra fue la siguiente: Control (C) y Experimental (E); ETAPA 1 (1), ETAPA 2 (2) y ETAPA (3); réplicas experimentales (_1-5); réplicas técnicas de secuenciación (a, b). A modo de ejemplo: muestra control, ETAPA 1, réplica experimental n°1, réplica de secuenciación n°1 = C1_1a.

Una vez obtenidos los resultados de la secuenciación, se realizó el procesamiento de las secuencias de los genes del 16S para las 60 muestras con el objetivo de identificar OTUs. Un OTU es una definición operacional que se utiliza para clasificar grupos de individuos estrechamente relacionados, en este caso secuencias de 16S que presentan un alto grado de identidad (Blaxter et al. 2005). Luego de los análisis y filtros para esta parte, declarados en detalle en la sección de materiales y métodos, se obtuvieron un total de 2.496.126 lecturas, con un máximo de 61.967 y un mínimo de 25.881 lecturas por muestras, logrando asignar un total de 95 OTUs dentro de las 60 muestras en estudio.

Tomando en cuenta la cantidad mínima de lecturas obtenidas en la muestra 22 (25.881 lecturas), se decidió realizar una rarefacción utilizando como máximo 25.000 lecturas como base, esto con el fin de evitar posibles cambios en las especies obtenidas por la diferencia en la profundidad de la secuenciación de cada muestra. La Figura 6 declara las curvas de rarefacción obtenidas. En todos los casos se observa que las curvas alcanzan un plató en las especies observadas a una profundidad aproximada de 15.000 lecturas, por lo que permite identificar que todas las muestras presentan la cantidad máxima de especies observadas.

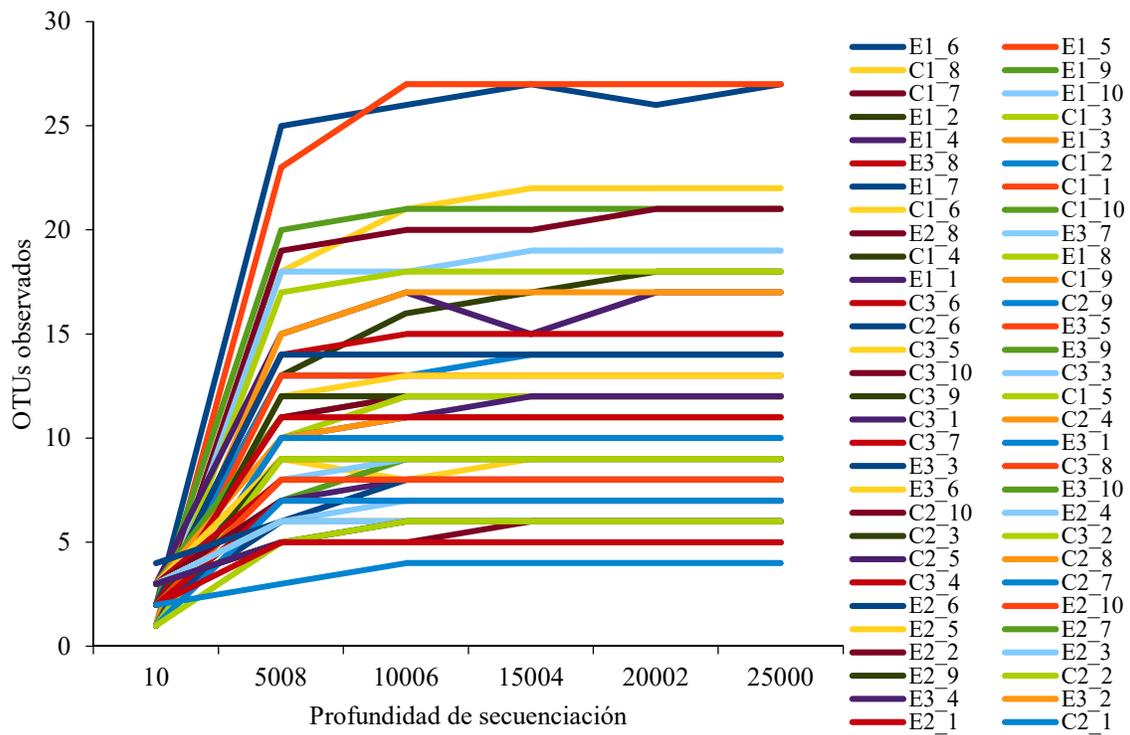


Figura 6. Curvas de rarefacción.

Curvas de rarefacción obtenidas a una profundidad de 25000 secuencias por muestras. El gráfico muestra las especies observadas (OTU) para las 60 muestras obtenidas de la secuenciación del ADN 16S de intestino de *D. melanogaster*. Muestras pertenecientes al grupo control y experimental indicadas con la letra (C) y (E) respectivamente. ETAPAS 1-3 del protocolo de deficiencia y reforzamiento indicadas con los números (1, 2 y 3), réplicas técnicas indicadas (_1-_5) y réplicas de secuenciación (a, b).

Posteriormente, para verificar si existe una concordancia en la abundancia de las especies obtenidas entre réplicas por cada ETAPA (tanto control como experimental), como también para corroborar la fidelidad de la réplica técnica de la secuenciación, se decidió realizar un “*cluster*” de agrupamiento (dendrograma), técnica que permite agrupar muestras en base a los resultados de abundancia y diversidad obtenidos de OTUs.

Manteniendo la misma nomenclatura de muestras, la Figura 7 presenta el dendrograma obtenido, donde se observa que: i) Existe un agrupamiento fuerte de pares entre las réplicas de secuenciación (a y b) para todas las muestras, corroborando la eficiencia y reproducibilidad del servicio, ii) Existe un agrupamiento fuerte entre las muestras pertenecientes al grupo control y experimental de la ETAPA 1 (cuadrado azul), resultado esperado puesto que ambas corresponden al mismo escenario inicial dentro del protocolo, iii) Existe una tendencia al agrupamiento del grupo control de la ETAPA 2 (cuadrado verde) con el grupo control y experimental en ETAPA 1, iv) Existe una separación del grupo experimental en ETAPA 2 (cuadrado rojo) en relación a las otras muestras, iv) Existe una agrupación entre las muestras de la ETAPA 3 para los grupos control y experimental (cuadrado amarillo), el cual se distancia de las otras ETAPAS 1 y 2.

Posteriormente se procedió a identificar las abundancias por especie bacteriana asignadas (OTUs) presentes en cada una de las agrupaciones. A nivel de filos, *Firmicutes* y *Proteobacterias* representan un 99% de la abundancia relativa del total del microbioma de la mosca, valor que se mantiene relativamente constante en todas las muestras analizadas.

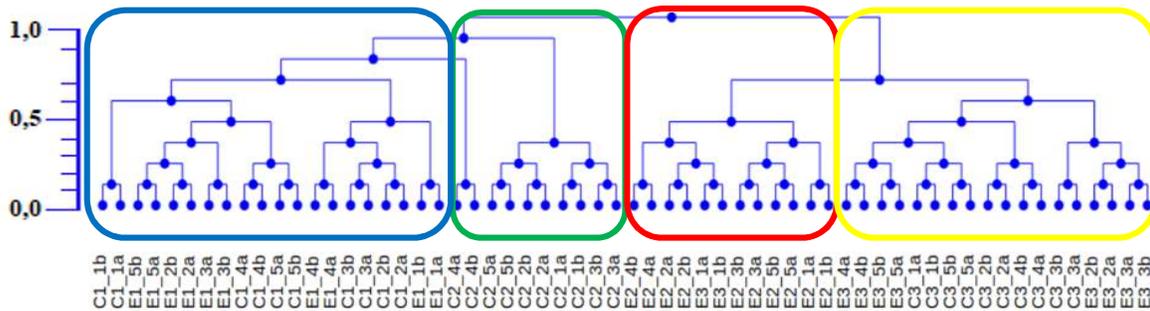


Figura 7. Dendrograma de agrupación de muestras por abundancia de OTUs.

La figura muestra la agrupación de las 60 muestras, la cercanía de las muestras está dada por la correlación que existe en la cantidad de secuencias (lecturas) obtenidas por cada OTUs. En el cuadrado azul se indican las muestras pertenecientes a las ETAPA 1 del grupo control y experimental, en verde las muestras control de la ETAPA 2, en rojo las muestras pertenecientes a la ETAPA 2 del grupo experimental y en amarillo las muestras de la ETAPA 3 del grupo control y experimental. Las muestras fueron agrupadas utilizando la distancia de Pearson.

A nivel de clase, como se aprecia en la Figura 8, en el grupo control se identificaron 3 clases predominantes, *Alphaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria* y *Bacilli*, siendo los dos primeros los que ocupan el 98% de las lecturas, con una predominancia clara de la clase *Alphaproteobacteria*, ocupando un 95% en la ETAPA 1, un 81% en la ETAPA 2, y un 49% en la ETAPA 3. Por el contrario, la clase *Gammaproteobacteria* presenta un aumento durante el transcurso de las ETAPAS, pasando de un 3% en la ETAPA 1, a un 13% en la ETAPA 2 y finalmente a un 43% en la ETAPA 3. Por otra parte, la clase *Bacilli* paso de un 1% en la ETAPA 1 a un 6% en la ETAPA 2 y finalmente a un 7% en la ETAPA 3, aumentando su abundancia en la medida que avanza el protocolo. Estos resultados sugieren fuertemente que existe una modificación en la composición del microbioma de la mosca solo por efecto del tiempo, corroborando los resultados obtenidos en el dendrograma de la Figura 7.

En el grupo experimental, la distribución a nivel de clase es similar al grupo control en la ETAPA 1, donde se observó un 94% en *Alphaproteobacteria*, un 3% en *Gammaproteobacteria* y un 2% en *Bacilli*. Sin embargo, dentro de la ETAPA 2, donde ocurre la deficiencia de Fe se observa un importante cambio en los patrones de abundancia para esta clase, *Alphaproteobacteria* pasan a ocupar un 23% de la abundancia, *Gammaproteobacteria* un 57% de la abundancia y los *Bacilli* un 20%, indicando que deficiencia de Fe intestinal en *D. melanogaster* impacta de forma importante la abundancia relativa a nivel de clases.

En la ETAPA 3 de reforzamiento del metal, se observó un aumento en el porcentaje de *Alphaproteobacteria*, alcanzando un 43%, y la clase de *Gammaproteobacteria* disminuyó a un 44%, mientras que *Bacilli* disminuyó a un 13%, acercándose a valores similares de perfiles de abundancia obtenidos en el grupo control de la ETAPA 3. En relación con la diversidad, se observó que no existe un cambio importante en las clases de bacterias detectadas, por el contrario, todos tienen representantes en cada una de las ETAPAS del protocolo tanto para el grupo control como experimental.

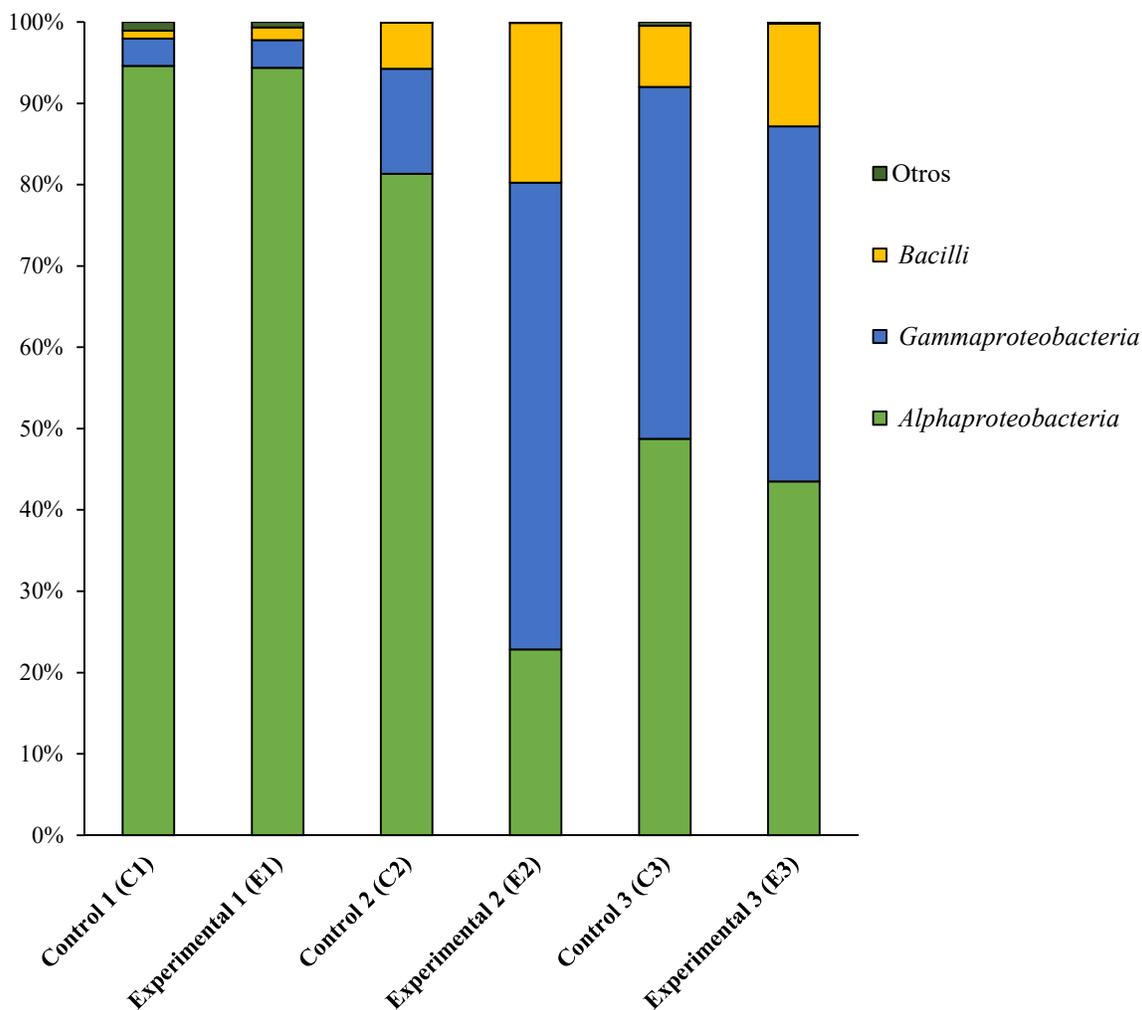


Figura 8. Abundancia relativa de OTUs identificados a nivel de clase en muestras de intestino de *D. melanogaster* durante el protocolo de deficiencia y reforzamiento de Fe.

Porcentaje de OTUs identificados a nivel de clase en cada una de las ETAPAS del proceso de deficiencia y reforzamiento de Fe en relación al total de OTUs por cada muestra. El promedio fue calculado para cada ETAPA con un total 10 muestras (5 réplicas biológicas con 2 réplicas de secuenciación).

Continuando con el análisis de especies, la Figura 9 describe las abundancias de las especies a nivel de orden. Se observó que los órdenes dominantes, tanto para el grupo control como para el grupo experimental fueron *Rhodospirillales*, *Enterobacteriales* y *Lactobacillales*, las cuales abarcan más del 99% de la abundancia total de las especies. En el grupo control, existe una disminución paulatina de *Rhodospirillales* a medida que avanzan las ETAPA, pasando de una abundancia del 95% en la ETAPA 1, al 81% en la ETAPA 2 y finalmente una abundancia del 48%. Para el orden *Enterobacteriales*, por el contrario, existe un aumento en la abundancia por cada ETAPA, pasando del 3% al 13% y finalmente a un 43% en la ETAPA 1, 2 y 3 respectivamente. En el caso del orden *Lactobacillales*, se observa un leve aumento en su abundancia pasando de un 1,5% a un 6%, entre las ETAPAS 1 y 2, mientras que al progresar a la ETAPA 3, el crecimiento se mantiene estable pasando de un 7% de abundancia. Para el caso del grupo experimental, el orden *Rhodospirillales* sufrió una caída considerable de un 94% a un 22% de abundancia producto de la deficiencia de Fe, marcadamente diferente en comparación a lo ocurrido en el grupo control el cual solo disminuyó un 10% entre la ETAPA 1 y 2. Esta situación fue revertida por el reforzamiento de la ETAPA 3, aumentando el orden *Rhodospirillales* su abundancia hasta un 43% similar al obtenido para el caso control. El orden *Enterobacteriales* sufrió un aumento en su abundancia, pasando de un 3% a un 57% entre la ETAPA 1 y 2, un aumento mayor en comparación al grupo control, el cual paso de un 3% a un 12%. Posteriormente, al igual que lo ocurrido con el orden *Rhodospirillales*, el reforzamiento con el metal (ETAPA 3), logró restaurar los valores de abundancia vistos en el control para el orden *Enterobacteriales*. El proceso de deficiencia también generó un aumento en la abundancia en *Lactobacillales*, pasando de un 1,5% a un 20%, el cual en la ETAPA de reforzamiento disminuyó sus niveles a un 13%, no logrando recuperar en su totalidad sus valores normales (7% en la ETAPA 3 del grupo control). En resumen, si bien, el episodio de deficiencia de Fe provoca una variación considerable sobre la abundancia de las especies en el microbioma a nivel de orden, este se logra recuperar en gran medida cuando se suplementa con el metal producto del proceso de reforzamiento, en especial en los órdenes que más abundancia abarcan, *Rhodospirillales* y *Enterobacteriales*.

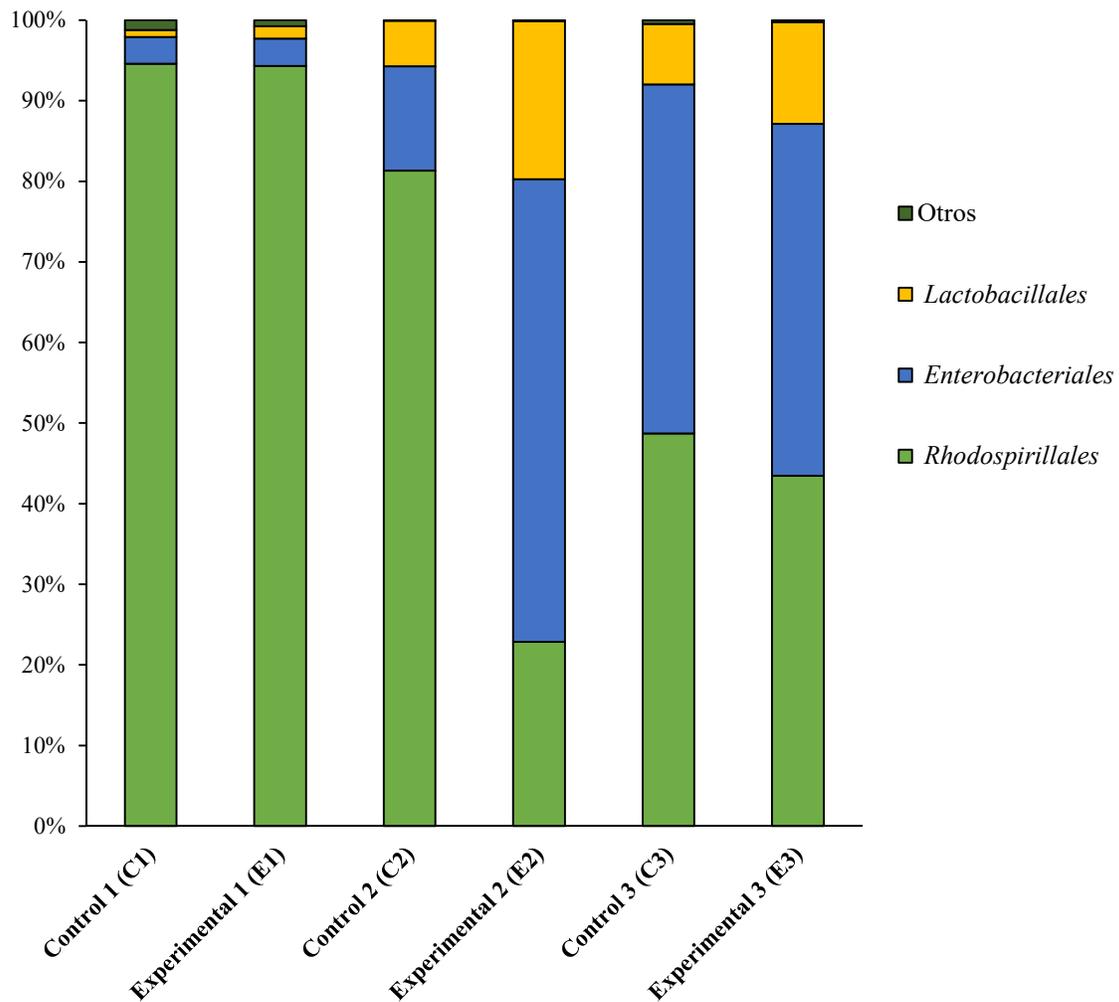


Figura 9. Abundancia relativa de OTUs identificados a nivel de orden en muestras de intestino de *D. melanogaster* durante el protocolo de deficiencia y reforzamiento de Fe.

Porcentaje de OTUs identificados a nivel de orden en cada una de las ETAPAS del proceso de deficiencia y reforzamiento de Fe. El promedio fue calculado para cada ETAPA con un total 10 muestras (5 réplicas biológicas con 2 réplicas de secuenciación).

Con el propósito de cuantificar cambios estadísticos sobre diversidad a nivel de especies entre los grupos, se decidió calcular la diversidad alfa, la cual nos permite obtener la riqueza de especies en un hábitat determinado. Para tener en cuenta tanto la riqueza en especies como la uniformidad, se han elaborado distintos índices para determinar la diversidad alfa de las especies. En este caso, se ocuparon 2 índices de diversidad distintos, Shannon y Simpson. El índice de Shannon entrega información acerca de la riqueza de especies (número de OTUs) y de la igualdad en la abundancia entre las especies. Si el valor del índice de Shannon aumenta indica un aumento en la riqueza y un aumento en la igualdad entre la abundancia de las especies. El índice de Simpson es una medida que permite obtener la riqueza de una población, que toma valores entre 0 y 1, donde valores cercanos a 0 indican una baja diversidad en la muestra y los valores más cercanos a 1, representan un aumento en la diversidad de la muestra (aumentando en la riqueza y/o igualdad de la abundancia entre especies en la muestra).

La Figura 10 muestra los resultados de estos parámetros. A nivel de número de especies observadas (Figura 10 A), el grupo control disminuyó su promedio considerablemente entre la ETAPA 1 y la ETAPA 2, pasando de 20 especies observadas a 8, valor que no fue afectado a medida que avanzó el tiempo hasta completar la ETAPA 3, donde el promedio de especies fue 9. Tanto el índice de Shannon (Figura 10 B), como el índice de Simpson (Figura 10 C) van en aumento por cada ETAPA, lo que indicaría que las muestras tienden a igualar su abundancia a medida que avanza el tiempo, producto de una disminución en el número de especies observadas más abundantes.

En el grupo experimental, los valores obtenidos en todos los parámetros en la ETAPA 1 son prácticamente iguales a los obtenidos para el grupo control, volviendo a ratificar la reproducibilidad y escenario equivalente dentro de nuestro protocolo. Las especies observadas también presentan una disminución importante entre la ETAPA 1 y 2, pasando de un promedio de 19 especies observadas, a 8 especies, valor que se mantiene constante al igual que en grupo control al finalizar la ETAPA 3. En cuanto a los índices de diversidad entre las ETAPA 1 y 2, existe un aumento importante del valor de ambos índices al finalizar la ETAPA 2, valor que se mantiene constante al finalizar la ETAPA 3.

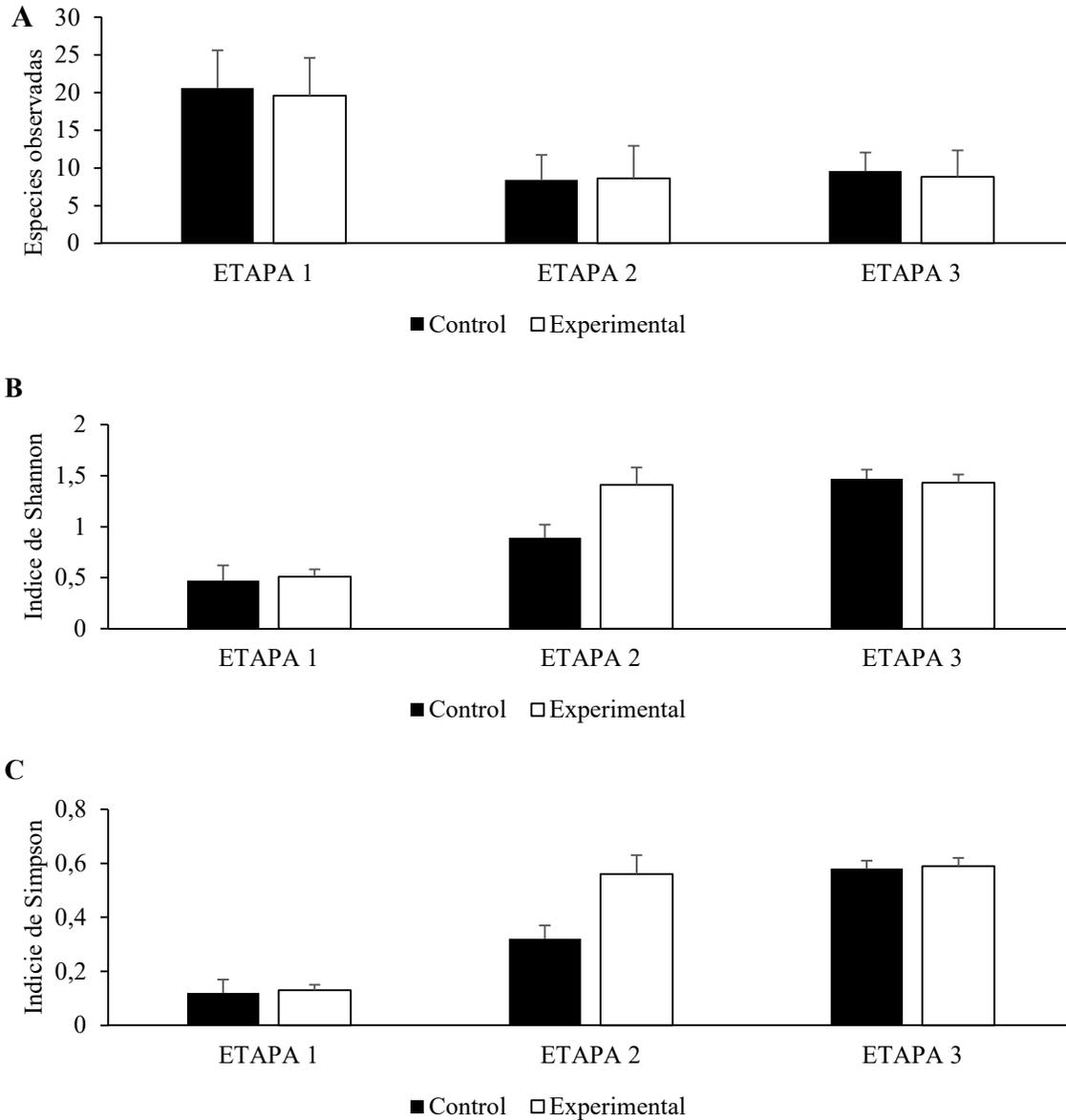


Figura 10. Diversidad de especies presentes en muestras de intestino de *D. melanogaster* durante el protocolo de deficiencia y reforzamiento de Fe.

Datos obtenidos por cada ETAPA para el grupo control y experimental dentro del protocolo de deficiencia y reforzamiento para Especies Observadas (A.), Índice de Shannon (B.) e Índice de Simpson (C.). El promedio de cada índice, como de las especies observadas, fue calculado para cada ETAPA con un total 10 muestras (5 réplicas biológicas con 2 réplicas de secuenciación).

Al comparar el grupo control con el grupo experimental, si bien la disminución de Fe al parecer no estaría afectando el número de especies, sí se observa una diferencia importante en los índices de diversidad. Tal como se comentó, a medida que avanzan las ETAPAS, en el grupo control hay un aumento proporcional en los valores, situación no observada en el grupo experimental donde existe un aumento de casi tres veces en los valores de ambos índices producto del déficit de Fe, valor que se mantiene constante en ambos índices producto del reforzamiento. Esto supone que el déficit de Fe, provocaría un aumento en la diversidad y riqueza de las muestras, lo cual se puede estar produciendo de forma indirecta, provocando una disminución en las especies más abundantes de la muestra, aumentando la igualdad entre especies, lo cual generaría un aumento en los valores de los índices de diversidad, valor que se mantiene constante al pasar a la ETAPA 3, tanto el grupo control como experimental, lo que indicaría que las especies más abundantes durante la ETAPA 1 no solo disminuirían por la pérdida del metal, si no que el factor tiempo también provocaría un cambio en los índices de diversidad, esto se ve reflejado en que tanto el grupo control como experimental presentan valores similares en su diversidad alfa en la ETAPA 3.

4.3 Construcción de redes de coocurrencia que representen las interacciones del microbioma de *D. melanogaster* durante el protocolo de deficiencia y reforzamiento con hierro.

Teniendo conocimiento sobre la diversidad y abundancia de la microbiota frente a cambios en la biodisponibilidad de Fe, el siguiente paso fue evaluar si los cambios observados impactan sobre las interacciones bacterianas dentro de la comunidad. Para esto, se construyeron 5 redes de coocurrencia representativas de las ETAPAS en estudio. Considerando la alta reproducibilidad de la ETAPA 1 entre las muestras control y experimental tal como se muestran en el dendrograma de la Figura 7, para la construcción de la red de la ETAPA 1 se decidió juntar los datos de abundancia de OTUs y el de concentración de Fe del grupo control y experimental, generando una sola red consolidada en la ETAPA 1 (Referencial), la cual será utilizada como referente en los análisis posteriores. Para las ETAPAS 2 y 3, las redes se construyeron de forma independiente tanto para el grupo control (C) como para el experimental (E).

En la Figura 11 se observa las redes obtenidas para cada ETAPA del proceso de deficiencia y reforzamiento. En general, todas las redes obtenidas en las condiciones control (Figura 11A-C), presentan una subred altamente conservada compuesta por interacciones entre los OTUs de la clase *Alphaproteobacteria* (nodos naranjos) y *Gammaproteobacteria* (nodos rojos), clases que representan la mayor abundancia en el intestino de *D. melanogaster*, como se indicó en la Figura 8. A nivel de identidad, la red referencial de la ETAPA 1 (C1) presenta un 61% de nodos comunes con la red de la ETAPA 2 (C2) y un 67% de nodos comunes con la red de la ETAPA 3 (C3). Además se observa que estos mantienen las características de los conectores positivos (verdes) y negativos (rojos) en todas las redes. La principal diferencia se observó en la reestructuración de la subred de la C1, compuesta entre las interacciones entre OTUs pertenecientes a la clase *Actinobacteria* (nodos morados), *Bacilli* (nodos verdes) y *Betaproteobacteria* (nodos amarillos), la cual se ve representada posteriormente en las C2 y C3 por interacciones entre OTUs de las clases *Alphaproteobacteria* (nodos naranjos) y *Bacilli* (nodos verdes).

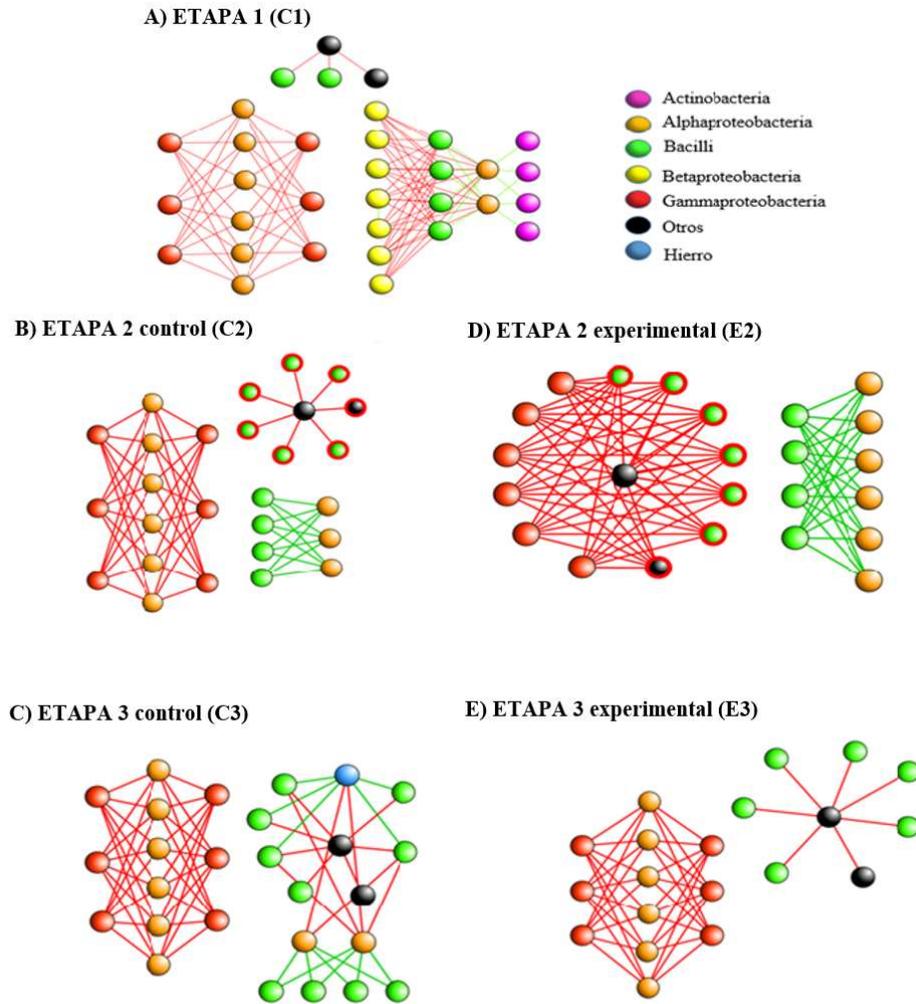


Figura 11. Redes de coocurrencia para cada ETAPA del proceso de deficiencia y reforzamiento de Fe.

Los conectores (correlaciones) están representados por las líneas que conectan los nodos (OTUs). El conector de color verde representa correlaciones positivas entre nodos y el conector de color rojo correlaciones negativas. Los nodos incluyen los OTUs obtenidos en las secuencias de los genes del 16S, los colores de los nodos representan su respectiva clase taxonómica. Bordes destacados en rojo se indican los OTUs claves dentro de la red. **A.** Red ETAPA 1(Referencial, C1). **B.** Red ETAPA 2 control (C2). **C.** Red ETAPA 3 control (C3). **D.** Red ETAPA 2 experimental (E2). **E.** Red ETAPA 3 experimental (E3). Cada red está compuesta con los datos de abundancia de 5 réplicas biológicas con una réplica técnica de secuenciación por cada muestra.

En el caso de las redes experimentales (Figura 11D-E), se observa que la ETAPA 2 (E2) y la ETAPA 3 (E3) presentan los mismos OTUs que sus respectivas ETAPAS controles, indicando que la deficiencia del metal y su posterior reforzamiento no producen cambios en la diversidad de la red. Ahora bien, el proceso de deficiencia de Fe representado en la red de la E2 presenta una reestructuración significativa a nivel de interacciones entre sus nodos al compararla con el resto de los modelos. Se distinguen claramente dos subredes, una totalmente nueva ausente en las otras redes, compuesta principalmente por interacciones negativas entre OTUs de la clase *Bacilli* (nodos verdes) y *Gammaproteobacteria* (nodo rojo), clases que presentan el mayor aumento en abundancia en el evento de deficiencia del metal. La otra subred está conformada por interacciones positivas entre OTUs de la clase *Bacilli* (nodos verdes) y *Alphaproteobacteria* (nodos naranjas), y si bien esta subred está presente en la red control, en la E2 presenta una mayor cantidad de miembros en la subred, como también una mayor conectividad positiva entre sus miembros, lo que indica que la deficiencia de Fe, actuaría aumentando las interacciones positivas en esta subred. Adicionalmente, la estructura altamente conservada de la subred compuesta por *Alphaproteobacteria* (nodos naranja) y *Gammaproteobacteria* (nodos rojos), en esta red está totalmente ausente marcando una de las principales diferencias con el resto de los modelos.

Finalmente, producto del evento de reforzamiento del metal, dentro del modelo E3 se observa una pérdida importante de interacciones entre los nodos presentes en la E2, recuperando la estructura conservada vista en las redes controles, destacando nuevamente la aparición de la subred compuesta por miembros de las clases *Alphaproteobacteria* (nodos naranjos) y *Gammaproteobacteria* (nodos rojos).

Descrito los modelos a nivel de sus componentes, se procedió a determinar los parámetros topológicos de cada red. Dentro de los análisis consideramos el número de nodos, valor que indica la cantidad de OTUs presentes en la red; el número de conectores, que da cuenta de las conexiones negativas y positivas en la red; la densidad de conectividad de la red, calculada como el cociente entre las conexiones reales y las conexiones posibles, tomando valores entre 0 y 1, donde un mayor

valor de densidad refleja una mayor conectividad en la red. Se determinó el coeficiente de “*clustering*” o agrupamiento, métrica que indica la tendencia de la red a formar subunidades o subredes. A mayor coeficiente de agrupamiento (rango de 0 – 1, con valores cercanos con una diferencia entre coeficientes menor a 0,2), existe un mayor número de asociaciones microbianas independientes. Se consideró también el camino promedio, análisis que indica el número promedio de “pasos” (conectores) entre dos nodos distintos al azar dentro de la red, entregando un parámetro de cuan acotado o compacto puede ser el modelo. Los resultados de los análisis topológicos para los modelos en estudio se indican en la Tabla 2.

La primera observación indica que existe un mayor número de nodos y conectores presentes en la red referencial en comparación a las demás redes. Esto podría tener relación con la cantidad de especies presentes en la ETAPA 1, la cual es mayor a las presentes en la ETAPA 2 y 3. Esta disminución notoria de abundancia se refleja también en una pérdida de la complejidad de la conectividad de la comunidad entre la C1 en relación con C2 y C3. El proceso de deficiencia de Fe generó una disminución en la cantidad de nodos y contrariamente un aumento en la cantidad de conectores en relación al control, lo que indicaría que la baja disponibilidad del metal aumenta las interacciones presentes en la red entregando un mayor grado de complejidad en la conectividad de la comunidad con relación a la situación control. El proceso de reforzamiento por su parte generó una disminución tanto de la cantidad de nodos como la cantidad de interacciones en la red, cuando se compara con su respectivo control, indicando que el aumento en la cantidad de metal impacta tanto a nivel de diversidad e interacciones.

El proceso de deficiencia de Fe generó una disminución en la cantidad de nodos y contrariamente un aumento en la cantidad de conectores en relación al control, lo que indicaría que la baja disponibilidad del metal aumenta las interacciones presentes en la red entregando un mayor grado de complejidad en la conectividad de la comunidad con relación a la situación control.

Tabla 2. Características topológicas de las redes de coocurrencia.

Red	Nodos	Conectores (positivos/negativos)	Densidad	Coefficiente de agrupamiento	Camino promedio
Referencial (C1)	33	93 (15/78)	0,176	0,169	1,587
Control 2 (C2)	27	55 (12/43)	0,157	0	1,522
Control 3 (C3)	27	62 (13/49)	0,177	0,051	1,836
Experimental 2 (E2)	24	73 (24/49)	0,264	0	1,463
Experimental 3 (E3)	20	43 (0/43)	0,226	0	1,543

El proceso de reforzamiento por su parte generó una disminución tanto de la cantidad de nodos como la cantidad de interacciones en la red, cuando se compara con su respectivo control, indicando que el aumento en la cantidad de metal impacta tanto a nivel de diversidad e interacciones.

En relación con la densidad de la red, se observa que el grupo control presenta una densidad similar para sus tres redes, consistente durante todo el tiempo del experimento, indicando que el factor tiempo no presentaría impacto significativo sobre el nivel de conectividad presente en las redes control. Producto del evento de deficiencia, se observa un aumento cercano al 70% en la densidad, el cual tendría relación con el aumento en la cantidad de conectores, mencionado anteriormente, evento que logra ser revertido en la etapa de reforzamiento de Fe.

Tanto el coeficiente de agrupamiento como el camino promedio presentan valores similares para todas las redes, mostrando que todos los modelos tienden a agruparse de forma similar, como también, al presentar un valor pequeño en su camino promedio, dan cuenta de un modelo acotado de baja conectividad, lo cual es esperado puesto que todos los modelos corresponden a microbiomas de *D. melanogaster*, lo cual induce un grado importante de conservación. En resumen, la información de estos parámetros indica, por un lado, que no existe una correlación clara entre la topología de la red y el tiempo transcurrido dentro del experimento, como tampoco hay una correlación producto de los eventos de deficiencia y reforzamiento de Fe.

Si bien las propiedades observadas nos permitieron definir el comportamiento de cada red por separado a escala global, la información topológica entregada no es suficiente para realizar una comparación a nivel de las especies (OTUs). Por esta razón, se decidió usar la aplicación NetShift, la cual permite la comparación entre redes de co-ocurrencia con el propósito de: i) Establecer una métrica de similitud entre dos modelos de redes (índice Jaccard) y ii) Determinar nodos fundamentales dentro del modelo, llamados “*drivers*”, definidos como OTUs con un gran número de conexiones directas. Además de presentar una alta frecuencia en caminos que permiten la conexión de otros nodos, los cuales actúan como grupos microbianos claves dentro de la red (puntaje de NESH). El programa inicia comparando dos redes (control y experimental) a nivel de nodos presentes tanto en grupo control como experimental, para posteriormente generar subredes comunes entre los grupos seleccionados. Estas subredes luego se utilizan para evaluar la existencia de cambios en las propiedades globales (estructura), como también las propiedades de cada uno de los nodos, logrando identificar posibles re-arreglos entre ellos, y así identificar los posibles OTUs “*drivers*” presentes en ambos modelos.

Como estrategia, se eligieron los siguientes pares de redes para las comparaciones: i) Para determinar posibles cambios en la estructura del microbioma de la mosca producto del efecto del tiempo (grupos controles), se comparó C1 contra C2 y C3. ii) Para el análisis del impacto de las dietas con Fe, se comparó E2 contra C2 (déficit) y E3 versus C3 (reforzamiento).

Tal como se indicó, los resultados de las comparaciones se cuantificaron mediante el índice Jaccard. Este índice que permite identificar re-ordenamientos en las subredes, presenta un rango entre 0 y 1, donde valores más cercano a 1 indican un menor re-ordenamiento en la red (mayor homología a nivel de abundancia y conectividad entre ambos modelos). En función de los resultados (Tabla 3), se observa que C1 presenta un índice de Jaccard igual a 1 cuando se compara con C2, lo que indica que ambas redes presentan una gran homología. Resultado equivalente cuando se compara C1 con C3 (índice de Jaccard de 0,954). Estas observaciones sugieren que las redes presentan similitudes en

la estructura de las interacciones durante todo el experimento, dando cuenta que el efecto del tiempo no presentaría un efecto significativo en la estructura de la red dentro del grupo control.

Producto del evento de deficiencia de Fe, se observa que E2 presenta un índice de Jaccard de 0,082, cuando se compara con su respectivo control, indicando la existencia de un re-ordenamiento entre ambas estructuras de las red, resultado que se condice con los cambios observados anteriormente (densidad), donde si bien, se mantienen constante los nodos entre ambos modelos, se observa un cambio importante en las conexiones entre sus nodos, lo que se refleja en un re-ordenamiento en la red producto de la deficiencia de Fe.

Tabla 3. Índices comparativos entre las subredes comunes presentes por pares de redes de coocurrencia seleccionadas.

Comparación entre redes	Índice de Jaccard	Índice de NESH máximo (nodos)	ΔB máximo (nodos)
C1/C2	1	0 (0)	0 (0)
C1/C3	0,954	0 (0)	0 (0)
C2/E2	0,082	2,571 (7)	0 (0)
C3/E3	1	0 (0)	0 (0)

En el proceso de reforzamiento con Fe, se observa que la comparación entre E3 con su respectivo control, presenta un índice de Jaccard igual a 1, lo que indica que no hay un reordenamiento entre estas dos redes. Este resultado indica que el efecto del reforzamiento logra revertir la estructura de las interacciones del microbioma observadas previamente al episodio de déficit, dando cuenta de la eficiencia de la recuperación que presenta el microbioma de la mosca frente a cambios en la biodisponibilidad de Fe.

Para obtener los OTUs “*drivers*”, se aplicó el puntaje de NESH en conjunto con el valor entregado por el “*A betweenness*” o ΔB . Ambos valores permiten identificar cambios a nivel de asociaciones de nodos individuales. El puntaje asignado por NESH entrega información del cambio en las interacciones de cada nodo en relación a su vecindad dentro de la subred generada, puntaje que toma valores desde 0 hasta el infinito, donde el aumento en este puntaje indica un mayor cambio en las interacciones de cada nodo. El análisis de ΔB , entrega información de la cantidad de caminos que pasan por cada nodo (*betweenness*), marcando la importancia de este para la red. Los valores van desde el -1 al 1, donde valores positivos, indican nodos con mayor importancia en la red (más transitados). En definitiva, nodos con valores mayores en su puntaje NESH y un ΔB cercano a 1 son indicativos de nodos claves para la red, o nodos denominados como “*drivers*”.

De acuerdo con los datos obtenidos (Tabla 3), para el grupo control se reafirma el hecho que no existe un reordenamiento entre la C1, la C2 y C3, resultado que se ve reflejado tanto en el puntaje de NESH como en el valor ΔB (todos presentan el mismo de valor igual a 0). Este resultado da cuenta que todos los nodos tienen un valor e importancia equivalente dentro de la red, por lo tanto, no es posible identificar OTUs “*drivers*” dentro de los modelos controles en estudio.

Para la red generada producto del evento de deficiencia de Fe, se observa que al compararla con su respectiva red control (C2/E2), se logran identificar 7 OTUs con una alta probabilidad de ser clasificados como “*drivers*”, puesto que sus correspondientes nodos presentan un puntaje de NESH elevado (Tabla 4).

Tabla 4. OTUs “drivers” obtenidos por cada par de subredes comunes entre las redes de coocurrencia seleccionadas.

Comparación entre redes	Especie	Filo
C2/E2	<i>Enterococcus termitis</i>	<i>Firmicutes</i>
C2/E2	<i>Enterococcus termitis</i>	<i>Firmicutes</i>
C2/E2	NA*	<i>Firmicutes</i>

*OTUs no asignados para una especie por ausencia de información a este nivel dentro de las bases de datos utilizadas (ver materiales y métodos).

Si bien, el ΔB de estos nodos indica que no cambian de tránsito entre las dos redes, su fuerte aumento en el puntaje de NESH indicaría un incremento en sus conexiones, lo que de todas formas sugiere una mayor importancia de estos 7 OTUs dentro de la red. En la Figura 11B (red C2) y 11D (red E2) se presentan los 7 nodos “drivers” destacados con un borde rojo. Interesantemente, 6 de ellos pertenecen a OTUs de la clase *Bacilli*. Esta clase presenta un gran aumento en su abundancia al producirse el evento de deficiencia del metal, lo que indicaría que esta clase, no solo presenta una buena adaptación a la deficiencia de Fe, sino que también presenta una gran importancia para la estructura de las comunidades bacterianas del intestino de *D. melanogaster*, durante la deficiencia del metal.

El séptimo nodo también pertenece al filo *Firmicutes*, el cual tiene el mayor aumento de abundancia en el proceso de deficiencia de Fe, pasando de un 1% a un 20%. Este resultado sugiere que este filo, no solo posee una gran adaptabilidad a la disminución del metal, sino que también tiene

una importancia significativa dentro de la estructura de las comunidades del microbioma intestinal al momento de presentar la deficiencia de Fe.

Para el caso del reforzamiento del metal, tal como ocurrió anteriormente en las comparaciones con los grupo controles, los datos indican que entre E3 y C3 existe una alta homología en su estructura de la comunidad, lo que indica que no hay presencia de un reordenamiento entre estas ETAPAS, presentando valores similares para el puntaje de NESH y para el ΔB (valores cercanos a 0), conduciendo a que no hay presencia de OTUs “drivers” entre ambos modelos, reafirmando el hecho que el reforzamiento de Fe restituye la condición control en términos de la estructura de las comunidades bacterianas presentes en *D. melanogaster*.

Finalmente se observa que el Fe se encuentra presente en solo una red (red control 3), interactuando de forma positiva con OTUs de la clase *Bacilli*, esta clase presenta un leve aumento en su abundancia y los niveles de Fe son similares a la ETAPA anterior lo que estaría indicando que esta clase, no solo se adapta a niveles bajos de Fe, como se vio anteriormente en el evento de deficiencia, también logra mantener su abundancia en el paso del tiempo, cuando no existen cambios en la concentración del metal. Como también existen interacciones negativas entre el Fe con OTUs de la clase *Alphaproteobacteria*, estas interacciones pueden deberse a la gran disminución de esta clase en esta ETAPA, lo que puede indicar que, aunque los niveles de Fe se mantengan constantes esta clase no se logra adaptar como otros miembros del microbioma a la dieta normal.

Si bien los niveles del metal se mantienen constante durante todo el evento de deficiencia y reforzamiento para el grupo control, el Fe solo interactúa en la red control 3, creemos que esto puede deberse a un cambio en la modulación del metal sobre el microbioma provocado por los cambios en el tiempo del protocolo. Al respecto, este cambio no se observaría en la ETAPA 3 experimental dada las altas concentraciones del metal presentes, las cuales provocarían una interacción diferente entre el Fe con el microbioma.

5. DISCUSIÓN.

5.1 Deficiencia y reforzamiento de hierro en *D. melanogaster*.

El Fe es un micronutriente esencial para todos los organismos vivos, por lo que alteraciones en su homeostasis generan grandes daños para los organismos, tales como problemas en el desarrollo (Farina et al. 2013) y aumento en las especies reactivas de oxígeno (Jomova y Valko 2011), siendo el principal problema para la salud humana la anemia por falta de este micronutriente. La anemia por falta de Fe es una enfermedad que afecta a más de 2 billones de personas alrededor del mundo (World Health Organization 2017), cuya principal causa se debe a la deficiencia del metal en la dieta, donde las concentraciones de Fe pueden llegar a disminuir entre un 50% a un 60% (Camaschella 2015). Al día de hoy, la principal forma para tratar la deficiencia de Fe, es a través de la administración oral del elemento directamente en la dieta, en una cantidad que oscila entre los 100 mg a 200 mg /día, lo que corresponde a un aumento de 10 a 20 veces sobre la ingesta diaria recomendada (Camaschella 2015), estrategia que permite restablecer las concentraciones del metal a sus niveles normales en el tiempo.

Dada la complejidad de realizar ensayos de deficiencia de Fe y el posterior reforzamiento del metal en humanos, ya sea por los problemas éticos que se atribuyen, o por la larga duración del ensayo, la elección de un modelo animal pertinente que permita realizar este tipo de ensayos fue necesario para la realización de la presente tesis. Dentro del gran número de modelos animales, la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*) se ha posicionado como una excelente alternativa para evaluar diferentes cambios en la concentración de metales (X. Tang y Zhou 2013b). Entre las razones principales, destacan su ciclo de vida corto, su fácil manipulación, su gran homología en genes en comparación con humanos, sumado a una morfología fraccionada de su intestino, lo que permite un estudio en detalle del órgano (Apidianakis y Rahme 2011; Buchon, Broderick, y Lemaitre 2013). En términos de homeostasis de Fe, el animal presenta una gran cantidad de proteínas homologas para la regulación del metal, en donde destacan proteínas para la absorción y almacenamiento del metal

(Mandilaras, Pathmanathan, y Missirlis 2013). Además, existe un gran conocimiento sobre los niveles de Fe presentes en el animal. Así, existen disponibles un alto número de estudios que indican la eficiencia de los mecanismos homeostáticos para mantener constante la concentración del metal dentro del animal (Missirlis et al. 2006; Bonilla-ramirez, Jimenez-del-rio, y Velez-pardo 2011; Tejeda-Guzmán et al. 2018), como también, a nivel de herramientas moleculares, la existencia de una gran librería de mutantes para el estudio relacionado a enfermedades causadas tanto por la deficiencia como acumulación de Fe (Bettedi et al. 2011; Calap-quintana, Gonz, y Sebasti 2017). A esto se suma, a la vasta cantidad de información referente al microbioma de la mosca, tema que se abordará en la sección siguiente de la discusión, hicieron de este modelo una excelente alternativa para su uso dentro de la presente tesis.

Tal como se comentó, fue de vital importancia primero definir un protocolo capaz de reproducir un evento de déficit y posterior reforzamiento de Fe. En base a los resultados obtenidos, nuestra estrategia experimental permitió exitosamente generar un proceso de deficiencia en un periodo de 5 días, teniendo en consideración siempre que la concentración de 2,2 DPD utilizada no afectó la viabilidad de la mosca. Del mismo modo, el escenario de reforzamiento generado por la adición de FeCl₃ por 5 días tampoco afectó la viabilidad del organismo, completando el protocolo en un tiempo total de 15 días. En particular, se obtuvo una alta consistencia en las cuantificaciones de los contenidos de Fe en el intestino de *D. melanogaster*, obteniendo valores similares a concentraciones del metal reportadas anteriormente para este animal (Bettedi et al. 2011; Missirlis et al. 2006), otorgando validez y reproducibilidad a nuestro protocolo. El proceso de deficiencia de Fe generó una disminución de la concentración del metal cercana al 52%, resultado similar a lo observado en episodios de deficiencia de Fe en humanos (Camaschella 2015), por lo que consideramos que la disminución del metal alcanzada a través de este método en *D. melanogaster* es útil para el análisis de deficiencia de Fe. Estudios anteriores realizados en moscas, muestran que el uso de otro quelante de Fe, como BPS, permiten la disminución en la concentración de Fe intestinal

del animal en un 50% aproximadamente (X. Tang y Zhou 2013a; Missirlis et al. 2006), resultados similares a los obtenidos, lo que sostiene la eficacia en la disminución en la concentración del metal obtenida por nuestro protocolo.

Por su parte, el evento de reforzamiento del metal permitió obtener valores en la concentración del metal con un 100% sobre los valores normales. Otros estudios, usando una concentración y periodo de tiempo similar del metal, han permitido generar un aumento de hasta 4 veces más en los niveles de Fe (Missirlis et al. 2006), sin afectar de manera significativa la sobrevivencia del animal. Si bien, los protocolos de reforzamiento en humanos permiten en el tiempo alcanzar niveles normales en la concentración del metal, el tratamiento consiste en una administración en el consumo de 2 veces la cantidad de Fe necesaria (Camaschella 2015), marcando un exceso similar al utilizado en nuestro protocolo. Adicionalmente, estudios declaran que naturalmente puede existir una acumulación de Fe en la etapa final de vida de la mosca adulta (posterior a los 30 días post-eclosión) (Massie, Aiello, y Williams 1985), alcanzando valores similares al obtenido en nuestros ensayos de reforzamiento, lo que sostiene que nuestro protocolo se encuentra dentro de los límites tolerables y no tóxicos para el animal.

En relación a la duración del experimento, el tiempo total de 15 días es considerablemente menor a otros protocolos realizados en ratas (Dostal et al. 2012), el cual puede presentar una duración de hasta 40 días, reafirmando la correcta elección de *D. melanogaster* para el estudio de homeostasis de Fe, puesto que se obtuvo una ventaja considerable al diseñar un ensayo en tiempo reducido en relación a otros modelos de estudio disponibles. En resumen, el protocolo de deficiencia de Fe y posterior reforzamiento del metal logró emular las condiciones a nivel de contenidos de Fe intestinal observados en humanos en un modelo simple y dentro un período acotado. En definitiva, establecimos una estrategia experimental simple y de bajo costo, que nos permite estudiar el efecto de cambios en la biodisponibilidad del micronutriente mediante el uso de una dieta controlada, como se pudo observar en cada una de la ETAPAS de nuestro protocolo.

5.2 Taxonomía y diversidad intestinal de *D. melanogaster*, frente a la deficiencia y reforzamiento de Fe.

Hoy en día, existe una gran cantidad de estudios sobre el microbioma de *D. melanogaster* (Han et al. 2017; Nin, Chun y Douglas 2011; Wong, Chaston, y Douglas 2013). Se sabe que cuando este animal tiene una crianza en laboratorio, presenta una cantidad reducida en su número de OTUs en relación al animal salvaje (Bik et al. 2013). Moscas de laboratorio tienen una riqueza que oscila entre 1 (estado de embrión prácticamente estéril) a 70 OTUs (moscas adultas). En relación a estos números, nuestros resultados indicaron que la ETAPA 1 presenta un promedio de 19 OTUs, valores dentro del rango esperado para *Drosophila* criada en laboratorio. Tanto en la ETAPA 2 y 3, ambos grupos (control y experimental) mostraron una disminución de OTUs, reduciendo la riqueza de especies a un promedio de 8 OTUs. Este primer dato da cuenta que el cambio en la riqueza observada no presenta relación con el cambio en el contenido de Fe, puesto la cantidad de OTUs es similar en ambos grupos. Estudios anteriores han señalado que no existe una correlación entre el número de OTUs y el envejecimiento del animal (Nin, Chun y Douglas 2011), por lo que, no es posible adjudicar este cambio de riqueza al efecto del tiempo, dado que el evento de reducción de especies solo se observa entre los 5 días que comprenden las ETAPAS 1 y 2. Una posible explicación radica en el cambio de la dieta, puesto en ese período las moscas pasaron de ser alimentadas con una dieta rica no estéril a una dieta control estéril. Este cambio supone que al inicio del experimento dentro en la ETAPA 1 (primeros 5 días), existe una fase de adaptación del microbioma a la nueva dieta, la cual se logra asentar en las ETAPAS posteriores alcanzando un número estable en la riqueza de las especies en ambos grupos. Pensando en una optimización al diseño del protocolo actual, se podría extender al menos a 10 días la ETAPA inicial de sistema inmune (previo a la ETAPA 1), con el objetivo de favorecer el asentamiento del microbioma producto del cambio de dieta

Basado en información previa, otra de las características del microbioma intestinal de *D. melanogaster*, además de presentar una riqueza acotada, es que la abundancia de especies está concentrada en pocos OTUs, representada mayoritariamente por los filos *Firmicutes* y

Proteobacterias, los cuales pueden llegar a presentar un 97% de la abundancia total del microbiana (Nin, Chun y Douglas 2011). En nuestros resultados se observó que en la ETAPA 1 los filos *Firmicutes* y *Proteobacterias*, representa un 99% de la abundancia relativa, valor que se mantiene durante todo el protocolo para ambos grupos, incluso frente al evento de deficiencia de Fe y posterior reforzamiento, esto indica la importancia que han adquirido estos filos para el hospedero y su capacidad para adaptarse frente a cambios en la disponibilidad del metal a este nivel jerárquico. Al respecto, distintos estudios indican que estos filos presentan una gran importancia para el animal a nivel de desarrollo, inmunidad, longevidad, entre otros (Wong, Vanhove, y Watnick 2016; Broderick, Buchon, y Lemaitre 2014; Douglas 2018). Participan en funciones de producción de distintos metabolitos como ácido acético, vitamina B1, folato, rivo flavina, entre otras moléculas (Douglas 2018), los cuales actuarían activando diferentes cascadas de señalización en el hospedero (Chul Shin et al. 2011; Storelli et al. 2011), o como cofactor de diferentes enzimas (Sannino, Dobson, y Edwards 2018).

A nivel de especie, nuestros resultados mostraron que el proceso de deficiencia generó un cambio en la abundancia de las bacterias, *Commensalibacter intestini*, *Enterococcus termitis* y *Providencia rettgeri*. La gran disminución que sufrió *C. intestini* (93% a 23%), da cuenta del impacto que puede generar un déficit de Fe para el microbioma (Dostal et al. 2012). En general, es conocida la importancia del metal para distintos procesos vitales para las bacterias (Chareyre y Mandin 2018; C Andrews, Robinson, y Rodríguez-Quñones 2003), como también la existencia de diferentes formas de obtención de Fe para ciertas familias bacterianas (Ellermann y Arthur 2017; Wanderman y Delepelaire 2004). Cuando existe una deficiencia del metal en el entorno, diversos son las estrategias que poseen las bacterias para captar el Fe, sin embargo, a la fecha no se conocen mecanismos clásicos de obtención de Fe para la familia *Acetobacteraceae*, familia a la cual pertenece *C. intestini*. Adicionalmente, estudios anteriores en intestino de rata, también muestran una disminución marcada en grupos bacterianos pertenecientes a esta familia cuando ocurre un evento de deficiencia de Fe (Dostal et al. 2012), reforzando el dato obtenido en cuanto a la baja abundancia de

esta familia de bacterias frente a la deficiencia del metal. Si bien, a la fecha no es claro la función de *C. intestini* sobre el hospedero, trabajos previos muestran una importancia de miembros del filo *Proteobacteria*, filo al cual pertenece esta bacteria, donde se observa que un desbalance en algunas especies de este filo pueden generar una disminución en la sobrevivencia de *D. melanogaster* bajo otras condiciones experimentales (Clark et al. 2015).

En cuanto al aumento de *P. rettgeri* y *E. termitis* (1% a 19% y de 3% a 57%, respectivamente), se ha observado que tanto en heces humanas como en intestinos de ratones, una disminución de Fe puede producir aumentos en la abundancia de bacterias pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* (Dostal et al. 2013; Dostal et al. 2012), familia a la cual pertenece *P. rettgeri*. Este aumento se puede deber a la capacidad de adaptación de esta bacteria a cambios en la concentración de Fe. Estudios han mostrado que esta familia posee una gran capacidad de producir moléculas llamadas sideróforos (quelante de Fe), mecanismo que le estaría confiriendo una mejor capacidad de adaptación frente a un escenario de déficit de Fe (Ellermann y Arthur 2017).

En relación con el aumento de *E. termitis*, bacteria perteneciente a la familia *Enterococcaceae*, no existe a la fecha información sobre una mayor capacidad para producir sideróforos o moléculas afines. No obstante, frente a una deficiencia del metal, otros estudios también han reportado el aumento de esta familia (Dostal et al. 2013). A la fecha, todavía no se conocen cuáles serían las causas del aumento en esta bacteria, por lo que más estudios son necesarios para comprender este fenómeno. Existe a nivel general una explicación dada por la posibilidad de crecimiento por nicho oportunista. Es posible que el aumento de *E. termitis* se vea propiciado por la gran disminución de *C. intestini*, lo que permitiría el aumento en la abundancia de otras especies.

El proceso de reforzamiento también generó un cambio en la abundancia de estas tres especies, *C. intestini*, *E. termitis* y *P. rettgeri*. Se observó un aumento en *C. intestini* y una disminución en *E. termitis* y *P. rettgeri* entre la ETAPA 2 y 3 del grupo experimental, valores que además se acercaron a los obtenidos en el grupo control en el ETAPA 3. Este resultado sugiere, al menos para estas tres especies, que el reforzamiento del metal logró recuperar los valores de

abundancia afectados por el déficit. Estos resultados están en concordancia con un trabajo previo publicado en ratas, donde una deficiencia de Fe produce un cambio en la abundancia del microbioma, y el posterior reforzamiento logra restituir en cierta medida el microbioma normal inicial (Dostal et al. 2012).

Es importante indicar que si bien estos resultados no nos entregan información acerca de la estructura de las interacciones y cómo éstas cambian en periodos de deficiencia y reforzamiento, sí aportan con información relevante de cómo diferentes bacterias se adaptan a estos cambios de Fe, mostrando que, frente a un proceso de deficiencia de Fe, existe un reordenamiento en el microbioma a nivel de la riqueza, el cual es observable de forma significativa desde un nivel de orden. Interesantemente, este cambio en el microbioma se logra revertir en cierta medida, cuando se produce el reforzamiento del metal, restaurando en gran parte la comunidad bacteriana intestinal.

Esta capacidad mostrada por la comunidad bacteriana se denomina resiliencia microbiana, definida como la capacidad del microbioma de volver a su condición normal cuando sufre distintos cambios que generen una disbiosis en la comunidad microbiana (A Lozupone et al. 2013). En el caso del microbioma intestinal, estos cambios pueden estar asociados a cambios en la dieta del hospedero. Diferentes estudios han señalado que cambios en la dieta en humanos por periodos cortos, inducen modificaciones en la diversidad y abundancia del microbioma. Estas modificaciones son revertidas cuando se retoma una dieta normal (A Lozupone et al. 2013; Sommer et al. 2017). Bajo el mismo contexto, tratamientos en humanos con diversos antibióticos, como por ejemplo claritromicina, producen cambios en la abundancia normal del microbioma. Al término del tratamiento, dentro del intestino se logra recuperar mayoritariamente la microbiota normal inicial (Janet et al. 2010). Estos eventos de resiliencia presentan periodos de tiempos diversos, los cuales pueden llegar a durar años, meses o días (como el observado en la presente tesis). En cualquiera de los casos, se destaca la capacidad de los microbiomas y su estrecha relación con la salud del hospedero (Janet et al. 2010).

5.3 Cambios en las interacciones de la comunidad bacteriana.

Para poder realizar un análisis de las interacciones de las comunidades bacterianas, se construyeron redes de coocurrencia para cada ETAPA. Esta estrategia permitió el análisis de las distintas asociaciones presentes en la comunidad a través de diferentes métricas, como por ejemplo, índices de similitud, Pearson y Spearman, los que permitieron identificar asociaciones tanto positivas como negativas entre los miembros que componen cada red.

En términos generales, por primera vez se logró identificar cambios en la estructura de las interacciones dentro de la comunidad intestinal de *D. melanogaster* cuando se produce un evento de deficiencia de Fe, estructura que luego es revertida al estado inicial cuando se suplementa con el metal. En relación con el efecto de la deficiencia de Fe, nuestros resultados mostraron que, si bien, este evento produce características topológicas globales similares en relación a la situación control, existe un reordenamiento marcado en la estructura de la red, destacando un aumento en las interacciones negativas entre miembros de la clase *Bacilli* y *Gammaproteobacteria*, donde se observa que esta última clase presenta el mayor aumento en su abundancia cuando se produce la deficiencia de Fe. Este aumento en las interacciones negativas se puede explicar por una posible competencia directa por el nicho entre miembros de estas dos clases (Lisa y Faust 2018; Faust y Raes 2012), lo que conlleva al aumento en su abundancia en este caso, generado por el evento de deficiencia de Fe. Al respecto, estudios previos de microbiomas dan cuenta que perturbaciones capaces de inducir una disminución en ciertos miembros de la comunidad, provocan cambios importantes de aumento en abundancia en otras especies dado las posibilidades de aperturas de nicho (Jernberg et al. 2010; Poretsky et al. 2015). A modo de ejemplo, tratamientos con antibióticos que provocan una disminución en la microbiota intestinal pueden generar el aumento de distintas bacterias, como el caso de *Clostridium difficile*, patógeno bacteriano que puede llegar a ser mortal para el hospedero. Adicionalmente, el aumento de este microorganismo se correlaciona con el incremento de abundancia de otras especies bacterianas, las cuales establecen principalmente interacciones

negativas entre los miembros, generando una nueva competencia por el nicho disponible (Steinway et al. 2015).

La deficiencia de Fe también generó un aumento de interacciones positivas entre miembros de las clases *Bacilli* y *Alphaproteobacteria*, esta última la que presentó la mayor disminución en abundancia. A diferencia de lo ocurrido con la clase *Gammaproteobacteria*, *Bacilli* al parecer no estaría compitiendo directamente por el mismo nicho con la clase *Alphaproteobacteria*, más bien estaría interactuando de forma indirecta posiblemente compartiendo algún metabolito. En relación a esto, estudios en microbiomas de suelo declaran que una interacción positiva entre miembros de la misma comunidad que no comparten el mismo espacio se puede dar de forma indirecta, como por ejemplo, a través del uso de un metabolito producido por una especie aeróbica el cual es adquirido por una especie anaeróbica dentro de la misma comunidad (Poretsky et al. 2015).

Al estudiar los componentes de la red, en el evento de deficiencia del metal, se observa que los nodos con mayor cantidad de conexiones, los cuales se estima que presentarían una mayor importancia en la estabilidad de la red (Hajishengallis, Darveau, y Curtis 2012), pertenecen al género *Acetobacter*. Se ha observado que este género es uno de los predominantes en *D. melanogaster*, teniendo importancia para el metabolismo, inmunidad y desarrollo de la mosca (Moghadam et al. 2018). Coincidiendo con nuestros resultados, miembros de este género presentaron en las redes controles un grado elevado de conectividad. Producto del proceso de deficiencia, esta configuración cambia radicalmente, perdiendo el grado el cual se ve reemplazado por otras bacterias de la familia *Enterococcaceae*. Si bien especies de esta familia pueden llegar a ser patógenas para distintas especies, como por ejemplo *Enterococcus faecalis* en humanos (Short y Brian 2010), también se ha observado que otros miembros cumplen funciones importantes en estabilizar el microbioma de *D. melanogaster* (Cox y Gilmore 2007), por lo que su aumento en las interacciones, dada la perturbación en la disponibilidad de Fe, no necesariamente se correlacionará con una predisposición a ser afectado por patógenos, sino eventualmente es una respuesta para contener mayoritariamente la funcionalidad del microbioma. Interesantemente, otro OTU que presenta un alto grado de conexiones es

Leuconostoc, el cual presenta una baja abundancia en el animal. Este resultado integra la idea que la integridad dentro de la comunidad bacteriana intestinal no solo está definida por miembros que presentan una alta abundancia en el microbioma del hospedero, sino que otras especies de menor presencia al parecer también están cumpliendo funciones de estabilidad (Hajishengallis, Darveau, y Curtis 2012), como es el caso de *Leuconostoc* frente a un evento de deficiencia de Fe para el microbioma *D. melanogaster*, tal como lo mostraron nuestros datos.

Para realizar un estudio más específico y más detallado de los cambios en la estructura de las redes, se usó el programa NetShift (Kuntal et al. 2019), herramienta que además permite definir nodos “drivers” dentro de la red, definidos como miembros claves para la estructura del microbioma puesto que presentan una alta frecuencia de conexión con otros OTUs. El primer resultado mostró la existencia de diferencias importantes en las subredes generadas entre E2 y C2 (deficiencia vs control). Se logró identificar 7 nodos drivers, 6 de ellos pertenecientes a la clase *Bacilli*. Esta clase presentó el mayor aumento en la abundancia durante el evento de deficiencia del metal sumado a un incremento significativo en su grado de conexiones, sugiriendo una alta capacidad de adecuación para estos miembros durante eventos de deficiencia de Fe dentro del microbioma. Adicionalmente, el incremento de abundancia de la clase *Bacilli*, sumado a su clasificación como driver dentro del microbioma cuando *D. melanogaster* cuando se ve expuesta a un escenario deficiente de Fe, dan cuenta que miembros de este grupo son cruciales para la estructura de la comunidad microbiana, suponiendo que cumplen funciones importantes para la homeostasis de la mosca. Al respecto, estudios han señalado que bacterias pertenecientes a esta clase son fundamentales para el correcto desarrollo en *D. melanogaster* (Chul Shin et al. 2011), correlacionando una disminución en la abundancia de esta clase con un aumento en la mortalidad de moscas adulta (Clark et al. 2015).

Producto del proceso de reforzamiento del metal, la comparación entre E3 y C3 (reforzamiento vs control) indicó que existe un alto grado de homología en la estructura de la red de reforzamiento en relación a su respectivo control. No se lograron identificar diferencias entre las características topológicas, ni OTUs drivers, indicando que el evento reforzamiento de Fe no solo

permite recuperar los valores de contenido intestinal de Fe, sino que restaura tanto la abundancia de los miembros de la comunidad bacteriana, como también la estructura del microbioma previo al evento de déficit. Al igual que lo discutido en la sección anterior, este resultado sostiene la capacidad de resiliencia microbiana para sostener cambios en la disponibilidad de Fe en la dieta, la cual actuaría tanto a nivel de abundancia de especies como a nivel de las interacciones entre especies en el microbioma de *D. melanogaster*.

A la fecha no existen datos concluyentes que indiquen que las estructuras de las interacciones en el microbioma presentan alguna utilidad biológica para el hospedero, sí se conoce una correlación directa entre alteraciones en las comunidades bacterianas en distintos tipos de enfermedades, tales como diabetes, obesidad, depresión, entre otras (Larsen et al. 2010; Maes et al. 2012; Turnbaugh et al. 2006). En este contexto, la presente tesis entregó información relevante de la capacidad del microbioma a nivel estructural para responder a cambios en la disponibilidad de Fe, considerando la importancia de este micronutriente para el organismo. Así, los datos aquí presentados servirán para reforzar la importancia de la correcta nutrición de este metal. Ahora bien, es importante declarar que es necesario extender este trabajo para evaluar la importancia de las estructuras de las interacciones de la comunidad y cómo estas afectan las funciones específicas que cumplen las especies, tanto para el microbioma como para el hospedero durante eventos de deficiencia y reforzamiento de Fe.

6. PROYECCIONES.

El Fe tiene una estrecha relación a nivel sistémico con otros metales (Loréal et al. 2014). Tal como se presentó, nuestro protocolo de diseño para el estudio de Fe fue exitoso en la determinación de la estructura de comunidades intestinales. En este contexto, estudiar cambios en la biodisponibilidad de cobre y zinc bajo la misma estrategia experimental, permitiría aumentar el conocimiento de la capacidad del microbioma para adecuarse a otros metales, sumado a entregar importante información sobre el efecto específico o combinado entre el Fe, cobre y zinc en estos términos.

Este trabajo permitió dilucidar que la deficiencia de Fe produce un cambio en la estructura de las interacciones del microbioma y que un posterior reforzamiento del metal permite recuperar estas estructuras. Si bien estos resultados nos dan un indicio de cómo se ven afectadas las estructuras bajo estas condiciones nutricionales, identificar específicamente el tipo de interacciones (comensalismo, parasitismo, depredación, competencia, etc.) es un tema pendiente por conocer.

Estudios previos indican que grupos bacterianos juegan un gran papel en la en diferentes funciones del hospedero, tales como respuestas antiinflamatorias, respuestas tolerogénicas (Watterlot et al. 2008), así como respuestas proinflamatorias (Llopis et al. 2008). Complementar nuestro estudio con análisis metagenómicos, metatranscriptómicos y metabolómicos permitiría definir de mejor manera la función de la comunidad y sus posibles ajustes metabólicos y respuestas globales frente a una deficiencia de Fe y su posterior reforzamiento.

Una de las ventajas que presenta *D. melanogaster*, es que su microbiota intestinal es acotada y fácilmente manipulable. Nuestro trabajo permitió identificar organismos que presentan una mayor cantidad de interacciones y abundancia dentro de la comunidad. Así, intervenir estos organismos directamente en la microbiota del hospedero (como por ejemplo mediante el uso de antibióticos), nos permitiría complementar la caracterización de estas especies en términos de su impacto sobre estructura de interacciones microbianas.

Nuestro protocolo perfectamente puede extrapolarse a modelos animales superiores, tales como ratón o rata. Los resultados obtenidos sostienen la importancia para futuros estudio en poblaciones humanas de la estructura del microbioma frente a cambios en la disponibilidad de Fe.

Finalmente, la capacidad de identificación de grupos, familias, clases y miembros dentro de la comunidad definidos como elementos claves para la estructura de la comunidad, permiten proyectar: i) la implementación kits de detección de eventos de déficit del metal, ii) la posible generación alimentos funcionales del tipo probióticos para su administración bajo escenarios de anemias de Fe.

7. CONCLUSIONES FINALES.

- Se diseñó y validó un protocolo exitoso para el estudio de la deficiencia de Fe y posterior reforzamiento del metal en el modelo de *D. melanogaster*.
- La disminución de Fe y el posterior reforzamiento no provocan un cambio en la riqueza de OTUs, pero si en la abundancia de los organismos observados dentro microbioma intestinal de *D. melanogaster*.
- La deficiencia de Fe provoca un cambio en la estructura de las comunidades generando un reordenamiento de las redes producto de una redistribución de interacciones positivas y negativas entre los miembros de la comunidad.
- Los resultados obtenidos en esta tesis refuerzan la importancia de estudiar la estructura de comunidades en poblaciones humanas no solo en condiciones de anemia de Fe, sino también frente a cambios en la disponibilidad de otros micronutrientes.

8. REFERENCIAS

- A Lozupone, Catherine, Jesse Stombaugh, Jeffrey Gordon, Janet Jansson, y Rob Knight. 2013. "Diversity , Stability and Resilience of the Human Gut Microbiota." *Nature* 489 (7415): 220–30.
- Apidianakis, Yiorgos, y Laurence G Rahme. 2011. "Drosophila Melanogaster as a Model for Human Intestinal Infection and Pathology." *Disease Models Mechanisms* 4 (1): 21–30.
- Babitt, Jodie L, y Herbert Lin. 2011. "The Molecular Pathogenesis of Hereditary Hemochromatosis." *Seminars in Liver Disease* 31 (3): 280–92.
- Balamurugan, Ramadass, R Regina Mary, Sucharita Chittaranjan, Hepsiba Jancy, R Shobana Devi, y Balakrishnan S Ramakrishna. 2010. "Low Levels of Faecal Lactobacilli in Women with Iron-Deficiency Anaemia in South India." *British Journal of Nutrition* 104 (7): 931–34.
- Barton, James C. 2013. "Hemochromatosis and Iron Overload : From Bench to Clinic." *The American Journal of the Medical Sciences* 346 (5): 403–12.
- Bettedi, Lucia, Mohamad F Aslam, Joanna Szular, Konstantinos Mandilaras, y Fanis Missirlis. 2011. "Iron Depletion in the Intestines of Malvolio Mutant Flies Does Not Occur in the Absence of a Multicopper Oxidase." *Journal of Experimental Biology* 214 (6): 971–78.
- Bik, Elisabeth M, Dmitri A Petrov, Fabian Staubach, John F Baines, y Sven Ku. 2013. "Host Species and Environmental Effects on Bacterial Communities Associated with Drosophila in the Laboratory and in the Natural Environment." *PloS One* 8 (8): e70749.
- Blaxter, Mark, Jenna Mann, Tom Chapman, Fran Thomas, Claire Whitton, Robin Floyd, y Eyuaalem Abebe. 2005. "Defining Operational Taxonomic Units Using DNA Barcode Data." *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 360 (1462): 1935–43.
- Bonilla-ramirez, Leonardo, Marlene Jimenez-del-rio, y Carlos Velez-pardo. 2011. "Acute and Chronic Metal Exposure Impairs Locomotion Activity in Drosophila Melanogaster : A Model to Study Parkinsonism." *Biometals* 24 (6): 1045–57.

- Broderick, Nichole A, Nicolas Buchon, y Bruno Lemaitre. 2014. "Microbiota-Induced Changes in *Drosophila Melanogaster* Host Gene Expression and Gut Morphology." *MBio* 5 (3): e01117–14.
- Buchon, Nicolas, Nichole A Broderick, y Bruno Lemaitre. 2013. "Gut Homeostasis in a Microbial World : Insights from *Drosophila Melanogaster*." *Nature Reviews Microbiology* 11 (9): 615.
- C Andrews, Simon, Andrea K Robinson, y Francisco Rodríguez-Quñones. 2003. "Bacterial Iron Homeostasis." *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Reviews* 27 (2-3): 215–37.
- Calap-quintana, Pablo, Javier Gonz, y Noelia Sebasti. 2017. "Drosophila Melanogaster Models of Metal-Related Human Diseases and Metal Toxicity." *International Journal of Molecular Sciences* 18 (7): 1456.
- Camaschella, Clara. 2015. "Iron Deficiency : New Insights into Diagnosis and Treatment." *Hematology* 2015 (1): 8–13.
- Caporaso, J Gregory, Justin Kuczynski, Jesse Stombaugh, Kyle Bittinger, Frederic D Bushman, Elizabeth K Costello, Noah Fierer. 2011. "QIIME Allows Analysis of High-Throughput Community Sequencing Data." *Nature Methods* 7 (5): 335–36.
- Chareyre, Sylvia, y Pierre Mandin. 2018. "Bacterial Iron Homeostasis Regulation by sRNAs." *Regulating with RNA in Bacteria and Archaea* 1 (1): 267–81.
- Chul Shin, Seung, Kim Sung-Hee, You Hyejin, Boram Kim, Aeri Kim, Lee Kyung-Ah, Yoon Joo-Heon, Ryu Ji-Hwan, y Lee Won-Jae. 2011. "Drosophila Microbiome Modulates Host Developmental and Metabolic Homeostasis via Insulin Signaling." *Science* 334 (6056): 670–74.
- Claesson, Marcus J, Ian B Jeffery, Paul W O Toole, O Lena, Jennifer Deane, Eamonn M M Quigley, y Magnus Simre. 2012. "An Irritable Bowel Syndrome Subtype Defined by Species-Specific Alterations in Faecal Microbiota." *Gut* 61 (7): 997–1006.
- Clark, Rebecca I, Anna Salazar, Matteo Pellegrini, W William, David W Walker, Rebecca I Clark,

- Anna Salazar. 2015. "Distinct Shifts in Microbiota Composition during *Drosophila* Aging Impair Intestinal Function and Drive Mortality." *CellReports* 12 (10): 1656–67.
- Cornelissen, Cynthia Nau, Meera Kelley, M Marcia, James E Anderson, Janne G Cannon, Myron S Cohen, y P Frederick Sparling. 1998. "The Transferrin Receptor Expressed by Gonococcal Strain FA1090 Is Required for the Experimental Infection of Human Male Volunteers." *Molecular Microbiology* 27 (3): 611–16.
- Cox, Christopher R, y Michael S Gilmore. 2007. "Native Microbial Colonization of *Drosophila* *Melanogaster* and Its Use as a Model of *Enterococcus Faecalis* Pathogenesis." *Infection and Immunity* 75 (4): 1565–76.
- Cryan, John F, Anders Lehmann, R Astrazeneca, Amanda J Page, Royal Adelaide, y F John. 2010. "A Gut Feeling about GABA : Focus on GABA B Receptors." *Frontiers in Pharmacology* 1 (124): 124.
- Ding, Hao, Ting Wang, Lora V Hooper, Gou Young Koh, Andras Nagy, Clay F Semenkovich, y Jeffrey I Gordon. 2004. "The Gut Microbiota as an Environmental Factor That Regulates Fat Storage." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101 (44): 15718–23.
- Dockray, Graham J. 2014. "Gastrointestinal Hormones and the Dialogue between Gut and Brain." *The Journal of Physiology* 592 (14): 2927–41.
- Dostal, Alexandra, Christophe Chassard, Florentine M Hilty, Michael B Zimmermann, Tanja Jaeggi, Samuela Rossi, y Christophe Lacroix. 2012. "Iron Depletion and Repletion with Ferrous Sulfate or Electrolytic Iron Modifies the Composition and Metabolic Activity of the Gut Microbiota in Rats." *The Journal of Nutrition* 142 (5): 271–77.
- Dostal, Alexandra, Sophie Fehlbaum, Christophe Chassard, Michael Bruce, y Christophe Lacroix. 2013. "Low Iron Availability in Continuous in Vitro Colonic Fermentations Induces Strong Dysbiosis of the Child Gut Microbial Consortium and a Decrease of Main Metabolites." *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Ecology* 83 (1): 161–75.
- Douglas, Angela E. 2018. "The *Drosophila* Model for Microbiome Research." *Lab Animal* 47 (6):

157–64.

- Edgar, Robert C. 2010. “Search and Clustering Orders of Magnitude Faster than BLAST.” *Bioinformatics* 26 (19): 2460–61.
- Ellermann, Melissa, y Janelle C Arthur. 2017. “Siderophore-Mediated Iron Acquisition and Modulation of Host-Bacterial Interactions.” *Free Radical Biology and Medicine* 105: 68–78.
- Farina, Marcelo, Daiana Silva Avila, João Batista Teixeira da Rocha, y Michael Aschner. 2013. “Metals, Oxidative Stress and Neurodegeneration: A Focus on Iron, Manganese and Mercury.” *Neurochemistry International* 62 (5): 575–94.
- Faust, Karoline, y Jeroen Raes. 2012. “Microbial Interactions : From Networks to Models.” *Nature Reviews Microbiology* 10 (8): 538–50.
- Faust, Karoline, y Jeroen Raes . 2016. “CoNet App : Inference of Biological Association Networks Using Cytoscape.” *F1000Research* 5 (1519): 1–14.
- Faust, Karoline, J Fah Sathirapongsasuti, Jacques Izard, Nicola Segata, Dirk Gevers, Jeroen Raes, y Curtis Huttenhower. 2012. “Microbial Co-Occurrence Relationships in the Human Microbiome.” *PLoS Computational Biology* 8 (7): e1002606.
- Fierer, Noah, Jonathan W Leff, Byron J Adams, Uffe N Nielsen, Scott Thomas, Christian L Lauber, Sarah Owens, Jack A Gilbert, Diana H Wall, y J Gregory Caporaso. 2012. “Cross-Biome Metagenomic Analyses of Soil Microbial Communities and Their Functional Attributes.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109 (52): 21390–95.
- Fodor, Anthony A, Todd Z Desantis, Kristine M Wylie, Jonathan H Badger, Yuzhen Ye, Theresa Hepburn, Ping Hu. 2012. “The “ Most Wanted ” Taxa from the Human Microbiome for Whole Genome Sequencing.” *PloS One* 7 (7): e41294.
- Gray, Nicola K, Kostas Pantopoulos, Thomas Dandekar, Brian A C Ackrellt, y Matthias W Hentze. 1996. “Translational Regulation of Mammalian and Drosophila Citric Acid Cycle Enzymes via Iron-Responsive Elements.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93 (10): 4925–30.

- Grenham, Sue, Gerard Clarke, John F Cryan, Timothy G Dinan, y Govind K Makharia. 2011. “Brain – Gut – Microbe Communication in Health and Disease.” *Frontiers in Physiology* 2 (2): 94.
- Hajishengallis, George, Richard Darveau, y Michael Curtis. 2012. “The Keystone Pathogen Hypothesis.” *Nature Reviews Microbiology* 10 (10): 717–25.
- Han, Gangsik, Hyo Jung Lee, Sang Eun Jeong, Che Ok Jeon, y Seogang Hyun. 2017. “Comparative Analysis of *Drosophila Melanogaster* Gut Microbiota with Respect to Host Strain , Sex , and Age.” *Microbial Ecology* 74 (1): 207–16.
- Handl, Stefanie, Scot E Dowd, y Jose F Garcia-mazcorro. 2011. “Massive Parallel 16S rRNA Gene Pyrosequencing Reveals Highly Diverse Fecal Bacterial and Fungal Communities in Healthy Dogs and Cats.” *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Ecology* 76 (2): 301–10.
- Hentze, Matthias W, Martina U Muckenthaler, y Nancy C Andrews. 2004. “Balancing Acts : Molecular Control of Mammalian Iron Metabolism.” *Cell* 117 (3): 285–97.
- Hiel, Matthias B Van, Bert Breugelmans, Charles N Pagel, Adam K Williams, Aiden K Varan, Richard Burke, Vernon M Bowles, y Philip Batterham. 2012. “The Ovicidal , Larvacidal and Adulticidal Properties of *Melanogaster*.” *PloS One* 7 (11): e49961.
- Holzer, Peter, Florian Reichmann, y Aitak Farzi. 2012. “Neuropeptides Neuropeptide Y , Peptide YY and Pancreatic Polypeptide in the Gut – Brain Axis.” *Neuropeptides* 46 (6): 261–74.
- Huse, Susan M, Yuzhen Ye, Yanjiao Zhou, y Anthony A Fodor. 2012. “A Core Human Microbiome as Viewed through 16S rRNA Sequence Clusters.” *PloS One* 7 (6): e34242.
- Janet, K, Hedvig E Jakobsson, Cecilia Jernberg, Anders F Andersson, Maria Sjo, y Lars Engstrand. 2010. “Short-Term Antibiotic Treatment Has Differing Long- Term Impacts on the Human Throat and Gut Microbiome.” *PloS One* 5 (3): e9836.
- Jehrke, Lisa, Fiona A Stewart, Andrea Droste, y Mathias Beller. 2018. “The Impact of Genome Variation and Diet on the Metabolic Phenotype and Microbiome Composition of *Drosophila*

- Melanogaster.” *Scientific Reports* 8 (1): 6215.
- Jernberg, Cecilia, Sonja Lo, Charlotta Edlund, y Janet K Jansson. 2010. “Long-Term Impacts of Antibiotic Exposure on the Human Intestinal Microbiota.” *Microbiology* 156 (11): 3216–23.
- Jomova, Klaudia, y Marian Valko. 2011. “Advances in Metal-Induced Oxidative Stress and Human Disease.” *Toxicology* 283 (2-3): 65–87.
- Kassebaum, Nicholas J, Rashmi Jasrasaria, Mohsen Naghavi, Sarah K Wulf, Nicole Johns, Rafael Lozano, Mathilda Regan. 2014. “A Systematic Analysis of Global Anemia Burden from 1990 to 2010.” *Blood* 123 (5): 615–25.
- Kuntal, Bhusan K, Pranjal Chandrakar, Sudipta Sadhu, y Sharmila S Mande. 2019. “‘ NetShift ’ : A Methodology for Understanding ‘ Driver Microbes ’ from Healthy and Disease Microbiome Datasets.” *Multidisciplinary Journal of Microbial Ecology* 13 (2): 442.
- Larsen, Nadja, Finn K Vogensen, Frans W J Van Den Berg, Dennis Sandris Nielsen, Anne Sofie, Bente K Pedersen, Waleed Abu Al-soud, Søren J Sørensen, y Lars H Hansen. 2010. “Gut Microbiota in Human Adults with Type 2 Diabetes Differs from Non-Diabetic Adults.” *PLoS One* 5 (2): e9085.
- Law, John H. 1999. “Iron Availability Dramatically Alters the Distribution of Ferritin Subunit Messages in *Drosophila Melanogaster*.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96 (6): 2716–21.
- Ley, Ruth E, Justin L Sonnenburg, Daniel A Peterson, y Jeffrey I Gordon. 2005. “Host-Bacterial Mutualism in the Human Intestine.” *Science* 307 (5717): 1915–21.
- Li, Kai, y Heinz Reichmann. 2016. “Role of Iron in Neurodegenerative Diseases.” *Journal of Neural Transmission* 123 (4): 389–99.
- Lisa, R, y Karoline Faust. 2018. “From Hairballs to Hypotheses – Biological Insights from Microbial Networks.” *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Reviews* 42 (6): 761–80.
- Litton, Edward, Jing Xiao, y Kwok M Ho. 2013. “Safety and Efficacy of Intravenous Iron Therapy

- in Reducing Requirement for Allogeneic Blood Transfusion : Systematic Review and Meta-Analysis of Randomised.” *British Medical Journal* 4822 (8): 1–10.
- Llopis, Marta, Maria Antolin, Monica Carol, Natalia Borrueal, Francesc Casellas, Cristina Martinez, y Francisco Guarner. 2008. “Lactobacillus Casei Downregulates Commensals ’ Inflammatory.” *Inflammatory Bowel Diseases* 15 (2): 275–83.
- Loréal, Olivier, Thibault Cavey, Edouard Bardou-Jacquet, Pascal Guggenbuhl, Martine Ropert, y Pierre Brissot. 2014. “Iron, Hepcidin, and the Metal Connection.” *Frontiers in Pharmacology* 5 (128): 128.
- Lozoff, Betsy, Isidora De Andraca, Marcela Castillo, Julia B Smith, Tomas Walter, y Paulina Pino. 2003. “Behavioral and Developmental Effects of Preventing Iron-Deficiency Anemia in Healthy Full-Term Infants.” *Pediatrics* 112 (4): 846–54.
- Maes, Michael, Marta Kubera, Jean-claude Leunis, y Michael Berk. 2012. “Increased IgA and IgM Responses against Gut Commensals in Chronic Depression : Further Evidence for Increased Bacterial Translocation or Leaky Gut.” *Journal of Affective Disorders* 141 (1) : 55–62.
- Mandilaras, Konstantinos, Tharse Pathmanathan, y Fanis Missirlis. 2013. “Iron Absorption in *Drosophila Melanogaster*.” *Nutrients* 5 (5): 1622–47.
- Massie, Harold R, Valerie R Aiello, y Trevor R Williams. 1985. “Iron Accumulation during Development and Ageing of *Drosophila*.” *Mechanisms of Ageing and Development* 29 (2): 215–20.
- Mcdonald, Daniel, Morgan N Price, Julia Goodrich, Eric P Nawrocki, Todd Z Desantis, Alexander Probst, Gary L Andersen, Rob Knight, y Philip Hugenholtz. 2011. “An Improved Greengenes Taxonomy with Explicit Ranks for Ecological and Evolutionary Analyses of Bacteria and Archaea.” *Multidisciplinary Journal of Microbial Ecology* 6 (3): 610–18.
- Missirlis, Fanis, Sara Holmberg, Teodora Georgieva, Boris C Dunkov, Tracey A Rouault, y John H Law. 2006. “Characterization of Mitochondrial Ferritin in *Drosophila*.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103 (15): 5893–98.

- Moghadam, Neda N, Pia Mai, Torsten N Kristensen, Nadieh De Jonge, y Simon Bahrndorff. 2018. “Strong Responses of *Drosophila Melanogaster* Microbiota to Developmental Temperature.” *Fly* 12 (1): 1–12.
- Motta, Jean-paul, Thibault Allain, Luke E Green-harrison, A Groves, Troy Feener, Hena Ramay, Paul L Beck. 2018. “Iron Sequestration in Microbiota Biofilms As A Novel Strategy for Treating Inflammatory Bowel Disease Iron Sequestration in Microbiota Biofilms As A Novel Strategy for Treating Inflammatory Bowel Disease.” *Inflammatory Bowel Diseases* 24 (7): 1493–1502.
- Mujica, Maria, Alex Brito, Alvaro Castillo-Carniglia, Manuel Olivares, y Eva Hertrampf. 2012. “Consumo Y Valoración Social de La Leche Purita Fortificada Y Cereal Del Programa Nacional de Alimentación Complementaria (PNAC) En Chile.” *Revista Chilena de Nutrición* 39 (7): 173–79.
- Nin, Chun Adam Wong, Patrick Ng, y Angela E. Douglas. 2011. “Low-Diversity Bacterial Community in the Gut of the Fruitfly *Drosophila Melanogaster*.” *Environmental Microbiology* 13 (7): 1889–1900.
- Papanikolaou, G, y K Pantopoulos. 2005. “Iron Metabolism and Toxicity.” *Toxicology and Applied Pharmacology* 202 (2): 199–211.
- Peter, Turnbaugh, Backhed Fredrik, Lucinda Fulton, y Gordon Jeffrey. 2008. “Marked Alterations in the Distal Gut Microbiome Linked to Dietinduced Obesity.” *Cell Host Microbe* 3 (4): 213–23.
- Piccinelli, Paul, y Tore Samuelsson. 2007. “Evolution of the Iron-Responsive Element.” *Rna* 13 (7): 952–66.
- Poretsky, Rachel Susan, Christopher S Miller, Thomas Jefferson Sharpton, y David Berry. 2015. “Cross-Biome Comparison of Microbial Association Networks.” *Frontiers in Microbiology* 6 (1200): 1–13.
- Qin, Junjie, Ruiqiang Li, Jeroen Raes, Manimozhiyan Arumugam, Kristoffer Solvsten Burgdorf,

- Chaysavanh Manichanh, Trine Nielsen. 2010. "A Human Gut Microbial Gene Catalogue Established by Metagenomic Sequencing." *Nature* 464 (3): 59–65.
- S. Neish, Andrew. 2014. "Mucosal Immunity and the Microbiome." *Annals of the American Thoracic Society* 11 (Supplement 1): S28–32.
- Sanderson, Stephanie, Wayne Boardman, Claudio Ciofi, y Richard Gibson. 2006. "Human Gut Microbes Associated with Obesity." *Nature* 444 (21): 1022–23.
- Sannino, David R, Adam J Dobson, y Katie Edwards. 2018. "The *Drosophila Melanogaster* Gut Microbiota Provisions Thiamine to Its Host." *American Society for Microbiology* 9 (2): e00155–18.
- Shannon, Paul, Andrew Markiel, Owen Ozier, Nitin S Baliga, Jonathan T Wang, Daniel Ramage, Nada Amin, Benno Schwikowski, y Trey Ideker. 2003. "Cytoscape : A Software Environment for Integrated Models of Biomolecular Interaction Networks." *Genome Research* 13 (11): 2498–2504.
- Short, Sarah M, y P Brian. 2010. "Female and Male Genetic Contributions to Post-Mating Immune Defence in Female *Drosophila Melanogaster*." *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 277 (1700): 3649–57.
- Skaar, Eric P. 2010. "The Battle for Iron between Bacterial Pathogens and Their Vertebrate Hosts." *PloS Pathogens* 6 (8): 6–9.
- Sommer, Felix, Jacqueline Moltzau Anderson, Richa Bharti, y Jeroen Raes. 2017. "The Resilience of the Intestinal Microbiota Influences Health and Disease." *Nature Reviews Microbiology* 15 (10): 630.
- Steinway, Steven N, Matthew B Biggs, Thomas P Loughran Jr, y Jason A Papin. 2015. "Inference of Network Dynamics and Metabolic Interactions in the Gut Microbiome." *PLoS Computational Biology* 11 (6): e1004338.
- Storelli, Gilles, Arnaud Defaye, Berra Erkosar, Pascal Hols, y Julien Royet. 2011. "Lactobacillus Plantarum Promotes *Drosophila* Systemic Growth by Modulating Hormonal Signals through

- TOR-Dependent Nutrient Sensing.” *Cell Metabolism* 14 (3): 403–14.
- Tang, Minghua, Daniel N Frank, Audrey E Hendricks, Diana Ir, Fabian Esamai, Edward Liechty, K Michael Hambidge, y Nancy F Krebs. 2017. “Iron in Micronutrient Powder Promotes an Unfavorable Gut Microbiota in Kenyan Infants.” *Nutrients* 9 (776): 1–12.
- Tang, Xiaona, y Bing Zhou. 2013a. “Ferritin Is the Key to Dietary Iron Absorption and Tissue Iron Detoxification in *Drosophila Melanogaster*.” *The FASEB Journal* 27 (1): 288–98.
- Tang, Xiaona, y Bing Zhou. 2013b. “Iron Homeostasis in Insects : Insights from *Drosophila* Studies.” *Union of Biochemistry and Molecular Biology Life* 65 (10): 863–72.
- Tapia, Lucia, Miriam Suazo, Christian Hödar, Veronica Cambiazo, y Mauricio Gonzalez. 2003. “Copper Exposure Modifies the Content and Distribution of Trace Metals in Mammalian Cultured Cells.” *Biometals* 16 (1): 169–74.
- Tejeda-Guzmán, Carlos, Abraham Rosas-Arellano, Thomas Kroll, Samuel Webb, Martha Barajas-Aceves, Beatriz Osorio, y Fanis Missirlis. 2018. “Biogenesis of Zinc Storage Granules in *Drosophila Melanogaster*.” *Journal of Experimental Biology* 221 (6): jeb168419.
- The Human Microbiome Project. 2012. “Structure , Function and Diversity of the Healthy Human Microbiome.” *Nature* 486 (7402): 207–14.
- Theil, Elizabeth C. 2011. “Iron Homeostasis and Nutritional Iron Deficiency.” *The Journal of Nutrition* 141 (4): 724S – 728S.
- Trinder, Mark, Brendan A Daisley, Josh S Dube, Gregor Reid, y Gil Sharon. 2017. “*Drosophila Melanogaster* as a High-Throughput Model for Host – Microbiota Interactions.” *Frontiers in Microbiology* 8 (8): 751.
- Turnbaugh, Peter J, Ruth E Ley, Michael A Mahowald, Vincent Magrini, Elaine R Mardis, y Jeffrey I Gordon. 2006. “An Obesity-Associated Gut Microbiome with Increased Capacity for Energy Harvest.” *Nature* 444 (7122): 1027–31.
- Wanderman, Cecile, y Philippe Delepelaire. 2004. “Bacterial Iron Sources: From Siderophores to Hemophores.” *Annual Review of Microbiology* 58: 611–47.

- Watterlot, Laurie, Omar Lakhdari, Luis G Bermu, Harry Sokol, Chantal Bridonneau, Jean-pierre Furet y Corinne Grangette. 2008. "Faecalibacterium Prausnitzii Is an Anti-Inflammatory Commensal Bacterium Identified by Gut Microbiota Analysis of Crohn Disease Patients." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105 (43): 16731–36.
- Whittaker, Paul. 1998. "Iron and Zinc Interactions in Humans." *The American Journal of Clinical Nutrition* 68 (2): 442–46.
- Wilsonl, Kenneth H, Rhonda B Blitchington, y Ronald C Greene. 1990. "Amplification of Bacterial 16S Ribosomal DNA with Polymerase Chain Reaction." *Journal of Clinical Microbiology* 28 (9): 1942–46.
- Winzerling, Joy J. 2010. "Insect Ferritins : Typical or Atypical ?" *Biochimica Et Biophysica Acta* 1800 (8): 824–33.
- Wong, Adam C N, Audrey S Vanhove, y Paula I Watnick. 2016. "The Interplay between Intestinal Bacteria and Host Metabolism in Health and Disease : Lessons from *Drosophila Melanogaster*." *Disease Models & Mechanisms* 9 (3): 271–81.
- Wong, Adam C-n, John M Chaston, y Angela E Douglas. 2013. "The Inconstant Gut Microbiota of *Drosophila* Species Revealed by 16S rRNA Gene Analysis." *The ISME Journal* 7 (10): 1922–32.
- World Health Organization. 2017. "Nutritional Anaemias: Tools for Effective Prevention and Control."