



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**MODELACIÓN COMPUTACIONAL METABÓLICA DE LA MICROBIOTA INTESTINAL
RELACIONADA A DIABETES TIPO 2**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias**

**PRESENTA:
JEAN PAUL SANCHEZ CASTAÑEDA**

**DR. OSBALDO RESENDIS ANTONIO
RAI-UNAM/ INMEGEN**

**DRA. MARÍA ELIZABETH TEJERO BARRERA
INMEGEN**

**Dr. RAFAEL PEÑA-MILLER
CCG-UNAM**

Ciudad de México. Marzo, 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

MODELACIÓN COMPUTACIONAL METABÓLICA DE LA MICROBIOTA INTESTINAL
RELACIONADA A DIABETES TIPO 2

por

Jean Paul Sánchez Castañeda

Instituto Nacional De Medicina Genómica (INMEGEN)

Tesis presentada para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

en

Posgrado de Ciencias Bioquímicas

Universidad Nacional Autónoma de México

Ciudad de México, México. Noviembre, 2021

Oficio de asignación de jurado



CGEP/PMDCB/1629/2021
Asunto: jurado de examen

SINODALES DESIGNADOS Presente

Estimado académico:

Los miembros del Subcomité Académico en reunión ordinaria de 20 de septiembre del presente año, conocieron la solicitud de asignación de **JURADO DE EXAMEN** para optar por el grado de **Maestría en Ciencias** del/la estudiante **Sánchez Castañeda Jean Paul**, con la tesis **"Modelación computacional metabólica de la microbiota intestinal relacionada a diabetes tipo 2"**, dirigida por el Dr. **Resendis Antonio Osbaldo**.

De su análisis se acordó nombrar el siguiente jurado en el que se encuentra usted incluido:

		Acepto		
PRESIDENTE	Aguilar Arnal Lorena	Si <input checked="" type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	<u>07/10/2021</u> fecha	 firma
VOCAL	Aldana González Maximino	Si <input type="checkbox"/> No <input checked="" type="checkbox"/>	<u>08/10/2021</u> fecha	 firma
VOCAL	Tovar Palacio Armando Roberto	Si <input checked="" type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	<u>16/10/21</u> fecha	 firma
VOCAL	Utrilla Carreri José	Si <input checked="" type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	<u>18/10/21</u> fecha	 firma
SECRETARIO	Encarnación Guevara Sergio Manuel	Si <input checked="" type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	<u>19/10/21</u> fecha	 firma

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA, HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 20 de septiembre de 2021
COORDINADORA

Dra. Claudia Lydia Treviño Santa Cruz

Contacto: mdcba@posgrado.unam.mx Tel. 55-5623-7006



Agradecimientos

Agradezco a la UNAM, por haberme aportado una formación valiosa y un espacio para desenvolverme en el ámbito científico a lado de grandes compañeros y profesionales de toda índole. En especial agradezco al programa de posgrado de Ciencias Bioquímicas por permitirme formar parte de esta gran comunidad universitaria.

También al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo otorgado durante estos 2 años, mediante el programa de becas del cual formé parte con el número: 1005702.

Agradezco al Instituto Nacional De Medicina Genómica (INMEGEN), por facilitarme un lugar de trabajo, equipo computacional y un espacio de convivencia científica.

Personalmente agradezco a:

A mis tutores Dr. Resendis, Dra. Tejero y el Dr. Peña-Miller del por su apoyo, motivación, y consejos durante estos años para impulsarme a realizar este proyecto, del cual me siento muy orgulloso.

A los miembros del jurado que revisaron y perfeccionaron este trabajo.

A mis compañeros del laboratorio de Genómica Computacional por todos los buenos momentos que pasamos, las risas, el compañerismo. Especialmente agradezco las enseñanzas que apoyaron la realización de este proyecto por parte de Estrella, César, Diego, Jorge, Giovanni y Aaron.

A mi familia que me dio continuamente su apoyo y compañía desde la distancia para cumplir con mis metas, dándome la oportunidad para mostrar de lo que soy capaz.

A mis amigos y amigas de todas partes de la república, que pese a la pandemia, supieron cómo mantenerse cerca de mí, creciendo mis ganas de conseguir ser una mejor persona cada día.

Índice de contenido

I. Índice de Figuras	VIII
II. Índice de Tablas	VIII
III. Resumen	IX
IV. Abstract	X
1. Introducción	1
1.1. La microbiota y su relación con la DM2	3
1.2. La biología de sistemas en el estudio de la microbiota intestinal y la DM2	6
1.3. Modelado basado en restricciones y Análisis de Balance de Flujos	7
1.4. Modelación <i>in silico</i> del metabolismo en microbioma empleando el <i>software</i> MICOM	10
1.4.1. Estudio <i>in silico</i> de las interacciones metabólicas microbianas	12
1.4.2. Intervenciones <i>in silico</i> de dieta y abundancias bacterianas	13
2. Justificación y contribución	15
2.1. Justificación	15
2.2. Contribución	15
3. Hipótesis	16
3.1 Hipótesis	16
4. Objetivos	
4.1 Objetivo General	17
4.1,1 Objetivos Particulares	17
5. Material y métodos	18

5.1. Estructura de datos	19
5.2. Modelado computacional del metabolismo en microbiota empleando MICOM	20
5.3. Inferencia de interacciones de cooperación y competencia en las comunidades bacterianas	21
5.4. Identificación del efecto de intervenciones univariadas y sus coeficientes de elasticidad	24
5.5. Flujos metabólicos de intercambio con el medio	24
5.5.1. Filtrado de datos y análisis estadísticos	25
6. Resultados y discusión	26
6.1. Identificación de las interacciones de cooperación y competencia en la ecología microbiana asociada con los estadios de salud/enfermedad relacionados a la DM2	27
6.1.1. Modelo de regresión logística multinomial de interacciones de cooperación y competencia en los estadios de salud/enfermedad relacionados a la DM2	31
6.1.2. Redes de interacción para géneros bacterianos relevantes según el modelo de regresión	34
6.2. Efectos de las intervenciones univariadas en los flujos de SFCA	37
6.3. Flujos de intercambio de SCFA presentan diferencias significativas entre grupos clínicos	39
6.4. Flujos netos de intercambio más significativos entre los grupos clínicos	41
6.4.1 Proyección 2D de flujos más significativos entre los grupos clínicos	44
6.5 Similitud del patrón de flujos de intercambio entre géneros bacterianos	45
7. Conclusiones y Perspectivas	47
7.1. Conclusiones	47
7.2. Perspectivas	49

Bibliografía	50
A. Coeficientes beta de modelo de regresión logística multinomial	57
B. Flujos relevantes estadísticamente	60

I. Índice de Figuras

1.1.	Pérdida de géneros bacterianos productores de butirato en 3 poblaciones	4
1.3.	Pasos y resultados en la realización de un FBA	8
1.4.	Análisis y resultados generados por MICOM	12
5.	Resumen global metodológico	18
5.1.	Distribución de individuos	19
5.2.	Resumen metodológico de MICOM	21
5.3	Construcción de modelo de regresión logística a partir de bloques	23
6.1	Redes de interacciones bacterianas para sanos, diabéticos y prediabéticos	29
6.2	Mapa de calor para matriz confusora	32
6.3	Redes de interacción de géneros bacterianos significativos por filos	36
6.4	Mapa de calor para intervenciones univariadas <i>in silico</i>	38
6.5	Gráficos de caja para los flujos de SCFA de intercambio con el medio	40
6.6	Gráficos de caja seleccionados por su alta significancia estadística	43
6.7	Reducción dimensional para los flujos de intercambio neto más relevantes relacionados a los diferentes estadios	45
6.8	Reducción dimensional para géneros bacterianos por sus flujos de intercambio con el medio	46

II. Índice de Tablas

6.1	Número de interacciones en la figura 7	30
6.2	Coefficientes beta significativos principales	34
A-1.	Coefficientes beta significativos para el modelo de regresión	57
B-1.	Flujos relevantes estadísticamente	60

MODELACIÓN COMPUTACIONAL METABÓLICA DE LA MICROBIOTA INTESTINAL RELACIONADA A DIABETES TIPO 2

por

Jean Paul Sánchez Castañeda

III. Resumen

En los últimos años se ha observado un aumento en los casos de diabetes mellitus tipo 2 (DM2) a nivel mundial, de los cuales México es uno de los países con mayor incidencia. Por esta razón se buscan nuevas estrategias para el seguimiento y tratamiento para diabetes tipo 2. Para ello se plantea entender la enfermedad desde varios enfoques, uno de ellos es a partir de la microbiota intestinal la cual se ha evidenciado su cambio en composición taxonómica, sus abundancias relativas y funciones bioquímicas. Diversas estrategias se han planteado para entender los cambios que sufre la microbiota intestinal durante el progreso de la diabetes mellitus tipo 2, de los que sobresalen estudios de asociación entre datos ómicos, variables clínicas y abundancias de especies microbianas. Sin embargo, a pesar de estos hallazgos, aún se desconocen los efectos metabólicos de estos cambios en la microbiota. En esta tesis proponemos un análisis *in silico* de la actividad metabólica de la microbiota en pacientes con distintos avances de la DM2. Nuestro análisis computacional parte de la reconstrucción *in silico* de varios organismos de la comunidad microbiana y sus abundancias relativas obtenidas a partir de tecnologías de secuenciación 16S o metagenoma para pacientes con normoglucemia, prediabetes y DM2. Esta estrategia de biología de sistemas constituye una plataforma cuantitativa y atractiva para crear hipótesis sobre el comportamiento metabólico de la microbiota intestinal, identificar sus diferencias y sugerir potenciales marcadores de bacterias y metabolitos en la DM2. En este contexto, este proyecto identificó diferencias significativas entre grupos en los perfiles de producción de ácidos grasos de cadena corta, además de 188 metabolitos con diferencias significativas entre ellos la melibiosa y el R-pantotenato. Además se encontró que las interacciones *in silico* significativas de cooperatividad y competitividad

que ocurren entre géneros del mismo filo, únicamente suceden entre los *Firmicutes*. Se identificó que la microbiota sana muestra una mayor resiliencia tanto a cambios nutrimentales, como de la composición de la microbiota.

IV. Abstract

In recent years, an increase in cases of type 2 diabetes mellitus (DM2) has been observed worldwide, where Mexico is one of the countries with the highest incidence. For this reason, new strategies were created for the monitoring and treatment of type 2 diabetes. For this, it is proposed to understand the disease from various approaches, one of them is from the intestinal microbiota; which has shown changes in taxonomic composition, its relative abundances, and biochemical functions. Various strategies have been proposed to understand the changes that intestinal microbiota undergoes during the progression of type 2 diabetes mellitus, of which stand out the association studies between omic data, clinical variables, and abundances of microbial species. However, despite these findings, the metabolic effects of these changes in the microbiota remain unknown. In this thesis, we propose an *in silico* analysis of the metabolic activity of the microbiota in patients with different advances in DM2. Our computational analysis required *in silico* reconstruction of several organisms of the microbial community and their relative abundances obtained from 16S sequencing technologies or metagenome for patients with normoglycemia, prediabetes, and DM2. This systems biology strategy constitutes an attractive quantitative approach to create hypotheses about the metabolic behavior of the intestinal microbiota, identify its differences, and suggest potential bacterial and metabolic markers in T2DM. In this context, this project identified significant differences between groups in the production profiles of short-chain fatty acids, in addition to 188 metabolites with significant differences between melibiose and R-pantothenate. In addition, cooperative and competitive interactions in the same phylum were found statically significant, just for Firmicutes. It was identified that the healthy microbiota shows greater resilience both to nutritional changes and to the composition of the microbiota.

Capítulo 1

Introducción

Existen tres tipos de diabetes, diabetes mellitus tipo 1 (DM1), la mellitus tipo 2 (DM2), y gestacional. La DM2 es el tipo más común y representa más del 90% de todos los casos a nivel mundial ^{1,2}. Además, la DM2 es una enfermedad que, en todo el mundo, ha incrementado el número de sus incidencias durante los últimos 20 años ³. En este sentido, México es un país con una de las mayores tasas de incidencia de DM2. En los últimos años se ha mostrado un crecimiento alarmante de este padecimiento debido a diferentes factores como una dieta alta en grasas y carbohidratos, obesidad, sedentarismo y factores genéticos ⁴.

Desde el punto de vista fisiológico, la DM2 se caracteriza por una desregulación del metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas que surge de una reducción en la secreción de insulina, resistencia a la insulina, o ambas. La fase prediabética es posible caracterizarla mediante valores clínicos como: los niveles alterados de glucosa en ayunas (IFG), tolerancia alterada de glucosa (IGT), ambos (IFG + IGT), o niveles elevados de hemoglobina glicosilada A1c (HbA1c)⁵. La condición clínica, la fisiopatología subyacente y la progresión de la enfermedad en individuos con diabetes pueden variar considerablemente entre los individuos y, en ocasiones, la presentación atípica de los síntomas puede dificultar la identificación clara de la DM2 ⁶. En este contexto, el uso de nuevos biomarcadores para diagnosticar este padecimiento resulta una herramienta relevante. Ejemplo de esto es el uso de la microbiota intestinal (taxones característicos) como un posible biomarcador, ya que existe evidencia que vincula esta patología con disbiosis funcionales microbianas y la composición alterada de la microbiota intestinal ^{7,8}. Por otra parte, es posible obtener a partir de la microbiota algunos otros biomarcadores como los metabolitos producidos por la misma ⁹⁻¹¹. Respecto a la microbiota intestinal, se conocen algunos metabolitos que tienen efectos conocidos y propuestos, sobre el estado de salud/bienestar de los individuos. Un ejemplo clásico son los ácidos grasos de

cadena corta (SCFA) de los cuales, su producción por la microbiota intestinal se ha visto asociada en diferentes enfermedades entre las que se encuentran la enfermedad del intestino irritable y la DM2; de este modo es que se ha llegado a sugerir su uso como biomarcador para dichas enfermedades ^{12,13}. Sin embargo, el estudio del efecto de la microbiota y su capacidad de producción de metabolitos, se ha centrado en sus capacidades genéticas, más allá que de sus actividades metabólicas ¹⁴. Por este motivo es necesario el uso de nuevas estrategias que permitan entender los mecanismos y actividades que se llevan a cabo dentro de la microbiota intestinal. Existen algunas aproximaciones, tanto experimentales como *in silico*, para abordar el estudio de los flujos metabólicos de intercambio dentro una comunidad bacteriana como es la microbiota intestinal ¹⁵. Es posible realizar un abordaje experimental a partir de estudios fluxomicos mediante marcaje isotópico, sin embargo, está sujeto a limitaciones en cuanto al cultivo de bacterias fuera de las condiciones del medio original ¹⁶. Lo cual podría ser la causa de no haber sido una estrategia tomada hasta la fecha para el estudio de una comunidad bacteriana compleja ¹⁵ relacionada a una patología como la DM2. Otra estrategia, que resulta atractiva es el modelado metabólico de comunidades a escalas realistas en diversidad microbiana ¹⁴. Este método de la biología de sistemas permite generar hipótesis con resultados prometedores del comportamiento metabólico de grupos bacterianos en condiciones específicas; a partir de información experimental como las abundancias relativas bacterianas ¹⁷, como se describe más adelante. Con la finalidad de hipotetizar sobre el comportamiento metabólico de la microbiota intestinal, no solo en cuanto a sus flujos de intercambio en el medio modelado, sino también las interacciones metabólicas que existen entre los miembros de la comunidad bacteriana; es que se decidió utilizar esta estrategia *in silico* para la realización de este proyecto. Para ello se decidió emplear un *software* de modelado específico, llamado MICOM, el cual además de poder modelar el metabolismo de la microbiota a escala realista de diversidad, también incluye otras herramientas que permiten explorar las interacciones metabólicas que existen entre las bacterias, y los efectos puntuales que podrían llegar a tener las modificaciones del medio (dieta del individuo) o modificaciones en la abundancia de ciertos integrantes de la microbiota ¹⁴. Aprovechando lo anterior, este proyecto buscó generar hipótesis que ayuden a entender las actividades metabólicas dentro de la

microbiota en la DM2, la cual hasta la fecha, ha sido escasamente abordada a partir del modelado metabólico ^{14,18}. De esta manera, se espera que esta tesis permita el fomento de la exploración en el entendimiento de la DM2, el uso de herramientas *in silico* para crear hipótesis y facilitar el diseño experimental guiado.

1.1. La microbiota y su relación con la DM2

La microbiota humana se encuentra formada por microorganismos que colonizan tanto mucosas como piel, y que superan en número a las células somáticas en el cuerpo ¹⁹. La microbiota intestinal humana es una de las microbiotas más ampliamente estudiadas, ya que es de extrema importancia en el mantenimiento de la salud, donde cambios como la disbiosis se asocia al desarrollo de enfermedades. Se ha reportado que ciertas alteraciones en la microbiota intestinal están asociadas con una variedad de afecciones médicas como la enfermedad de Crohn, obesidad, diabetes y cáncer ²⁰. Sin embargo, la microbiota está sometida a una variación constante de sus taxones y abundancias, llegando a ser un equilibrio dinámico ^{21,22}. Debido a este comportamiento dinámico, resulta todo un reto identificar biomarcadores en la microbiota intestinal, asociados a un estado de enfermedad.

Varios estudios han demostrado una amplia gama de asociaciones entre la microbiota intestinal y la DM2 en cohortes chinas, europeas y americanas ^{23,24}. Por otra parte, en el caso de los estados prediabéticos caracterizados por glucosa alterada en ayunas (IFG), tolerancia alterada de glucosa (IGT), o ambos; se ha visto que también existen cambios composicionales y posiblemente funcionales de la microbiota intestinal ²⁵. Algunas de estas investigaciones de forma general sugieren que la microbiota intestinal en individuos con DM2 es menos eficiente en la producción de SCFA debido a la pérdida de bacterias productoras de estos metabolitos ^{26,27}. Sin embargo, este hallazgo no siempre se observa en individuos con DM2, para los mismos metabolitos. Estudios realizados en poblaciones en distinto contexto geográfico indican que los géneros bacterianos que se encuentran asociados con la DM2 varían apoyando la observación de que existe una heterogeneidad en la microbiota intestinal entre poblaciones

separadas geográficamente ²⁸. Este último hecho podría explicar por qué se observa una disparidad entre los resultados en cuanto a la pérdida de taxones productores de SCFA de la microbiota intestinal, asociados a individuos de diferentes países con DM2, donde se ha visto que los taxones son distintos (Fig. 1) ^{23, 7}.

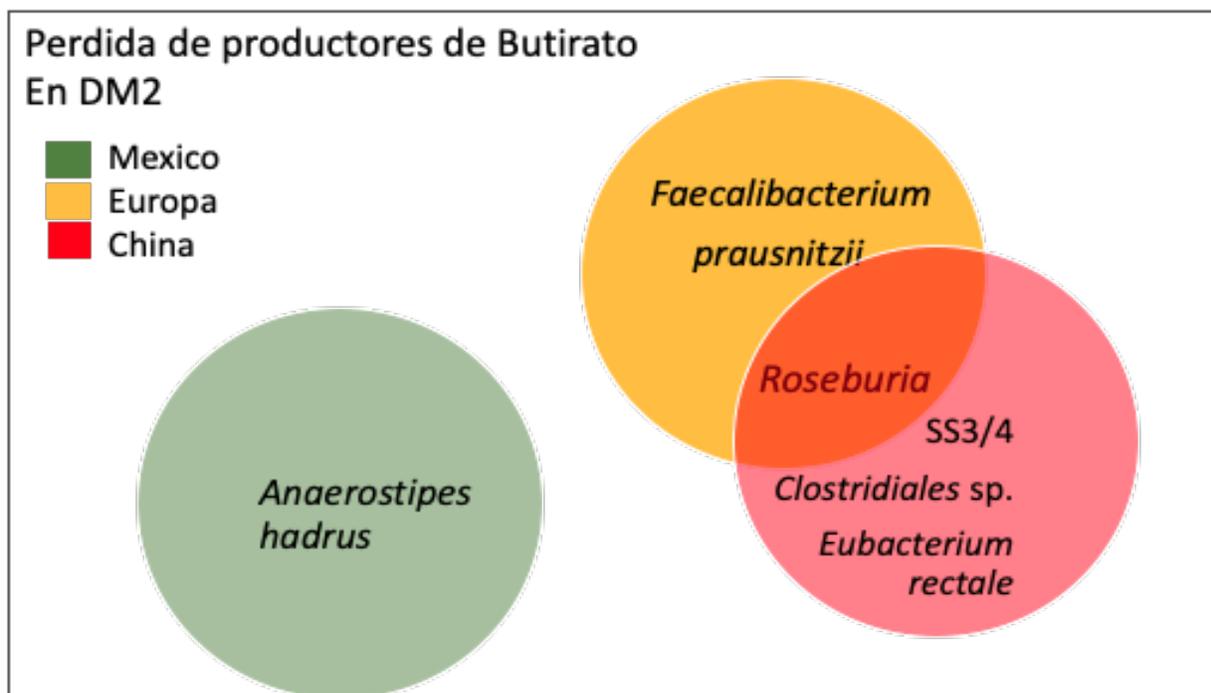


Figura 1. Diferencias entre la pérdida de especies bacterianas productoras de SCFA de la microbiota intestinal, asociadas a individuos con DM2, en diferentes poblaciones ^{7,23,29}.

Además de la correlación negativa en la producción de los SCFA con la DM2, también existen metabolitos que tienen una correlación asociados con la efectividad de los tratamientos. Tal es el caso de los fenoles, donde se ha visto que productos ricos en compuestos fenólicos (Por ej. el aceite de oliva extra virgen) mejoran el control metabólico en individuos con DM2 ³⁰. Es probable que la capacidad de la microbiota intestinal de producir fenoles se vea asociada con un estado de salud y la ausencia de DM2. Por otra parte, estudios recientes revelan que también las bacterias degradadoras de mucina, como *Akkermansia muciniphila*, juegan un papel importante en la DM2 debido a que su presencia mejora la función hepática, reduce la inflamación, alivia el estrés oxidativo, entre otras funciones benéficas ³¹. Se ha visto que la degradación de mucina,

por *A. muciniphila* conduce a un aumento de las uniones estrechas y la secreción de mucina por las células caliciformes productoras de mucina en el epitelio intestinal; lo que engrosa la capa de mucina; mediante una posible regulación post-transcripcional^{31–33}. Estudios han encontrado que la disminución en abundancia de *A. muciniphila* está asociada con una alteración de la secreción de insulina, DM2 sin tratar, con obesidad e hipertensión^{34–37}. Lo anterior da evidencia de la existencia de una gama distinta de funciones bacterianas y comunitarias que afectan al hospedero y su abundancia se asocia al progreso de la DM2. Apoyando esa idea, recientemente se han reportado una serie de otros metabolitos producidos por la microbiota que han sido correlacionados con la DM2. Tal es el caso del sulfuro de hidrógeno (H₂S), el tiosulfato y N-óxido de trimetilamina (TMAO) entre otros^{38–40}. Así, se ha encontrado que algunas bacterias sulfuro-reductoras, como *Desulfovibrio piger*, están enriquecidas en la DM2. Además, se ha asociado significativamente bacterias reductoras de sulfato en el modelo murino de síndrome metabólico y en animales con una dieta alta en grasas⁴¹. El H₂S generado por bacterias reductoras de sulfato, influye en varios sistemas biológicos, incluidos los sistemas endocrino, cardiovascular y nervioso. El H₂S activa directamente la secreción del péptido 1 similar al glucagón (GLP-1) y aumenta los taxones reductores de sulfato. Notablemente, se ha visto esta producción de H₂S como una parte intrínseca de la patogenia de la DM2 en Africanos⁴⁰.

Estos enfoques han sido cualitativos en cuanto al comportamiento metabólico hipotetizado para la microbiota, ya que la presencia de genes metabólicos en la microbiota no garantiza su expresión ni un cambio en la reacción bioquímica asociada. Una estrategia para incrementar la certeza del estado metabólico de la microbiota es la medición directa de los flujos mediante el marcaje de carbono o nitrógeno⁴². Las limitantes de esta tecnología es que es costosa, aún está en desarrollo para el estudio de comunidades bacterianas, y las condiciones de cultivo difieren con las que se tienen *in situ*; esto se refleja en los pocos estudios de este tipo, y la falta de ellos para la DM2^{14,43,44}. Una alternativa es el uso de herramientas de biología de sistemas; que permiten un abordaje teórico sobre el fenotipo metabólico de la microbiota, creando hipótesis al tomar en cuenta un gran conjunto de datos.

1.2. La biología de sistemas en el estudio de la microbiota intestinal y la DM2

Entender las complejas interacciones y mecanismos metabólicos que llevan a cabo la microbiota intestinal en el desarrollo y tratamiento de DM2 resulta necesario para un posterior desarrollo de estrategias que permitan la prevención y diseño de tratamientos o coadyuvantes. En este contexto, la biología de sistemas es un formalismo adecuado para entender las interacciones y mecanismos metabólicos de la microbiota intestinal. Su formalismo integra el análisis de datos masivos ómicos, e inclusive el modelado del metabolismo en comunidades microbianas como es la microbiota intestinal.

Existen estudios donde se ha implementado el uso de herramientas de biología de sistemas para el estudio de la microbiota intestinal en padecimientos como el síndrome de intestino irritable, la obesidad, y la DM2, principalmente empleando datos ómicos ^{40,45}. Notablemente, dichos estudios han identificado y resaltado algunos genes de la microbiota relacionados con funciones particulares y los han correlacionado con estados de salud y enfermedad ^{14,46–48}. Una estrategia complementaria es el modelado metabólico *in silico*, el cual permite obtener hipótesis sobre el fenotipo de comunidades bacterianas así como de cada uno de sus miembros. Esto lo realiza al estimar los flujos metabólicos de una bacteria o una comunidad microbiana utilizando modelos metabólicos a escala genómica, restricciones asociadas a mecanismos enzimáticos, y algoritmos de optimización computacional ^{49,50}. Esta estrategia permite cuantificar las alteraciones metabólicas de la comunidad microbiana que pueden generar un cambio de los metabolitos disponibles en el lumen intestinal de su hospedero, al utilizar modelos computacionales que proponen flujos metabólicos en las redes bioquímicas ²⁹. En bacterias individuales, el modelado metabólico mediante el análisis de balance de flujo (FBA), es comúnmente utilizado como herramienta en la ingeniería de vías metabólicas. El FBA ha demostrado ser una herramienta valiosa para explorar sus respectivas capacidades metabólicas y se ha utilizado exitosamente en la investigación básica ^{49,50}.

1.3. Modelado basado en restricciones y Análisis de Balance de Flujos

Entre los posibles paradigmas para explorar la actividad metabólica en microbiota se encuentran los modelos basados en restricciones. Estos son de gran interés para inferir la actividad metabólica en microorganismos integrando modelos metabólicos a escala genómica. Recientemente, estos modelos se han aplicado para evaluar la actividad metabólica en microbiota con resultados interesantes para contribuir a la interpretación y posible control del metabolismo bacteriano ^{51,52}.

Los análisis basados en restricciones de redes metabólicas han ganado una popularidad considerable para simular el metabolismo celular, de los cuales el Análisis de Balance de Flujos (FBA) es el más utilizado. La realización de un FBA implica cuatro pasos: reconstrucción de una red metabólica, representación matemática de las estequiometrias de las reacciones con balance en carga y masa, definición de la función objetivo (OF), y la optimización de la OF con adición de restricciones enzimáticas y termodinámicas (Figura 2).

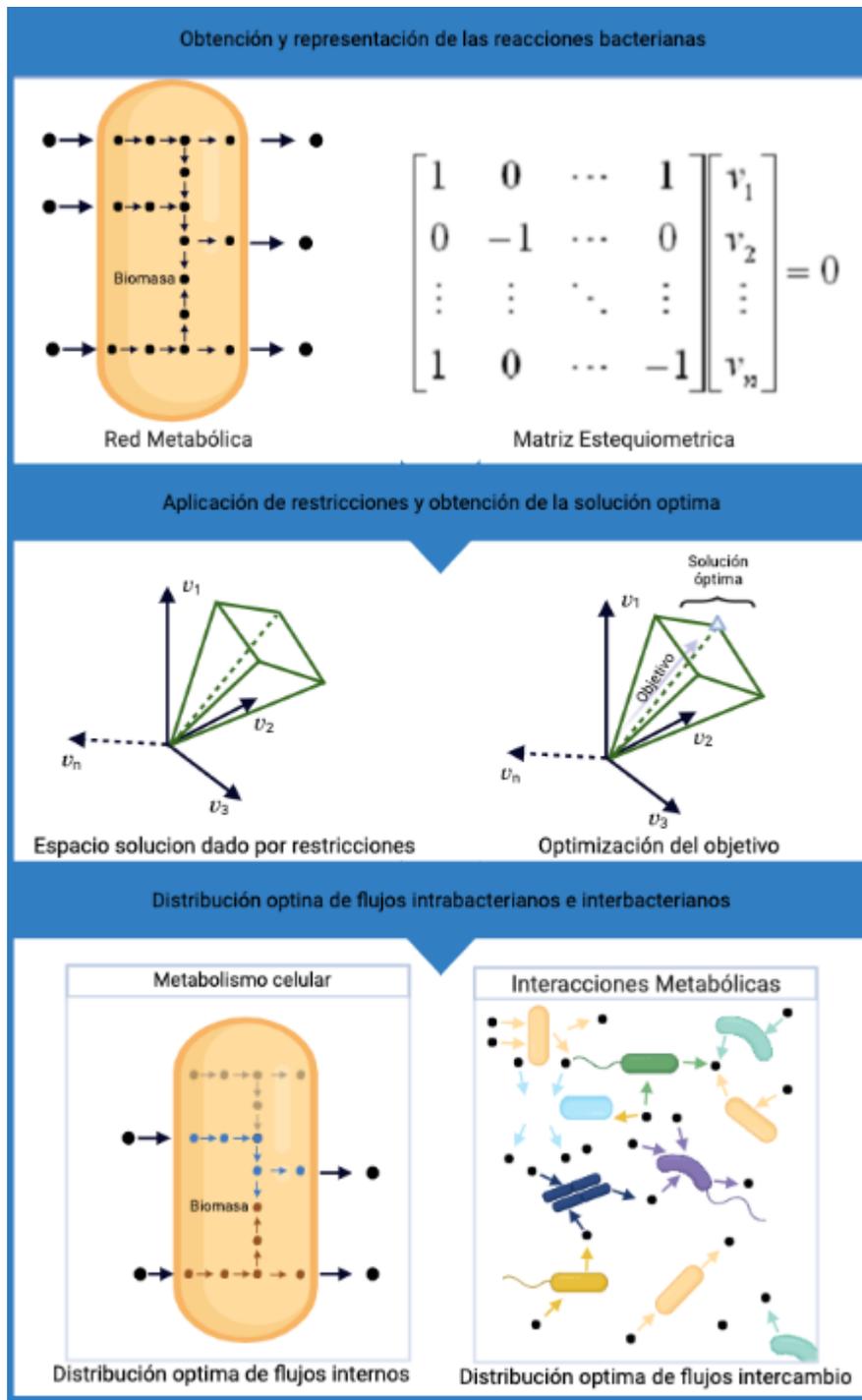


Figura 2. Proceso global en la realización de un FBA. En los primeros 2 rectángulos superiores se muestra de arriba a abajo y de izquierda a derecha los 4 pasos generales a realizar, para la obtención de la distribución de flujos resultante mostrada en el rectángulo inferior.

En el FBA, la aproximación de flujos se realiza a partir de un modelo metabólico a escala del genoma que contiene todas las reacciones bioquímicas conocidas del organismo u organismos (ej. comunidades bacterianas o microbiota intestinal). Para definir el sistema, cada una de las reacciones bioquímicas y de transporte del modelo biológico se identifican por medio de las enzimas o transportadores de membrana y genes correspondientes, que tipo de reacción llevan a cabo, su reversibilidad, los metabolitos involucrados, así como la compartimentación ⁵³. Posteriormente estas reacciones y sus correspondientes estequiometrias se representarán con un formalismo matemático mediante una matriz estequiométrica que permitirá el uso de herramientas informáticas para la resolución de la OF. La función objetivo, puede representar la producción de uno o varios metabolitos, que mediante su optimización lineal, determina la distribución del flujo de reacción de estado estacionario en una red metabólica. La optimización de la OF se basa en la premisa de las presiones de selección durante la evolución que guían los sistemas hacia la optimización, por lo tanto el sistema biológico modelado se desempeña de manera óptima con respecto a una función metabólica; usualmente la producción de biomasa, que se representa como la generación de macromoléculas específicas para cada célula (los bloques de construcción que se utilizan para generarlos), y por ende son necesarias para la proliferación celular ^{54,55,56}. Elegir la OF para la maximización del crecimiento o biomasa permite predicciones consistentes con las observaciones experimentales. Otras funciones objetivos incluyen: la minimización de la producción de ATP, que resulta útil para determinar las condiciones de eficiencia energética metabólica óptima; minimización de la absorción de nutrientes y/o maximización de producción de un metabolito deseado, esto empleado para la optimizar la producción de compuestos químicos. Los resultados posibles (espacio solución) tras la optimización de funciones objetivo se reducen mediante la implementación de restricciones. En general, para reflejar las condiciones enzimáticas, termodinámicas y ambientales, existen 4 tipos de restricciones: físico-químicas, restricciones espaciales o topológicas, restricciones ambientales dependientes de la condición, y regulatorias ⁵⁶⁻⁵⁸. Una vez que se define la OF y se asume que el sistema está en estado estacionario, el sistema de ecuaciones se resuelve con el conjunto de

restricciones de balance de masa. Esta distribución de flujo sugiere las capacidades metabólicas presentes en el sistema ^{50,56}.

Para la realización del FBA se puede utilizar una variedad de herramientas para la optimización como son COBRA *Toolbox* (*constraints-based reconstruction - Toolbox*), SNA, OptCom, BacArena, y MICOM para comunidades bacterianas a escala realista ^{14,59–62}.

1.4. Modelación *in silico* del metabolismo en microbioma empleando el software MICOM

Uno de los retos actuales en el área de la Biología de sistemas es la inferencia de la actividad metabólica en comunidades bacterianas en el intestino. Con la finalidad de contribuir a este objetivo, se han planteado en la literatura algunas propuestas, entre estas MICOM (Microbial Community), un software desarrollado en nuestro grupo de trabajo. Micom permite construir un modelo de comunidad a partir de una lista de modelos hechos en COBRA previamente curados y dispuestos en la base de datos AGORA (*assembly of gut organisms through reconstruction and analysis*). De forma breve, MICOM calcula los flujos de intercambio entre bacterias con el medio ambiente definido por la dieta, mediante FBA. Esto lo realiza partiendo de las abundancias bacterianas y, por lo tanto, es compatible tanto con datos experimentales de secuenciación del gen marcador ribosomal ARNr 16S, como con secuenciación shotgun. Además, mediante una variedad de algoritmos permite una optimización compensatoria (compensación cooperativa) que modela el equilibrio entre la maximización de la tasa de crecimiento individual y los objetivos cooperativos de la comunidad, esto con la finalidad de obtener un comportamiento realista y en cuanto a las velocidades de crecimiento bacterianas.

Micom parte de varias suposiciones para inferir tasas de crecimiento y flujos en una comunidad microbiana, las cuales son:

1. Las tasas de crecimiento y las abundancias relativas en la comunidad se mantienen estables.

2. La mayoría de los taxones que están presentes en una muestra biológica deberían poder crecer (tener una tasa de crecimiento mayor a 0).
3. Las abundancias relativas de ADN se pueden utilizar como una aproximación al peso seco de los taxones bacterianos.

La extensión de FBA a las comunidades microbianas ha sido un desafío debido a la necesidad de modelar los intercambios metabólicos entre bacterias y sugerir una función objetivo adecuada para imitar el crecimiento de toda la comunidad y de especies bacterianas individuales ¹⁴.

Las restricciones implementadas en MICOM, como la dieta (restricción ambiental) y las abundancias de especies microbianas, son necesarias para el modelado de la comunidad. Las restricciones implementadas en MICOM también han sido utilizadas en otros softwares similares como SteadyCom ^{14,63}. Estas restricciones se aplican a todos los problemas de optimización en MICOM y se denominan "limitaciones de la comunidad".

Micom además de permitir obtener los flujos metabólicos óptimos, también permite que a partir de estos flujos se realicen análisis útiles como son la identificación de relaciones de competitividad y cooperatividad, y el análisis de elasticidades ¹⁴ (Figura 3).

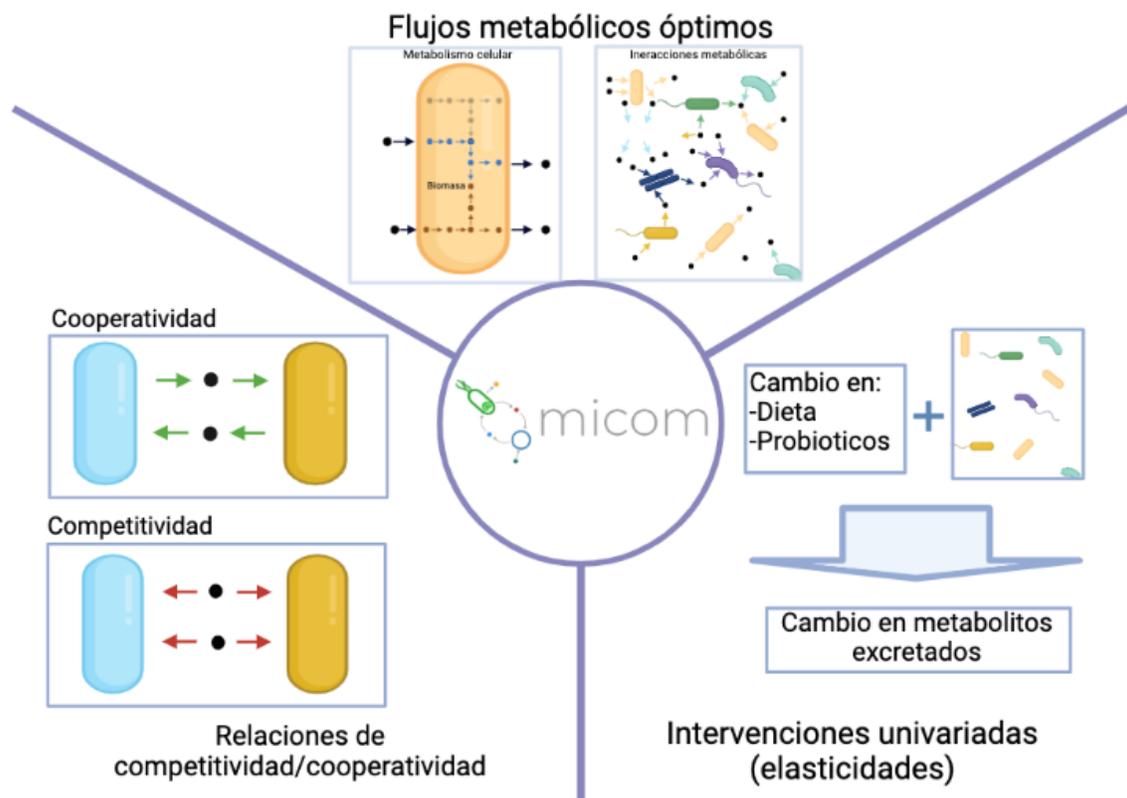


Figura 3. Análisis y resultados generados con MICOM. En la parte superior se muestra la distribución de flujos óptimos por bacteria y en comunidad bacteriana, el cual es el resultado principal y que sirve como base para el resto de análisis. En la parte inferior derecha se muestran las variables de partida necesarias para identificar los cambios en perfiles de excreción metabólica de comunidades bacterianas. En la parte inferior izquierda se muestra el tipo de interacciones metabólicas que puede identificar MICOM a partir de los metabolitos compartidos en el medio.

1.4.1. Estudio *in silico* de las interacciones metabólicas microbianas

Las interacciones entre los miembros de una comunidad bacteriana son complejas y difíciles de describir para cada caso concreto. Una manera de proponer teóricamente la dependencia del crecimiento de una bacteria de la presencia de otras bacterias es a partir de realizar eliminación de taxones o *knockouts in silico* presentes en la comunidad bacteriana. Donde se realiza para cada taxón individual en una comunidad bacteriana y se observa cómo esto cambia las tasas de crecimiento de otras bacterias. Existen 2 tipos de interacciones asociadas a dichos cambios, por una parte un comportamiento cooperativo y por otra un comportamiento competitivo. Si la eliminación de una bacteria

aumenta el crecimiento de otra, esto indica competitividad, mientras que una tasa de crecimiento disminuida indica cooperatividad. Este tipo de intervenciones *In silico* se pueden realizar empleando MICOM, para ello, después de eliminar un OTU bacteriano realiza un proceso de optimización mediante una compensación cooperativa, para obtener una única solución en cada caso. Este tipo de intervenciones teóricas se han realizado en diferentes estudios, y se ha visto que las especies dentro de las comunidades con mayor cantidad de interacciones cooperativas, existe menos superposición de recursos. Mientras que en las interacciones de tipo competitiva existe la múltiple requerimiento de los recursos compartidos^{64,65}. Este tipo de simulaciones han mostrado que, si bien, las comunidades competitivas pueden resistir mejor la invasión de especies, estas son menos robustas al cambio de nutrientes. En contraposición, las comunidades cooperativas son susceptibles a la invasión de especies pero resistentes al cambio de nutrientes en el medio^{65,66}. Notablemente, estudios previos han identificado comportamientos interesantes, respecto a la microbiota intestinal de la DM2. Por ejemplo, muchos de los géneros bacterianos con un mayor número de interacciones, son aquellos que anteriormente se habían visto asociados con la salud o enfermedad intestinal, como *Anaerostipes*, *Blautia*, *Escherichia* y *Eubacterium*¹⁴. Este tipo de intervenciones podrían sugerir las diferentes dinámicas que existen entre miembros de la microbiota intestinal y de esta manera estudiar su asociación en padecimientos como la DM2. Además se podrá identificar a los miembros con una mayor cantidad de interacciones con los demás miembros de la microbiota, para proponer intervenciones que restauren la dinámica de una microbiota sana.

1.4.2. Intervenciones *in silico* de dieta y abundancias bacterianas

Las intervenciones univariadas particulares, que consisten aumentar la disponibilidad de un solo metabolito en la dieta o aumentar la abundancia de un solo género bacteriano a la vez, son cuantificadas mediante el uso de coeficientes de elasticidad (elasticidades) que son medidas adimensionales de cuán fuertemente afecta un parámetro a un flujo metabólico dado^{67,68}. Un alto coeficiente de elasticidad, implica que esa intervención genera un gran aumento o decremento del flujo metabólico

seleccionado, dependiendo de la dirección del cambio. Por otro lado, valores cercanos a cero para el coeficiente de elasticidad, hablan de la robustez del sistema ante las intervenciones dadas. En algunos casos, como en el diseño de tratamientos, dietas o probióticos; se tiene interés en probar ciertas estrategias puntuales de intervención en nuestros modelos. Específicamente, en la modificación de los flujos de exportación de la microbiota al medio ambiente. Para ello MICOM a partir de las elasticidades ofrece principalmente información con respecto a:

- El impacto que tiene el cambio de la abundancia de bacterias en los intercambios.
- Como se ven modificados los intercambios al modificar los flujos relacionados a la dieta.

De igual manera que en los *knockouts In silico*, después de generar estas intervenciones, se realiza una optimización con compensación cooperativa. Este tipo de intervenciones pueden ser útiles cuando se busca un medio para, por ejemplo, aumentar la producción de algún metabolito de interés que tenga la capacidad de mejorar los perfiles metabólicos de individuos con DM2, como puede ser el butirato.

Los efectos más fuertes y más comúnmente observados en estudios previos de microbiota relacionada a DM2 fue la disminución en la producción general de SCFA ⁶⁹.

En estudios previos se ha visto que las muestras de individuos sanos presentan coeficientes de elasticidad más bajos que las dos muestras de diabetes tipo 2, lo que puede interpretarse como una robustez a los cambios. Lo cual indica que es factible emplear este tipo de herramientas para la modificación del comportamiento metabólico de la microbiota de individuos con DM2, con una menor robustez a intervenciones ¹⁴.

En este contexto, este trabajo de tesis se enfoca en la caracterización teórica del comportamiento metabólico de comunidades microbianas asociadas a DM2. Con este fin se implementará una serie de métodos de modelos basados en restricciones para el metabolismo en comunidades de bacterias y crear hipótesis sobre los posibles flujos de exportación de la microbiota en una cohorte de individuos diabéticos mexicanos. Este proyecto, representa un punto de partida valioso para el diseño de experimentos de validación, identificación de biomarcadores y desarrollo de estrategias de modificación de microbiota intestinal con fines terapéuticos en DM2.

Capítulo 2

Justificación y contribución

2.1. Justificación

Debido a que los casos de diabetes mellitus tipo 2 (DM2) son cada vez más comunes en todo el mundo, siendo en México la segunda causa de mortalidad, es importante entender las modificaciones metabólicas en la microbiota intestinal de individuos con distinto avance de la DM2 ⁷⁰. La implementación de métodos de biología de sistemas permitirá caracterizar sus alteraciones y en un futuro diseñar biomarcadores metabólicos o tratamientos de mayor efectividad en población mexicana.

2.2. Contribución

Este proyecto busca identificar funciones metabólicas de la microbiota intestinal de individuos mexicanos diagnosticados con DM2, lo que permitirá formular estrategias experimentales para la identificación de biomarcadores metabólicos y el diseño de modificación de las abundancias y/o interacciones metabólicas microbianas para el tratamiento de DM2.

Capítulo 3

Hipótesis

3.1. Hipótesis

Mediante un modelado metabólico *in silico* de la microbiota intestinal proveniente de una cohorte estratificada en individuos sanos, con prediabetes y diabetes, se podrán identificar diferencias significativas entre la actividad metabólica asociada a la microbiota intestinal. Además de reproducir aspectos generales tales como la disminución en la producción de ácidos grasos de cadena corta (SCFA), nuestro análisis permitirá identificar posibles mecanismos metabólicos y biomarcadores relacionados al progreso de la enfermedad.

Capítulo 4

Objetivos

4.1. Objetivo General

- ❖ Caracterizar e inferir las actividades metabólicas entre microbiota intestinal en individuos con diferentes estadios de la diabetes tipo 2 (sanos, con prediabetes, y con DM2) a partir de un modelo *in silico* del metabolismo de comunidades bacterianas.

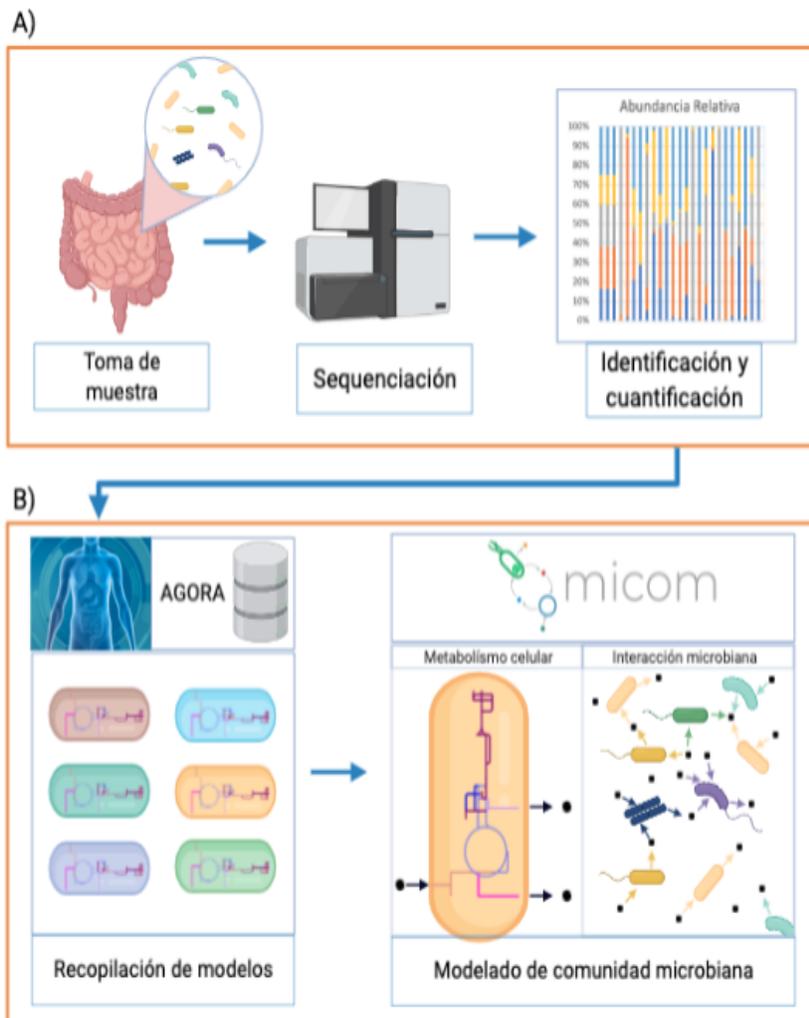
4.1.1 Objetivos particulares

- ❖ Realizar un modelado basado en restricciones de las comunidades bacterianas presentes en las muestras para cada estadio de DM2, utilizando el software “MICOM”.
- ❖ Identificar los metabolitos de exportación de las comunidades bacterianas hacia el lumen intestinal, así como las interacciones entre la microbiota, mediante modelado computacional.
- ❖ Evaluar los resultados en base a reportes en la literatura.
- ❖ Proponer algunos biomarcadores para el progreso de la DM2 en población Mexicana.

Capítulo 5

Material y métodos

Durante el desarrollo de este trabajo de investigación se requirió un conjunto de pasos secuenciales que inician en la toma de muestra y secuenciación (Figura 4A), que fué parte de un estudio de asociación de nuestro grupo de laboratorio. Por último, se realizó el modelado metabólico de comunidades microbianas (Figura 4B) y análisis posteriores, lo cual es lo que aporta esta tesis; los scripts y datos empleados se encuentran en: <https://github.com/resendilab/MICOM-MEX-Diabetes/>



5.1. Estructura de datos

Las muestras de microbiota fecal provienen de 402 individuos del estado de Guanajuato, México; sin diagnóstico previo de diabetes, que se clasifican en los siguiente grupos: Tolerancia normal a glucosa (NT), individuos con DM2; con prediabetes, glucosa alterada en ayunas (IFG), tolerancia alterada de glucosa (IGT), ambos (IFG+IGT). Adicionalmente se tienen 25 individuos con DM2 y antecedentes de tratamiento con metformina (los cuales fueron excluidos del modelado). Estos datos fueron generados por el grupo de Biología de Sistemas perteneciente a RAI-UNAM, INMEGEN y la Universidad de Guanajuato; y actualmente se encuentran publicados en el artículo *“Progressive shifts in the gut microbiome reflect prediabetes and diabetes development in a treatment-naive Mexican cohort”* <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.602326>⁷¹. En este artículo se menciona que el protocolo de estudio fue revisado y aprobado por el Consejo de Investigaciones de la Universidad de Guanajuato. Todos los participantes proporcionaron su consentimiento informado por escrito para participar en este estudio. La distribución de los individuos en los grupos se muestra en la figura 5:

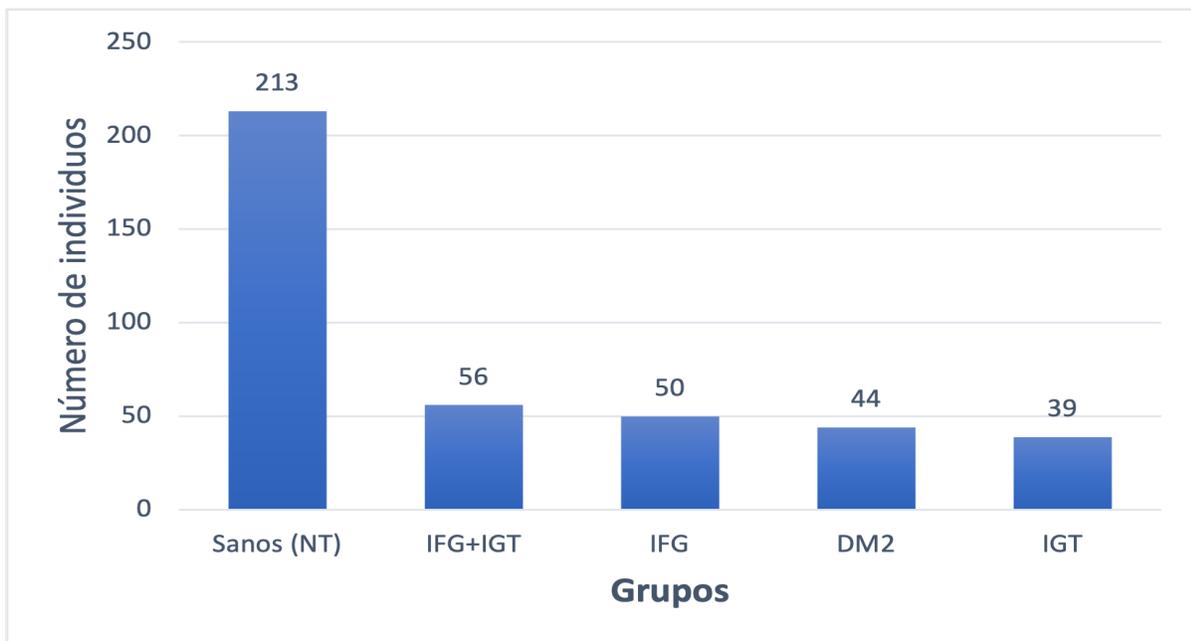


Figura 5. Distribución de individuos en grupos de estadios de salud/enfermedad relacionados a la diabetes y prediabetes. Tolerancia normal a glucosa (NT), glucosa alterada en ayunas (IFG), tolerancia alterada de glucosa (IGT), prediabetes combinada (IFG+IGT), diabetes mellitus tipo 2 (DM2)

5.2. Modelado computacional del metabolismo en microbiota empleando MICOM

A partir de las 402 muestras seleccionadas y sus respectivas abundancias relativas se realizó de forma secuencial diferentes pasos para llegar a los resultados de las interacciones, intervenciones univariadas y flujos de intercambio con el medio. Inicialmente mediante una matriz que contiene las muestras, los géneros presentes y sus abundancias relativas, se realizó la construcción del modelo de comunidad, donde a cada bacteria presente se le asignó su respectivo modelo proveniente de las 773 posibles reconstrucciones contenidas en AGORA. Posteriormente, para la realización de los pasos siguientes (Figura 6) se utilizó MICOM (versión 0.10.1 en python 3.5), en un servidor empleando un máximo de 28 procesadores dispuestos en paralelo. Para las reconstrucciones que representaron cada muestra se unieron en un modelo multicompartimental, donde aquellas bacterias con una abundancia relativa menor a 1×10^{-3} fueron descartadas. Posteriormente se eligió el medio de crecimiento de las bacterias a modelar, el cual impone los límites superiores para los flujos de metabolitos de consumo; en este caso se basó en una dieta occidental promedio ya que es la más acorde a la población elegida y fué utilizada en otros estudios ^{14,72,73}. A continuación se realizó un modelado en medio mínimo es decir, el conjunto mínimo de flujos de importación que permiten un crecimiento óptimo en el medio seleccionado. Para tener en cuenta la captación en el intestino delgado, redujimos todos los flujos de importación de los metabolitos comúnmente absorbidos en el intestino delgado en un factor de 10, cómo ha sido reportado previamente ^{14,74}. Posteriormente se realizó un modelado de “compensación cooperativa” que consta de modelar el sistema resolviendo 2 funciones objetivo a la vez (aumento de la biomasa de la comunidad y aumento de biomasa individual), con un coeficiente de compensación de 0.5; lo cual indica el valor máximo de optimización para la comunidad bacteriana. Esto último para permitir un comportamiento más acorde a lo que ocurre en comunidades bacterianas de forma natural, como es la microbiota intestinal, según lo reportado ¹⁴. Para información más específica, se sugiere revisar la guía de MICOM: <https://resendislab.github.io/micom/>.

Hasta este punto se identificaron los flujos metabólicos y tasas de crecimiento bacterianos, para cada muestra. Estos resultados son importantes pues aportan la información necesaria para caracterizar los flujos de exportación al lumen de metabolitos (incluido los SFCA) y el comportamiento que servirá de base para identificar el efecto que tendrán tanto los *knockouts* con las intervenciones univariadas (elasticidades).

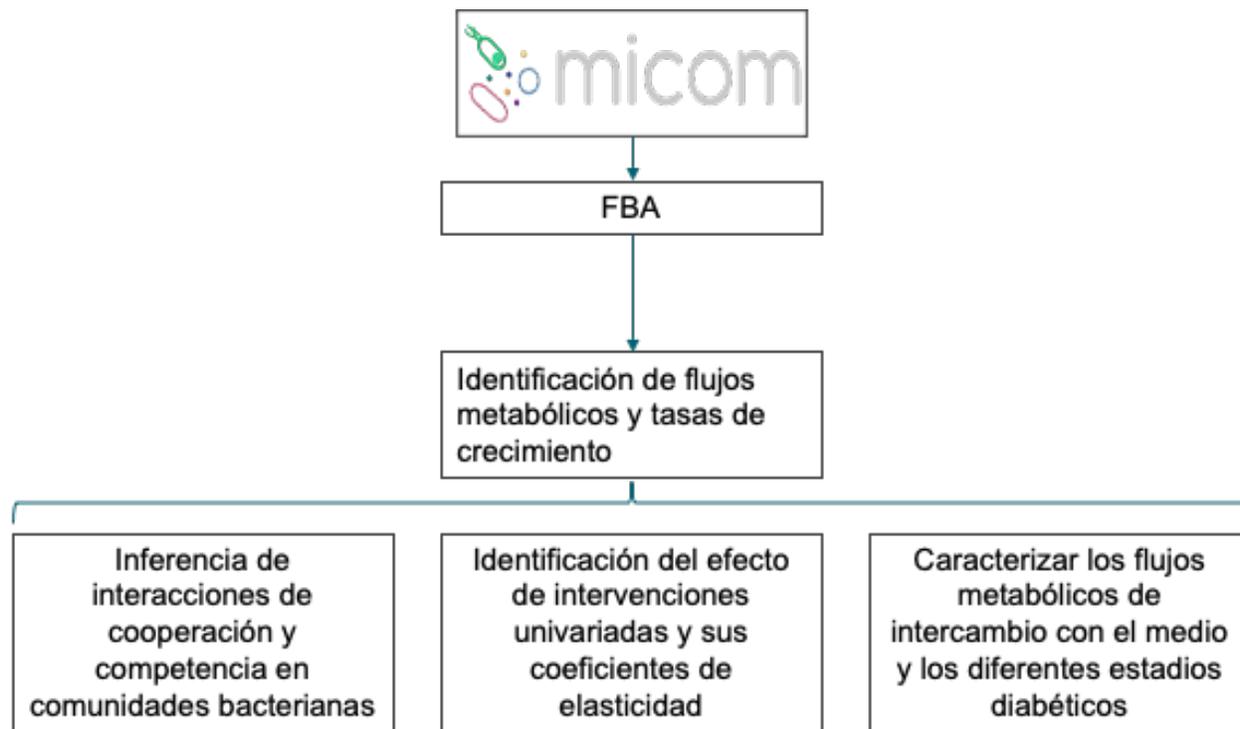


Figura 6. Pasos que se realizaron en MICOM, para realizar la caracterización a nivel de sistemas.

5.3. Inferencia de interacciones de cooperación y competencia en las comunidades bacterianas

Para estudiar las posibles interacciones de la microbiota de las muestras obtenidas se realizaron 2 intervenciones: *knockouts in silico* e intervenciones univariadas (concentración de metabolito en el medio o abundancia bacteriana) para obtener coeficientes de elasticidad. Con el fin de cuantificar las interdependencias de la tasa de crecimiento, se realizaron *knockouts in silico* para cada género en cada muestra y se rastreó el cambio en las tasas de crecimiento para todos los géneros restantes en la muestra. Aquí encontramos, como la tasa de crecimiento de cada género fue influenciada

por otro género; cada interacción se registró por pares, de género bacteriano intervenido con el afectado. En nuestra simulación definimos una interacción cooperativa entre dos géneros cuando al eliminar uno de los géneros (*knockout*), el otro género redujo su producción de biomasa. De forma complementaria, una interacción entre dos géneros se definió como competitiva cuando al eliminar uno de los géneros en otro género aumentó su producción de biomasa. Este proceso se realizó con todos los pares de géneros. y se construyó las redes de interacción mostradas en la figura 8. Con el propósito de identificar las interacciones asociadas al distinto progreso de la diabetes tipo 2, el estudio de *knockout* se realizó sobre un subconjunto de 39 individuos seleccionados en cada grupo de los definidos en la figura 5. Esta selección numérica se determinó para explorar las diferencias entre los grupos evitando el problema de balance de muestras. En la figura 8 se muestran las interacciones de las 195 muestras seleccionadas totales (39 para cada uno de los 5 grupos) y seleccionando las 500 interacciones de mayor magnitud.

Posteriormente se realizaron 4 pruebas de ANOVA, una considerando los valores de interacción (cambio en las velocidades de crecimiento) y 3 para el número de interacciones cooperativas, competitivas y totales; respectivamente. Esto con la finalidad de identificar diferencias estadísticamente significativas entre el número y fuerza de interacciones, y los diferentes estatus a los que puede pertenecer cada muestra. A pesar de que el estudio anterior nos permitió concluir que no existen diferencias en el número de interacciones cooperativas y competitivas entre los grupos de estudio, a un nivel más detallado evaluamos la existencia de interacciones entre géneros que podrían estar asociados al progreso de la enfermedad. Manteniendo este objetivo, se realizó una regresión logística multinomial sobre la dirección de las interacciones en cada estadio. Las variables dependientes fueron de tipo categóricas siendo los grupos de estudios indicados en la figura 5. Las variables predictoras fueron todos los pares de interacción bacterianos mostrados, incluyendo el tipo de interacción (cooperativa, competitiva, sin interacción), representadas de forma booleana en *one hot encoding*. El modelo final se obtuvo de un ensamble serial de tipos de pares de interacción estadísticamente relevantes obtenidas de varios modelos regresión de bloques de 4 variables (Figura 7). De esta manera, en cada simulación, se seleccionaron aquellos pares de interacción que tuvieran un coeficiente beta con un valor de $p < 0.05$, para al menos uno de los grupos de

estudio. Posteriormente, a partir de aquellas variables con un coeficiente significativo, se emplearon para generar un nuevo modelo y se comprobó que las interacciones permanecieran significativas, ver figura 7. Al final de este proceso iterativo se obtuvo un modelo final. La precisión del modelo se evaluó con los mismos datos de entrenamiento y se realizó un heatmap de la matriz de confusión.

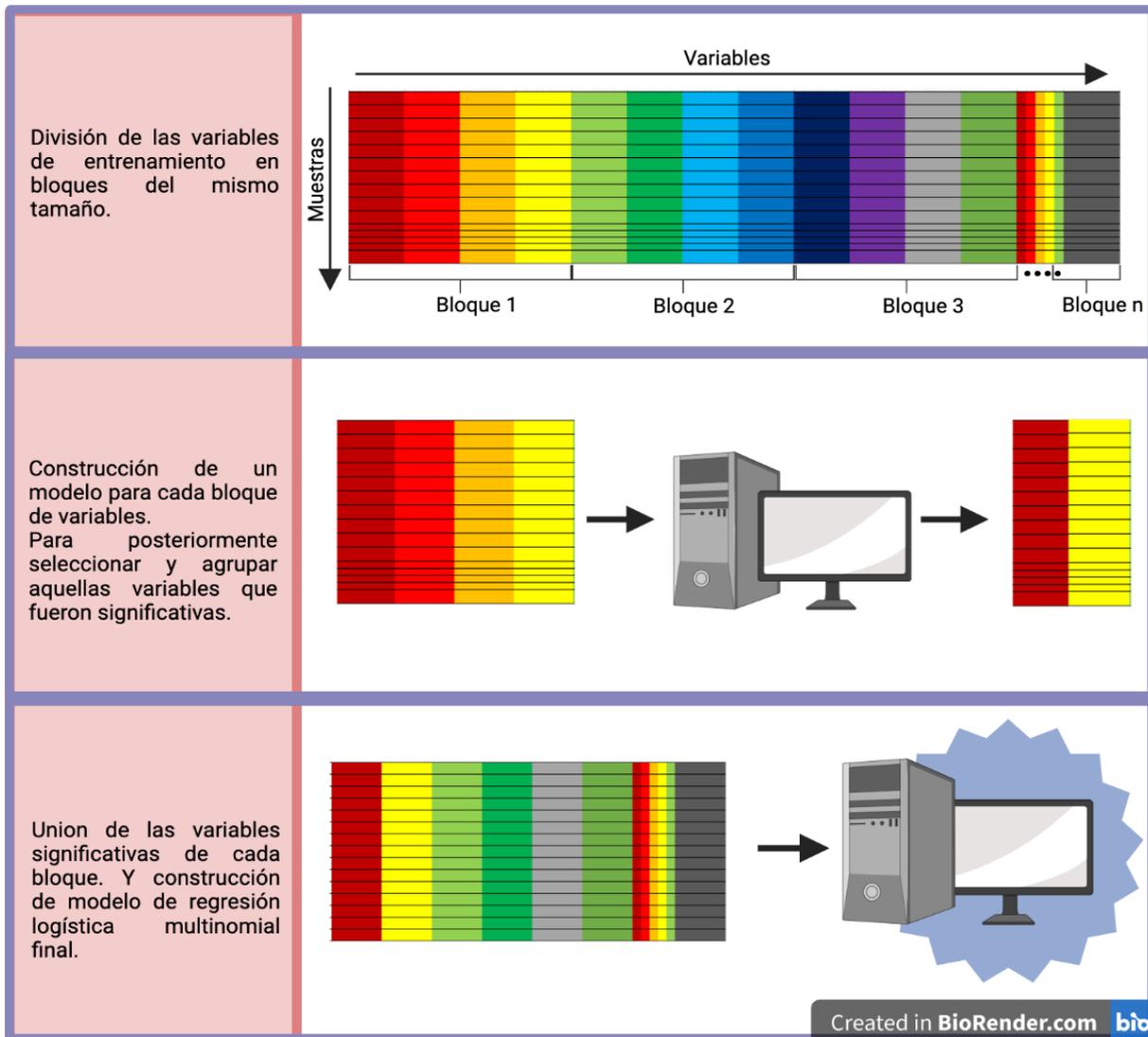


Figura 7. Construcción de modelo de regresión logística de forma a partir de bloques. De arriba hacia abajo, muestra los pasos que se llevaron a cabo para generar el modelo final, utilizado para el análisis de datos.

Finalmente, se realizó un análisis ecológico donde se identificaron los fillos a los que pertenecen los pares de interacciones relevantes del modelo, generando con ellos redes donde cada género fue representado como un nodo y su color corresponde a su filo. Este último estudio, tiene el propósito de comparar el comportamiento de la comunidad bacteriana entre los tipos de interacción, además de identificar fillos y géneros bacterianos claves en esta.

5.4. Identificación del efecto de intervenciones univariadas y sus coeficientes de elasticidad

Nuestro modelo *in silico* tiene capacidad para diseñar estrategias personalizadas en la modificación de la microbiota en individuos con prediabetes o DM2 buscando recuperar funciones asociadas a la salud, como la producción de SCFA (acetato, butirato y propionato). Para ejemplificar estas capacidades, se partió de la selección aleatoria de una muestra por estadio y se realizaron intervenciones *in silico* univariadas utilizando el software MICOM. En cada simulación, se modificó la abundancia de metabolito en el medio (dieta) y la abundancia de cada género, una intervención a la vez. Para medir el efecto de la intervención, se obtuvo un coeficiente de elasticidad que indica cómo afecta específicamente cada intervención a la producción de uno o varios metabolitos deseados. Utilizando los coeficientes de elasticidad, se generó un mapa de calor de las intervenciones más relevantes presentes a lo largo de las muestras para los metabolitos seleccionados.

5.5. Flujos metabólicos de intercambio con el medio

Después del modelado metabólico basado en restricciones que se realizó con MICOM, se obtuvo una matriz de flujos, la cual contiene información sobre las reacciones y su actividad en unidades de flujo metabólico ($\text{mmol/gDW}\cdot\text{h}$). Posteriormente se recuperaron únicamente los flujos de intercambio con el medio de todas las muestras y se escalaron con respecto a la abundancia relativa de cada género bacteriano correspondiente. Para identificar similitudes en el comportamiento de géneros

bacterianos, la matriz de flujos fue empleada en la generación de gráficos UMAP (*Uniform Manifold Approximation and Projection*); la cual es una técnica de aprendizaje de máquinas no supervisado para la reducción de dimensiones, que muestra cercanía entre los individuos graficados según la similitud entre sus variables independientes. Posteriormente se realizaron gráficos de caja (o *boxplots*) para los flujos totales de SCFA, es decir los resultantes al sumar los flujos de exportación, importación o ambos (flujo neto) en cada muestra. Finalmente para cada tipo de flujo se realizó en cada grupo de muestras una eliminación de valores atípicos; con la finalidad de evitar la influencia de estos valores en el análisis estadístico posterior, permitiendo encontrar de forma clara las diferencias entre los grupos. Los valores por encima de $Q3 + 1.5 \times IQR$ o por debajo de $Q1 - 1.5 \times IQR$ fueron considerados como valores atípicos (*outliers*). Donde Q1 y Q3 son el primer y tercer cuartil, respectivamente. IQR es el rango intercuartílico ($IQR = Q3 - Q1$).

5.5.1. Filtrado de datos y análisis estadísticos

Una vez teniendo los flujos netos sin valores atípicos, se inició normalizando los datos mediante el método de Rankit, esto con el fin de cumplir el supuesto de normalidad de datos para los análisis posteriores. Después se realizó un ANOVA para cada flujo neto con respecto a los grupos, seguido de su respectivo ajuste de valor de p. Posteriormente se realizó como *post hoc* una prueba de comparaciones múltiples, la cual fue la de Bonferroni; una vez obtenidas estas comparaciones se corrigió la inflación del error de tipo I (*false discovery rate* o FDR). Por último se generó una tabla basal (tabla B-1) donde se conservaron de manera ordenada los 188 flujos con un valor de p menores a 0.01 obtenidos del ANOVA, señalando la media, la desviación estándar y las diferencias significativas encontradas por pares de grupos en el *post hoc*. Mediante estos flujos ordenados se seleccionaron los 40 flujos más relevantes para posteriormente realizar un UMAP. Posteriormente se generaron *boxplots* para 6 de los flujos que presentaron mayor relevancia estadística según el ANOVA, donde se indicó la significancia estadística obtenida en el estudio por pares mediante asteriscos (valores de $p < 0.05^*$, $< 0.01^{**}$, $< 0.001^{***}$). Para lo anterior se empleó R studio (versión 1.2.5019).

Capítulo 6

Resultados y discusión

Nuestros análisis partieron de datos de abundancias bacterianas previamente reportadas para una población mexicana estratificada por distintos grados de avance de la DM2 ²⁹. De manera simplificada estos datos provienen de la secuenciación de la región hipervariable V4 del gen de ARNr 16S bacteriano, lo cual otorga información sobre las bacterias a nivel de género bacteriano para cada uno de los 402 individuos. Estos individuos están estratificados según su estado de salud o progreso hacia la diabetes. A continuación se presentan una serie de análisis computacionales donde se exploró cuestiones tales como la caracterización *in silico* de las interacciones bacterianas en cada paciente, el efecto de ciertas intervenciones en la abundancia y los flujos de intercambio con el medio, particularmente la producción de SCFA en la microbiota. Estos estudios nos permitieron establecer hipótesis sobre el fenotipo metabólico de la microbiota intestinal que diferencian los estadios de la DM2, sus mecanismos metabólicos, y estructurar posibles estrategias para abatir su avance. Así, nuestro estudio propone fenotipos de la microbiota que podrían jugar un papel relevante en el desarrollo de la DM2, de los cuales se propone su posterior validación experimental. Estos fenotipos bacterianos los proponemos como potenciales biomarcadores, y posibles elementos de control metabólico de la microbiota, de la población de individuos estudiada en este proyecto.

6.1. Identificación de las interacciones de cooperación y competencia en la ecología microbiana asociada con los estadios de salud/enfermedad relacionados a la DM2

Un primer estudio que exploramos fué inferir las reglas de interacción de la microbiota intestinal, mediante el modelado in silico en el software MICOM, partiendo de las abundancias de las bacterias medidas experimentalmente. La premisa central que motivó este estudio estriba en el hecho de que el progreso de la DM2 conlleva alteraciones metabólicas principalmente en el consumo de la glucosa. Consecuencia de esta alteración, hay evidencia de que la microbiota cambia su composición, y una pregunta que le precede es si las reglas de interacción ecológica también cambian con el progreso de la enfermedad. Con este objetivo, se realizaron *knockouts in silico* para cada género bacteriano, en cada muestra, para identificar las posibles interacciones metabólicas que se llevan a cabo entre miembros de la microbiota intestinal. Posteriormente a este estudio, se identificaron las interacciones relevantes y típicas de los diferentes estadios de DM2. De forma breve, las interacciones entre cada género de cada muestra fueron clasificadas como cooperativas o competitivas, esto considerando que la magnitud de cada una representa el cambio en la velocidad de crecimiento del género afectado.

A partir de estos resultados se generó una representación visual de los mismos. Se obtuvieron 5 gráficos que muestran las interacciones, su fuerza y tipo (competitivo y cooperativo), que se generaron a partir de las 500 interacciones de mayor magnitud. En términos generales concluimos las siguientes observaciones. La primera observación general que encontramos fue una tendencia a la disminución en el número de interacciones en las muestras de diabéticos en comparación a los sanos (Figura 8). Además, notamos que el grupo de individuos sanos tuvo el mayor número de interacciones competitivas (Tabla 1) con respecto a todos los grupos, lo cual se ha postulado que es una característica de una microbiota resistente a invasiones bacterianas^{65,66}. También, es el grupo con más nodos o bacterias participantes en las interacciones, además fué el segundo grupo con mayor número de interacciones conjuntas competitivas y cooperativas detectadas por nuestro algoritmo, después de

IFG+IGT (Tabla 1). El número alto de nodos identificados en los individuos sanos nos sugiere que podría estar relacionado con la alta diversidad asociada a la microbiota sana, que se va perdiendo durante el progreso hacia la DM2 ^{75,65,66}. Por otra parte, observamos, principalmente en las muestras de individuos sanos, un subconjunto de bacterias que se encuentran altamente interconectadas por una red de interacciones cooperativas incluidas *Prevotella*, *Streptococcus* y *Alistipes*; mientras que en el grupo IFG+IGT se observan principalmente en los últimos 2 géneros bacterianos (bordes azules en la figura 8). Se sabe que estos géneros son productores de SCFA y a menudo se asocian con estados de salud o bienestar ^{27,76}. En nuestro caso, debido a su alta conectividad caracterizadas por interacciones cooperativas podría ser un mecanismo adecuado para asegurar su supervivencia ante cambios nutrimentales ^{65,66}. Notablemente, en el resto de los grupos de la cohorte se observa un comportamiento similar en estos géneros, pero con un menor número de interacciones; con la excepción de los géneros *Dorea* y *Dialister*, que se encuentran también altamente conectados cooperativamente en IGT y DM2, respectivamente. Esto entra en concordancia con la literatura donde el aumento de la abundancia de *Dorea* está correlacionada con la DM2⁷⁷ y para *Dialister* se ha observado una alta abundancia con un mayor nivel de glucosa en la prediabetes ^{78,79}. Por otra parte, en el caso de los sanos se observa una fuerte interacción competitiva entre *Prevotella* y *Alistipes*, de igual modo que en *Streptococcus* y *Veillonella*. Estos pares de interacciones competitivas fuertes se deben a un traslape del consumo metabólico de dichos géneros ¹⁴, esto posiblemente debido a que los pares pertenecen al filo *Bacteroides* y *Firmicutes*, respectivamente; pues es altamente probable que exista dicho traslape en géneros pertenecientes al mismo filo, según lo indicado en la literatura ⁸⁰.

Grupo	N.Com	N.Cop
Sanos	66	55
IGT	49	38
IFG	45	40
IFG+IGT	43	81
T2D	47	36

Tabla 1. Número de interacciones competitivas y cooperativas por grupo, de la figura 8. Además muestra el valor de la interacción con mayor magnitud, tanto cooperativa como competitiva por grupo.

Con la finalidad de identificar si existen diferencias estadísticamente significativas entre las interacciones y los estadios, procedimos a realizar pruebas de ANOVA con el número y magnitud de las fuerzas de interacción entre cada set de individuos. Se encontró que la diferencia en el número de interacciones, su magnitud y el tipo de interacción en la microbiota no fué estadísticamente significativa. Sin embargo, como se mencionó anteriormente existe una tendencia visual a la baja en el número de interacciones conforme avanza la DM2. Consideramos que para sustentar esta observación es necesario aumentar el número de integrantes en los grupos, para poder observar diferencias significativas en dicha tendencia. Si bien se puede describir únicamente tendencias que no resultaron significativas, es posible que el conjunto de interacciones por pares puedan ayudar a clasificar los diferentes estadios, como se sugiere en el siguiente apartado.

6.1.1. Modelo de regresión logística multinomial de interacciones de cooperación y competencia en los estadios de salud/enfermedad relacionados a la DM2

Pese a que no existieron diferencias significativas entre el número de interacciones en la microbiota que se infirieron en cada grupo de pacientes, se decidió realizar una regresión logística multinomial ya que es probable que haya pares de interacción que den peso a clasificar las muestras en algún grupo. Para esta regresión se utilizaron como variable independiente los tipos de interacciones predichas anteriormente entre géneros bacterianos de cada muestra, donde la variable a predecir fue la procedencia de cada muestra (NT, IFG, IGT, IFG+IGT, y DM2). La regresión tuvo una precisión del 75% para predecir la clasificación, la precisión individual de cada grupo se puede apreciar en la figura 9. A partir del modelo se obtuvieron 81 interacciones estadísticamente relevantes para al menos un grupo de estudio (ver Tabla A-1 en apéndice A), mismas que dan peso a la descripción de cada uno de los estadios. Esto podría mostrar la complejidad de interacciones y mecanismos que se deben de tomar en cuenta si se desea identificar enfermedades como la DM2, a partir de la microbiota intestinal ⁸¹⁻⁸⁴.

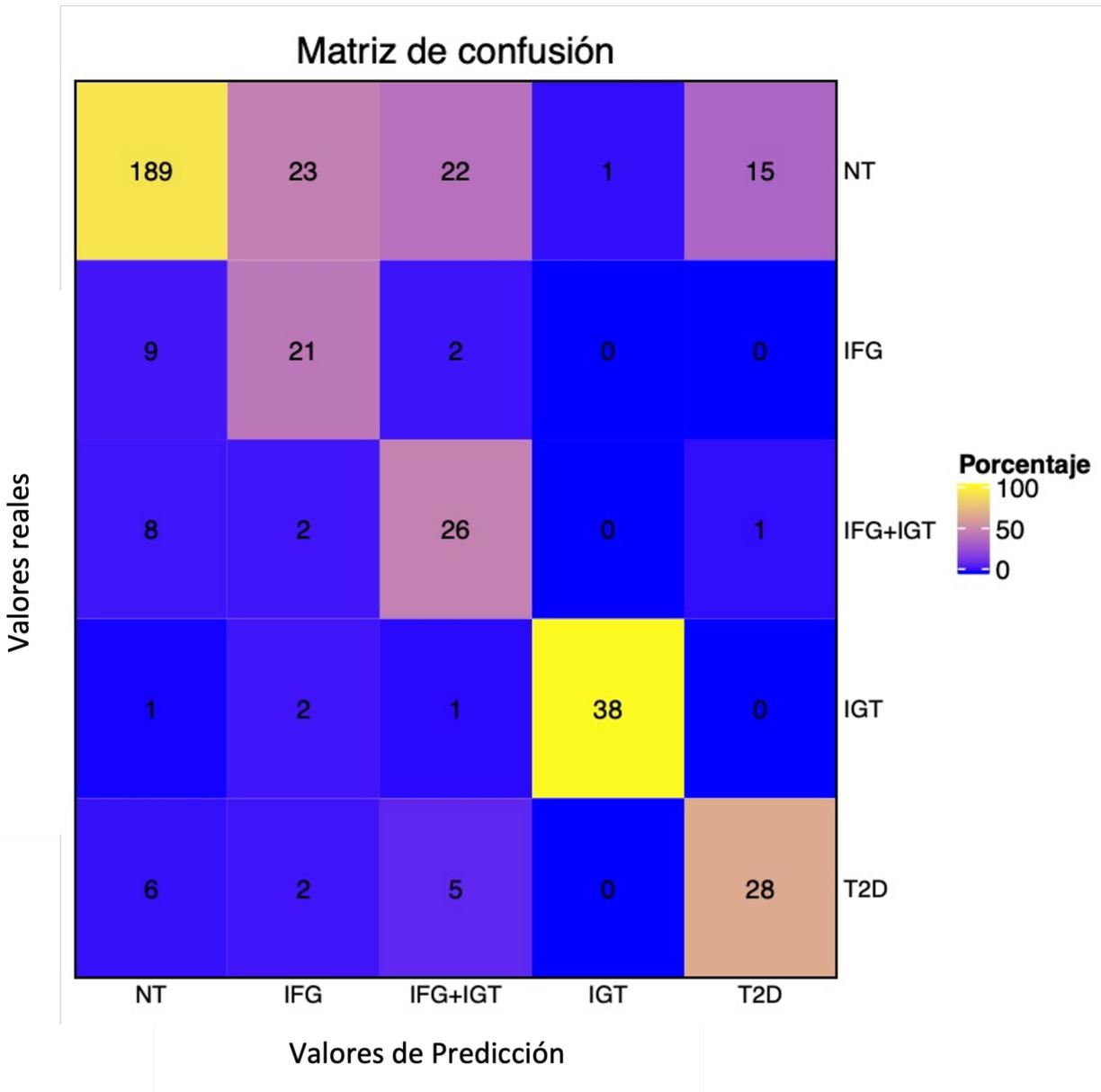


Figura 9. Matriz confusora de regresión logística multinomial. Al sumar cada valor presente en cada columna se encuentra la totalidad real de los individuos de cada clasificación y en las filas el total de los valores predichos por cada grupo. Dentro de cada cuadro se observa el número de predicciones que se obtuvieron para dicho estadio. Los colores corresponden al porcentaje de clasificaciones acertadas que se realizó para cada categoría.

En la tabla 2 se puede observar las 10 interacciones con coeficientes de mayor significancia estadística y magnitud, en al menos uno de los grupos de estudio. Se puede apreciar que las interacciones más significativas y relevantes están en las columnas que corresponden al IGT y DM2, lo cual permitió que fueran los grupos con una clasificación más precisa, además de la categoría de referencia (Sanos).

Referente a estos resultados anteriormente mencionados de interacciones bacterianas relevantes competitivas y cooperativas y DM2, se sabe que hasta la fecha no existe información semejante en la literatura. Lo que se ha visto es que la presencia o enriquecimiento en conjunto de géneros de los pares de interacción relevantes están asociadas con un estado de salud. La primer fila de coeficientes (Tabla 2) muestra que cuando no existe interacción entre *Lachnoclostridium* y *Blautia* ayuda a clasificar al modelo a individuos con IGT, si bien esto podría ser explicado ya que se ha mencionado en la literatura que en individuos diabéticos tratados con acarbose esta asociado tanto con una mejoría en el estado de salud y aumento en las abundancias de estos géneros bacterianos, a los cuales se les tribuye el efecto benéfico ⁸⁵. Consistentes con esta observación, nuestros resultados apoyan que estos géneros bacterianos promueven un estado de salud y su ausencia un estado de enfermedad como es el IGT. De igual modo se encuentran relacionados, en la quinta fila de coeficientes, estos mismos géneros en una interacción competitiva según el modelo, al estadio de salud; que son consideradas como bacterias benéficas ⁸⁶. Además de que en la interacción es de tipo competitiva y aportan resiliencia ante invasiones bacterianas, como se ha reportado ^{65,66}. Por otra parte, cuando no existe ninguna interacción entre *Sutterella* y *Faecalibacterium* está asociada con un valor alto de coeficiente beta y significancia con la T2D, y en menor medida con la salud, según nuestros resultados. Esto podría deberse a que *Sutterella*, se ha visto asociada con enfermedades como el autismo y la enfermedad inflamatoria intestinal, pero es abundantes en el duodeno de adultos sanos ⁸⁷; mientras que *Faecalibacterium* es bien conocido por ser una bacteria benéfica ⁸⁸. Por otra parte, un aumento conjunto de ambos géneros se ha asociado a padecimientos como la dermatitis atópica en niños ⁸⁹, lo cual puede jugar un papel importante en la descripción principalmente de la T2D, y en menor medida el grupo sano, en nuestro estudio.

Predictor	IFG	IFG_IGT	IGT	T2D
Constant	-0.274***	-0.475***	-1.342	-1.081***
Lachnoclostridium_Blautia_Non	-0.556	2.511	27.176**	-0.369
Phascolarctobacterium_Lachnoclostridium_Non	0.371	-0.78	-21.908*	1.675
Intestinibacter_Phascolarctobacterium_cop	-0.84	-0.316	-16.871**	-2.101**
Sutterella_Subdoligranulum_Non	-20.593	3.658	1.258	-16.285***
Lachnoclostridium_Blautia_com	0.556	-0.55	-15.366**	-4.199**
Paraprevotella_Lachnoclostridium_cop	-0.903	-0.474	14.616**	-1.826
Sutterella_Faecalibacterium_Non	19.275	-4.001	-2.489*	14.543***
Phascolarctobacterium_Veillonella_com	0.749	0.159	13.767***	0.465
Paraprevotella_Lachnoclostridium_Non	0.457	0.787	-13.702**	-2.893**
Dorea_Enterococcus_com	3.453	0.315	-13.694*	4.703

Tabla 2. Coeficientes significativos de la regresión logística multinomial. Los valores de significancia se representaron mediante asteriscos(valores de $p < 0.05$ *, < 0.01 **, < 0.001 ***). Esta tabla muestra los 10 coeficientes significativos más elevados. Para ver la tabla completa, revisar la tabla B-1. El nombre del predictor indica el par de géneros bacterianos del estudio de *knockouts* (género eliminado y afectado, respectivamente) y al final indica la clasificación en la interacción que tuvo: cop (cooperativo), com (competitivo), Non (sin interacción).

6.1.2. Redes de interacción para géneros bacterianos relevantes según el modelo de regresión

Con la finalidad de identificar si las interacciones mostradas en la sección anterior (Tabla A-1 del apéndice A) tuvieron preferencia en algún filo particular, se generaron y analizaron redes. El motivo para realizar estas redes con distinción por filios fue para explorar si los géneros bacterianos que pertenecen al mismo, o distinto filo, tienden a tener un tipo de interacción más probable. En estudios de ecología microbiana se ha encontrado que géneros del mismo filo tienen a competir ⁸⁰, una posible explicación de esta aseveración es que debido al grado de superposición metabólica dentro del mismo filo es generalmente más alto que entre miembros de diferentes filo, y da como resultado una mayor competencia, como se ha descrito en la literatura ^{90,91}. Por otra parte, en el modelado de la microbiota oral se han visto interacciones cooperativas dentro de filios como *Firmicutes* o *Bacteroides* ⁹². Para identificar si alguna de estas hipótesis es más acorde a nuestro estudio, se separaron las redes por interacciones entre géneros del mismo filo y distinto filo, donde cada nodo corresponde a un género bacteriano y la línea

conectora corresponde a la presencia de interacción. Respecto a las aseveraciones de la literatura anteriormente mencionadas, nuestro estudio propone una tercera opción pues se obtuvieron datos balanceados en el número de interacciones. Esta discordancia es posible que dependa de varios factores tales como el método de identificación de interacciones, la comunidad bacteriana estudiada, y el medio en el que se encuentra. Pese a que no se obtuvo únicamente interacciones competitivas para organismos del mismo filo, el número de interacciones competitivas para organismos del mismo filo (Figura 10D) fué ligeramente superior (14 interacciones) a comparación de las interacciones cooperativas del mismo filo (10 interacciones, Figura 10B). Además, se observa que solo en *Firmicutes* se presenta interacciones entre géneros pertenecientes al mismo filo y que a su vez fueron relevantes para nuestro modelo de regresión, tanto para interacciones cooperativas como competitivas (Figura 10B y D). Mientras que en las interacciones entre diferentes filios, se aprecia que todos los filios interactúan únicamente con *Firmicutes*, tanto cooperativamente como competitivamente (Figura 10 A y C). Lo cual indica la importancia de este filo en la comunidad bacteriana intestinal. Esta observación resalta especialmente con *Lacnospirillum* (nodo con más conexiones en Figura 10), que para cada tipo de interacción mostró ser relevante pues es el género y filo que se encuentra con mayor número de interacciones, sin importar el tipo (competitiva o cooperativa). Es importante prestar especial atención a este filo, pues hay evidencia sólida sobre que la alteración en la proporción de Firmicutes y Bacteroidetes (ambos constituyen más del 90% de la microbiota intestinal) conduce al desarrollo de obesidad⁹³. Esto ha sido cuestionado pues es probable que la influencia del microbioma intestinal en la obesidad y otros padecimientos como la DM2 sea mucho más compleja que un simple desequilibrio en la proporción entre filios⁸⁰. De esta manera los descubrimientos expuestos en este proyecto, generan nuevas hipótesis de la manera en la que dichos filios juegan su papel en la comunidad bacteriana.

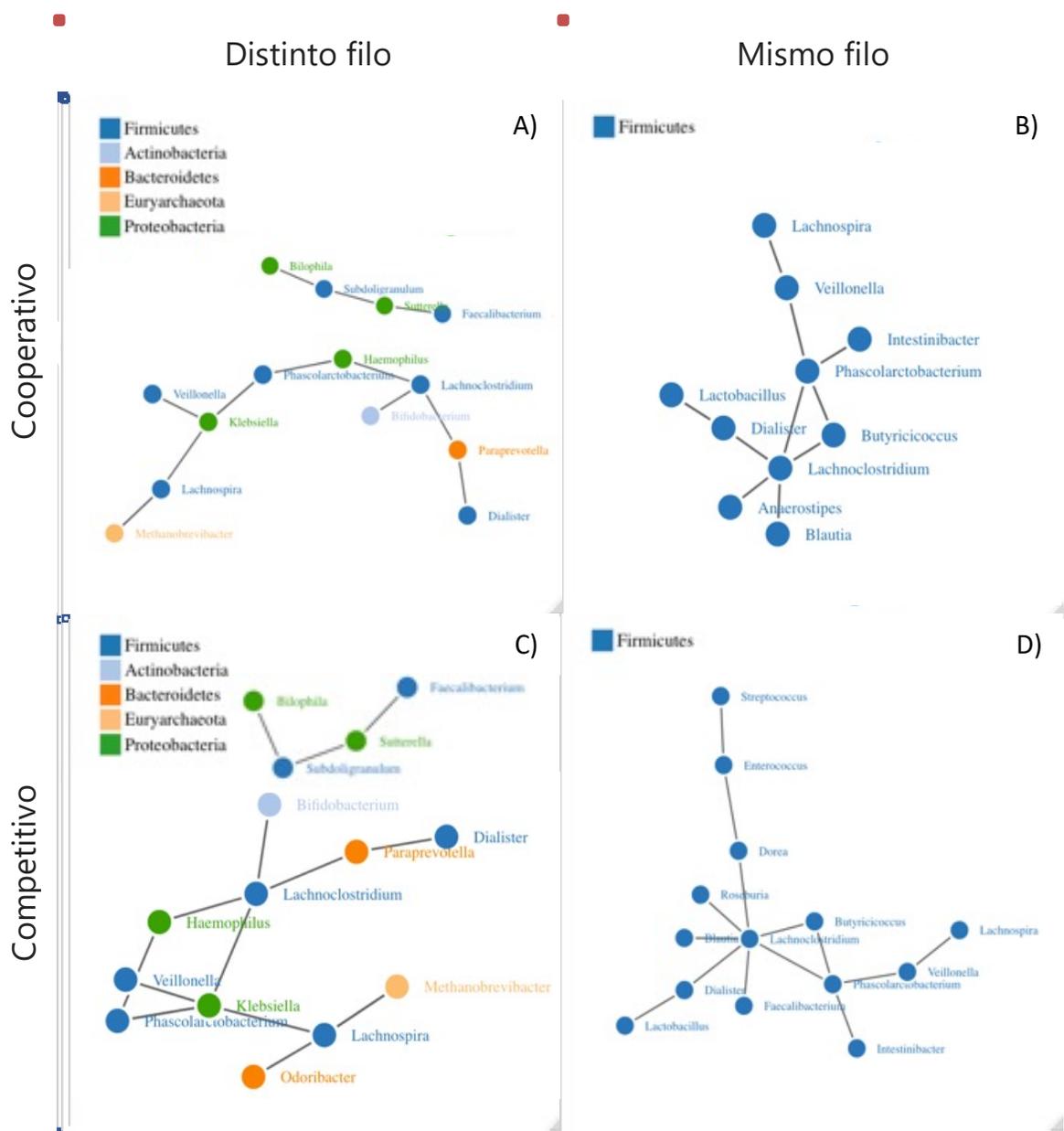


Figura 10. Redes de pares de interacción relevantes estadísticamente para al menos uno de los grupos estudiados. Estas redes fueron obtenidas mediante la regresión logística multinomial de *knockouts*, y mediante cada línea conectora muestra un par de interacción bacteriano que fue estadísticamente significativo. En la columna izquierda se puede apreciar aquellas interacciones que se presentaron entre diferentes filos bacterianos, mientras que en la derecha se encuentran las interacciones entre los mismos filos. La primera fila de arriba abajo muestra las redes para interacciones competitivas, la segunda para interacciones cooperativas.

6.2. Efectos de las intervenciones univariadas en los flujos de SFCA

Las intervenciones univariadas se realizaron con la intención de identificar en aquellos individuos seleccionados, la resiliencia y/o susceptibilidad de su microbiota a cambios en el perfil de producción de SCFA. Los impactos de las intervenciones univariadas particulares se cuantifican mediante el uso de coeficientes de elasticidad, los cuales nos indican las alteraciones de una variable en con respecto a cambios de otras. Estas intervenciones se realizaron en 5 muestras, que corresponden a un paciente en cada clasificación. Observamos que los efectos de las intervenciones individuales fueron muy heterogéneos para las muestras (Figura 11). Se observa que algunas intervenciones fueron capaces de aumentar la producción de SCFA, principalmente para propionato y butirato en las muestras correspondientes a IFG y T2D; como es el caso del aumento de la concentración de pectina y L-arabinosa en el medio (dieta), respectivamente. Por otra parte, para los individuos con IFG y DM2, algunos de los géneros que al ser intervenidos, generaban un aumento en la producción de propionato y butirato fueron *Alistipes*, *Anaerostipes*, *Dorea*, entre otros; todos ellos productores de SCFA⁹⁴⁻⁹⁷. En este estudio, se observó que en la microbiota del individuo sano, como era de esperarse, existen pocas intervenciones que afectan fuertemente la producción de SCFA, lo cual sugiere que dicha comunidad microbiana presenta robustez ante cambios metabólicos en el medio, como se observa en las filas correspondiente a los valores de elasticidad para los sanos de la Figura 11.

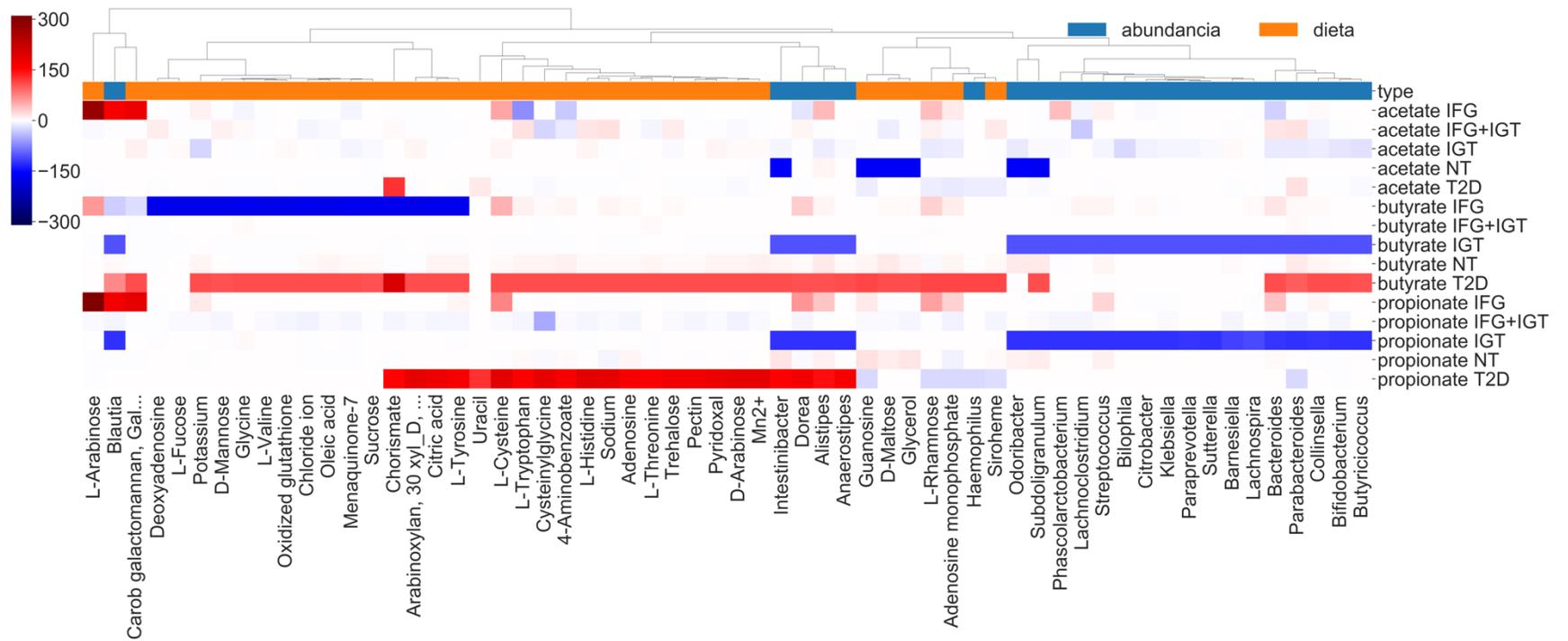


Figura 11. Efectos de las intervenciones sobre la producción de SCFA en 5 muestras. Cada fila denota un SCFA en un individuo específico dentro de las categorías NT, IFG, IGT, IFG + IGT, T2D. Cada columna indica un componente de intervención ya sea de dieta o un género bacteriano, estos denotados en regiones naranjas y azúles respectivamente. Los colores en la barra lateral denotan la elasticidad (es decir, el cambio porcentual en la producción de SCFA dado un aumento porcentual en el efector específico). El rojo denota intervenciones que aumentan la producción de SCFA, y el azul denota intervenciones que disminuirían su producción.

6.3. Flujos de intercambio de SCFA presentan diferencias significativas entre grupos clínicos

Los flujos de importación no mostraron ningún comportamiento particular entre los estadios (Figura 12A). Sin embargo, se observa una tendencia a la disminución en los flujos de exportación, butirato y acetato (Figura 12B), durante el progreso de la enfermedad. Esto es consistente con la literatura; exceptuando por el estado prediabético combinado, para el caso del acetato, donde se observa una tendencia a la alza respecto al control sano (Figura 12B). En el caso del flujo de exportación de propionato, se observa un comportamiento significativo en IGT, que aumenta respecto al resto de los estadios, incluso con respecto a los sanos; mientras que en la condición IFG este metabolito presenta el menor flujo de exportación. El efecto neto al sumar los flujos de importación y exportación de propionato, muestra un comportamiento similar al descrito anteriormente (Figura 12C), lo cual implica una mayor disponibilidad de propionato en el lumen intestinal de los individuos con IGT y menor para aquellos con IFG. Esto entra en concordancia con hallazgos previos, donde se observa que altos niveles de propionato en la dieta genera una disminución en la glucosa alterada en ayuno (IFG), esto podría explicar que las muestras con una microbiota altamente productora de propionato generan un estado aislado de IGT ^{98,99}. El mismo efecto se puede hipotetizar al ver que las muestras de los individuos con IFG, presentan menor flujo de producción y flujo neto de propionato, por ende una alta glucemia en ayunas. Los flujos de exportación de propionato significativamente diferenciados entre estadios, genera una hipótesis útil sobre el comportamiento de la microbiota que sugiere estudios posteriores para su corroboración experimental.

Por otra parte se observa que los flujos netos de acetato son significativamente mayores en sanos que en los casos prediabéticos IFG y IFG+IGT. El acetato tiene la capacidad de aumentar la secreción de insulina, aumentar el crecimiento de las células beta, entre otras funciones; lo cual podría generar esta diferencia entre los grupos. Finalmente, existe una tendencia del flujo neto de butirato a disminuir en el grupo sano, únicamente significativa en contra de IGT. Este resultado parece ser contraintuitivo dado que en el estudio previo realizado con estas mismas muestras indica que en individuos

sanos existe un incremento de géneros productores de butirato ²⁹. Por lo que se sugiere posteriormente explorar experimentalmente dicho comportamiento mediante estudios metabolómicos.

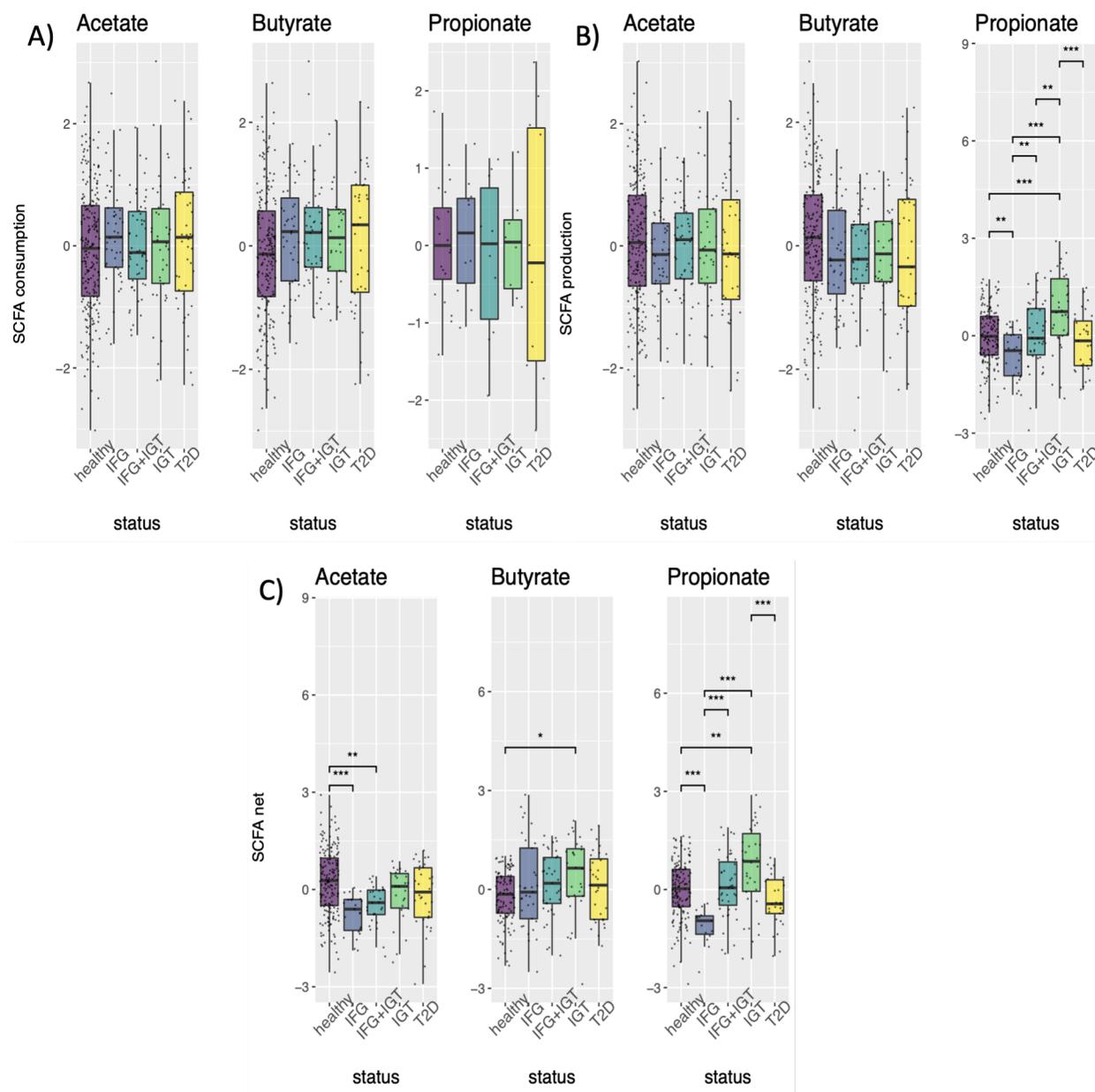


Figura 12. Flujos de intercambio de SCFA con el medio, por estadio. (A) Flujos de importación, (B) flujos de exportación, (C) Flujos netos. (valores de $p < 0.05^*$, $< 0.01^{**}$, $< 0.001^{***}$).

6.4. Flujos netos de intercambio más significativos entre los grupos clínicos

A partir de los flujos de exportación normalizados se realizó un análisis comparativo intergrupos e intragrupos, con la finalidad de identificar aquellos flujos que tuvieran diferencias significativas estadísticamente entre los grupos de estudio. Los resultados se presentan en la tabla B-1 (en el apéndice B), y muestra 188 flujos de intercambio neto que fueron relevantes estadísticamente. Dos de los flujos más relevantes fueron la melibiosa y la R-acetoina, los cuales no se han reportado ningún efecto referente a la DM2. Este es uno de los principales hallazgos de nuestro análisis computacional y sugiere de forma pertinente su estudio experimental a futuro para comprobar este comportamiento e identificar los posibles efectos que tengan dichos metabolitos en los estadios relacionados a la diabetes y prediabetes. La melibiosa, se le han identificado propiedades terapéuticas para otros tipos de padecimientos como el Parkinson; pues tiene la capacidad de inhibir el estrés oxidativo, reducir la neuroinflamación y regular la autofagia ^{100,101}. Por otro lado, también identificamos diferencias significativas en los flujos netos de R-pantotenato, fenilacetato, ácido 3-hidroxi-butírico; los cuales se encuentran asociados con estadios de salud/enfermedad relacionados a la DM2. Se ha encontrado que una alta concentración de ácido 3-hidroxi-butírico (también conocido como ácido β -hidroxi-butírico) en plasma, se asocia con un aumento del riesgo de padecer DM2 ¹⁰²; lo cual entra en total concordancia con el aumento significativo de dicho metabolito encontrado en este trabajo durante la progresión de DM2, pasando por prediabetes (Figura 13). Por otra parte, se sabe que el fenilacetato disminuye la concentración y producción de glucosa en condiciones de DM2, pero el vínculo entre estas alteraciones no se conoce a detalle aún ¹⁰³. En nuestro gráfico se aprecia un aumento de dicho metabolito, durante la progresión de la DM2, lo cual podría indicar un posible mecanismo compensatorio de la microbiota, ante dicha condición. Por otra parte el pantotenato que forma parte de las vitaminas B, se ha observado en poblaciones chinas que a nivel metagenómico, los sujetos con diabetes tipo 2 tuvieron cambios significativos en el perfil de abundancia de genes de la microbiota relacionados con el metabolismo de vitaminas ¹⁰⁴. Este metabolito se ha planteado como

un nuevo biomarcador predictivo asociado con el desarrollo y la progresión de la enfermedad renal diabética ¹⁰⁵, lo cual podría ser planteado como un biomarcador para IFG, como se muestra en el *boxplot* de la Figura 13. Finalmente, otro Flujo de intercambio que resultó relevante y ha sido reportados en relación a la DM2, es el caso de la degradación de la mucina (O-glicanos mucínicos), donde se ha reportado que las bacterias degradadoras de mucina, como *A. muciniphila*, se asocian a un estado de salud ante la DM2, al mejorar la función hepática, reduciendo la inflamación, aliviando el estrés oxidativo ³¹. Los metabolitos mencionados anteriormente, además de otros que nuestro análisis identificó con diferencias significativas (tabla B-1), son de relevancia para postularlos como biomarcadores potenciales para monitorear la enfermedad y ser guía en la comprensión fisiopatología de la prediabetes y la DM2.

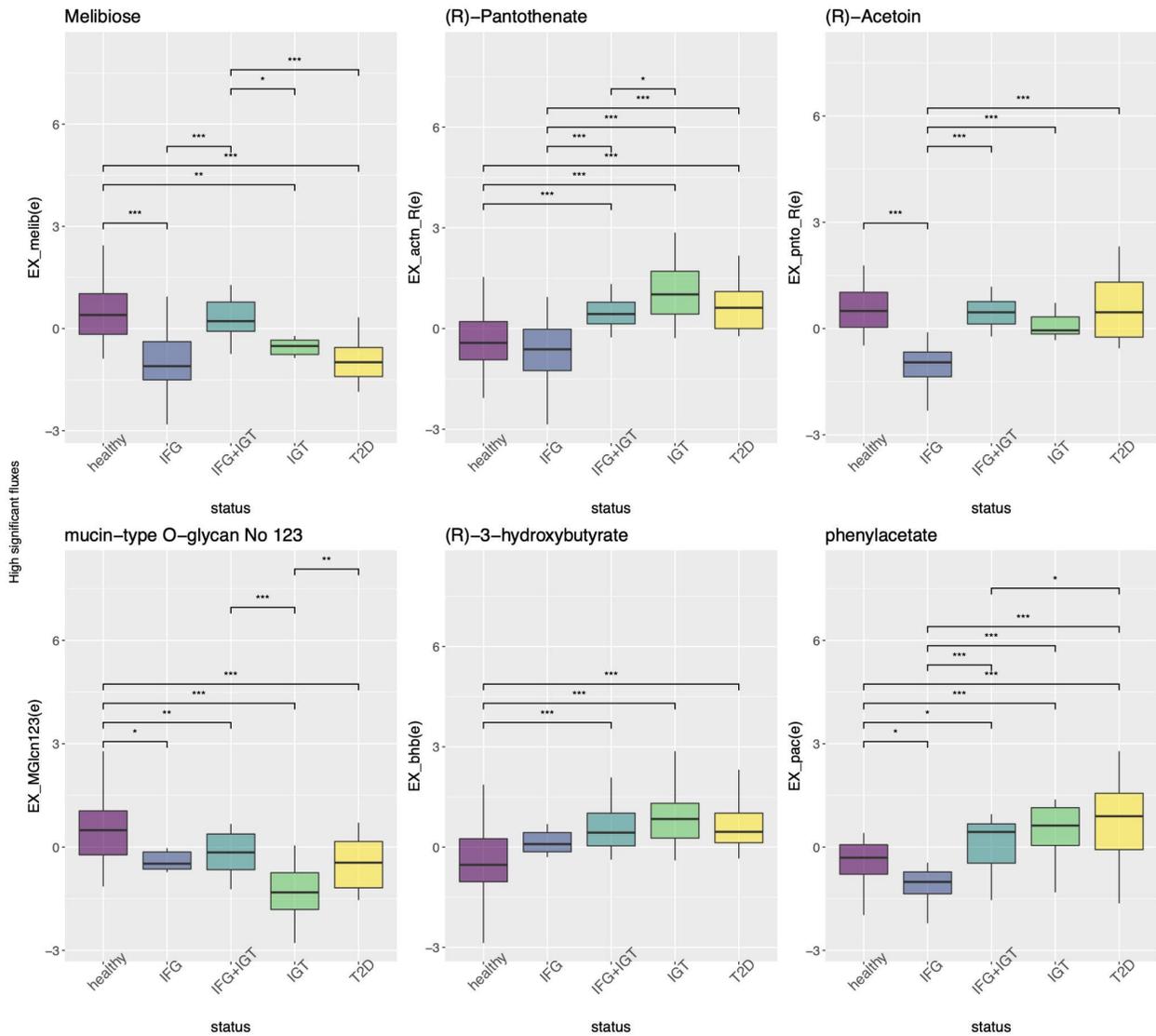


Figura 13. *boxplots* de 6 de los flujos netos más relevantes estadísticamente. Cada uno de los flujos se encuentra normalizado por el método de rankit. El nombre del flujo y su metabolito asociado, se muestran del lado izquierdo y en la parte superior de cada grupo de *boxplots*, respectivamente. La significancia estadística se muestra mediante asteriscos. Donde para un valor de $p < 0.001$ se representó mediante ***, mientras que para un valor de $p < 0.01$ y $p < 0.05$, se señaló con ** y *, respectivamente.

6.4.1 Proyección 2D de flujos más significativos entre los grupos clínicos

A partir del análisis estadístico realizado en la sección previa, se seleccionaron los flujos netos estadísticamente más significativos entre grupos y se realizó una reducción de dimensión mediante el software R para generar el gráfico UMAP (*Uniform Manifold Approximation and Projection*) (Figura 14). Esta proyección de los datos en un espacio de menor dimensión se realizó con la finalidad de evaluar la capacidad de agrupar las categorías o grupos de estudio a partir del conjunto de flujos netos seleccionados. En el UMAP mostrado en la figura 14 se aprecia la generación de clusters sutilmente separados para los diferentes grupos de estudio. Esta proyección nos permitió sustentar la relevancia de estos flujos para describir los diferentes estadios. Además debido a las similitudes presentes entre los grupos muestra una intersección entre los puntos correspondientes a los estados prediabéticos IGT, IFG+IGT y el diabetico. En la mitad izquierda del gráfico del eje x, se observan 2 grupos de puntos casi formados puramente de individuos sanos y con IFG. Por otra parte en el extremo derecho se observa un grupo de puntos verdes que muestra un comportamiento similar entre sí mismos, de individuos IFG+IGT y diferenciado con respecto al resto de las muestras.

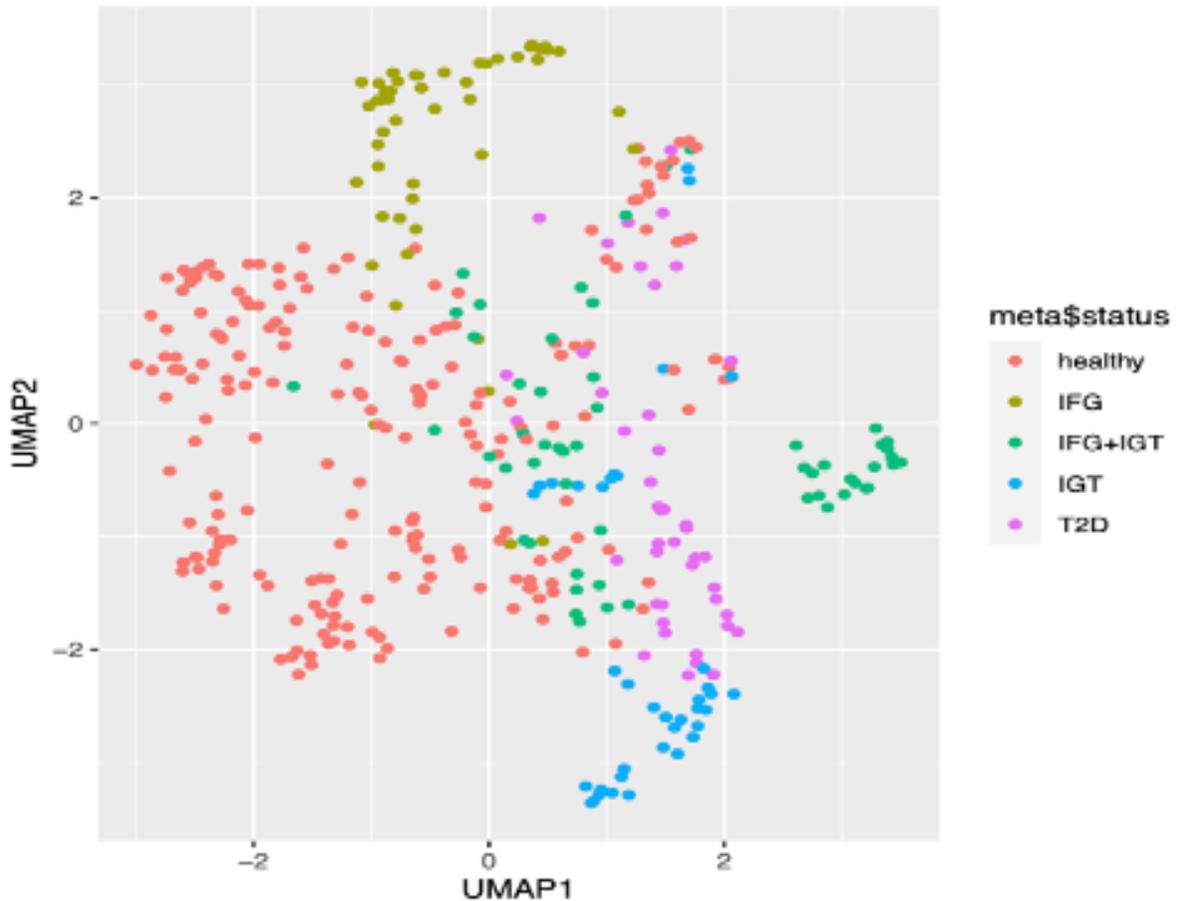


Figura 14. UMAP de los flujos de exportación filtrados mediante métodos estadísticos. Cada punto corresponde a un individuo y cada color corresponde a un grupo. Fue generado a partir de los 40 flujos con menor valor de p de ANOVA.

6.5 Similitud del patrón de flujos de intercambio entre géneros bacterianos

En esta sección exploraremos las analogías y diferencias de los patrones de actividad metabólica de los flujos de intercambio entre el medio (dieta) y toda la comunidad de microbiota. Así, con la finalidad de identificar las diferencias y similitudes existentes entre el comportamiento metabólico de los géneros bacterianos en todas las muestras, realizamos una reducción de dimensionalidad mediante el software R para generar un UMAP. Tal y como se muestra en la Figura

15, El UMAP producido mostró consistentemente un comportamiento similar entre las bacterias del mismo género. Inmediatamente resalta a la vista la existencia de una cercanía entre varios géneros bacterianos, esto indicando su similitud en cuanto al perfil de intercambio de metabolitos con el medio. Ejemplo de ello es la ampliación de una zona mostrada en la la figura 15, donde se observa una marcada cercanía entre los géneros *Roseburia*, *Faecalibacterium* y *Butyrivibrio*; todos ellos pertenecen al orden *Clostridiales* y conocidos por ser productores de SCFA, principalmente butirato ¹⁰⁶⁻¹⁰⁸.

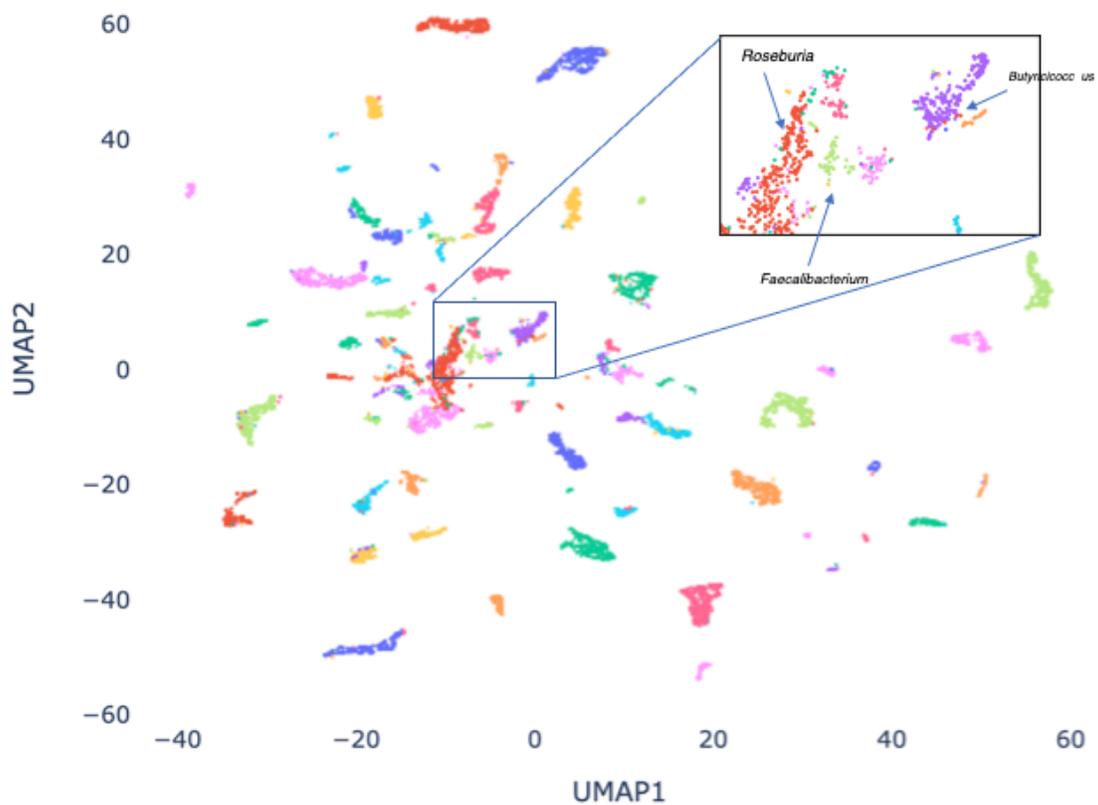


Figura 15. UMAP de flujos de intercambio con el medio de todos los géneros bacterianos para todas las muestras. Los géneros modelados corresponden a los puntos, el color depende del género al que pertenecen.

Capítulo 7

Conclusiones y Perspectivas

7.1. Conclusiones

El estudio de la microbiota y su asociación con la DM2 es una línea de trabajo de gran interés para identificar mecanismos de monitoreo y tratamiento de esta enfermedad. Entender los mecanismos metabólicos que inducen estas asociaciones, es un campo pionero en la actualidad que clama del desarrollo de nuevas metodologías computacionales capaces de integrar datos de microbiota y postular hipótesis verificables experimentalmente. Los resultados presentados en esta tesis pretenden contribuir a este último aspecto. Partiendo de datos de microbiota intestinal de 402 individuos Mexicanos con distintos grados de avance de la enfermedad, nuestro estudio in silico de reconstrucciones metabólicas de bacterias nos permitió concluir las siguientes observaciones. En general, observamos que existen cambios importantes en las interacciones entre la microbiota, los flujos netos y de exportación; que podrían ayudar a identificar biomarcadores y características particulares de la microbiota de la población estudiada en los diferentes estadios asociados a la DM2. No existen diferencias significativas entre el número y tipo de interacciones entre los tipos de muestras. Sin embargo, se observó una tendencia a disminuir tanto las interacciones de tipo competitivas como cooperativas conforme la enfermedad progresa, desde los sanos a los diabéticos, pasando por los prediabéticos; por lo que se sugiere aumentar el número de individuos de cada grupo de estudio. A partir de un modelo de regresión logística multinomial, se identificó algunos pares de géneros, cuya presencia ó ausencia de interacción (cooperativa o competitiva), permiten clasificar los grupos clínicos con relativa precisión. Esta es una predicción del modelo cuya verificación experimental queda para futuros estudios. En términos de las intervenciones

univariadas, se concluyó que estas tienen un impacto más sustancial en los individuos con algún estadio diabético, en comparación con los sanos, debido a la posible resiliencia de este último. Respecto a la actividad metabólica de los géneros bacterianos, se concluyeron las siguientes observaciones. Se apreció una diferencia significativa del flujo neto de tres SCFA entre varios estadios, lo da indicios de que el modelado puede ayudar a identificar el comportamiento diferenciado de la microbiota entre estadios. Además se mostró que los flujos disminuidos para IGT de propionato y para IFG de acetato, tienen una posible explicación cuando se recurre a la literatura. Los flujos netos de intercambio con el medio, específicamente aquellos que fueron significativos, tienen sustento con la literatura para algunos casos; por otra parte aquellos flujos significativos donde su metabolito inherente no se ha reportado en la literatura, podría guiar estudios de evaluación de los efectos de estos metabolitos en la salud del hospedero, además de su potencialidad de servir como un posible marcador de la enfermedad correspondiente. Finalmente, empleando métodos de reducción dimensional no supervisado como UMAP, es posible apreciar *clusters* de los grupos de estudio, lo cual indica la relación de los flujos con los estadios. Como tal, es deseable que los métodos presentados aquí ayuden a aprovechar los datos asequibles del microbioma para diseñar estrategias de intervención personalizadas y estudios experimentales.

En este contexto, se puede decir que los resultados de este proyecto de tesis son un parteaguas en la investigación guiada, mediante la creación de hipótesis basadas en reglas lógicas, aplicadas en métodos computacionales; en este caso el modelado metabólico con MICOM, para su futura comprobación experimental. Además de presentar información innovadora en el entendimiento de la microbiota asociada a la diabetes en mexicanos. La metodología de este proyecto, puede ser empleada para el estudio *in silico* de la microbiota en otras poblaciones y para otras enfermedades donde el metabolismo de la microbiota pudiera tener injerencia. De forma puntual, fueron cumplidos los objetivos propuestos en esta tesis, donde se pudo caracterizar e inferir las actividades de intercambio metabólico de la microbiota asociados a la DM2, mediante el modelado *in silico*. Fue posible no solo identificar potenciales metabolitos de intercambio con el medio que estarían a disposición del

lumen intestinal, sino que también fue posible identificar interacciones metabólicas entre las bacterias, y el efecto que tendrían ciertas intervenciones sobre la microbiota. Esto permite sugerir interacciones y metabolitos precisos para el diseño de tratamientos personalizados, que podrían ayudar a entender el comportamiento de la microbiota asociada a la prediabetes y la DM2. Consideramos que este es un trabajo original y de gran relevancia, dando un paso a caracterizar la interacción entre la microbiota y el hospedero. Muy particularmente, por asentar las bases de un modelo cuantitativo hacia la identificación de biomarcadores que puedan ayudar a diagnosticar o identificar los comportamientos particulares de la microbiota en el desarrollo de la DM2.

7.2. Perspectivas

Este proyecto ha sido capaz de identificar comportamientos metabólicos asociados a la microbiota intestinal relacionados a los estadios de salud, prediabetes y DM2. Lo cual sugiere la capacidad efectiva del modelado metabólico en el estudio de la microbiota intestinal. Teniendo en cuenta esto, resulta relevante considerar los hallazgos novedosos obtenidos durante el modelado, que podrían indicar posibles mecanismos que resulten relevantes en el entendimiento de la microbiota asociada a la DM2 y la identificación de posibles biomarcadores que indiquen alteraciones en la microbiota asociadas a dicha enfermedad. Para esto último, es necesario un estudio experimental de los resultados obtenidos. De esta manera es sugerible realizar estudios metabólicos (de preferencia combinando exometaboloma, intrametaboloma y fluxoma), de la microbiota intestinal en la misma población. Muy particularmente, a partir de la lista de flujos y metabolitos propuestos por el análisis estadístico (tabla B-1), además de los clásicos los SCFAs. Por otra parte, se sugiere realizar estudios fluxómicos y estudios ecológicos de interacción, para corroborar lo hipotetizado sobre las interacciones metabólicas de cooperatividad y competitividad. Estos aspectos, y algunos otros derivados de esta tesis, serán los objetivos a desarrollar en futuros estudios sobre población Mexicana.

Bibliografía

1. López Stewart, G. Diabetes Mellitus: clasificación, fisiopatología y diagnóstico. *Medwave* **9**, (2009).
2. Calderón Hernández, E. A. Propuesta de educación médica integral y funcional, para la adherencia y prevención en pacientes con patologías crónicas. (2020).
3. Zimmet, P. Z., Magliano, D. J., Herman, W. H. & Shaw, J. E. Diabetes: a 21st century challenge. *Lancet Diabetes Endocrinol* **2**, 56–64 (2014).
4. Escobedo-de la Peña, J. *et al.* [Diabetes in Mexico. CARMELA study]. *Cir. Cir.* **79**, 424–431 (2011).
5. DeFronzo, R. A. From the Triumvirate to the Ominous Octet: A New Paradigm for the Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus. *Diabetes* **58**, 773–795 (2009).
6. Hawa, M. I. *et al.* Adult-Onset Autoimmune Diabetes in Europe Is Prevalent With a Broad Clinical Phenotype: Action LADA 7. *Diabetes Care* 2013;36:908–913. *Diabetes Care* **37**, 1494–1494 (2014).
7. Qin, J. *et al.* A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature* **490**, 55–60 (2012).
8. Yassour, M. *et al.* Sub-clinical detection of gut microbial biomarkers of obesity and type 2 diabetes. *Genome Med.* **8**, 17 (2016).
9. Zhao, F., An, R., Wang, L., Shan, J. & Wang, X. Specific Gut Microbiome and Serum Metabolome Changes in Lung Cancer Patients. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **11**, 725284 (2021).
10. Chen, D. *et al.* Microbiome and Metabolome Analyses Reveal Novel Interplay Between the Skin Microbiota and Plasma Metabolites in Psoriasis. *Front. Microbiol.* **12**, 643449 (2021).
11. Tomas-Barberan, F. A., Selma, M. V. & Espín, J. C. Polyphenols' Gut Microbiota Metabolites: Bioactives or Biomarkers? *J. Agric. Food Chem.* **66**, 3593–3594 (2018).
12. Farup, P. G., Rudi, K. & Hestad, K. Faecal short-chain fatty acids - a diagnostic biomarker for irritable bowel syndrome? *BMC Gastroenterol.* **16**, 51 (2016).
13. Laakso, M. Biomarkers for type 2 diabetes. *Mol Metab* **27S**, S139–S146 (2019).
14. Diener, C., Gibbons, S. M. & Resendis-Antonio, O. MICOM: Metagenome-Scale Modeling To Infer Metabolic Interactions in the Gut Microbiota. *mSystems* **5**, (2020).
15. Blanco-Míguez, A., Fdez-Riverola, F., Sánchez, B. & Lourenço, A. Resources and tools for the high-throughput, multi-omic study of intestinal microbiota. *Brief. Bioinform.* **20**, 1032–1056 (2019).

16. Allaband, C. *et al.* Microbiome 101: Studying, Analyzing, and Interpreting Gut Microbiome Data for Clinicians. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **17**, 218–230 (2019).
17. Heinken, A., Basile, A. & Thiele, I. Advances in constraint-based modelling of microbial communities. *Current Opinion in Systems Biology* **27**, 100346 (2021).
18. Rosario, D. *et al.* Understanding the Representative Gut Microbiota Dysbiosis in Metformin-Treated Type 2 Diabetes Patients Using Genome-Scale Metabolic Modeling. *Front. Physiol.* **9**, 775 (2018).
19. Geman, O. *et al.* Deep learning tools for human microbiome big data. in *Soft Computing Applications* 265–275 (Springer International Publishing, 2018).
20. Resendis-Antonio, O. & Diener, C. Editorial: Systems Biology and the Challenge of Deciphering the Metabolic Mechanisms Underlying Cancer. *Front. Physiol.* **8**, 537 (2017).
21. Hernandez, C. J., Guss, J. D., Luna, M. & Goldring, S. R. Links Between the Microbiome and Bone. *J. Bone Miner. Res.* **31**, 1638–1646 (2016).
22. Chen, L. *et al.* The long-term genetic stability and individual specificity of the human gut microbiome. *Cell* **184**, 2302–2315.e12 (2021).
23. Karlsson, F. H. *et al.* Gut metagenome in European women with normal, impaired and diabetic glucose control. *Nature* **498**, 99–103 (2013).
24. Qin, J. *et al.* A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature* **490**, 55–60 (2012).
25. Wu, H. *et al.* The Gut Microbiota in Prediabetes and Diabetes: A Population-Based Cross-Sectional Study. *Cell Metab.* **32**, 379–390.e3 (2020).
26. Vos, W. M. de, de Vos, W. M. & Nieuwdorp, M. A gut prediction. *Nature* vol. 498 48–49 (2013).
27. Duvallet, C., Gibbons, S. M., Gurry, T., Irizarry, R. A. & Alm, E. J. Meta-analysis of gut microbiome studies identifies disease-specific and shared responses. *Nature Communications* vol. 8 (2017).
28. Yatsunenkov, T. *et al.* Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature* vol. 486 222–227 (2012).
29. Diener, C. *et al.* Progressive Shifts in the Gut Microbiome Reflect Prediabetes and Diabetes Development in a Treatment-Naive Mexican Cohort. *Front. Endocrinol.* **11**, 602326 (2020).
30. Santangelo, C. *et al.* Consumption of extra-virgin olive oil rich in phenolic compounds improves metabolic control in patients with type 2 diabetes mellitus: a possible involvement of reduced levels of circulating visfatin. *J. Endocrinol. Invest.* **39**, 1295–1301 (2016).
31. Zhang, L. *et al.* Akkermansia muciniphila can reduce the damage of gluco/lipotoxicity, oxidative stress and inflammation, and normalize intestine microbiota in streptozotocin-induced diabetic rats. *Pathog. Dis.* **76**, (2018).
32. Grander, C. *et al.* Recovery of ethanol-induced Akkermansia muciniphila depletion ameliorates alcoholic liver disease. *Gut* **67**, 891–901 (2018).
33. Fujisaka, S. *et al.* Bofutsushosan improves gut barrier function with a bloom of Akkermansia

- muciniphila and improves glucose metabolism in mice with diet-induced obesity. *Sci. Rep.* **10**, 5544 (2020).
34. Le Chatelier, E. *et al.* Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature* **500**, 541–546 (2013).
 35. Ellekilde, M. *et al.* Characterization of the gut microbiota in leptin deficient obese mice - Correlation to inflammatory and diabetic parameters. *Res. Vet. Sci.* **96**, 241–250 (2014).
 36. Zhang, J. *et al.* Decreased Abundance of *Akkermansia muciniphila* Leads to the Impairment of Insulin Secretion and Glucose Homeostasis in Lean Type 2 Diabetes. *Adv. Sci.* **8**, e2100536 (2021).
 37. Depommier, C. *et al.* Supplementation with *Akkermansia muciniphila* in overweight and obese human volunteers: a proof-of-concept exploratory study. *Nat. Med.* **25**, 1096–1103 (2019).
 38. Kim, Y., Keogh, J. & Clifton, P. A review of potential metabolic etiologies of the observed association between red meat consumption and development of type 2 diabetes mellitus. *Metabolism* **64**, 768–779 (2015).
 39. Sanchez-Alcoholado, L. *et al.* Role of Gut Microbiota on Cardio-Metabolic Parameters and Immunity in Coronary Artery Disease Patients with and without Type-2 Diabetes Mellitus. *Front. Microbiol.* **8**, 1936 (2017).
 40. Doumatey, A. P. *et al.* Gut Microbiome Profiles Are Associated With Type 2 Diabetes in Urban Africans. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **10**, 63 (2020).
 41. Zhang, C. *et al.* Interactions between gut microbiota, host genetics and diet relevant to development of metabolic syndromes in mice. *ISME J.* **4**, 232–241 (2010).
 42. Hu, Y., Zheng, Q. & Wanek, W. Flux Analysis of Free Amino Sugars and Amino Acids in Soils by Isotope Tracing with a Novel Liquid Chromatography/High Resolution Mass Spectrometry Platform. *Anal. Chem.* **89**, 9192–9200 (2017).
 43. Feng, X. *et al.* Bridging the gap between fluxomics and industrial biotechnology. *J. Biomed. Biotechnol.* **2010**, 460717 (2010).
 44. Binsl, T. W. *et al.* Measuring non-steady-state metabolic fluxes in starch-converting faecal microbiota in vitro. *Benef. Microbes* **1**, 391–405 (2010).
 45. Greenblum, S., Turnbaugh, P. J. & Borenstein, E. Metagenomic systems biology of the human gut microbiome reveals topological shifts associated with obesity and inflammatory bowel disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 594–599 (2012).
 46. Kulkarni, P., Devkumar, P. & Chattopadhyay, I. Could dysbiosis of inflammatory and anti-inflammatory gut bacteria have an implications in the development of type 2 diabetes? A pilot investigation. *BMC Res. Notes* **14**, 52 (2021).
 47. Xu, Z., Malmer, D., Langille, M. G. I., Way, S. F. & Knight, R. Which is more important for classifying microbial communities: who's there or what they can do? *ISME J.* **8**, 2357–2359 (2014).
 48. Petersen, C. *et al.* Dietary supplementation with strawberry induces marked changes in the

- composition and functional potential of the gut microbiome in diabetic mice. *J. Nutr. Biochem.* **66**, 63–69 (2019).
49. Resendis-Antonio, O., Reed, J. L., Encarnación, S., Collado-Vides, J. & Palsson, B. Ø. Metabolic reconstruction and modeling of nitrogen fixation in *Rhizobium etli*. *PLoS Comput. Biol.* **3**, 1887–1895 (2007).
 50. Orth, J. D., Thiele, I. & Palsson, B. Ø. What is flux balance analysis? *Nat. Biotechnol.* **28**, 245–248 (2010).
 51. Abram, F. Systems-based approaches to unravel multi-species microbial community functioning. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* **13**, 24–32 (2015).
 52. Witherden, E. A., Moyes, D. L., Bruce, K. D., Ehrlich, S. D. & Shoaie, S. Using systems biology approaches to elucidate cause and effect in host–microbiome interactions. *Current Opinion in Systems Biology* **3**, 141–146 (2017).
 53. Seaver, S. M. D., Henry, C. S. & Hanson, A. D. Frontiers in metabolic reconstruction and modeling of plant genomes. *J. Exp. Bot.* **63**, 2247–2258 (2012).
 54. Lachance, J.-C. *et al.* BOFdat: Generating biomass objective functions for genome-scale metabolic models from experimental data. *PLoS Comput. Biol.* **15**, e1006971 (2019).
 55. Feist, A. M., Herrgård, M. J., Thiele, I., Reed, J. L. & Palsson, B. Ø. Reconstruction of biochemical networks in microorganisms. *Nat. Rev. Microbiol.* **7**, 129–143 (2009).
 56. Raman, K. & Chandra, N. Flux balance analysis of biological systems: applications and challenges. *Brief. Bioinform.* **10**, 435–449 (2009).
 57. Reed, J. L., Famili, I., Thiele, I. & Palsson, B. O. Towards multidimensional genome annotation. *Nat. Rev. Genet.* **7**, 130–141 (2006).
 58. Price, N. D., Reed, J. L. & Palsson, B. Ø. Genome-scale models of microbial cells: evaluating the consequences of constraints. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**, 886–897 (2004).
 59. Bauer, E., Zimmermann, J., Baldini, F., Thiele, I. & Kaleta, C. BacArena: Individual-based metabolic modeling of heterogeneous microbes in complex communities. *PLoS Comput. Biol.* **13**, e1005544 (2017).
 60. Zomorodi, A. R. & Maranas, C. D. OptCom: a multi-level optimization framework for the metabolic modeling and analysis of microbial communities. *PLoS Comput. Biol.* **8**, e1002363 (2012).
 61. Schellenberger, J. *et al.* Quantitative prediction of cellular metabolism with constraint-based models: the COBRA Toolbox v2.0. *Nat. Protoc.* **6**, 1290–1307 (2011).
 62. Lakshmanan, M., Koh, G., Chung, B. K. S. & Lee, D.-Y. Software applications for flux balance analysis. *Brief. Bioinform.* **15**, 108–122 (2012).
 63. Chan, S. H. J., Simons, M. N. & Maranas, C. D. SteadyCom: Predicting microbial abundances while ensuring community stability. *PLoS Comput. Biol.* **13**, e1005539 (2017).
 64. Coyte, K. Z. & Rakoff-Nahoum, S. Understanding Competition and Cooperation within the Mammalian Gut Microbiome. *Curr. Biol.* **29**, R538–R544 (2019).

65. Machado, D. *et al.* Polarization of microbial communities between competitive and cooperative metabolism. *Nat Ecol Evol* **5**, 195–203 (2021).
66. Coyte, K. Z., Schluter, J. & Foster, K. R. The ecology of the microbiome: Networks, competition, and stability. *Science* **350**, 663–666 (2015).
67. Savageau, M. A. *Biochemical Systems Analysis: A Study of Function and Design in Molecular Biology*. (CreateSpace, 2010).
68. Heinrich, R. & Rapoport, T. A. A linear steady-state treatment of enzymatic chains. General properties, control and effector strength. *Eur. J. Biochem.* **42**, 89–95 (1974).
69. Diener, C., Gibbons, S. M. & Resendis-Antonio, O. MICOM: metagenome-scale modeling to infer metabolic interactions in the gut microbiota. doi:10.1101/361907.
70. Canché-Aguilar, D. L., Zapata-Vázquez, R. E., Rubio-Zapata, H. A. & Cámara-Vallejos, R. M. Efecto de una intervención educativa sobre el estilo de vida, el control glucémico y el conocimiento de la enfermedad, en personas con diabetes mellitus tipo 2, Bokobá, Yucatán. *Rev. Ordem Med.* **30**, (2018).
71. Diener, C. *et al.* Progressive shifts in the gut microbiome reflect prediabetes and diabetes development in a treatment-naïve Mexican cohort. doi:10.1101/710152.
72. Noronha, A. *et al.* The Virtual Metabolic Human database: integrating human and gut microbiome metabolism with nutrition and disease. *Nucleic Acids Res.* **47**, D614–D624 (2019).
73. Magnúsdóttir, S. *et al.* Generation of genome-scale metabolic reconstructions for 773 members of the human gut microbiota. *Nat. Biotechnol.* **35**, 81–89 (2017).
74. Kiela, P. R. & Ghishan, F. K. Physiology of Intestinal Absorption and Secretion. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* **30**, 145–159 (2016).
75. Lambeth, S. M. *et al.* Composition, Diversity and Abundance of Gut Microbiome in Prediabetes and Type 2 Diabetes. *J Diabetes Obes* **2**, 1–7 (2015).
76. Morgan, X. C. *et al.* Dysfunction of the intestinal microbiome in inflammatory bowel disease and treatment. *Genome Biol.* **13**, R79 (2012).
77. Li, Q. *et al.* Implication of the gut microbiome composition of type 2 diabetic patients from northern China. *Sci. Rep.* **10**, 5450 (2020).
78. Ciubotaru, I., Green, S. J., Kukreja, S. & Barengolts, E. Significant differences in fecal microbiota are associated with various stages of glucose tolerance in African American male veterans. *Transl. Res.* **166**, 401–411 (2015).
79. Barengolts, E. *et al.* Gut microbiota varies by opioid use, circulating leptin and oxytocin in African American men with diabetes and high burden of chronic disease. *PLoS One* **13**, e0194171 (2018).
80. Zheng, W., Zhao, Z., Gong, Q., Zhai, B. & Li, Z. Effects of cover crop in an apple orchard on microbial community composition, networks, and potential genes involved with degradation of crop residues in soil. *Biol. Fertil. Soils* **54**, 743–759 (2018).
81. Antoniewicz, M. R. A guide to deciphering microbial interactions and metabolic fluxes in

- microbiome communities. *Curr. Opin. Biotechnol.* **64**, 230–237 (2020).
82. Stanislawski, M. A., Dabelea, D., Lange, L. A., Wagner, B. D. & Lozupone, C. A. Gut microbiota phenotypes of obesity. *NPJ Biofilms Microbiomes* **5**, 18 (2019).
 83. Laukens, D., Brinkman, B. M., Raes, J., De Vos, M. & Vandenabeele, P. Heterogeneity of the gut microbiome in mice: guidelines for optimizing experimental design. *FEMS Microbiol. Rev.* **40**, 117–132 (2016).
 84. Chen, L. *et al.* Gut microbial co-abundance networks show specificity in inflammatory bowel disease and obesity. *Nat. Commun.* **11**, 4018 (2020).
 85. Takewaki, F. *et al.* Habitual Dietary Intake Affects the Altered Pattern of Gut Microbiome by Acarbose in Patients with Type 2 Diabetes. *Nutrients* **13**, (2021).
 86. He, C. *et al.* The eradication of *Helicobacter pylori* restores rather than disturbs the gastrointestinal microbiota in asymptomatic young adults. *Helicobacter* **24**, e12590 (2019).
 87. Hiippala, K., Kainulainen, V., Kalliomäki, M., Arkkila, P. & Satokari, R. Mucosal Prevalence and Interactions with the Epithelium Indicate Commensalism of *Sutterella* spp. *Front. Microbiol.* **7**, 1706 (2016).
 88. Ferreira-Halder, C. V., Faria, A. V. de S. & Andrade, S. S. Action and function of *Faecalibacterium prausnitzii* in health and disease. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* **31**, 643–648 (2017).
 89. Reddel, S. *et al.* Gut microbiota profile in children affected by atopic dermatitis and evaluation of intestinal persistence of a probiotic mixture. *Sci. Rep.* **9**, 4996 (2019).
 90. Trosvik, P. & de Muinck, E. J. Ecology of bacteria in the human gastrointestinal tract--identification of keystone and foundation taxa. *Microbiome* **3**, 44 (2015).
 91. Marino, S., Baxter, N. T., Huffnagle, G. B., Petrosino, J. F. & Schloss, P. D. Mathematical modeling of primary succession of murine intestinal microbiota. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 439–444 (2014).
 92. Li, W. & Ma, Z. S. FBA Ecological Guild: Trio of Firmicutes-Bacteroidetes Alliance against Actinobacteria in Human Oral Microbiome. *Sci. Rep.* **10**, 287 (2020).
 93. Turnbaugh, P. J. *et al.* An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* **444**, 1027–1031 (2006).
 94. Vacca, M. *et al.* The Controversial Role of Human Gut Lachnospiraceae. *Microorganisms* **8**, (2020).
 95. Vital, M., Karch, A. & Pieper, D. H. Colonic Butyrate-Producing Communities in Humans: an Overview Using Omics Data. *mSystems* **2**, (2017).
 96. Clark, R. L. *et al.* Design of synthetic human gut microbiome assembly and function. *bioRxiv* 2020.08.19.241315 (2020) doi:10.1101/2020.08.19.241315.
 97. Bui, T. P. N. *et al.* Mutual Metabolic Interactions in Co-cultures of the Intestinal Anaerostipes rhamnosivorans With an Acetogen, Methanogen, or Pectin-Degrader Affecting Butyrate Production. *Front. Microbiol.* **10**, 2449 (2019).

98. Boillot, J. *et al.* Effects of dietary propionate on hepatic glucose production, whole-body glucose utilization, carbohydrate and lipid metabolism in normal rats. *Br. J. Nutr.* **73**, 241–251 (1995).
99. Priyadarshini, M., Wicksteed, B., Schiltz, G. E., Gilchrist, A. & Layden, B. T. SCFA Receptors in Pancreatic β Cells: Novel Diabetes Targets? *Trends Endocrinol. Metab.* **27**, 653–664 (2016).
100. Lin, C.-H. *et al.* Lactulose and Melibiose Attenuate MPTP-Induced Parkinson's Disease in Mice by Inhibition of Oxidative Stress, Reduction of Neuroinflammation and Up-Regulation of Autophagy. *Front. Aging Neurosci.* **12**, 226 (2020).
101. Lee, G.-C. *et al.* The potential of lactulose and melibiose, two novel trehalase-indigestible and autophagy-inducing disaccharides, for polyQ-mediated neurodegenerative disease treatment. *Neurotoxicology* **48**, 120–130 (2015).
102. Flores-Guerrero, J. L. *et al.* [beta]eta-hydroxybutyrate and risk for incident type 2 diabetes: Results from the prevend prospective cohort study. *Endocr. abstr.* (2019) doi:10.1530/endoabs.67.o57.
103. Mendonça Machado, N. *et al.* Type 2 Diabetes Metabolic Improvement After Roux-en-Y Gastric Bypass May Include a Compensatory Mechanism That Balances Fatty Acid β and ω Oxidation. *JPEN J. Parenter. Enteral Nutr.* **44**, 1417–1427 (2020).
104. Das, P., Babaei, P. & Nielsen, J. Metagenomic analysis of microbe-mediated vitamin metabolism in the human gut microbiome. *BMC Genomics* **20**, 208 (2019).
105. Ma, T. *et al.* UPLC-MS-based urine nontargeted metabolic profiling identifies dysregulation of pantothenate and CoA biosynthesis pathway in diabetic kidney disease. *Life Sci.* **258**, 118160 (2020).
106. Duncan, S. H., Hold, G. L., Barcenilla, A., Stewart, C. S. & Flint, H. J. Roseburia intestinalis sp. nov., a novel saccharolytic, butyrate-producing bacterium from human faeces. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **52**, 1615–1620 (2002).
107. Taneja, V. Chapter 39 - Microbiome: Impact of Gender on Function & Characteristics of Gut Microbiome. in *Principles of Gender-Specific Medicine (Third Edition)* (ed. Legato, M. J.) 569–583 (Academic Press, 2017).
108. Eeckhaut, V. *et al.* The Probiotic *Butyrivibrio pullicaecorum* Reduces Feed Conversion and Protects from Potentially Harmful Intestinal Microorganisms and Necrotic Enteritis in Broilers. *Front. Microbiol.* **7**, 1416 (2016).

Apéndice A

Coeficientes beta de modelo de regresión logística multinomial

Tabla A-1. Coeficientes significativos de la regresión logística multinomial. los valores de significancia se representaron mediante asteriscos(valores de $p < 0.05$ *, < 0.01 **, < 0.001 ***).

Predictor	IFG	IFG_IGT	IGT	T2D
Constant	-0.274***	-0.475***	-1.342	-1.081***
Lachnospiraceae_Blaustia_Non	-0.556	2.511	27.176**	-0.369
Phascolarctobacterium_Lachnospiraceae_Non	0.371	-0.78	-21.908*	1.675
Intestinibacter_Phascolarctobacterium_cop	-0.84	-0.316	-16.871**	-2.101**
Sutterella_Subdoligranulum_Non	-20.593	3.658	1.258	-16.285***
Lachnospiraceae_Blaustia_com	0.556	-0.55	-15.366**	-4.199**
Paraprevotella_Lachnospiraceae_cop	-0.903	-0.474	14.616**	-1.826
Sutterella_Faecalibacterium_Non	19.275	-4.001	-2.489*	14.543***
Phascolarctobacterium_Veillonella_com	0.749	0.159	13.767***	0.465
Paraprevotella_Lachnospiraceae_Non	0.457	0.787	-13.702**	-2.893**
Dorea_Enterococcus_com	3.453	0.315	-13.694*	4.703
Lachnospiraceae_Blaustia_cop	-0.275	-2.437*	-13.153*	3.487*
Lachnospiraceae_Haemophilus_com	0.15	0.575	12.67*	-4.503**
Lachnospiraceae_Haemophilus_cop	0.544	-1.167	-12.533*	3.51*
Roseburia_Lachnospiraceae_Non	0.506	-0.938	11.801*	-3.91*
Phascolarctobacterium_Veillonella_cop	-0.421	0.63	-11.772***	1.501
Haemophilus_Phascolarctobacterium_cop	-0.543	-0.053	-11.579**	0.257
Intestinibacter_Phascolarctobacterium_com	-0.298	0.126	11.449**	0.065
Sutterella_Faecalibacterium_com	-10.801	1.319	9.008**	-11.175***
Roseburia_Lachnospiraceae_com	-1.176*	-0.351	-11.068**	1.974
Phascolarctobacterium_Lachnospiraceae_cop	-1.117	-2.248**	11.026*	-1.853*
Veillonella_Lachnospira_com	-1.147	-2.564**	-9.902**	-3.076**
Lachnospiraceae_Faecalibacterium_com	0.783	1.135	-9.783*	3.311*
Sutterella_Subdoligranulum_com	11.133	-2.064	-4.615	9.561***
Phascolarctobacterium_Lachnospiraceae_com	0.472	2.553***	9.54*	-0.904
Lachnospiraceae_Dialister_com	-0.975	-0.238	-9.003*	-0.519

Table A-1 continued from previous page

Predictor	IFG	IFG_IGT	IGT	T2D
Lachnospira_Odoribacter_com	-1.454**	-0.015	-8.728*	-0.943
Klebsiella_Lachnoclostridium_Non	-0.503	-0.264	-7.944**	-0.558
Sutterella_Faecalibacterium_cop	-8.749	2.206*	-7.861*	-4.448***
Haemophilus_Phascolarctobacterium_com	0.146	-0.36	7.377**	-1.595
Bilophila_Subdoligranulum_com	0.008	-1.53*	7.113*	2.241*
Butyricoccus_Lachnoclostridium_Non	0.147	-2.343**	-6.974*	-2.361**
Dorea_Lachnoclostridium_com	-0.466	-1.067	6.616*	-5.261***
Phascolarctobacterium_Butyricoccus_cop	-0.901	-0.963	-6.223**	-0.536
Veillonella_Klebsiella_com	0.18	2.21**	6.15**	1.142
Dialister_Paraprevotella_Non	0.113	-0.297	-6.115**	1.43
Lachnospira_Klebsiella_com	-0.857	-0.981	-3.575*	-5.949**
Bilophila_Subdoligranulum_cop	-0.949	0.594	-3.081	-5.91***
Sutterella_Subdoligranulum_cop	9.186	-2.069	2.015	5.643***
Lachnospira_Methanobrevibacter_com	0.089	-0.354	2.193	-5.53**
Bilophila_Subdoligranulum_Non	0.667	0.461	-5.374**	2.588**
Dialister_Lachnoclostridium_Non	0.281	-0.91*	5.304*	-0.407
Lachnoclostridium_Dialister_Non	0.281	-0.91*	5.304*	-0.407
Veillonella_Lachnospira_Non	0.533	1.088	5.3*	3.682***
Dorea_Lachnoclostridium_Non	-0.354	0.035	-8.849	5.152**
Klebsiella_Phascolarctobacterium_com	-0.978	0.072	1.662	-4.974***
Butyricoccus_Lachnoclostridium_cop	-0.696	-0.337	4.857*	1.783*
Lachnospira_Klebsiella_cop	-0.034	0.084	-1.235	4.821***
Phascolarctobacterium_Butyricoccus_Non	-0.841	2.462**	4.46*	-2.242**
Intestinibacter_Phascolarctobacterium_Non	0.863*	-0.285	4.081*	0.956
Lachnoclostridium_Anaerostipes_cop	-0.584	-1.531*	3.892	-3.827***
Paraprevotella_Lachnoclostridium_com	0.172	-0.788	-2.256	3.639***
Lachnospira_Methanobrevibacter_cop	-0.127	-0.188	-3.847	3.549*
Lachnospira_Klebsiella_Non	0.617	0.422	3.468*	0.047
Phascolarctobacterium_Klebsiella_Non	-0.269	-0.673	-3.437*	0.925
Klebsiella_Phascolarctobacterium_Non	-0.269	-0.673	-3.437*	0.925
Veillonella_Lachnospira_cop	0.34	1.001	3.26*	-1.687
Dialister_Lactobacillus_com	-0.304	-3.201**	7.7	-0.635
Lachnoclostridium_Anaerostipes_Non	0.399	0.455	-2.155	3.062***
Phascolarctobacterium_Veillonella_Non	-0.602	-1.264	-3.337	-3.046**
Klebsiella_Phascolarctobacterium_cop	0.973	0.126	0.433	2.969**
Phascolarctobacterium_Klebsiella_cop	-0.291	-1.031	-0.726	-2.79**
Enterococcus_Streptococcus_com	4.845	2.715*	8.984	3.146
Klebsiella_Lachnoclostridium_com	-0.256	-0.606	3.221	-2.563*
Dialister_Paraprevotella_cop	-2.22*	-1.095	3.331	-2.145
Butyricoccus_Lachnoclostridium_com	0.275	2.204***	0.775	-0.502
Methanobrevibacter_Lachnospira_com	-0.359	-2.024*	-6.266	-0.083
Dialister_Lactobacillus_cop	-0.001	1.987*	-7.404	0.616
Dialister_Lachnoclostridium_cop	-1.194	-0.523	-2.788	-1.983*
Phascolarctobacterium_Butyricoccus_com	1.468**	-1.974*	0.421	1.697
Dialister_Paraprevotella_com	1.833**	0.917	1.442	-0.366
Lachnoclostridium_Bifidobacterium_com	-1.787**	-0.568	3.52	-0.813
Lactobacillus_Dialister_Non	0.031	0.739*	-1.638*	-1.062***
Dialister_Lactobacillus_Non	0.031	0.739*	-1.638*	-1.062***
Veillonella_Klebsiella_cop	-0.548	-1.595*	-2.414	-0.825
Methanobrevibacter_Lachnospira_cop	0.321	1.482*	4.612	-1.897
Phascolarctobacterium_Klebsiella_com	0.287	1.229*	2.821	0.785

Table A-1 continued from previous page

Predictor	IFG	IFG_IGT	IGT	T2D
Lachnoclostridium_Bifidobacterium_cop	1.018*	-0.758	0.496	-0.064
Haemophilus_Lachnoclostridium_Non	-0.969**	0.117	-1.479	-0.088
Lachnoclostridium_Haemophilus_Non	-0.969**	0.117	-1.479	-0.088
Lachnospira_Methanobrevibacter_Non	-0.236	0.067	0.313	0.9*
Methanobrevibacter_Lachnospira_Non	-0.236	0.067	0.313	0.9*

Apéndice B

Flujos relevantes estadísticamente

Tabla B-1. Variables basales de los grupos. Se muestra en la primera y segunda columna los flujos y metabolitos asociados a estos, respectivamente. Los promedios para cada grupo y flujos normalizados fueron presentados en cada celda más el valor de desviación estándar, además orden de la tabla está dada por los valores de p menores obtenidos del ANOVA. Las letras dentro de cada celda indican que en el estudio por pares (Bonferroni) se obtuvo valores de $p < 0.05$ (a con Healthy, b con IFG, c con IGT, d con IFG+IGT).

Exchange flux	Related metabolite	Total (n=402)	Healthy (n=213)	IFG (n=50)	IGT (n=39)	IFG+IGT (n=56)	T2D (n=44)
EX_melib(e)	Melibiose	1.15e-17±9.99e-01	4.73e-01±8.20e-01	-9.42e-01±9.92e-01a	-5.35e-01±2.38e-01a	3.27e-01±5.47e-01bc	-9.04e-01±6.45e-01ad
EX_pnto_R(e)	(R)-Pantothenate	-1.24e-17±9.99e-01	5.39e-01±6.31e-01	-9.63e-01±8.25e-01a	1.01e-01±3.41e-01b	4.60e-01±4.51e-01b	6.11e-01±1.00e+00b
EX_actn_R(e)	(R)-Acetoin	-2.11e-17±9.99e-01	-3.42e-01±8.44e-01	-6.80e-01±1.02e+00	1.11e+00±8.18e-01ab	4.72e-01±4.53e-01abc	6.89e-01±7.23e-01ab
EX_MGlc123(e)	mucin-type O-glycan No 123	1.47e-17±9.99e-01	4.75e-01±8.47e-01	-4.19e-01±2.64e-01a	-1.28e+00±7.70e-01a	-1.90e-01±5.99e-01ac	-4.99e-01±7.48e-01ac
EX_bhb(e)	(R)-3-hydroxybutyrate	-3.83e-17±9.99e-01	-4.17e-01±9.45e-01	1.50e-01±3.55e-01	9.07e-01±7.92e-01a	5.45e-01±6.85e-01a	6.00e-01±7.31e-01a
EX_MGlc169(e)	mucin-type O-glycan No 169	-4.51e-17±9.99e-01	-5.79e-01±7.93e-01	9.62e-01±9.09e-01a	-7.85e-02±6.09e-02	4.64e-01±7.05e-01a	4.64e-02±7.76e-01ab
EX_MGlc55_rl(e)	released mucin-type O-glycan No 55	1.48e-17±9.99e-01	4.71e-01±8.45e-01	-3.52e-01±2.10e-01	-1.14e+00±8.41e-01a	-6.48e-01±8.06e-01a	-1.64e-01±7.01e-01ac
EX_pac(e)	phenylacetate	1.47e-17±9.99e-01	-4.52e-01±6.86e-01	-1.15e+00±6.14e-01a	4.34e-01±8.89e-01ab	1.13e-01±7.25e-01ab	7.29e-01±1.10e+00abd
EX_MGlc152(e)	mucin-type O-glycan No 152	-1.94e-17±9.99e-01	4.42e-01±8.68e-01	-4.91e-01±4.03e-01a	-1.06e+00±9.95e-01a	-4.77e-01±7.52e-01a	-4.27e-01±8.65e-01a
EX_MGlc19(e)	mucin-type O-glycan No 19	-5.07e-18±9.99e-01	-5.64e-02±6.17e-01	8.96e-01±9.76e-01a	-1.03e+00±9.10e-01ab	6.50e-01±8.23e-01ac	-3.89e-01±5.66e-01bd
EX_tym(e)	tyraminium	2.14e-17±9.99e-01	-3.76e-01±7.65e-01	1.01e+00±4.60e-01a	1.48e+00±8.03e-01a	-7.62e-02±1.04e+00bc	6.37e-01±2.26e-01a
EX_MGlc194(e)	mucin-type O-glycan No 194	-2.12e-17±9.99e-01	5.11e-01±7.69e-01	-5.60e-01±6.49e-01a	-2.52e-01±1.35e-01	-6.61e-01±1.13e+00a	5.25e-01±7.11e-01bd
EX_MGlc153(e)	mucin-type O-glycan No 153	1.67e-18±9.99e-01	-8.89e-02±4.25e-01	-9.20e-01±9.63e-01a	7.29e-01±1.19e+00ab	1.99e-01±7.85e-01b	6.86e-01±7.88e-01ab
EX_kestopt(e)	Ketopentose (4 fru, 1 glc inulin-type fructo-oligosaccharide)	2.14e-17±9.99e-01	3.30e-01±7.47e-01	-9.53e-01±8.89e-01a	-4.04e-01±9.55e-01a	1.20e-01±4.35e-01b	8.64e-01±1.00e+00bc
EX_oxa(e)	oxalate(2-)	2.71e-17±9.99e-01	-3.39e-02±8.41e-01	-1.11e+00±4.43e-01a	8.96e-01±1.08e+00ab	-1.10e+00±3.61e-01ac	-1.19e+00±3.37e-01ac
EX_MGlc45_rl(e)	released mucin-type O-glycan No 45	-1.63e-18±9.99e-01	-3.89e-01±7.35e-01	3.57e-01±9.57e-01a	-5.55e-01±1.18e+00b	8.61e-01±9.48e-01ac	1.82e-01±6.80e-01
EX_MGlc107_rl(e)	released mucin-type O-glycan No 107	6.12e-18±9.99e-01	1.70e-01±2.87e-01	-1.24e-02±9.22e-01	-9.28e-01±9.66e-01ab	-3.88e-01±7.44e-01	9.45e-01±1.01e+00abcd
EX_MGlc98_rl(e)	released mucin-type O-glycan No 98	-1.63e-18±9.99e-01	1.33e-01±4.93e-01	7.61e-01±1.14e+00a	-8.61e-01±1.15e+00ab	-1.91e-01±9.26e-01bc	-2.37e-01±4.69e-01b
EX_MGlc84_rl(e)	released mucin-type O-glycan No 84	4.32e-17±9.99e-01	4.17e-02±6.57e-01	-4.28e-01±4.36e-01	-1.05e+00±9.23e-01a	7.80e-01±1.07e+00abc	1.82e-02±9.61e-01cd
EX_MGlc131(e)	mucin-type O-glycan No 131	-2.83e-17±9.99e-01	5.86e-02±7.48e-01	-9.61e-01±9.05e-01a	2.92e-01±3.96e-01b	7.02e-01±1.16e+00ab	3.68e-01±6.42e-01b
EX_MGlc48(e)	mucin-type O-glycan No 48	1.53e-17±9.99e-01	-3.48e-01±6.24e-01	4.98e-02±8.45e-01	-5.49e-01±1.31e+00	8.31e-01±1.01e+00abc	5.34e-01±9.09e-01ac
EX_gthox(e)	Oxidized glutathione	7.02e-18±9.99e-01	3.68e-01±8.04e-01	-8.29e-01±1.14e+00a	4.34e-01±3.68e-01b	3.83e-01±4.49e-01b	-1.90e-03±4.25e-01b
EX_MGlc48_rl(e)	released mucin-type O-glycan No 48	-1.62e-18±9.99e-01	4.69e-01±7.23e-01	-2.69e-01±1.46e+00a	-8.42e-01±7.37e-01a	-6.10e-01±5.95e-01a	2.40e-02±5.79e-01c
EX_so3(e)	Sulfite	1.19e-17±9.98e-01	2.27e-02±6.45e-01	9.32e-01±1.02e+00a	-1.43e+00±5.56e-01ab	1.83e-01±9.75e-01c	1.62e-01±3.21e-01c
EX_MGlc25(e)	mucin-type O-glycan No 25	4.28e-17±9.99e-01	-2.06e-01±6.72e-01	3.36e-01±9.20e-01	-9.32e-01±1.09e+00ab	8.40e-01±9.37e-01ac	2.54e-01±1.08e+00c
EX_ind3ac(e)	indole-3-acetate	-4.98e-18±9.98e-01	-9.93e-01±5.13e-01	9.07e-01±7.16e-01a	-4.97e-01±4.87e-01b	-1.06e-01±9.23e-01ab	-1.59e-01±3.21e-01b
EX_MGlc39_rl(e)	released mucin-type O-glycan No 39	1.75e-17±9.99e-01	-3.19e-01±7.86e-01	-7.06e-01±7.40e-01	7.96e-01±1.12e+00ab	5.10e-01±8.78e-01ab	-4.15e-01±6.97e-01cd

Table B-1 continued from the previous page

Exchange flux	Related metabolite	Total (n=402)	Healthy (n=213)	IFG (n=50)	IGT (n=39)	IFG+IGT (n=56)	T2D (n=44)
EX_MGlen27_ri(e)	released mucin-type O-glycan No 27	-3.37e-18±9.99e-01	-4.56e-01±7.43e-01	5.34e-01±1.29e+00a	4.35e-01±1.03e+00a	5.29e-01±8.04e-01a	-2.56e-01±6.75e-01bd
EX_MGlen74_ri(e)	released mucin-type O-glycan No 74	1.47e-17±9.99e-01	8.22e-02±7.44e-01	-9.69e-01±9.93e-01a	8.82e-01±1.16e+00ab	-5.84e-02±7.03e-01bc	-7.35e-02±1.04e+00bc
EX_uri(e)	Uridine	3.57e-18±9.99e-01	-7.18e-02±7.38e-01	8.54e-01±1.19e+00a	-5.42e-01±8.28e-01b	-2.64e-01±9.20e-01b	-4.59e-01±8.55e-01b
EX_din(e)	Deoxyinosine	-2.17e-18±9.99e-01	2.93e-01±7.87e-01	5.21e-02±8.89e-01	-6.82e-01±6.28e-01a	-1.08e+00±8.08e-01ab	7.47e-01±9.49e-01cd
EX_MGlen89_ri(e)	released mucin-type O-glycan No 89	2.71e-17±9.99e-01	1.43e-01±7.37e-01	-6.98e-01±1.00e+00a	-8.01e-01±1.00e+00a	-3.89e-01±7.39e-01	7.95e-01±1.15e+00abcd
EX_MGlen170(e)	mucin-type O-glycan No 170	3.65e-18±9.99e-01	3.06e-01±2.52e-01	-8.60e-01±8.99e-01a	9.44e-01±9.63e-01b	-5.40e-02±8.45e-01bc	-2.02e-01±8.68e-01c
EX_MGlen41_ri(e)	released mucin-type O-glycan No 41	4.24e-17±9.99e-01	-5.01e-01±7.38e-01	7.94e-01±1.17e+00a	3.08e-02±3.03e-01	8.26e-02±8.87e-01b	4.10e-01±8.60e-01a
EX_MGlen84(e)	mucin-type O-glycan No 84	-2.14e-17±9.99e-01	-7.94e-02±7.24e-01	-8.22e-01±1.17e+00a	1.45e-01±4.75e-01b	7.65e-01±1.06e+00ab	1.60e-01±4.64e-01b
EX_12ppd_8(e)	(S)-propane-1,2-diol	6.87e-20±9.99e-01	-4.19e-01±6.96e-01	-6.36e-01±8.74e-01	6.15e-01±1.09e+00ab	1.64e-01±8.35e-01ab	5.64e-01±1.12e+00ab
EX_MGlen57_ri(e)	released mucin-type O-glycan No 57	2.19e-17±9.99e-01	-1.57e-01±2.18e-01	7.66e-01±9.89e-01a	-9.65e-01±9.11e-01ab	1.29e-02±6.12e-01bc	-1.39e-01±7.29e-01bc
EX_MGlen114_ri(e)	released mucin-type O-glycan No 114	-4.51e-17±9.99e-01	-3.04e-01±5.10e-01	-8.85e-01±1.06e+00	2.38e-01±8.74e-01b	6.32e-01±1.11e+00ab	3.06e-01±8.04e-01ab
EX_isocapr(e)	isocaproate	-6.14e-18±9.99e-01	-3.23e-01±7.38e-01	-6.17e-01±7.25e-01	8.84e-01±1.14e+00ab	-1.39e-01±8.29e-01c	3.25e-01±9.74e-01ab
EX_MGlen68(e)	mucin-type O-glycan No 68	-5.01e-18±9.99e-01	-1.18e-01±4.21e-01	-7.72e-01±1.11e+00a	9.73e-01±9.53e-01ab	2.95e-02±8.09e-01bc	1.53e-01±9.13e-01bc
EX_isoval(e)	isovalerate, 3-Methylbutanoate	-6.14e-18±9.99e-01	-3.23e-01±7.40e-01	-6.12e-01±7.18e-01	8.82e-01±1.15e+00ab	-1.39e-01±8.29e-01c	3.25e-01±9.74e-01ab
EX_MGlen87_ri(e)	released mucin-type O-glycan No 87	-2.29e-17±9.99e-01	6.67e-02±7.26e-01	-1.14e+00±8.29e-01a	4.19e-01±1.21e+00b	-8.35e-02±4.02e-01b	5.10e-01±1.22e+00b
EX_MGlen32_ri(e)	released mucin-type O-glycan No 32	1.45e-17±9.99e-01	2.37e-01±8.87e-01	-9.61e-01±5.56e-01a	5.40e-01±9.98e-01b	-3.62e-01±9.33e-01ac	-8.79e-01±8.94e-01ac
EX_MGlen55(e)	mucin-type O-glycan No 55	7.59e-18±9.99e-01	-4.16e-01±6.68e-01	-7.45e-01±4.89e-01	7.95e-01±1.06e+00ab	4.07e-01±1.08e+00ab	-4.86e-02±9.35e-01c
EX_dextrin(e)	Dextrin	4.56e-17±9.99e-01	-7.80e-02±4.86e-01	6.84e-01±1.10e+00a	-5.81e-01±6.34e-01b	-9.12e-01±1.01e+00ab	7.23e-01±6.10e-01acd
EX_tmao(e)	Trimethylamine N-oxide	-2.15e-17±9.99e-01	-3.20e-01±8.75e-01	5.87e-01±1.20e+00a	1.33e-01±7.22e-01	5.37e-01±9.51e-01a	-2.76e-01±8.03e-01bd
EX_glygn5(e)	glycogen, structure 5 (glycogenin-2[1,4-Glc])	7.02e-18±9.99e-01	-2.02e-01±4.12e-01	-9.60e-01±8.98e-01a	2.29e-01±9.59e-01b	6.35e-01±1.10e+00ab	1.25e-01±9.76e-01b
EX_MGlen163(e)	mucin-type O-glycan No 163	3.70e-17±9.99e-01	6.47e-02±5.68e-01	-7.60e-01±1.14e+00a	8.81e-01±1.08e+00ab	-1.71e-01±9.33e-01c	2.48e-01±8.47e-01b
EX_MGlen141(e)	mucin-type O-glycan No 141	4.57e-17±9.99e-01	5.57e-02±8.92e-01	7.40e-01±1.07e+00a	-7.39e-01±3.52e-01b	-4.07e-01±5.71e-01b	-7.79e-01±9.85e-01ab
EX_MGlen103_ri(e)	released mucin-type O-glycan No 103	-9.26e-18±9.99e-01	1.50e-01±7.12e-01	-3.29e-01±2.32e-01	-1.19e+00±8.63e-01a	4.31e-01±1.35e+00c	6.85e-02±9.06e-01c
EX_MGlen135(e)	mucin-type O-glycan No 135	4.30e-17±9.99e-01	1.06e-01±7.69e-01	-2.31e-01±2.47e-02	4.55e-01±9.43e-01	-9.96e-01±9.43e-01ac	3.98e-01±1.18e+00d
EX_T_antigen(e)	T antigen (core 1)	3.56e-17±9.99e-01	3.17e-01±6.03e-01	-2.08e-01±1.06e+00	-9.00e-01±9.58e-01a	6.83e-01±1.11e+00bc	-3.21e-01±9.33e-01ad
EX_MGlen78_ri(e)	released mucin-type O-glycan No 78	-3.51e-17±9.99e-01	5.56e-02±4.89e-01	-8.72e-01±1.00e+00a	6.09e-01±1.26e+00b	1.71e-02±5.50e-01b	4.58e-01±9.65e-01b
EX_ha_deg1(e)	hyaluronan degradation product 1	-2.57e-17±9.98e-01	1.36e-01±4.59e-01	5.76e-01±7.04e-01	9.24e-01±9.97e-01a	-1.29e-01±8.53e-01c	-9.49e-01±8.94e-01abcd
EX_MGlen28_ri(e)	released mucin-type O-glycan No 28	-2.57e-17±9.99e-01	2.04e-01±7.09e-01	6.71e-01±1.10e+00	-9.85e-01±1.05e+00ab	-3.87e-01±8.92e-01ab	8.49e-02±9.99e-01c
EX_cspg_a_degr(e)	Dimer GalNAc6S-GlcA	-2.29e-17±9.99e-01	-3.97e-01±8.49e-01	2.58e-01±2.32e-01	7.79e-01±1.24e+00a	3.46e-01±7.26e-01a	4.03e-01±8.46e-01a
EX_MGlen158_ri(e)	released mucin-type O-glycan No 158	-1.90e-17±9.99e-01	-3.36e-01±5.84e-01	-7.96e-01±8.68e-01	-7.28e-02±1.14e+00	7.02e-01±1.02e+00abc	3.23e-01±9.33e-01ab
EX_cspg_ab_rest(e)	Not degradable product CSABC-PASE_A/B, Gal4S-Gal-Xyl-L-Ser-protein	-2.57e-17±9.98e-01	-7.29e-01±5.53e-01	6.89e-02±3.00e-01	9.06e-01±8.93e-01a	4.68e-01±1.07e+00a	-5.88e-01±4.50e-01cd
EX_amylose300(e)	amylose (n=300 repeat units, alpha-1,4-glc)	3.70e-17±9.99e-01	-2.46e-01±8.07e-01	-1.83e-01±1.01e+00	1.56e+00±7.88e-01ab	3.42e-01±1.12e+00ac	1.19e+00±2.35e-01ab
EX_agal1b6agal(e)	Beta-1,6-N,N-diacetylgalactosamine	1.75e-17±9.99e-01	-3.79e-01±6.79e-01	-1.74e-01±1.42e+00	4.14e-01±7.17e-01a	9.05e-01±9.36e-01ab	-5.04e-02±7.36e-01d
EX_dhac(e)	deoxycholic acid	1.46e-17±9.98e-01	-5.23e-01±4.57e-01	8.68e-01±8.99e-01a	5.67e-01±9.04e-01a	-8.76e-01±9.87e-01bc	3.03e-01±4.18e-01d
EX_MGlen70(e)	mucin-type O-glycan No 70	-9.90e-18±9.99e-01	1.63e-01±7.15e-01	-2.35e-01±1.21e+00	-9.88e-01±9.20e-01a	-3.27e-01±7.72e-01	6.71e-01±1.21e+00bcd
EX_MGlen153_ri(e)	released mucin-type O-glycan No 153	-5.05e-18±9.99e-01	-4.85e-01±4.80e-01	8.12e-01±1.01e+00a	-6.09e-01±9.14e-01b	-7.92e-02±1.06e+00b	1.86e-01±9.36e-01a
EX_ppa(e)	propionate	5.01e-18±9.99e-01	-6.34e-03±8.75e-01	-1.12e+00±5.45e-01a	6.86e-01±1.29e+00ab	1.07e-01±9.51e-01b	-3.54e-01±7.83e-01c
EX_MGlen160(e)	mucin-type O-glycan No 160	-5.04e-17±9.99e-01	-4.36e-01±3.09e-01	6.92e-01±1.04e+00a	5.10e-02±1.02e+00b	-2.15e-01±7.45e-01b	-6.77e-01±8.94e-01b
EX_arabtr(e)	Arabinotriose	-1.41e-17±9.98e-01	1.79e-01±4.67e-01	3.96e-01±9.25e-01	-6.25e-01±6.09e-01	-1.01e+00±8.95e-01ab	7.17e-01±1.07e+00cd
EX_MGlen104(e)	mucin-type O-glycan No 104	3.56e-17±9.99e-01	1.42e-02±6.99e-01	-5.66e-01±8.87e-01	1.21e-01±5.01e-01	-5.42e-01±1.04e+00a	8.48e-01±1.13e+00abd
EX_MGlen33_ri(e)	released mucin-type O-glycan No 33	-2.12e-17±9.99e-01	-6.66e-02±5.39e-01	7.72e-01±1.17e+00a	-6.77e-01±1.24e+00b	-4.05e-01±9.55e-01b	1.33e-01±7.52e-01
EX_MGlen132(e)	mucin-type O-glycan No 132	3.83e-18±9.99e-01	-3.11e-01±6.05e-01	-5.01e-01±1.19e+00	2.81e-01±1.17e+00b	8.23e-01±9.26e-01ab	-3.12e-01±6.63e-01d
EX_MGlen105_ri(e)	released mucin-type O-glycan No 105	-9.86e-18±9.99e-01	-2.37e-01±6.73e-01	-5.47e-01±1.15e+00	5.27e-01±1.06e+00ab	8.79e-02±1.12e+00	9.27e-01±9.87e-01abd
EX_MGlen30(e)	mucin-type O-glycan No 30	-2.12e-17±9.99e-01	9.40e-02±7.17e-01	1.00e+00±1.01e+00a	-6.31e-01±1.26e+00ab	-4.10e-01±9.82e-01b	2.80e-01±5.51e-01c
EX_MGlen13(e)	mucin-type O-glycan No 13	2.06e-17±9.99e-01	-3.84e-01±9.21e-01	3.45e-01±6.99e-01a	-1.07e-01±3.47e-01	6.43e-01±9.46e-01a	7.03e-01±9.95e-01a
EX_cspg_c_rest(e)	Not degradable product CSABC-PASE_C, Gal6S-Gal-Xyl-L-Ser-protein	6.80e-18±9.98e-01	-9.10e-01±4.51e-01	3.70e-01±5.65e-01a	2.02e-01±4.55e-01a	6.68e-01±1.18e+00a	-4.81e-01±6.09e-01d
EX_MGlen2_ri(e)	released mucin-type O-glycan No 2	1.12e-17±9.99e-01	-5.16e-01±7.78e-01	6.87e-01±1.15e+00a	2.58e-01±9.92e-01a	1.06e-01±6.20e-01	3.04e-01±8.85e-01a
EX_sT_antigen(e)	sialyl-T antigen	-1.02e-17±9.99e-01	-2.44e-02±6.68e-01	7.33e-01±1.11e+00a	-5.94e-01±1.31e+00b	-7.17e-01±5.88e-01ab	2.27e-01±8.54e-01cd

Table B-1 continued from the previous page

Exchange flux	Related metabolite	Total (n=402)	Healthy (n=213)	IFG (n=50)	IGT (n=39)	IFG+IGT (n=56)	T2D (n=44)
EX_MGlc169_ri(e)	released mucin-type O-glycan No 169	1.14e-17±9.99e-01	-1.27e-01±4.28e-01	4.91e-01±9.51e-01a	5.67e-01±1.23e+00a	-8.26e-01±9.71e-01abc	-3.14e-01±7.01e-01c
EX_MGlc155_ri(e)	released mucin-type O-glycan No 155	-4.51e-17±9.99e-01	-3.18e-01±5.37e-01	7.14e-01±1.23e+00a	1.99e-01±7.03e-01	-6.11e-01±1.08e+00bc	2.90e-01±8.82e-01d
EX_isobut(e)	Isobutyrate, 2-Methylpropanoate	1.94e-17±9.99e-01	2.89e-02±9.22e-01	-8.85e-01±6.22e-01a	7.44e-01±1.28e+00ab	-8.56e-02±8.27e-01bc	-2.32e-01±8.00e-01c
EX_galla3acgal(e)	Alpha-1,3-Galactose-N-acetylgalactosamine	2.06e-17±9.99e-01	-3.90e-01±9.19e-01	-1.70e-02±7.05e-01	6.96e-01±1.11e+00a	6.53e-01±8.93e-01a	5.56e-02±6.14e-01
EX_acnam2a6agal(e)	Alpha-2,6-N-acetylneuraminic-N-acetylgalactosamine	5.11e-17±9.99e-01	-2.58e-01±3.66e-01	6.80e-01±1.12e+00a	-8.07e-01±1.10e+00b	3.48e-01±8.78e-01c	-5.01e-02±7.63e-01
EX_MGlc104_ri(e)	released mucin-type O-glycan No 104	2.07e-17±9.99e-01	-1.26e-01±7.08e-01	-5.14e-01±1.27e+00	-1.81e-01±3.84e-01	-5.51e-02±1.06e+00	1.01e+00±9.74e-01abcd
EX_MGlc87(e)	mucin-type O-glycan No 87	-3.50e-17±9.99e-01	2.34e-01±6.52e-01	-8.72e-01±9.63e-01a	6.60e-01±1.23e+00b	2.13e-02±1.16e+00b	-7.53e-01±6.04e-01ac
EX_MGlc71(e)	mucin-type O-glycan No 71	3.26e-17±9.99e-01	-3.71e-01±5.80e-01	6.50e-01±1.36e+00a	6.79e-02±9.18e-01	-2.35e-01±1.07e+00b	4.33e-01±8.07e-01a
EX_MGlc186(e)	mucin-type O-glycan No 186	2.14e-17±9.99e-01	-3.80e-01±4.64e-01	6.18e-01±9.08e-01a	5.86e-01±9.90e-01a	-5.79e-01±1.13e+00bc	1.58e-01±9.53e-01d
EX_MGlc23(e)	mucin-type O-glycan No 23	-2.58e-17±9.99e-01	6.41e-03±6.37e-01	6.90e-01±1.19e+00a	-8.70e-01±1.18e+00ab	-4.10e-02±8.24e-01bc	2.78e-01±8.64e-01c
EX_MGlc146(e)	mucin-type O-glycan No 146	-1.76e-17±9.99e-01	-4.68e-02±4.50e-01	2.80e-01±1.30e+00	7.38e-01±7.97e-01a	-8.96e-01±9.88e-01abc	-8.64e-02±7.16e-01
EX_MGlc29(e)	mucin-type O-glycan No 29	4.63e-18±9.99e-01	2.82e-01±5.07e-01	-7.73e-01±1.07e+00a	6.25e-01±1.26e+00b	-3.81e-01±9.26e-01ac	-3.03e-02±7.54e-01
EX_MGlc189_ri(e)	released mucin-type O-glycan No 189	-3.51e-17±9.99e-01	-2.50e-01±8.16e-01	-5.68e-01±7.45e-01	-4.35e-01±7.98e-01	8.26e-01±1.10e+00abc	4.45e-01±9.37e-01ab
EX_MGlc193(e)	mucin-type O-glycan No 193	4.57e-17±9.99e-01	-1.76e-01±5.47e-01	3.99e-01±9.41e-01	-1.25e-01±4.53e-01	8.32e-01±1.05e+00a	-7.20e-01±1.18e+00bd
EX_MGlc99_ri(e)	released mucin-type O-glycan No 99	3.56e-17±9.99e-01	-2.96e-01±8.01e-01	-5.94e-01±9.10e-01	2.01e-01±1.13e+00	1.73e-01±9.10e-01	8.84e-01±9.15e-01ab
EX_MGlc109_ri(e)	released mucin-type O-glycan No 109	2.11e-18±9.99e-01	-3.37e-01±6.09e-01	7.50e-01±1.08e+00a	-4.32e-01±3.34e-01b	-1.05e-01±1.01e+00b	-8.32e-01±5.79e-01b
EX_cd2(e)	Cadmium	-2.19e-17±9.99e-01	-4.48e-01±5.61e-01	9.64e-01±9.61e-01a	4.02e-01±4.50e-01a	2.01e-02±1.36e+00b	-7.25e-01±7.07e-01b
EX_chor(e)	chorismate	-3.30e-18±9.99e-01	1.68e-02±9.04e-01	-1.01e+00±4.44e-01a	6.52e-01±1.25e+00ab	1.38e-02±8.31e-01bc	-2.80e-01±9.92e-01c
EX_MGlc56_ri(e)	released mucin-type O-glycan No 56	4.24e-17±9.99e-01	-3.01e-01±7.33e-01	-5.29e-01±1.15e+00	4.38e-01±8.35e-01ab	3.65e-01±7.60e-01b	7.38e-01±1.19e+00ab
EX_MGlc157_ri(e)	released mucin-type O-glycan No 157	5.50e-18±9.99e-01	-2.99e-02±6.63e-01	-6.75e-01±1.19e+00a	-2.36e-02±1.64e-01	-1.75e-01±1.07e+00	9.46e-01±9.98e-01abd
EX_glyasn(e)	Glycyl-L-asparagine	-8.85e-18±9.99e-01	2.42e-01±7.63e-01	-3.27e-01±5.93e-01	3.35e-01±1.49e+00	-1.14e+00±8.46e-01ac	5.34e-01±8.08e-01d
EX_alasp(e)	L-alanyl-L-aspartate	1.86e-17±9.99e-01	3.01e-01±7.24e-01	-2.07e-01±8.11e-01	-1.11e+00±9.50e-01ab	-3.48e-01±8.67e-01	7.43e-01±1.08e+00bcd
EX_pyr(e)	pyruvate	-2.86e-17±9.99e-01	-5.50e-02±8.55e-01	-1.22e+00±5.01e-01a	7.56e-01±1.22e+00ab	5.23e-02±8.76e-01b	8.45e-02±1.13e+00b
EX_MGlc128_ri(e)	released mucin-type O-glycan No 128	-2.29e-17±9.99e-01	-3.39e-01±6.96e-01	-3.52e-02±1.17e+00	-4.92e-01±5.74e-01	7.29e-01±1.05e+00abc	3.80e-01±1.13e+00a
EX_alagly(e)	L-alanylglycine	3.33e-17±9.99e-01	1.38e-01±5.71e-01	-1.65e-01±9.65e-01	-1.08e+00±8.54e-01ab	1.90e-01±9.32e-01c	1.02e+00±9.32e-01c
EX_MGlc88(e)	mucin-type O-glycan No 88	1.48e-17±9.99e-01	-1.30e-01±6.95e-01	5.83e-01±1.32e+00a	-2.45e-01±4.86e-01	-7.30e-01±9.38e-01ab	4.63e-01±9.59e-01ad
EX_MGlc145(e)	mucin-type O-glycan No 145	5.46e-18±9.99e-01	-2.32e-01±6.20e-01	7.15e-01±1.13e+00a	-1.71e-01±4.35e-01	-6.42e-01±1.08e+00b	3.41e-01±1.00e+00d
EX_MGlc185(e)	mucin-type O-glycan No 185	4.22e-17±9.99e-01	-2.73e-01±6.26e-01	-2.98e-01±6.90e-01	9.09e-01±1.02e+00ab	-3.99e-01±1.19e+00c	1.08e-01±1.06e+00c
EX_MGlc109(e)	mucin-type O-glycan No 109	-2.82e-17±9.99e-01	-5.43e-01±4.14e-01	6.97e-01±1.03e+00a	-3.03e-01±1.23e+00b	1.09e-01±9.72e-01a	-1.31e-02±7.28e-01b
EX_diaet(e)	Diacetyl	5.28e-18±9.99e-01	-2.26e-02±8.99e-01	-1.12e+00±4.64e-01a	5.68e-01±1.28e+00ab	1.81e-01±9.70e-01b	-2.58e-01±8.08e-01bc
EX_gchola(e)	glycocholate	1.86e-17±9.99e-01	2.17e-01±7.58e-01	-2.80e-01±5.82e-01	6.37e-02±9.12e-01	-9.04e-01±1.06e+00a	8.17e-01±1.00e+00bd
EX_MGlc119_ri(e)	released mucin-type O-glycan No 119	1.12e-17±9.99e-01	-2.68e-01±4.88e-01	3.96e-01±1.07e+00a	8.28e-01±9.42e-01a	-3.13e-02±7.59e-01c	-6.50e-01±1.19e+00bc
EX_MGlc63_ri(e)	released mucin-type O-glycan No 63	-9.87e-18±9.99e-01	1.72e-01±8.22e-01	2.66e-01±1.37e+00	6.60e-02±8.05e-01	-1.05e+00±8.62e-01abc	5.03e-02±7.49e-01d
EX_MGlc20(e)	mucin-type O-glycan No 20	5.81e-17±9.99e-01	-1.98e-01±4.58e-01	1.00e+00±7.77e-01a	-2.16e-01±3.43e-01b	2.19e-01±7.62e-01	-5.33e-01±1.27e+00b
EX_MGlc126(e)	mucin-type O-glycan No 126	2.68e-17±9.99e-01	-1.10e-01±4.48e-01	5.92e-01±1.18e+00a	4.30e-01±7.59e-01	-7.79e-01±1.03e+00abc	-9.75e-02±9.72e-01
EX_MGlc187(e)	mucin-type O-glycan No 187	4.22e-17±9.99e-01	-3.21e-01±5.79e-01	-4.20e-01±1.26e+00	7.82e-01±1.11e+00ab	-3.51e-02±6.97e-01	5.78e-01±8.33e-01ab
EX_lald_L(e)	(S)-lactaldehyde	-3.35e-17±9.99e-01	1.15e-02±9.10e-01	-1.09e+00±8.71e-01a	4.66e-01±1.08e+00b	-8.85e-02±7.53e-01b	4.07e-01±1.16e+00b
EX_Ser_Thr(e)	protein-linked serine or threonine residue (O-glycosylation site)	-6.65e-18±9.99e-01	-4.35e-01±7.89e-01	7.44e-01±1.23e+00a	-1.97e-01±8.10e-01b	2.34e-01±9.30e-01a	1.91e-01±7.35e-01
EX_MGlc10(e)	mucin-type O-glycan No 10	1.14e-17±9.99e-01	-1.16e-01±4.95e-01	5.84e-01±1.22e+00a	4.08e-01±8.19e-01	-8.01e-01±1.09e+00abc	6.65e-02±8.06e-01d
EX_alaleu(e)	L-alanyl-L-leucine	1.79e-17±9.99e-01	3.34e-01±8.39e-01	-1.51e-01±6.13e-01	-3.72e-01±6.40e-01	-1.02e+00±9.40e-01ab	3.56e-01±1.15e+00d
EX_MGlc168_ri(e)	released mucin-type O-glycan No 168	-5.08e-18±9.99e-01	-4.35e-01±4.40e-01	-3.17e-01±1.80e-01	2.25e-01±9.73e-01	6.27e-01±1.12e+00a	-4.80e-01±1.06e+00d
EX_MGlc94_ri(e)	released mucin-type O-glycan No 94	6.52e-18±9.99e-01	9.03e-02±8.15e-01	-6.51e-01±6.95e-01a	7.33e-01±1.14e+00ab	-5.43e-01±1.12e+00ac	2.40e-01±9.88e-01bd
EX_MGlc95(e)	mucin-type O-glycan No 95	7.96e-18±9.99e-01	-1.01e-02±3.36e-01	-3.95e-01±8.87e-01	-8.66e-01±9.67e-01a	5.26e-01±1.09e+00bc	4.52e-01±9.93e-01bc
EX_fia(e)	F1alpha	-1.90e-17±9.99e-01	1.50e-01±7.60e-01	-1.13e-01±6.74e-01	7.54e-01±1.13e+00	-7.68e-01±1.16e+00ac	9.79e-02±8.06e-01d
EX_MGlc14(e)	mucin-type O-glycan No 14	8.92e-17±9.99e-01	-5.68e-01±5.27e-01	-5.21e-01±6.13e-01	7.11e-01±1.13e+00ab	4.82e-01±8.87e-01ab	-3.62e-02±1.10e+00
EX_MGlc175_ri(e)	released mucin-type O-glycan No 175	-1.76e-17±9.99e-01	-5.62e-01±5.83e-01	4.61e-01±1.18e+00a	6.21e-01±1.03e+00a	1.92e-01±8.97e-01a	-2.47e-01±8.69e-01c
EX_ac(e)	acetate	-1.20e-17±9.99e-01	2.43e-01±1.03e+00	7.55e-01±5.99e-01a	-1.67e-01±8.45e-01	-4.99e-01±6.11e-01a	-1.73e-01±1.00e+00d
EX_MGlc154_ri(e)	released mucin-type O-glycan No 154	5.47e-18±9.99e-01	-1.12e-01±6.75e-01	4.26e-01±5.82e-01	2.52e-01±9.65e-01	-6.98e-01±1.18e+00abc	7.03e-01±1.17e+00ad
EX_MGlc85(e)	mucin-type O-glycan No 85	1.75e-17±9.99e-01	-3.15e-02±6.09e-01	-7.70e-01±1.23e+00a	6.78e-01±1.12e+00ab	4.05e-01±1.07e+00b	6.68e-02±7.10e-01b
EX_MGlc102(e)	mucin-type O-glycan No 102	4.58e-17±9.99e-01	-8.48e-02±4.60e-01	-8.80e-01±1.05e+00a	-9.74e-02±5.71e-01	2.29e-01±1.02e+00b	7.07e-01±1.17e+00ab
EX_MGlc173_ri(e)	released mucin-type O-glycan No 173	-1.63e-17±9.99e-01	-1.07e-01±6.92e-01	-1.72e-01±6.13e-01	9.24e-01±1.17e+00ab	2.19e-01±9.42e-01	-6.19e-01±1.21e+00cd

Table B-1 continued from the previous page

Exchange flux	Related metabolite	Total (n=402)	Healthy (n=213)	IFG (n=50)	IGT (n=39)	IFG+IGT (n=56)	T2D (n=44)
EX_MGlc116(e)	mucin-type O-glycan No 116	4.22e-17±9.99e-01	-4.36e-01±4.60e-01	6.03e-01±1.16e+00a	3.26e-01±1.02e+00a	-5.90e-01±9.78e-01bc	1.64e-01±8.49e-01d
EX_MGlc188(e)	mucin-type O-glycan No 188	-1.01e-17±9.99e-01	-1.86e-01±6.21e-01	2.07e-01±1.32e+00	6.00e-01±1.09e+00a	-7.95e-01±9.24e-01bc	4.13e-01±7.38e-01d
EX_q8(e)	Ubiquinone-8	-4.05e-18±9.98e-01	2.46e-01±2.25e-01	1.75e-01±7.57e-01	-4.98e-01±5.77e-01	-8.04e-01±9.69e-01ab	8.96e-01±8.91e-01cd
EX_gcald(e)	glycolaldehyde	-1.82e-17±9.99e-01	-1.47e-01±8.81e-01	2.59e-02±8.76e-01	8.93e-01±1.25e+00ab	-6.06e-01±2.90e-01c	-7.69e-02±1.03e+00c
EX_glyasp(e)	Glycyl-L-aspartate	-1.06e-17±9.99e-01	3.03e-02±5.76e-01	2.40e-02±7.03e-01	7.53e-01±1.35e+00	-8.79e-01±1.07e+00abc	6.02e-01±7.33e-01d
EX_MGlc124(e)	mucin-type O-glycan No 124	7.01e-18±9.99e-01	-8.45e-02±8.04e-01	1.82e-02±1.02e+00	9.03e-01±1.11e+00ab	-3.06e-01±9.78e-01c	-7.65e-01±6.73e-01c
EX_MGlc22_rl(e)	released mucin-type O-glycan No 22	6.13e-18±9.99e-01	-4.41e-01±5.34e-01	4.95e-01±1.03e+00a	7.69e-01±1.00e+00a	-4.50e-01±9.32e-01bc	-9.37e-03±1.11e+00
EX_MGlc139_rl(e)	released mucin-type O-glycan No 139	-9.85e-18±9.99e-01	-3.55e-01±7.44e-01	7.76e-01±1.17e+00a	6.39e-02±1.02e+00	6.55e-02±7.68e-01b	6.24e-02±1.15e+00b
EX_MGlc10_rl(e)	released mucin-type O-glycan No 10	0.00e+00±9.99e-01	-2.61e-01±2.89e-01	2.47e-01±1.16e+00	7.04e-01±9.57e-01a	-7.92e-01±9.17e-01bc	4.16e-02±7.97e-01d
EX_MGlc135_rl(e)	released mucin-type O-glycan No 135	2.12e-17±9.99e-01	-4.61e-02±3.33e-01	-5.10e-01±1.06e+00	8.80e-01±1.06e+00ab	2.13e-01±9.60e-01	-4.63e-01±9.45e-01c
EX_MGlc168(e)	mucin-type O-glycan No 168	5.11e-17±9.99e-01	-4.61e-01±2.76e-01	2.24e-01±1.04e+00	7.84e-01±1.00e+00a	-4.28e-01±1.00e+00c	-2.50e-01±8.09e-01c
EX_MGlc159_rl(e)	released mucin-type O-glycan No 159	6.13e-18±9.99e-01	-4.08e-01±8.56e-01	7.93e-01±1.10e+00a	-3.27e-01±6.65e-01b	2.56e-01±8.44e-01a	-3.13e-01±7.03e-01b
EX_metsox_S_L(e)	L-Methionine Sulfoxide	8.85e-18±9.99e-01	-1.11e-01±9.55e-01	2.05e-02±1.08e+00	1.68e+00±7.09e-01ab	-1.47e-01±7.13e-01c	7.91e-02±9.92e-01c
EX_MGlc160_rl(e)	released mucin-type O-glycan No 160	3.44e-19±9.99e-01	-4.50e-01±6.22e-01	-1.79e-01±4.02e-01	8.24e-01±1.10e+00ab	2.60e-01±1.05e+00a	-2.48e-01±1.03e+00c
EX_MGlc131_rl(e)	released mucin-type O-glycan No 131	3.82e-18±9.99e-01	-1.86e-01±6.11e-01	-2.85e-01±8.59e-01	5.68e-02±1.87e-01	7.45e-01±1.23e+00ab	-4.56e-01±1.12e+00d
EX_cbl1(e)	Cob(β)alamin	-4.52e-17±9.98e-01	2.02e-01±5.40e-02	3.65e-01±3.91e-01	4.12e-01±1.29e+00	-7.88e-01±7.08e-01bc	6.52e-01±5.54e-01d
EX_dttp(e)	dTTP	-1.42e-17±9.99e-01	-5.62e-01±7.45e-01	-3.63e-01±8.17e-01	2.55e-01±5.72e-01	7.41e-01±1.08e+00ab	-2.76e-01±6.81e-01d
EX_alahis(e)	L-alanyl-L-histidine	-1.26e-17±9.99e-01	3.56e-01±8.96e-01	-4.24e-01±6.71e-01a	-8.52e-01±1.11e+00a	-9.12e-01±8.37e-01a	3.07e-01±9.24e-01cd
EX_glcmannan(e)	Konjac glucomannan, MW 77,500 (PMID:17962981), ManGlc - 2:1 -> 286 man, 143 glc_D	1.47e-17±9.99e-01	-2.37e-01±8.74e-01	1.29e-01±1.09e+00	1.39e+00±6.04e-01ab	1.13e-01±1.04e+00c	9.73e-01±4.56e-01a
EX_MGlc137(e)	mucin-type O-glycan No 137	-2.11e-17±9.99e-01	-1.58e-01±7.68e-01	6.11e-01±1.26e+00a	-1.53e-02±1.18e+00	3.47e-01±8.64e-01	-6.07e-01±9.32e-01bd
EX_MGlc152_rl(e)	released mucin-type O-glycan No 152	3.47e-17±9.99e-01	1.04e-01±7.42e-01	4.62e-01±1.32e+00	1.43e-01±1.17e+00	-6.97e-01±8.81e-01abc	-5.91e-01±9.64e-01ab
EX_trypta(e)	tryptaminium	-1.42e-17±9.99e-01	-6.50e-01±7.67e-01	6.96e-01±1.17e+00a	3.84e-01±7.19e-01a	-3.44e-02±7.71e-01	4.22e-01±7.63e-01a
EX_MGlc123_rl(e)	released mucin-type O-glycan No 123	2.31e-17±9.99e-01	-1.63e-01±4.54e-01	2.03e-01±3.52e-01	9.13e-01±9.92e-01a	-2.27e-01±1.18e+00c	-5.61e-01±1.08e+00c
EX_agam1b6agal(e)	Beta-1,6-N-acetylglucosamine-N-acetylglactosamine	-1.76e-17±9.99e-01	-2.86e-02±7.46e-01	3.65e-01±9.97e-01	-3.77e-01±4.44e-01	6.08e-01±1.11e+00a	-8.39e-01±1.04e+00abd
EX_glc_D(e)	D-glucose	5.09e-17±9.99e-01	-4.67e-01±4.65e-01	5.93e-01±1.24e+00a	2.58e-01±6.21e-01	-4.63e-01±7.15e-01b	-6.39e-01±7.55e-01b
EX_MGlc54_rl(e)	released mucin-type O-glycan No 54	5.38e-17±9.99e-01	-1.90e-01±6.14e-01	7.57e-01±1.13e+00a	-3.16e-01±5.74e-01b	-5.99e-01±1.13e+00b	6.12e-02±1.01e+00
EX_MGlc140_rl(e)	released mucin-type O-glycan No 140	-6.67e-18±9.99e-01	-4.82e-01±4.69e-01	5.56e-01±1.27e+00a	1.29e-01±9.36e-01	1.82e-01±7.51e-01a	-5.03e-01±9.59e-01b
EX_MGlc96(e)	mucin-type O-glycan No 96	-1.62e-18±9.99e-01	-4.06e-01±6.61e-01	5.33e-01±1.19e+00a	5.11e-01±1.08e+00a	-1.55e-01±1.10e+00b	1.18e-01±6.94e-01
EX_tyr_L(e)	L-tyrosine	-6.13e-18±9.99e-01	3.71e-01±6.60e-01	-6.09e-01±1.36e+00a	2.55e-01±7.07e-01b	-3.94e-01±1.09e+00a	7.83e-02±7.05e-01
EX_malt(e)	Maltose	-1.05e-17±9.99e-01	-1.72e-01±3.38e-01	-7.65e-01±8.39e-01	8.75e-01±9.75e-01ab	-7.36e-02±8.92e-01c	-2.29e-01±1.22e+00c
EX_MGlc142_rl(e)	released mucin-type O-glycan No 142	1.12e-17±9.99e-01	-4.71e-01±7.47e-01	5.43e-01±1.36e+00a	4.71e-01±8.17e-01a	5.27e-01±7.75e-01a	6.69e-02±9.73e-01
EX_MGlc6_rl(e)	released mucin-type O-glycan No 6	7.40e-18±9.99e-01	-2.52e-02±5.44e-01	-7.80e-01±1.06e+00a	8.57e-03±3.52e-01	-1.51e-01±1.19e+00	8.00e-01±1.16e+00abd
EX_MGlc74(e)	mucin-type O-glycan No 74	-1.90e-17±9.99e-01	-6.02e-02±5.89e-01	-7.02e-01±1.01e+00a	7.55e-01±1.21e+00ab	-1.96e-01±7.42e-01c	1.89e-01±1.18e+00b
EX_hxan(e)	Hypoxanthine	1.06e-17±9.99e-01	-1.89e-01±7.75e-01	-4.28e-03±8.79e-01	-5.73e-01±8.89e-01	4.62e-01±1.25e+00ac	4.50e-01±1.17e+00ac
EX_MGlc118(e)	mucin-type O-glycan No 118	-2.57e-17±9.99e-01	-4.80e-02±6.50e-01	1.40e-01±1.44e+00	2.23e-01±3.54e-01	-8.42e-01±7.90e-01abc	6.17e-01±1.05e+00ad
EX_fla_rl(e)	released Flalpha antigen	-6.19e-18±9.99e-01	2.64e-01±8.73e-01	4.46e-01±1.04e+00	-8.65e-01±1.17e+00ab	-3.17e-01±7.68e-01	-6.38e-03±6.72e-01c
EX_MGlc183(e)	mucin-type O-glycan No 183	1.12e-17±9.99e-01	-1.27e-01±4.73e-01	-8.27e-01±1.04e+00	5.55e-01±1.35e+00ab	-1.42e-01±9.28e-01	5.13e-01±9.07e-01b
EX_glcur(e)	D-glucuronate	3.86e-17±9.99e-01	2.26e-01±4.07e-01	-1.04e-01±7.28e-01	-7.01e-01±1.12e+00a	2.47e-01±5.25e-01c	7.07e-01±1.15e+00c
EX_MGlc12_rl(e)	released mucin-type O-glycan No 12	1.67e-18±9.99e-01	-2.54e-01±6.18e-01	2.69e-01±8.04e-01	-6.81e-01±1.21e+00b	6.46e-01±1.22e+00ac	3.69e-01±8.95e-01c
EX_adchac(e)	Allodeoxycholic acid	1.20e-17±9.98e-01	-7.70e-01±5.80e-01	9.41e-01±8.80e-01a	1.25e-01±1.08e+00a	-3.64e-02±1.20e+00	9.83e-02±5.88e-01a
EX_glyleu(e)	Glycylleucine	3.32e-17±9.98e-01	-3.17e-02±4.08e-01	-1.68e-01±6.53e-01	8.82e-01±1.14e+00b	-7.32e-01±1.18e+00c	6.42e-01±7.17e-01d
EX_MGlc118_rl(e)	released mucin-type O-glycan No 118	-2.57e-17±9.99e-01	-3.43e-01±5.34e-01	5.09e-01±1.23e+00a	7.18e-01±9.84e-01a	-2.44e-01±1.25e+00bc	1.41e-01±8.33e-01
EX_MGlc122_rl(e)	released mucin-type O-glycan No 122	3.81e-17±9.99e-01	3.38e-01±5.35e-01	5.83e-01±6.64e-01	4.50e-01±3.15e-01	-5.77e-01±1.26e+00abc	3.71e-03±8.68e-01
EX_glyglu(e)	Glycyl-L-glutamate	-4.40e-17±9.98e-01	1.30e-01±6.48e-01	-6.77e-03±9.10e-01	9.20e-02±4.73e-01	-9.65e-01±9.82e-01ab	8.10e-01±1.16e+00d
EX_fuc_L(e)	L-fucose	1.45e-17±9.99e-01	-2.72e-01±8.04e-01	-6.20e-01±4.88e-01	6.28e-01±1.29e+00ab	4.36e-02±8.16e-01	2.78e-01±1.05e+00ab
EX_mantr(e)	mannotriose (beta,1,4)	2.46e-17±9.99e-01	4.19e-01±9.01e-01	-2.66e-01±8.99e-01a	-1.07e+00±1.04e+00a	-3.31e-01±5.71e-01	7.19e-02±7.74e-01c
EX_core5(e)	Core 5	5.09e-17±9.99e-01	3.62e-01±6.12e-01	3.31e-01±1.23e+00	5.98e-01±4.29e-01	-7.41e-01±1.05e+00abc	-1.44e-01±9.36e-01
EX_MGlc70_rl(e)	released mucin-type O-glycan No 70	-1.23e-17±9.99e-01	-2.08e-01±7.58e-01	-4.17e-01±4.63e-01	9.71e-01±9.95e-01ab	-8.86e-02±1.28e+00c	-7.50e-02±9.91e-01c
EX_MGlc89(e)	mucin-type O-glycan No 89	6.45e-18±9.99e-01	-2.91e-01±6.08e-01	7.05e-01±1.26e+00a	1.48e-01±9.87e-01	-1.77e-01±5.81e-01b	-9.94e-02±1.30e+00b
EX_MGlc65_rl(e)	released mucin-type O-glycan No 65	4.22e-17±9.99e-01	1.01e-01±8.24e-01	-1.99e-01±4.89e-01	-1.36e-01±3.20e-01	-9.14e-01±1.06e+00a	5.80e-01±1.28e+00d
EX_MGlc25_rl(e)	released mucin-type O-glycan No 25	1.45e-17±9.99e-01	-4.20e-01±6.24e-01	4.86e-01±1.42e+00a	-8.90e-02±8.07e-01	2.17e-01±6.33e-01a	3.03e-01±1.07e+00a
EX_MGlc36_rl(e)	released mucin-type O-glycan No 36	2.68e-17±9.99e-01	-2.71e-01±7.87e-01	-3.99e-01±5.50e-01	-1.28e-01±3.11e-01	-3.04e-02±1.20e+00	7.93e-01±1.09e+00abd
EX_15dap(e)	NA	2.45e-17±9.99e-01	-2.66e-01±8.88e-01	4.14e-01±3.82e-01	3.32e-02±9.00e-01	1.14e+00±7.84e-01ac	-3.24e-01±1.00e+00d
EX_fum(e)	Fumarate	3.27e-17±9.99e-01	4.56e-03±8.99e-01	-1.09e+00±6.37e-01a	3.38e-01±1.12e+00b	9.67e-02±9.06e-01b	1.84e-01±1.22e+00b

Table B-1 continued from the previous page

EX_core2(e)	Core 2	-5.04e-17±9.99e-01	-6.38e-02±4.63e-01	5.19e-01±1.30e+00	-6.49e-01±1.11e+00b	5.27e-01±8.98e-01c	-4.25e-01±8.81e-01bd
EX_MGlcN81(e)	mucin-type O-glycan No 81	-6.69e-18±9.99e-01	-9.57e-02±5.80e-01	-5.73e-01±1.00e+00	-4.76e-01±6.30e-01	7.08e-01±1.12e+00abc	9.26e-02±1.29e+00
EX_duri(e)	Deoxyuridine	9.29e-18±9.98e-01	1.47e-01±6.21e-01	-9.63e-02±8.03e-01	3.57e-01±1.49e+00	-9.06e-01±9.51e-01ac	6.98e-01±8.04e-01d
EX_MGlcN172(e)	mucin-type O-glycan No 172	2.14e-17±9.99e-01	-9.79e-02±5.32e-01	-7.11e-01±9.78e-01	-1.08e-02±3.66e-01	8.05e-02±1.32e+00b	7.53e-01±1.06e+00ab
EX_4hpro(e)	trans-4-hydroxy-L- proline	0.00e+00±9.98e-01	-4.05e-01±6.04e-01	-3.91e-02±8.94e-01	1.29e+00±6.55e-01ab	-3.43e-01±1.32e+00c	-8.79e-02±4.96e-01c
EX_MGlcN170_ri(e)	released mucin-type O-glycan No 170	5.47e-18±9.99e-01	-1.35e-01±6.29e-01	-1.59e-01±5.09e-01	8.90e-01±1.11e+00ab	-3.51e-01±1.08e+00c	-1.78e-01±1.20e+00c
EX_MGlcN144_ri(e)	released mucin-type O-glycan No 144	5.38e-17±9.99e-01	-2.87e-01±5.71e-01	-5.77e-01±2.72e-01	6.97e-01±1.28e+00ab	-3.19e-01±1.05e+00c	3.55e-01±9.33e-01
EX_ocdcea(e)	octadecenoate (n-C18:1)	-4.52e-17±9.98e-01	-2.33e-01±7.38e-01	-6.15e-01±1.07e+00	6.08e-01±7.39e-01b	1.42e-01±5.27e-01	1.10e+00±9.95e-01ab