



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

DynaMICOM: UNA HERRAMIENTA COMPUTACIONAL PARA EL ANÁLISIS DE LA  
DINÁMICA DEL METABOLISMO DE LA MICROBIOTA INTESTINAL

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
Maestro en Ciencias

PRESENTA  
CRISTIAN MENDOZA ORTIZ

DR. OSBALDO RESENDIS ANTONIO  
INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA GENÓMICA  
RAI-C3-UNAM

DRA. ELISA DOMÍNGUEZ HÜTTINGER  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

DRA. SOFÍA MORÁN RAMOS  
INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA GENÓMICA

Ciudad de México, octubre, 2023



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.

DynaMICOM: UNA HERRAMIENTA COMPUTACIONAL PARA EL ANÁLISIS DE LA  
DINÁMICA DEL METABOLISMO DE LA MICROBIOTA INTESTINAL

por

Cristian Mendoza Ortiz

Instituto Nacional de Medicina Genómica

Tesis presentada para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

en

Maestría Y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Ciudad de México, octubre, 2023

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar, agradezco a Dios y a mi familia. Especialmente, a mi madre, a Angie, a Juliana y a Megan por su apoyo inmensurable desde la distancia y por apropiarse de todos mis sueños y ayudarme a alcanzarlos.

También, al pueblo mexicano por recibirme en su país como un nacional más y por darme la oportunidad de conocer su cultura. Agradezco a la UNAM por brindarme una formación de calidad y las herramientas necesarias para sacar adelante este proyecto.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por haberme apoyado con la beca número 1103002. Asimismo, agradezco el apoyo financiero otorgado por el Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) para la asistencia al XXXIII Congreso Nacional de Bioquímica (2022).

A mi tutor, el Dr. Osbaldo Resendis, por acompañarme durante estos años, asesorarme y recibirme en su laboratorio. Además, por darme la posibilidad de incursionar en el área de la Biología de Sistemas. También, agradezco a las doctoras Elisa Domínguez y Sofía Morán por supervisar el desarrollo de este trabajo y aportar desde sus áreas de conocimiento para garantizar un proyecto de calidad.

Finalmente, agradezco a mis compañeros del posgrado por los buenos momentos que pasamos, por las aventuras y por las anécdotas. Especialmente, a David, Jesús, Amaury, Emmanuel, Andrés, Araceli y María Clara. A Clara, en particular, por acompañarme desde el inicio, por abrirme las puertas de su casa, enseñarme a cocinar y facilitar mis trámites y mi vida en general como estudiante foráneo.

**ÍNDICE GENERAL****ÍNDICE DE FIGURAS**

7

**ÍNDICE DE TABLAS**

9

**LISTA DE SIGLAS**

10

**RESUMEN**

11

**ABSTRACT**

12

**1. INTRODUCCIÓN**

13

**2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

16

2.1. Planteamiento del problema

16

2.2. Hipótesis

16

2.3. Objetivo general

16

2.4. Objetivos específicos

16

**3. MARCO TEÓRICO**

18

3.1. La microbiota intestinal humana

18

3.2. Estudios transversales y longitudinales

18

3.3. Modelos animales de la microbiota intestinal humana

19

3.3.1. El ratón como paradigma en estudios de microbiota intestinal

20

3.3.2. Ratones libres de gérmenes y gnotobióticos

21

3.4. Técnicas de secuenciación para el estudio de la microbiota intestinal

23

3.4.1. Secuenciación de amplicones o análisis de genes marcadores

24

3.4.2. Secuenciación metagenómica shotgun

26

3.5. Modelado matemático de la microbiota intestinal

27

3.5.1. Modelos ecológicos

29

	5
3.5.1.1. Modelo generalizado de Lotka-Volterra	30
3.5.1.2. Modelo ecológico lineal	32
3.5.1.3. Limitaciones de los modelos ecológicos	32
3.5.2. Modelos del metabolismo a escala genómica	33
3.5.2.1. Análisis de balance de flujo (FBA)	34
3.5.2.2. FBA en comunidades microbianas	36
3.5.2.3. Herramientas computacionales para el análisis del metabolismo en la microbiota intestinal	39
3.5.2.4. Herramientas computacionales para el análisis dinámico del metabolismo de la microbiota intestinal	40
<b>4. METODOLOGÍA</b>	<b>41</b>
4.1. Modelado de la dinámica del metabolismo en la microbiota intestinal mediante una estrategia híbrida entre ctFBA y modelos ecológicos	41
4.1.1. Análisis metabólico mediante ctFBA	42
4.1.2. Modelado ecológico	44
4.2. Bases de datos sintéticas	44
4.3. Base de datos longitudinales de un experimento de infección con Clostridium difficile	46
4.4. Dietas para ctFBA	47
4.5. Simulación del crecimiento microbiano	48
4.6. Estimación de flujos metabólicos por ctFBA	48
4.7. Evaluación del desempeño del modelo	50
4.8. Disponibilidad de los datos	50
4.8.1. Repositorio de DynaMICOM	50

	6
4.8.2. Dietas para ctFBA	51
4.8.3. Reconstrucciones metabólicas de AGORA	51
4.8.4. Repositorios de MICOM y de los modelos ecológicos	51
<b>5. RESULTADOS</b>	<b>53</b>
5.1. DynaMICOM: desarrollo de la herramienta computacional derivada de la estrategia híbrida entre ctFBA y modelos ecológicos	53
5.2. FBA e inferencia de tasas de crecimiento por trade-off cooperativo	55
5.3. Inferencia de interacciones a partir de knockouts in silico	57
5.4. Estimación de flujos metabólicos por FBA	61
5.5. Simulación del crecimiento microbiano con DynaMICOM	65
5.6. Validación de DynaMICOM con los ratones gnotobióticos de la base de datos de Bucci et al., 2016	68
<b>6. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES</b>	<b>72</b>
<b>7. REFERENCIAS</b>	<b>76</b>
<b>PERMISOS PARA EL USO DE FIGURAS</b>	<b>86</b>
<b>APÉNDICE A</b>	<b>88</b>
<b>APÉNDICE B</b>	<b>91</b>
<b>APÉNDICE C</b>	<b>95</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Generación y monitoreo de ratones gnotobióticos	22
Figura 2. Técnicas de secuenciación comúnmente utilizadas para el estudio del microbioma intestinal	23
Figura 3. Esquema del gen 16S rRNA con sus regiones conservadas, variables e hipervariables y algunos <i>primers</i> usados para su amplificación	24
Figura 4. Protocolo de análisis de datos de secuenciación 16S rRNA	25
Figura 5. Protocolo de análisis de datos de secuenciación metagenómica <i>shotgun</i>	27
Figura 6. Analogía entre biorreactores de tratamiento de aguas residuales y la microbiota intestinal humana	28
Figura 7. Modelo generalizado de Lotka-Volterra para inferir la estructura de comunidades microbianas y su respuesta a estímulos externos a partir de datos de secuenciación	31
Figura 8. Formulación de un problema de FBA	35
Figura 9. Restricción del espacio solución de un problema FBA	36
Figura 10. Esquema del sistema a considerar para aplicar FBA en comunidades microbianas	37
Figura 11. Modelado del metabolismo de la microbiota intestinal humana por ctFBA	38
Figura 12. Modelo híbrido entre MICOM y gLV para el análisis de la dinámica del metabolismo en la microbiota de manera iterativa	41
Figura 13. Esquema del estudio de infección en un modelo murino llevado a cabo por Bucci et al., 2016	46

Figura 14. Vías de biosíntesis de SCFA a partir de la fermentación de carbohidratos en la dieta y las principales bacterias productoras de SCFA para cada vía	49
Figura 15. Diagrama de lenguaje unificado de modelado (UML) para DynaMICOM	54
Figura 16. Selección de una fracción de la tasa de crecimiento máxima comunitaria ( <i>trade-off</i> ) para una comunidad constituida por 10 especies bacterianas que habitan un hospedero bajo una dieta promedio occidental.	56
Figura 17. Coeficientes de interacción a partir de <i>knockouts in silico</i>	60
Figura 18. Flujos metabólicos de producción de SCFA estratificados por dieta del hospedero	62
Figura 19. Flujos metabólicos de producción de SCFA estratificados por especie bacteriana	64
Figura 20. Dinámica de las abundancias de comunidades microbianas sintéticas de composición aleatoria constituidas por 5 especies bacterianas	66
Figura 21. Dinámica de las abundancias de comunidades microbianas sintéticas de composición aleatoria constituidas por 10 especies bacterianas	67
Figura 22. Dinámica de las abundancias del ratón 2 de la base de datos de Bucci et al., 2016	69
Figura 23. Evaluación del desempeño de DynaMICOM con la base de datos de Bucci et al., 2016	71
Figura C-1. Evolución de la composición microbiana de la microbiota intestinal de cinco ratones gnotobióticos en un experimento de inoculación con <i>C. difficile</i>	96

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Variables y parámetros del modelo generalizado de Lotka-Volterra	30
Tabla 2. Variables y parámetros del modelo ecológico lineal	32
Tabla A-1. Comunidades sintéticas de composición aleatoria de 5 especies	88
Tabla A-2. Comunidades sintéticas de composición aleatoria de 10 especies	89
Tabla B-1. Comunidades sintéticas de composición definida	91
Tabla C-1. Composición inicial de la microbiota intestinal de cinco ratones gnotobióticos en un experimento de inoculación con <i>C. difficile</i>	95

## LISTA DE SIGLAS

Las siglas a continuación corresponden a las iniciales de sus expresiones asociadas en inglés. A lo largo de este escrito se omite la frase “por sus siglas en inglés” para cada sigla con el objetivo de evitar redundancias.

Sigla	Expresión
ASV	Variantes de secuenciación de amplicones
ctFBA	Análisis de balance de flujo por <i>trade-off</i> cooperativo
dFBA	Análisis de balance de flujo dinámico
DNA	Ácido desoxirribonucleico
GEM	Modelo a escala genómica
gLV	Lotka-Volterra generalizado
FBA	Análisis de balance de flujo
LV	Lotka-Volterra
LRA	Lineal a partir de abundancias relativas
MAC	Carbohidratos accesibles a la microbiota
OTU	Unidad taxonómica operativa
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
rRNA	Ácido ribonucleico ribosómico o ribosomal
SCFA	Ácidos grasos de cadena corta

## RESUMEN

La estabilidad de la microbiota intestinal humana es alterada por cambios abruptos en la dieta, eventos de infección y terapias con antibióticos. La comprensión de los mecanismos detrás de estas transiciones es fundamental para generar predicciones con respecto a intervenciones personalizadas sobre estas comunidades microbianas. Los modelos matemáticos permiten estudiar holísticamente sistemas complejos como este a partir de datos de tecnologías genómicas. Recientemente, se han utilizado modelos ecológicos para representar el crecimiento y las interacciones entre los miembros de la microbiota. Sin embargo, estos modelos se ven limitados cuando los cambios composicionales están guiados por el metabolismo de la comunidad. En este trabajo se presenta el desarrollo de DynaMICOM, una herramienta computacional basada en un modelo híbrido entre Análisis de balance de flujo por *trade-off* cooperativo (ctFBA) y modelos ecológicos que permite el análisis de la dinámica del metabolismo de la microbiota intestinal. El componente ctFBA permite estimar tasas de crecimiento y distribuciones de flujos metabólicos y posibilita la inferencia de interacciones a través de *knockouts in silico*. La confiabilidad de estas estimaciones se demostró utilizando dos bases de datos sintéticas y las dietas promedio de cuatro poblaciones humanas. También, se probó la capacidad de la herramienta para identificar flujos metabólicos de ácidos grasos de cadena corta, que tienen interés clínico, y los microorganismos responsables de su síntesis (e.g. *Faecalibacterium prausnitzii* y *Roseburia hominis* en el caso del butirato). Además, se evaluó la capacidad predictiva de DynaMICOM con datos longitudinales de ratones gnotobióticos en un estudio de infección con *Clostridium difficile*. Se encontró que la mejor configuración de la herramienta, para las condiciones evaluadas, corresponde al uso de un modelo ecológico lineal sin iteraciones. Sin embargo, debido a la ausencia de una dieta bien descrita para los ratones, no se pudo generalizar esta configuración. DynaMICOM demostró ser una base fundamental y eficiente computacionalmente para la predicción personalizada de la respuesta de la microbiota intestinal a perturbaciones; por tanto, se incentivan los esfuerzos dirigidos a una mejor validación y a la expansión de sus capacidades.

## ABSTRACT

Abrupt changes in the diet, infection events, and antibiotic therapies alter the stability of the intestinal microbiota. Understanding the mechanisms behind these transitions is essential to generate predictions regarding personalized interventions in these microbial communities. Mathematical models allow complex systems like this to be holistically studied using data from genomic technologies. Recently, ecological models have been used to represent the growth and interactions between taxa in microbiota. However, when community metabolism guides compositional changes, the performance of these models decreases. In this work, I developed DynaMICOM, a computational tool based on a hybrid model between cooperative trade-off Flux Balance Analysis (ctFBA) and ecological models that allows the analysis of the dynamics of intestinal microbiota metabolism. The ctFBA component estimates growth rates and metabolic flux distributions through cooperative trade-off and infers interactions via *in silico knockouts*. I demonstrated the reliability of these estimates using two synthetic databases and the average diets of four different human populations. I also tested the tool's ability to identify short-chain fatty acids, which are clinically relevant metabolites, and the microorganisms responsible for their synthesis (e.g., *Faecalibacterium prausnitzii* and *Roseburia hominis*, in the case of butyrate). Furthermore, I evaluated the predictive ability of DynaMICOM with longitudinal data from gnotobiotic mice in a *Clostridium difficile* infection study. I found that the best configuration of the tool corresponds to the use of LRA as an ecological model without iterations. However, I did not generalize this setup due to the absence of a well-described diet for these mice. DynaMICOM proved to be a fundamental and computationally efficient foundation for personalized prediction of gut microbiota response to perturbations; therefore, efforts aimed at better validation and expansion of their capabilities are encouraged.

## 1. INTRODUCCIÓN

La dinámica de la microbiota intestinal humana es modulada por diversos factores como la dieta, la ocurrencia de una infección, o bien el tratamiento con antibióticos aplicados específicamente a individuos (David et al., 2014; Joseph et al., 2020). Estos eventos se manifiestan en alteraciones en las concentraciones de las bacterias y de los metabolitos del sistema. Dependiendo de cómo se dan estas transiciones, se puede o no desencadenar un cambio permanente en la composición de la microbiota (Dethlefsen & Relman, 2011; Sonnenburg et al., 2016).

El estudio de estas alteraciones es de alta complejidad debido a que la microbiota intestinal humana está constituida por billones de microorganismos que interactúan entre sí (Jansma & Aidy, 2020). A partir de datos de tecnologías genómicas, la aplicación de modelos matemáticos y computacionales derivados de la biología de sistemas en microbiota intestinal humana permite: (1) abordar de manera holística este sistema, (2) hacer inferencia con respecto a los mecanismos metabólicos responsables de estados de salud y enfermedad en el hospedero y (3) llevar a cabo predicciones sobre la respuesta de pacientes a intervenciones personalizadas. A pesar de que estos modelos han sido útiles en el estudio de microorganismos por separado, aún existen preguntas fundamentales a resolver al modelar el metabolismo de la microbiota. Por ejemplo: ¿qué tipos de modelos matemáticos son apropiados para estudiar los metabolitos producidos por los miembros de la microbiota intestinal humana que guían las transiciones entre diferentes estados fenotípicos del hospedero?, ¿qué tipo de predicciones se pueden realizar a partir de estos modelos?, ¿qué tan variables son los perfiles metabólicos y la capacidad funcional de estas comunidades a nivel intraindividual?, y ¿qué tan variables son los enterotipos y

metabotipos de estas comunidades dependiendo del estado de salud o enfermedad de su hospedero?

Con la finalidad de entender las interacciones de la microbiota, varios modelos se han propuesto en la literatura. Entre estos, los modelos de tipo Lotka-Volterra (LV) han sido ampliamente utilizados en el estudio de la dinámica del crecimiento de la microbiota intestinal (Bucci et al., 2016; Fisher & Mehta, 2014; Joseph et al., 2020; Kuntal et al., 2019). Estos son modelos ecológicos que tienen como valores de entrada datos longitudinales de abundancias microbianas que definen parámetros asociados con el crecimiento de los microorganismos para postular las interacciones que pueden surgir entre la comunidad de bacterias y estimar el efecto ante diferentes perturbaciones. Así, estos modelos pueden ser usados para predecir un estado futuro del microbioma y para comprender el comportamiento de este sistema si las condiciones iniciales son alteradas (Kuntal et al., 2019). A pesar de que se han obtenido resultados importantes con los modelos ecológicos descritos, estos carecen de una aproximación al metabolismo de los miembros de la comunidad microbiana, lo cual puede reducir su capacidad predictiva cuando las interacciones mediadas por reacciones bioquímicas son dominantes (Suzuki et al., 2022).

Por otro lado, el Análisis de balance de flujo (FBA) es un formalismo cuantitativo que parte de una reconstrucción metabólica a escala genómica para estimar las capacidades metabólicas de una bacteria. El FBA se lleva a cabo bajo la suposición de estado estacionario y requiere del establecimiento de restricciones y de la optimización de una función objetivo para obtener la distribución de flujos metabólicos asociados con las muestras bajo estudio (Orth et al., 2010). En el contexto de este formalismo, se desarrolló la herramienta computacional MICOM, la cual lleva a cabo un protocolo denominado FBA de *trade-off* cooperativo (ctFBA) que incluye

la maximización de una función objetivo y el establecimiento de un balance entre el crecimiento de la comunidad y el crecimiento individual de cada microorganismo (Diener et al., 2020). A pesar de su aplicación extensa, MICOM lleva a cabo el ctFBA bajo condiciones de estado estacionario, lo que puede limitar el análisis de estudios longitudinales centrados en la exploración de las interacciones metabólicas de la microbiota intestinal bajo perturbaciones.

En este trabajo, se desarrolló DynaMICOM, una herramienta computacional que permite el análisis de la dinámica de los flujos metabólicos asociados con la microbiota intestinal humana. DynaMICOM está basada en un modelo híbrido que recapitula la simplicidad de los modelos de tipo LV, pero que además permite analizar las distribuciones de flujos metabólicos de la microbiota intestinal en diferentes instantes mediante una aproximación de tipo ctFBA. El desarrollo de este algoritmo constituye la parte medular de esta tesis y representa un avance en el modelado dinámico de la microbiota.

## **2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

### **2.1. Planteamiento del problema**

Si bien se han desarrollado herramientas computacionales para el análisis dinámico de comunidades microbianas, éstas no permiten un análisis a nivel metabólico del sistema en estudios longitudinales. La limitación de tales marcos teóricos dificulta la comprensión de los mecanismos detrás de la progresión de enfermedades y limita las predicciones que se pueden hacer con respecto a intervenciones personalizadas.

### **2.2. Hipótesis**

Un modelo computacional híbrido capaz de integrar el formalismo de Análisis de balance de flujo (FBA) y el de modelos ecológicos (como los de Lotka-Volterra y sus variantes) permitirá identificar especies bacterianas y rutas metabólicas relevantes en la microbiota intestinal bajo condiciones fisiológicas específicas de su hospedero. Esta herramienta computacional permitirá llevar a cabo predicciones sobre el microbioma cuando es sometido a perturbaciones debidas a la alteración de su composición o a cambios en la dieta de su hospedero.

### **2.3. Objetivo general**

Desarrollar una herramienta computacional que permita estudiar la dinámica del metabolismo de la microbiota intestinal humana a partir de datos de secuenciación y reconstrucciones metabólicas a escala genómica de los microorganismos involucrados.

### **2.4. Objetivos específicos**

- Desarrollar una herramienta computacional que, a partir de un modelo matemático híbrido basado en modelos ecológicos y FBA, datos de secuenciación mediante dos

tecnologías (16S y metagenoma) y reconstrucciones metabólicas a escala genómica, permita estudiar la dinámica del metabolismo de la microbiota intestinal humana.

- Llevar a cabo una prueba de concepto con una base de datos sintética que permita estudiar el desempeño de la herramienta.
- Convertir la herramienta desarrollada en un repositorio público de GitHub para que pueda ser implementada por la comunidad científica.

### **3. MARCO TEÓRICO**

#### **3.1. La microbiota intestinal humana**

Los microorganismos que viven dentro de y sobre los humanos se conocen como la microbiota humana. El conjunto de genomas de estos microorganismos es el microbioma humano (Turnbaugh et al., 2007). Si bien la microbiota humana ocupa casi cualquier parte del cuerpo, la mayoría habita en el intestino (Salehi et al., 2021). A partir del duodeno, se genera un gradiente continuo ascendente de concentración de microorganismos hasta el colon, y es en el intestino grueso donde se alcanza el máximo número de microorganismos. Particularmente, mediciones recientes indican que en el colon pueden habitar hasta 100 mil millones de microorganismos por gramo (De Vos et al., 2022). Esta tesis se centra en la microbiota del intestino grueso humano. En adelante, el término microbiota intestinal se refiere a la microbiota intestinal del colon humano.

El estudio de este sistema es fundamental porque las alteraciones en su homeostasis, conocidas como disbiosis, son tan significativas como la genética del hospedero en el desarrollo de ciertas enfermedades (Salehi et al., 2021). Debido a esto, se ha buscado una mejor comprensión del papel de la microbiota intestinal humana en el desarrollo y, potencialmente, en el diagnóstico de diferentes enfermedades (Wang & Jia, 2016).

#### **3.2. Estudios transversales y longitudinales**

Existen dos aproximaciones principales para inferir relaciones entre miembros de la microbiota intestinal: análisis transversales y longitudinales. En los estudios transversales se determinan las abundancias relativas de los microorganismos en muestras provenientes de varios individuos (Fisher & Mehta, 2014). Estos estudios son importantes para encontrar diferencias en las comunidades microbianas entre diferentes poblaciones humanas, tales como individuos sanos

y enfermos o individuos que habitan diferentes regiones geográficas. Sin embargo, debido a la enorme variación en la microbiota entre individuos y factores de confusión (tales como la dieta, el estilo de vida, o la medicación), actualmente, es un reto identificar las diferencias en abundancia que sean consecuencia exclusiva de la fisiología de la enfermedad de interés (Knight et al., 2018).

Por otra parte, en estudios longitudinales se lleva a cabo un seguimiento en el tiempo de las abundancias relativas de los microorganismos en un ambiente particular de un individuo (Fisher & Mehta, 2014). Con la finalidad de comprender las relaciones entre los microorganismos y crear modelos predictivos sobre sus alteraciones en abundancia, las series de tiempo de estas mediciones se acoplan usualmente a modelos dinámicos (e.g. sistemas de ecuaciones diferenciales ordinarias). Estos estudios, aunque más costosos que los transversales, son importantes para inferir los mecanismos detrás de la aparición de una enfermedad y evaluar patrones de respuesta durante su progresión (Knight et al., 2018).

El seguimiento temporal de la composición y funcionalidad de la microbiota intestinal de un individuo es relevante en este proyecto debido a que, en ocasiones, la inestabilidad de la microbiota puede ser un mejor predictor de una condición fisiológica que los taxones presentes en un tiempo específico. Por ejemplo, individuos con enfermedad intestinal inflamatoria presentan mayores fluctuaciones en su microbiota intestinal que los individuos control (Halfvarson et al., 2017).

### **3.3. Modelos animales de la microbiota intestinal humana**

Al igual que la selección de un diseño experimental apropiado determina el éxito de un estudio sobre microbiota intestinal humana (sección 3.2), la elección de un modelo animal es fundamental. En estudios previos, se han utilizado modelos como *Caenorhabditis elegans*,

*Drosophila melanogaster*, *Hydra* spp. y *Danio rerio* debido a una serie de ventajas pragmáticas entre las que se encuentran: (1) su fácil crianza, (2) la facilidad de analizar un gran número de generaciones y (3) la capacidad de obtener imágenes del organismo completo (Glowacki et al., 2021). Estos modelos han permitido elucidar principios importantes detrás de las interacciones entre los miembros de la microbiota intestinal (Gould et al., 2018; Ortiz et al., 2021). Más aún, el uso de cerdos ha potenciado los resultados e interpretaciones obtenidos en estudios de microbiota de organismos modelo debido a su similitud con los seres humanos en anatomía, fisiología, grado de desarrollo al nacer y fisiopatología de sus enfermedades (M. Wang & Donovan, 2015). Esta cercanía ha impulsado el uso de esta especie para representar una plataforma traslacional (Ericsson, 2019; Gehrig et al., 2019; Vlasova et al., 2018). No obstante, el tamaño de los cerdos y los costos y tiempos asociados con su logística hacen inviables a estos modelos para la mayoría de los estudios de microbiota intestinal (Glowacki et al., 2021).

### **3.3.1. El ratón como paradigma en estudios de microbiota intestinal**

A pesar de la utilidad de los modelos anteriormente descritos, el ratón ha predominado en investigación biomédica, especialmente en estudios de microbioma. Algunas de las ventajas que ofrece este animal son: (1) periodos de gestación cortos, (2) fácil crianza y manipulación debido a su tamaño, (3) una amplia disponibilidad de herramientas para su evaluación fenotípica y modificación genética y (4) una gran variedad de cepas estandarizadas que pueden minimizar la variabilidad (Glowacki et al., 2021).

Los ratones como modelo han sido fundamentales para establecer relaciones de causalidad en estudios de microbiota intestinal. Un ejemplo es el caso de estudio de la obesidad. En 2008, Turnbaugh et al. demostraron que la transferencia de microbiota intestinal de ratones con obesidad a ratones libres de gérmenes no obesos promueve un incremento en la adiposidad y

disfunción metabólica del receptor. Este y otros estudios han sido fundamentales para la comprensión de la relación entre la microbiota intestinal y la salud de su hospedero. Sin embargo, dependiendo del estudio, la variabilidad interindividual de la microbiota intestinal podría ser una limitación para el establecimiento de causalidad. Por ejemplo, en el caso de proyectos de desarrollo de herramientas computacionales, a menudo se prefiere utilizar comunidades definidas para facilitar la construcción y validación de la herramienta (Bauer et al., 2017; Bucci et al., 2016). Los ratones libres de gérmenes y gnotobióticos junto con las comunidades microbianas sintéticas han sido ampliamente utilizados para el establecimiento de ratones con microbiotas intestinales de composición definida.

### **3.3.2. Ratones libres de gérmenes y gnotobióticos**

Los ratones libres de gérmenes son ratones que han sido criados sin microorganismos, mientras que los ratones gnotobióticos son ratones inicialmente libres de gérmenes que han sido colonizados con una comunidad de microorganismos donde todos los miembros son conocidos (Glowacki et al., 2021) (figura 1). El trabajo con estas comunidades definidas ha sido esencial para dilucidar el papel de miembros específicos de la microbiota intestinal en: (1) el crecimiento (Blanton et al., 2016; Charbonneau et al., 2016; Schwarzer et al., 2016) (2) la ganancia de peso y salud metabólica (Fei & Zhao, 2013; Ridaura et al., 2013) y (3) la resistencia a patógenos del hospedero (Alavi et al., 2020; Fukuda et al., 2011; Hsiao et al., 2014).

El establecimiento de comunidades definidas debe responder a dos preguntas (Tian & Bisanz, 2022): (1) ¿qué tan diversa debe ser la comunidad para mantener la funcionalidad del organismo? y (2) ¿cómo seleccionar cepas con la capacidad de coexistir entre estas y el hospedero? Por ejemplo, en 2022, Cheng et al. crearon una de las comunidades definidas más completas hasta la fecha a partir de las 99 especies bacterianas más comunes del Proyecto

Microbioma Humano (Turnbaugh et al., 2007), complementadas con otras 20 especies para garantizar la resiliencia del sistema.

Por otra parte, cuando el objetivo de un estudio es la construcción de una herramienta computacional, es importante garantizar que los miembros de las microbiotas modelo por analizar cuenten con el nivel suficiente de información. Por ejemplo, con la finalidad de desarrollar una herramienta basada en FBA para el estudio de la microbiota intestinal, Bauer et al. construyeron un sistema *in vivo* que incluye únicamente especies bacterianas con reconstrucciones metabólicas curadas y validadas (Bauer et al. 2017) (sección 3.5.2). Para profundizar en el uso de modelos animales en estudios de microbiota intestinal y en los criterios para la selección de miembros de comunidades sintéticas, se recomiendan los estudios de Glowacki et al., 2021 y Tian & Bisanz, 2022, respectivamente.

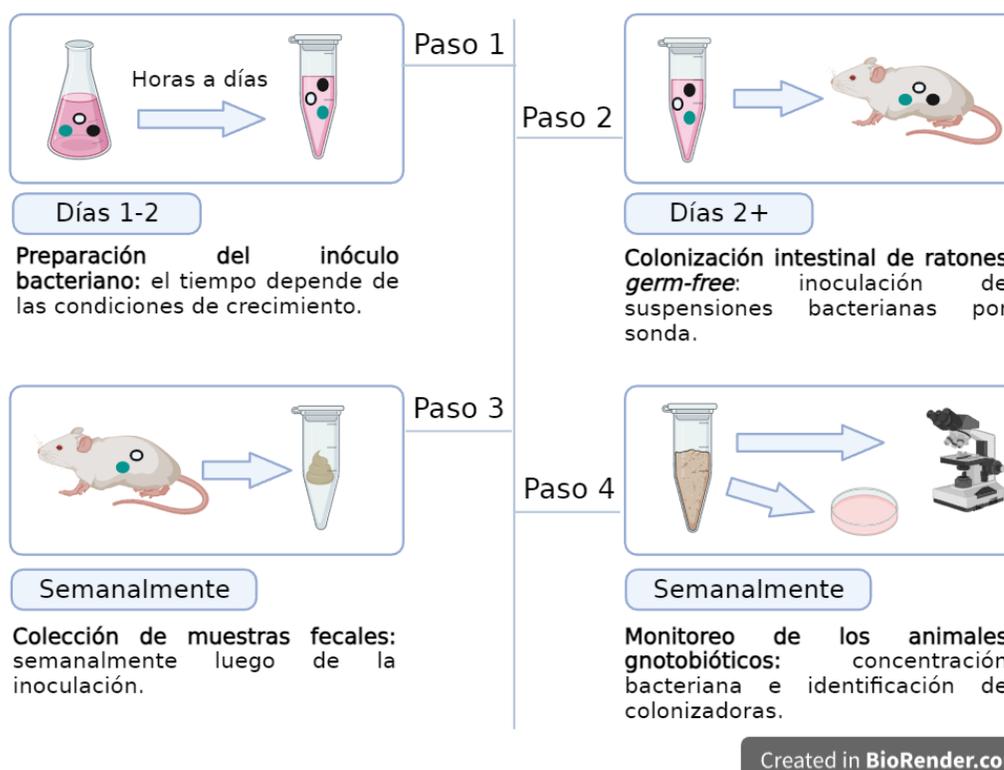


Figura 1. Generación y monitoreo de ratones gnotobióticos. Adaptada de Zucoloto et al., 2021 con BioRender.com.

### 3.4. Técnicas de secuenciación para el estudio de la microbiota intestinal

Las dos estrategias de secuenciación más utilizadas en estudios de microbiota son la secuenciación de amplicones y la secuenciación metagenómica *shotgun*. En la figura 2, se sintetizan los alcances de cada una de estas estrategias. Este trabajo se concentra en la composición bacteriana de la microbiota intestinal debido a que la información genómica que se ha obtenido a partir de la microbiota no bacteriana es aún incipiente y se encuentra subrepresentada en las bases de datos genómicos. A continuación, se sintetizan los *pipelines* de secuenciación de amplicones y de secuenciación metagenómica *shotgun*. Para profundizar en estos protocolos, se recomiendan los estudios de Gao et al., 2021, Knight et al., 2018 y Liu et al., 2021.

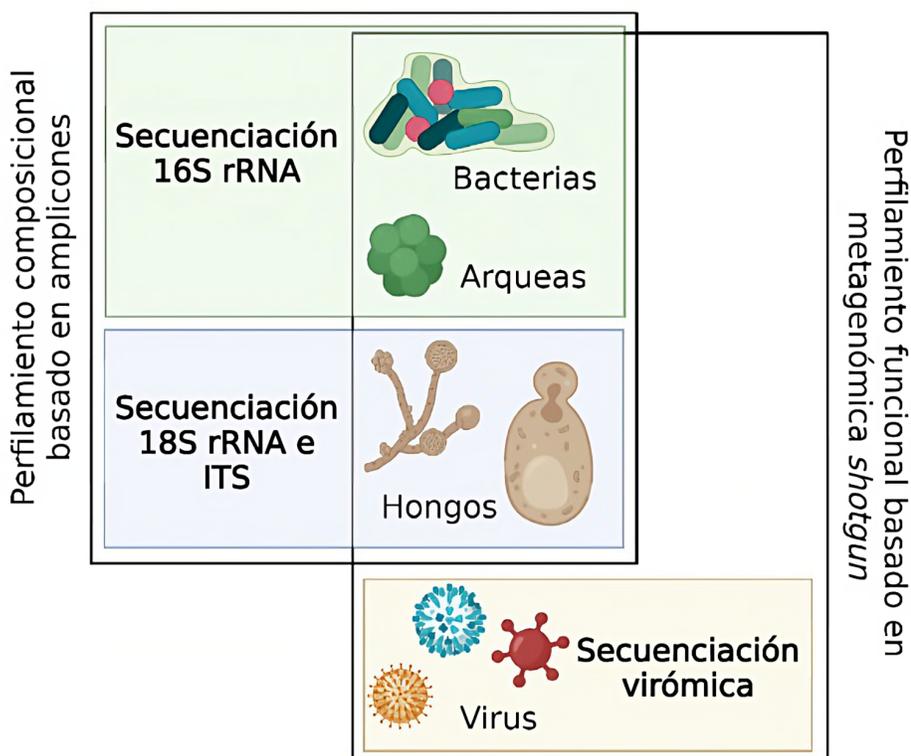


Figura 2. Técnicas de secuenciación comúnmente utilizadas para el estudio del microbioma intestinal. Adaptada de Gao et al., 2021 con BioRender.com.

### 3.4.1. Secuenciación de amplicones o análisis de genes marcadores

En la secuenciación de genes marcadores se utilizan *primers* dirigidos a regiones específicas de un gen con el fin de determinar la filogenia microbiana en una muestra (Knight et al., 2018). Los genes marcadores son genes conservados que típicamente contienen una región altamente variable que puede ser usada para la identificación y que es flanqueada por regiones altamente conservadas que pueden servir como sitios de unión para *primers* de PCR (Knight et al., 2018).

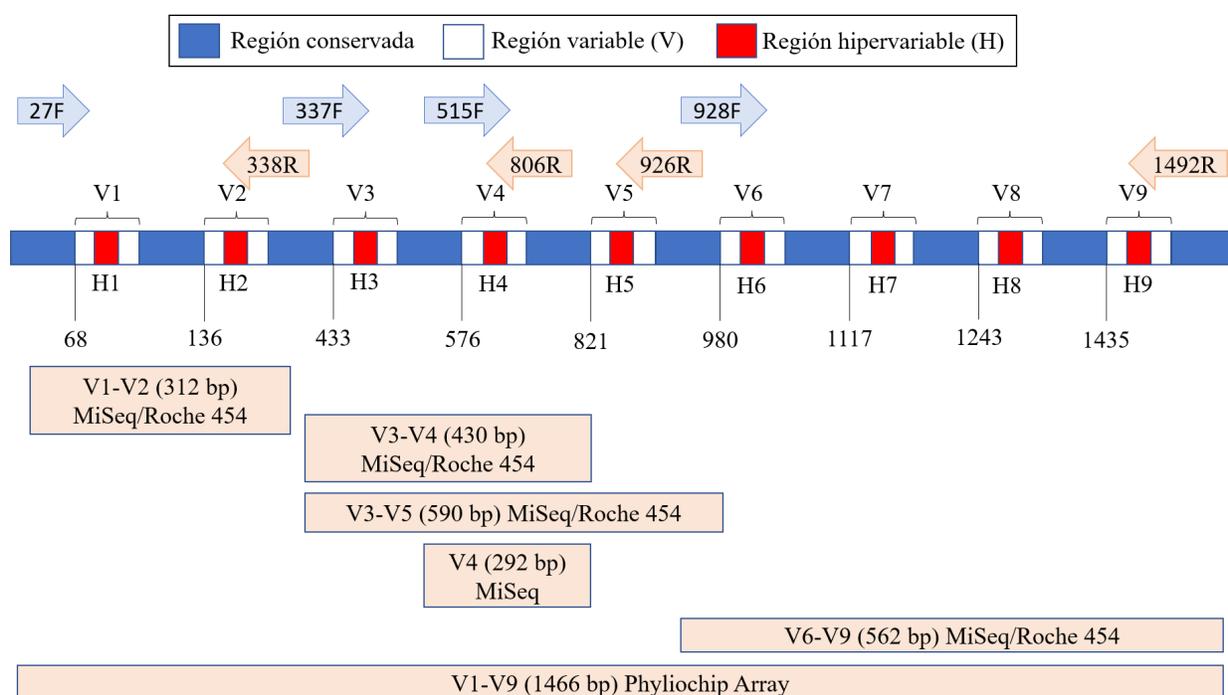


Figura 3. Esquema del gen 16S rRNA con sus regiones conservadas, variables e hipervariables y algunos *primers* usados para su amplificación. Las regiones conservadas se representan en azul, las regiones variables (V) en gris y las regiones hipervariables (H) en rojo. Adaptada de Shahi et al., 2017.

Los genes marcadores más utilizados son el 16S rRNA para bacterias y las secuencias ITS para hongos. Estos permiten un análisis rápido, factible y de baja resolución de la comunidad microbiana. Es importante mencionar que, incluso en condiciones óptimas, la resolución de esta técnica a menudo solo incluye información de los géneros y no de las especies

bacterianas (Knight et al., 2018). En la secuenciación de amplicones 16S rRNA, el gen de interés tiene nueve regiones hipervariables espaciadas por regiones conservadas (figura 3).

En la última década, se han desarrollado varias herramientas bioinformáticas para el análisis de datos de secuenciación 16S rRNA. La mayoría de estas consisten en tres pasos esenciales: (1) preprocesamiento de los datos y control de calidad, (2) asignación taxonómica y (3) caracterización de la comunidad (figura 4).

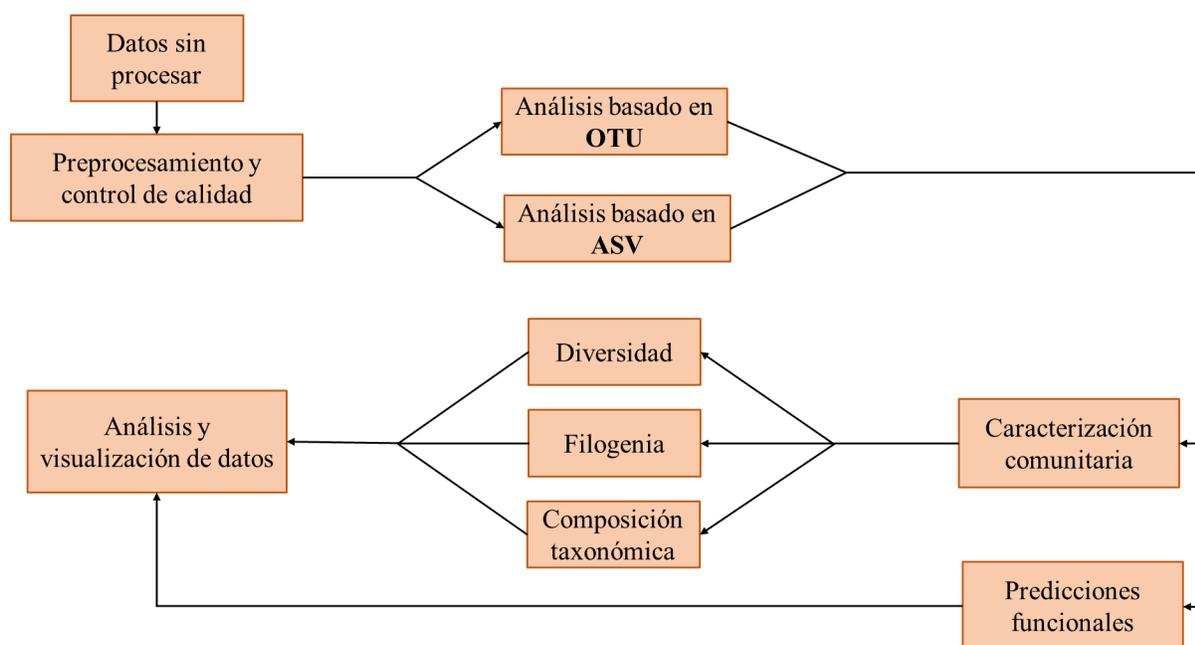


Figura 4. Protocolo de análisis de datos de secuenciación 16S rRNA. Adaptada de Gao et al., 2021.

Habiendo secuenciado las regiones de interés, en el preprocesamiento de los datos, se remueven los adaptadores y se lleva a cabo un protocolo de recorte y filtrado de las lecturas (secuencias de pares de bases inferidas en un fragmento de DNA) de acuerdo con un puntaje umbral (Gao et al., 2021). La asignación taxonómica se realiza con base en unidades taxonómicas operativas, OTU, o en variantes de secuenciación de amplicones, ASV. Los OTU son grupos definidos por la similitud de sus secuencias, mientras que la obtención de ASV consiste en inferir las secuencias originales en las muestras antes de la introducción de errores de

amplificación y secuenciación. Idealmente, los ASV tienen una resolución de hasta un nucleótido (Callahan et al., 2017). La caracterización de la comunidad consta de análisis básicos en ecología microbiana como estudios de diversidad.

### 3.4.2. Secuenciación metagenómica *shotgun*

La metagenómica es la técnica de secuenciación de todos los genomas en una muestra. Desde el punto de vista experimental, esta tecnología consiste en la captura de todo el DNA presente en una muestra, incluido material genético de las bacterias, el DNA viral y de células eucariotas. Este muestreo global brinda información relevante, no únicamente de la microbiota bacteriana, sino también de la composición genética de otros microorganismos en el microambiente (Knight et al., 2018). Sin embargo, esta tecnología es costosa y requiere de más inversión de tiempo en laboratorio que la amplificación de genes marcadores (Gao et al., 2021). Notablemente, cuando se tiene la suficiente profundidad de secuenciación (número de lecturas por muestra), la resolución de la técnica puede llegar a nivel de especie o cepa (Scholz et al., 2016).

El *pipeline* de la secuenciación metagenómica *shotgun* difiere del de la secuenciación de amplicones 16S rRNA principalmente en que, por tratarse de la secuenciación de pequeños fragmentos del genoma de los microorganismos presentes, es necesario asignar estos fragmentos a los microorganismos correspondientes en el orden apropiado (Contreras et al., 2016). Para ello, se utilizan dos estrategias: una aproximación basada en alineamiento y una basada en el ensamblado (figura 5).

El análisis basado en alineamiento consiste en mapear las lecturas a bases de datos de genomas referencia, mientras que el análisis basado en el ensamblado requiere de la

reconstrucción de genomas múltiples y depende fuertemente de la cobertura genómica (Gao et al., 2021).

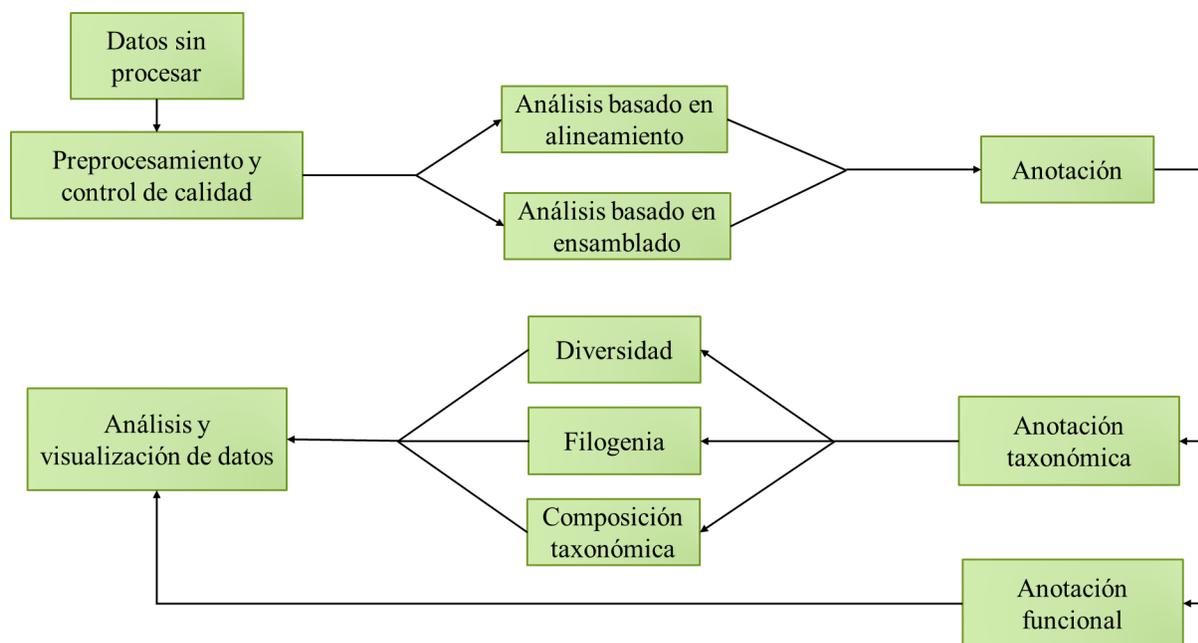


Figura 5. Protocolo de análisis de datos de secuenciación metagenómica *shotgun*. Adaptada de Gao et al., 2021.

### 3.5. Modelado matemático de la microbiota intestinal

El modelado matemático de la microbiota intestinal es fundamental para comprender las relaciones ecológicas que emergen en este sistema y para llevar a cabo predicciones sobre el efecto que puedan tener diferentes perturbaciones en la microbiota de un individuo. En 2014, Bucci y Xavier llevaron a cabo una revisión de varios tipos de modelos matemáticos que podrían representar adecuadamente la microbiota intestinal a partir de una analogía entre este sistema y el cultivo de microorganismos en biorreactores para el tratamiento de aguas residuales (figura 6). De acuerdo con los autores, los dos sistemas están constituidos por múltiples especies microbianas que son susceptibles de manera diferencial a perturbaciones. En el caso de los biorreactores, las perturbaciones son consecuencia de modificaciones en las variables

operacionales, mientras que en la microbiota intestinal las perturbaciones corresponden a tratamientos con antibióticos, cambios en la dieta y exposición a microorganismos externos.

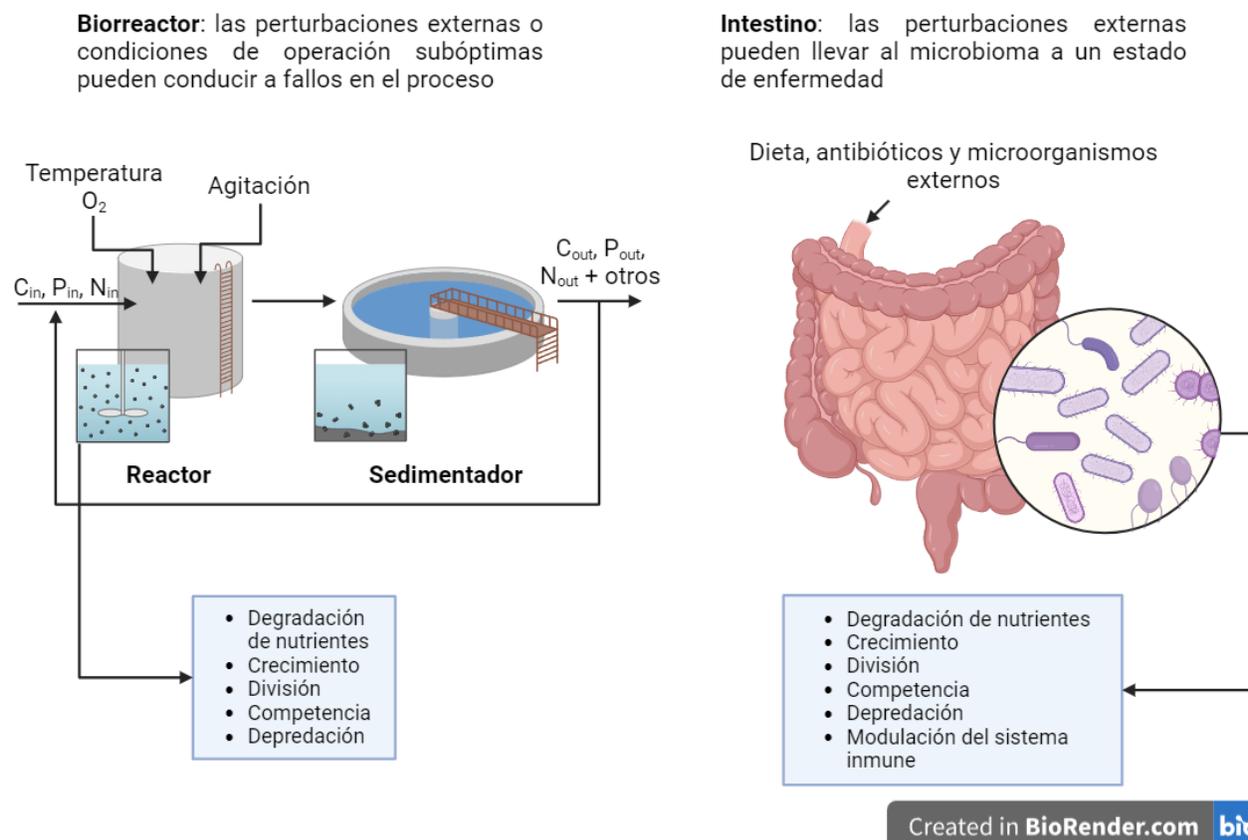


Figura 6. Analogía entre biorreactores de tratamiento de aguas residuales y la microbiota intestinal humana. Adaptada de Bucci & Xavier, 2014 con BioRender.com.

Por otro lado, en 2015, Coyte et al. concluyeron que la microbiota intestinal es un sistema constituido por tantas especies que interactúan entre sí, que es difícil que un hospedero pueda ejercer control sobre cada especie en particular. Ellos hipotetizaron que, en lugar de esto, los hospederos pueden actuar como ingenieros de ecosistemas que manipulan propiedades generales de las comunidades microbianas para su beneficio. Esto lo explicaron a partir de la alimentación específica y no específica que podría afectar la proporción de microorganismos que cooperan entre sí, modulando la estabilidad del sistema. En este trabajo de tesis, se considera que, bajo un

enfoque matemático adecuado, es posible sugerir intervenciones sobre la microbiota intestinal humana, que sean de utilidad en medicina personalizada.

Las dos estrategias de modelado más utilizadas en el estudio de estos sistemas son el modelado ecológico y el modelado del metabolismo a partir de reconstrucciones a escala genómica. A través de las dos, se han realizado contribuciones importantes en la comprensión de la microbiota intestinal. A continuación, se presentan las características, alcances y limitaciones de estos dos enfoques.

### **3.5.1. Modelos ecológicos**

La dinámica de las abundancias de las especies bacterianas en la microbiota intestinal ha sido modelada a partir de sistemas de ecuaciones diferenciales que provienen del análisis de ecosistemas macroscópicos (Bucci et al., 2016; Fisher & Mehta, 2014; Joseph et al., 2020; Kuntal et al., 2019). Cuando se adaptan estas ecuaciones a ecosistemas microscópicos se debe tener en cuenta que los tiempos de generación en bacterias se encuentran en el orden de horas. Esto facilita la obtención de datos para la parametrización y validación. Sin embargo, tiempos de generación tan pequeños podrían entorpecer la inferencia de parámetros debido a que la frecuencia de muestreo en estudios longitudinales de microbiota intestinal, en el mejor de los casos, es de una muestra cada día (Lim et al., 2023).

Las ecuaciones de tipo Lotka-Volterra (LV) han sido el tipo de modelo ecológico más utilizado en el estudio de la dinámica de la microbiota intestinal. A continuación, se presentan los dos modelos LV empleados en este estudio. Para profundizar en los modelos LV, se recomienda revisar el artículo de Joseph et al., 2020.

### 3.5.1.1. Modelo generalizado de Lotka-Volterra

El modelo generalizado de Lotka-Volterra (gLV por sus siglas en inglés) deriva del modelo clásico de Lotka-Volterra usado en ecología matemática para modelar sistemas simples de dos especies, depredador-presa (Bucci & Xavier, 2014). gLV extiende el concepto a un número arbitrario de especies. Su ecuación es la siguiente:

$$\forall i = 1, \dots, D: \quad \frac{dx_i(t)}{dt} = x_i(t) \left( g_i + \sum_{j=1}^D A_{ij}x_j(t) + \sum_{p=1}^P B_{ip}u_p(t) \right) \quad (1)$$

Tabla 1. Variables y parámetros del modelo generalizado de Lotka-Volterra (gLV).

Variable/parámetro	Significado
$x_i$	Abundancia del taxón $i$
$g_i$	Tasa de crecimiento del taxón $i$
$A_{ij}$	Coefficiente de interacción del taxón $j$ sobre el taxón $i$
$B_{ip}$	Coefficiente de perturbación de la perturbación $p$ sobre el taxón $i$
$u_p$	Variable dicotómica de perturbación

En resumen, el cambio en la abundancia de cada taxón  $i$  depende de la velocidad de crecimiento de este, de las interacciones entre el taxón  $i$  y todos los demás taxones y de las perturbaciones  $p$  sobre el taxón  $i$ .

Esta aproximación permite hacer inferencia sobre interacciones especie-especie a partir de series temporales de los grupos microbianos (figura 7).

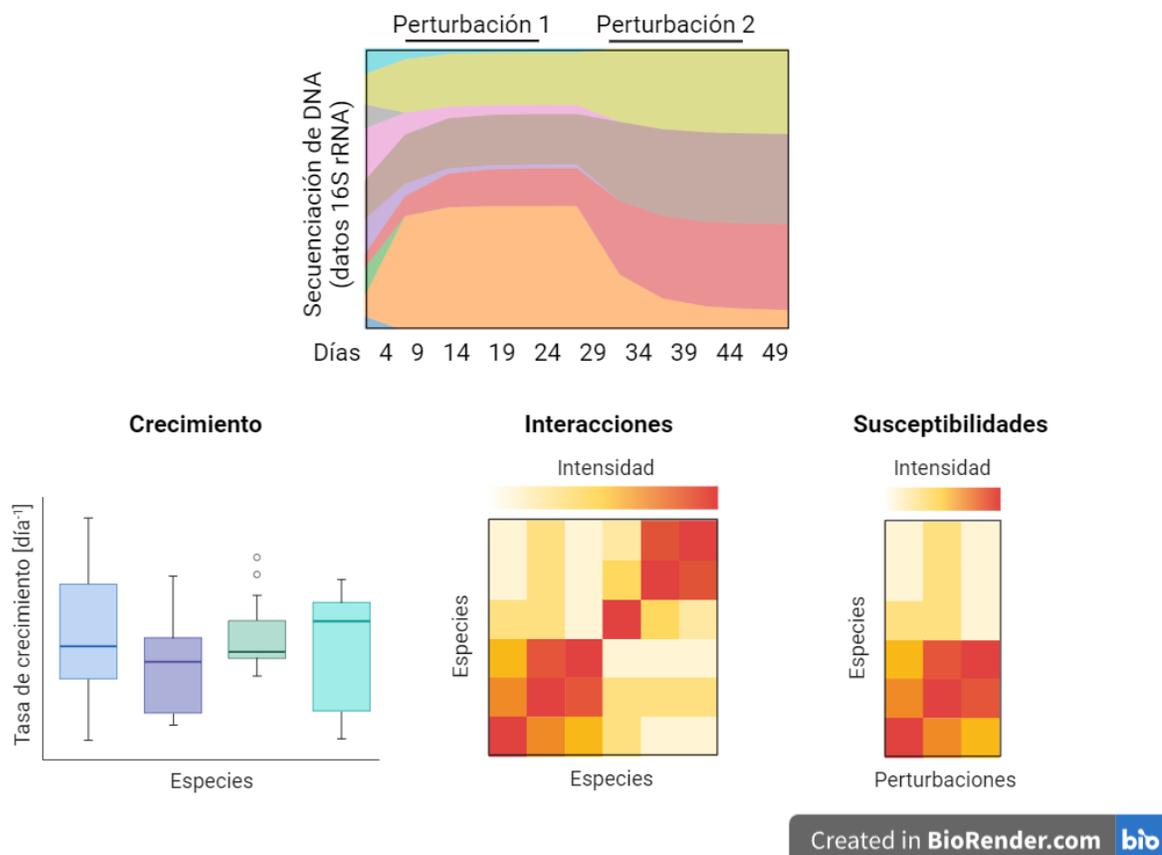


Figura 7. Aplicaciones del modelo generalizado de Lotka-Volterra en la inferencia de la estructura de comunidades microbianas y su respuesta a estímulos externos a partir de datos de secuenciación. Adaptada de Bucci & Xavier, 2014 con BioRender.com.

Cuando gLV se alimenta con datos de secuenciación, se puede hacer la inferencia de parámetros de crecimiento e interacción en las condiciones en que viven los microorganismos. Además, gLV permite la simulación de perturbaciones externas dependientes del tiempo como cambios en la dieta, infecciones y terapias con antibióticos (Bucci et al., 2016; Stein et al., 2013). Una aplicación importante de este modelo es la identificación de microorganismos clave en la microbiota (Fisher & Mehta, 2014). Estos son microorganismos de alta relevancia para la caracterización de grupos poblacionales, ya sea por su presencia diferencial o por el número de interacciones con otros miembros de la comunidad a la que pertenecen.

### 3.5.1.2. Modelo ecológico lineal

El modelo ecológico lineal es una versión simplificada de gLV:

$$\forall i = 1, \dots, D: \quad \frac{dx_i(t)}{dt} = g_i + \sum_{j=1}^D A_{ij}x_j(t) + \sum_{p=1}^P B_{ip}u_p(t) \quad (2)$$

Tabla 2. Variables y parámetros del modelo ecológico lineal (LRA).

Variable/parámetro	Significado
$x_i$	Abundancia del taxón i
$g_i$	Tasa de crecimiento del taxón i
$A_{ij}$	Coefficiente de interacción del taxón j sobre el taxón i
$B_{ip}$	Coefficiente de perturbación de la perturbación p sobre el taxón i
$u_p$	Variable dicotómica de perturbación

En 2020, Joseph et al. evaluaron la capacidad predictiva de cuatro modelos ecológicos en tres bases de datos longitudinales. En particular, observaron que, a pesar de la simplicidad del modelo lineal, su error cuadrático medio no presentó diferencias significativas con respecto al error asociado al modelo gLV.

### 3.5.1.3. Limitaciones de los modelos ecológicos

La simplicidad de los modelos ecológicos también acarrea una serie de limitaciones. Por un lado, se supone que las interacciones son constantes. Esto contrasta con la naturaleza del sistema, en el cual, los cambios en el ambiente o en las densidades de las especies pueden inducir cambios en las interacciones, por ejemplo, del mutualismo a la competencia (Momeni et al., 2017; van den Berg et al., 2022). Por otro lado, las interacciones mediadas por moléculas pequeñas, como el intercambio de metabolitos, no son modeladas explícitamente, lo cual limita

el estudio de propiedades emergentes de la comunidad (van den Berg et al., 2022). En esta tesis, se abordaron estos dos problemas mediante el acoplamiento entre ecuaciones de tipo Lotka-Volterra y modelos del metabolismo a escala genómica (sección 3.5).

### 3.5.2. Modelos del metabolismo a escala genómica

En la última década, se han desarrollado un gran número de herramientas computacionales para el análisis del metabolismo de comunidades microbianas (Scott et al., 2023). Estas herramientas se basan en modelos a escala genómica (GEM) y análisis de balance de flujos (FBA). Los GEM son una representación matemática de la red metabólica codificada en el genoma de un organismo (Scott et al., 2023). Específicamente, para la generación del GEM de un taxón se parte de una anotación genómica de este y, a partir de ella y bases de datos de reacciones bioquímicas (e.g. KEGG), se genera una lista de las reacciones y metabolitos asociados con los productos génicos identificados conocida como reconstrucción preliminar (Thiele & Palsson, 2010). Idealmente, todas las reacciones y metabolitos que se incluyen en este listado deben tener un soporte experimental. Para ello, se lleva a cabo un proceso de refinamiento de la reconstrucción que incluye balances de carga y de masa de cada metabolito, análisis de la direccionalidad de las reacciones e identificación de reacciones ausentes, todo esto de la mano de datos reportados en la literatura (Thiele & Palsson, 2010). Finalmente, la reconstrucción es convertida en un sistema de ecuaciones diferenciales ordinarias, en el que cada ecuación corresponde a la dinámica de cada uno de los metabolitos descrita por los coeficientes estequiométricos de estos en las reacciones que participan y las velocidades de estas reacciones (Thiele & Palsson, 2010).

El FBA es un formalismo de programación lineal para resolver un GEM en estado estacionario dada una serie de restricciones sobre los flujos metabólicos y una combinación

lineal de estos flujos como función objetivo (Orth et al., 2010). A continuación, se describe en detalle este formalismo.

### *3.5.2.1. Análisis de balance de flujo (FBA)*

En 2010, Orth, Thiele y Palsson llevaron a cabo una revisión exhaustiva de la teoría del FBA. A continuación, se sintetiza el protocolo descrito por ellos.

La primera etapa en un FBA corresponde a la suposición de estado estacionario. Se convierte el sistema de ecuaciones diferenciales de un GEM en un sistema lineal homogéneo y se representa de manera matricial (figura 8 a, b y c). La matriz asociada al modelo se denomina matriz estequiométrica y se suele representar con la letra  $S$ . Esta matriz es de tamaño  $m \times n$ , donde  $m$  corresponde al número de metabolitos y  $n$  al número de reacciones. Las entradas en cada columna son los coeficientes estequiométricos de los metabolitos que participan en una reacción específica. El flujo metabólico a través de todas las reacciones en la red es representado por el vector  $v$ . La producción de biomasa es representada por medio de la adición de una reacción de biomasa artificial (una columna adicional en la matriz estequiométrica) que consume metabolitos precursores a estequiometrías que simulan el crecimiento celular.

Una vez construido el sistema matricial y debido a que en los GEM hay más reacciones que metabolitos, es necesario delimitar el espacio de posibles soluciones del sistema. Esto se logra mediante el establecimiento de restricciones máximas y mínimas para las velocidades de ciertas reacciones (figura 9).

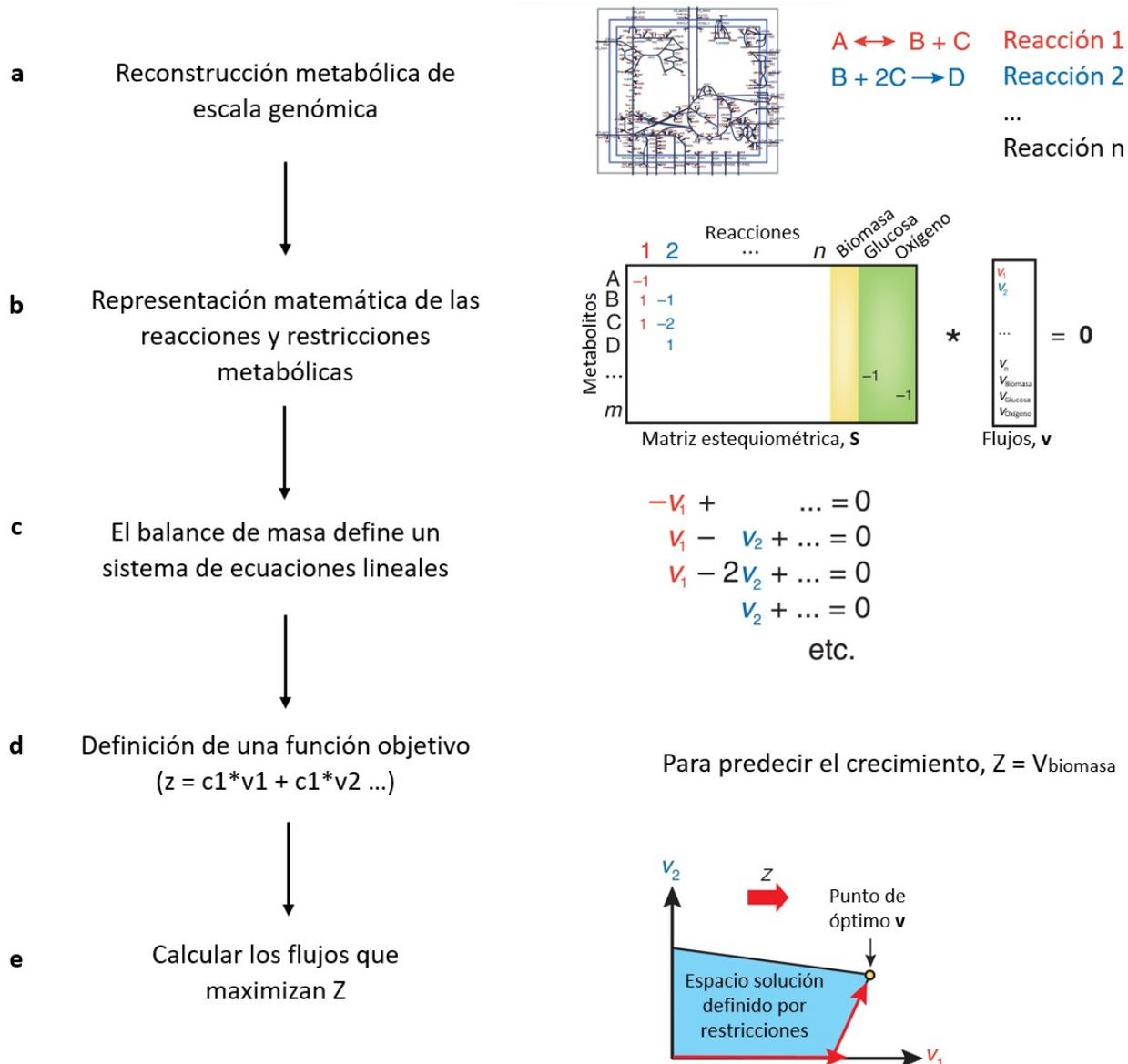


Figura 8. Formulación de un problema de FBA. Adaptada de Orth et al., 2010.

Finalmente, se establece una función objetivo y se lleva a cabo el proceso de optimización de esta (figura 8 d y e). La función debe definir un fenotipo que sea relevante para el problema bajo estudio, por ejemplo, el crecimiento celular o la producción de un metabolito de interés.

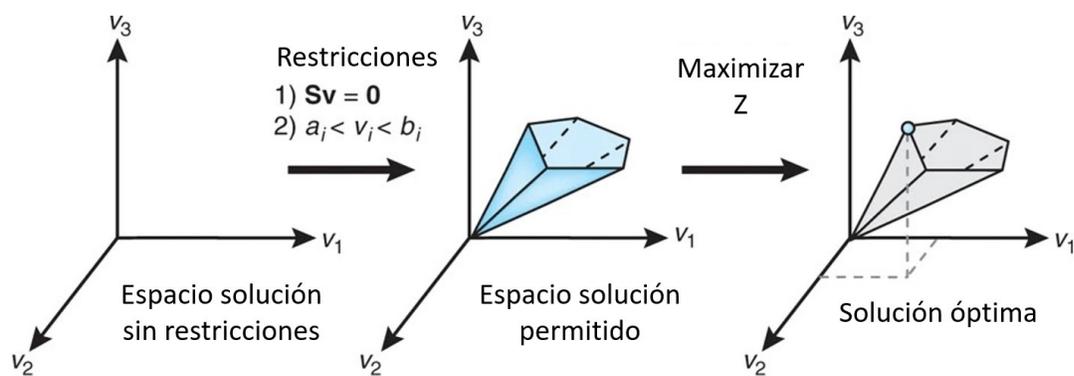


Figura 9. Restricción del espacio solución de un problema FBA. Adaptada de Orth et al., 2010.

### 3.5.2.2. FBA en comunidades microbianas

De acuerdo con Dillard et al., 2021, el análisis del metabolismo de una comunidad microbiana por FBA se puede lograr si se integran los GEM de sus miembros en una comunidad simulada (figura 10). Estos autores sugieren dos tipos adicionales de reacciones para este caso: las reacciones de transporte y las de intercambio. Las reacciones de transporte representan el flujo de metabolitos entre el ambiente intracelular de los microorganismos y el espacio compartido entre los miembros de la comunidad, mientras que las reacciones de intercambio corresponden al flujo de metabolitos entre ese espacio compartido y los alrededores (e.g. el hospedero).

Otra consideración importante al extrapolar el FBA a comunidades microbianas es la definición de la función objetivo. En el análisis de organismos individuales, usualmente se optimiza la tasa de crecimiento porque los organismos pueden estar evolutivamente optimizados para alcanzar una tasa de crecimiento cercana a su máximo (Diener & Gibbons, 2023). Sin embargo, esto no tiene tanto sentido en comunidades microbianas. Los microorganismos individuales no tienen motivos para mantener el máximo crecimiento comunitario. De hecho, una tasa de crecimiento comunitario demasiado alta podría requerir que taxones de baja abundancia sacrifiquen su propio crecimiento para proveer nutrientes a un taxón de mayor

abundancia, algo que va en contra de la evolución (Diener & Gibbons, 2023). En un estudio previo con comunidades *in vitro* se observó que la tasa de crecimiento comunitaria disminuyó cuando se incrementó la riqueza de la comunidad (hasta el 60% de su máximo en el peor de los casos), posiblemente debido a los costos impuestos por la competencia (Senne de Oliveira Lino et al., 2021).

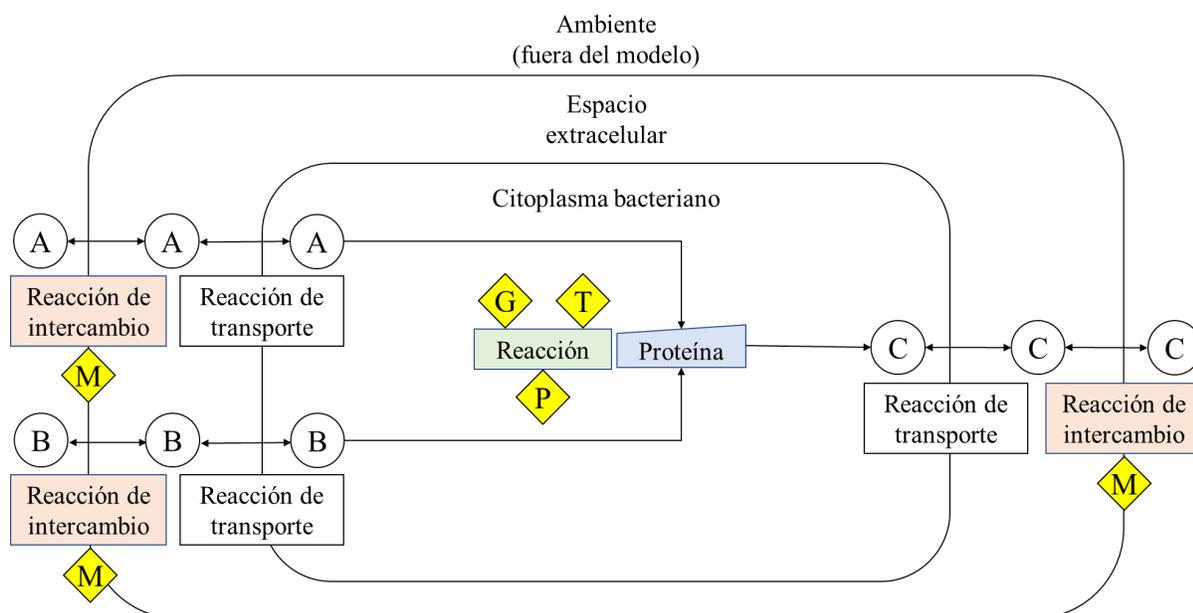


Figura 10. Esquema del sistema a considerar para aplicar FBA en comunidades microbianas. A, B y C son metabolitos. M: datos metabolómicos, G: datos genómicos, T: datos transcriptómicos y P: datos proteómicos. Adaptado de Dillard et al., 2021.

Para resolver el problema de la función objetivo se han propuesto varias estrategias. En 2012, Zomorodi y Maranas dividieron la optimización en dos etapas. Primero, llevaron a cabo la optimización a nivel individual y luego maximizaron el crecimiento comunitario. Este protocolo lo incorporaron en la herramienta computacional OptCom. Sin embargo, esta aproximación es intensa y no escalable al número de especies de la microbiota intestinal. En 2020, Diener et al. mejoraron esa estrategia mediante un método que denominaron FBA de *trade-off* cooperativo (ctFBA) constituido por tres etapas: (1) se maximiza la tasa de crecimiento comunitario, (2) se fija una fracción de esa tasa, denominada *trade-off*, y (3) se determinan las tasas de crecimiento

individuales para esa fracción mediante el planteamiento de un problema de minimización cuadrática (figura 11). Los autores implementaron este protocolo en la herramienta computacional MICOM.

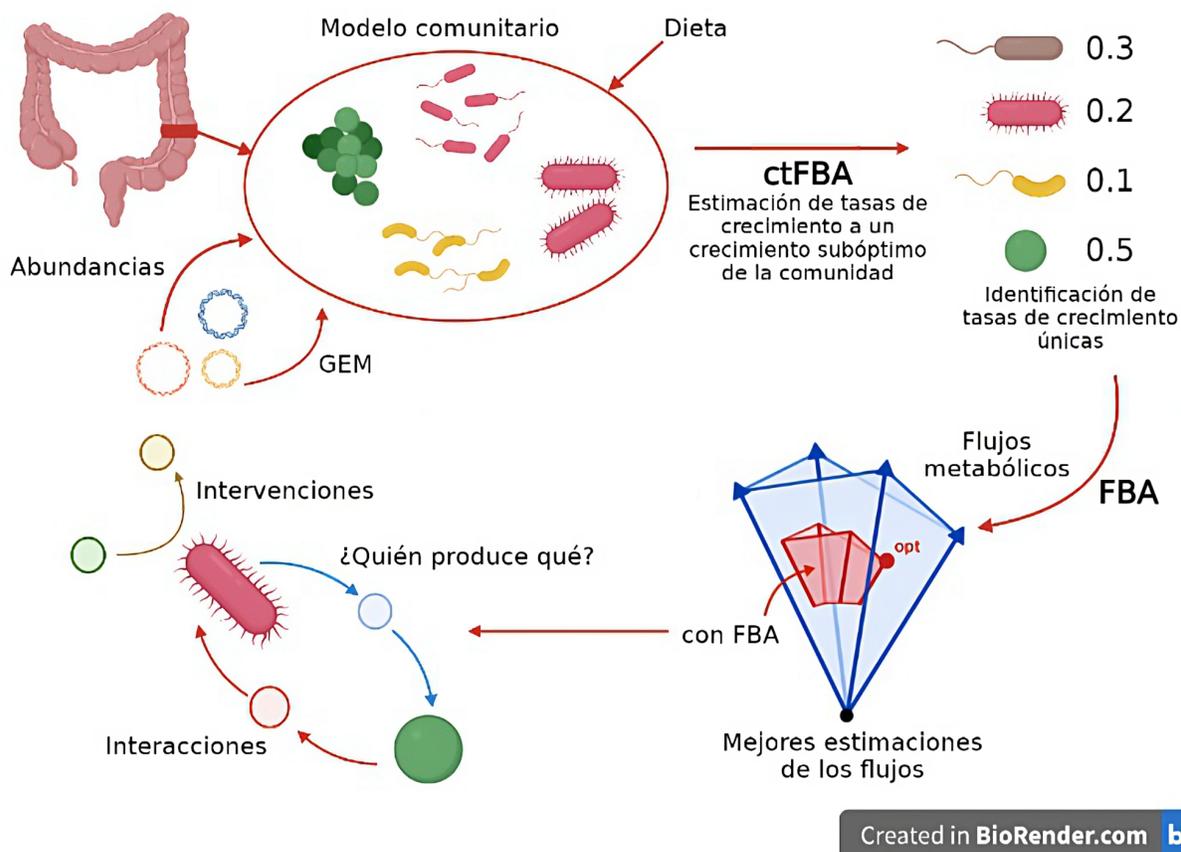


Figura 11. Modelado del metabolismo de la microbiota intestinal humana por FBA de *trade-off* cooperativo (ctFBA). Adaptada de <https://micom-dev.github.io/micom> con BioRender.com.

El desempeño de MICOM fue evaluado a través de una cohorte de diabetes conformada por 186 personas. Las tasas de crecimiento determinadas por MICOM presentaron correlaciones significativas con velocidades de duplicación estimadas a partir de datos de secuenciación metagenómica *shotgun*. MICOM permitió la predicción de una reducción en la producción de SCFA en los diabéticos, así como una restauración de estos metabolitos en los pacientes al ser tratados con metformina (Diener et al., 2020). La herramienta también permite simular cambios en las abundancias de los microorganismos y en los componentes de la dieta, lo cual brinda la

posibilidad de hacer predicciones sobre el efecto de intervenciones personalizadas sobre el metabolismo en la microbiota.

### 3.5.2.3. *Herramientas computacionales para el análisis del metabolismo en la microbiota intestinal*

En 2023, Scott et al. compararon cualitativa y cuantitativamente el desempeño de algunas de las herramientas computacionales para el análisis del metabolismo en la microbiota intestinal. En esta sección se sintetizan los resultados de estos autores.

Para la evaluación cualitativa, se estimaron los parámetros FAIR de 24 herramientas (Wilkinson et al., 2016). Los parámetros FAIR evalúan la facilidad con que una herramienta es localizada (*Findable*), implementada (*Accesible*) y articulada con otras herramientas (*Interoperability*), así como la consistencia de sus resultados (*Reusability*). Estos parámetros garantizan un mantenimiento de calidad y la reproducibilidad de la estrategia (Barker et al., 2022; Katz et al., 2021). Las herramientas con mejor desempeño cualitativo fueron SteadyCom (Chan et al., 2017), MICOM (Diener et al., 2020) y MMT (Heinken & Thiele, 2022). En particular, los autores destacaron cinco propiedades de MICOM: (1) es sometida rutinariamente a actualizaciones y estas se encuentran bien documentadas, (2) cuenta con un excelente soporte constituido por dos canales de discusión, (3) es gratuita, (4) cuenta con un manual de usuario detallado y frecuentemente actualizado y (5) sus soluciones son consistentes y no tiene problemas de divergencia (Scott et al., 2023).

Luego, como evaluación cuantitativa, se estudió la capacidad predictiva de SteadyCom, MICOM y MMT con una base de datos sobre la fermentación de gas de síntesis por el co-cultivo de *Clostridium autoethanogenum* y *Clostridium kluyveri* (Diender et al., 2019). MICOM y SteadyCom produjeron resultados razonables. Ninguna fue superior a la otra, por lo que pueden ser consideradas como un punto de partida para el modelado metabólico de la microbiota

intestinal. No obstante, dadas las características FAIR de MICOM, los autores recomendaron esta herramienta.

#### 3.5.2.4. *Herramientas computacionales para el análisis dinámico del metabolismo de la microbiota intestinal*

En el estudio de Scott et al., 2023, también se revisaron herramientas computacionales para el análisis de comunidades microbianas por medio de FBA dinámico o dFBA, un algoritmo de modelado dinámico basado en la aplicación iterativa de FBA (Mahadevan et al., 2002). Sin embargo, ninguna de las herramientas cumplió aceptablemente con los principios FAIR ni exhibió una buena capacidad predictiva. Además, los dFBA son conocidos por ser muy demandantes computacionalmente (Diener & Gibbons, 2023). Scott et al. sugirieron incorporar modelos ecológicos a las herramientas existentes basadas en FBA para facilitar el análisis dinámico del metabolismo de la microbiota intestinal. En este trabajo de tesis, se presenta el desarrollo de un modelo híbrido de dos componentes: (1) modelado ecológico y (2) modelado del metabolismo. Para el modelado ecológico, se emplearon ecuaciones de tipo Lotka-Volterra, mientras que, para el modelado del metabolismo, se implementó la herramienta computacional MICOM, que se basa en FBA de *trade-off* cooperativo (sección 4.1). La principal contribución de esta tesis se concentra en la creación de una herramienta computacional que permite analizar la dinámica del metabolismo en la microbiota intestinal, que es fácil de implementar y proporciona resultados consistentes.

## 4. METODOLOGÍA

### 4.1. Modelado de la dinámica del metabolismo en la microbiota intestinal mediante una estrategia híbrida entre ctFBA y modelos ecológicos

En este trabajo se implementó una estrategia híbrida para estudiar la dinámica del metabolismo de la microbiota intestinal (figura 12). Esta aproximación se basa en la suposición de que los cambios en las concentraciones de los miembros de la microbiota intestinal implican alteraciones en las interacciones metabólicas entre estos. Para ello, se articularon modelos ecológicos y MICOM, iterativamente.

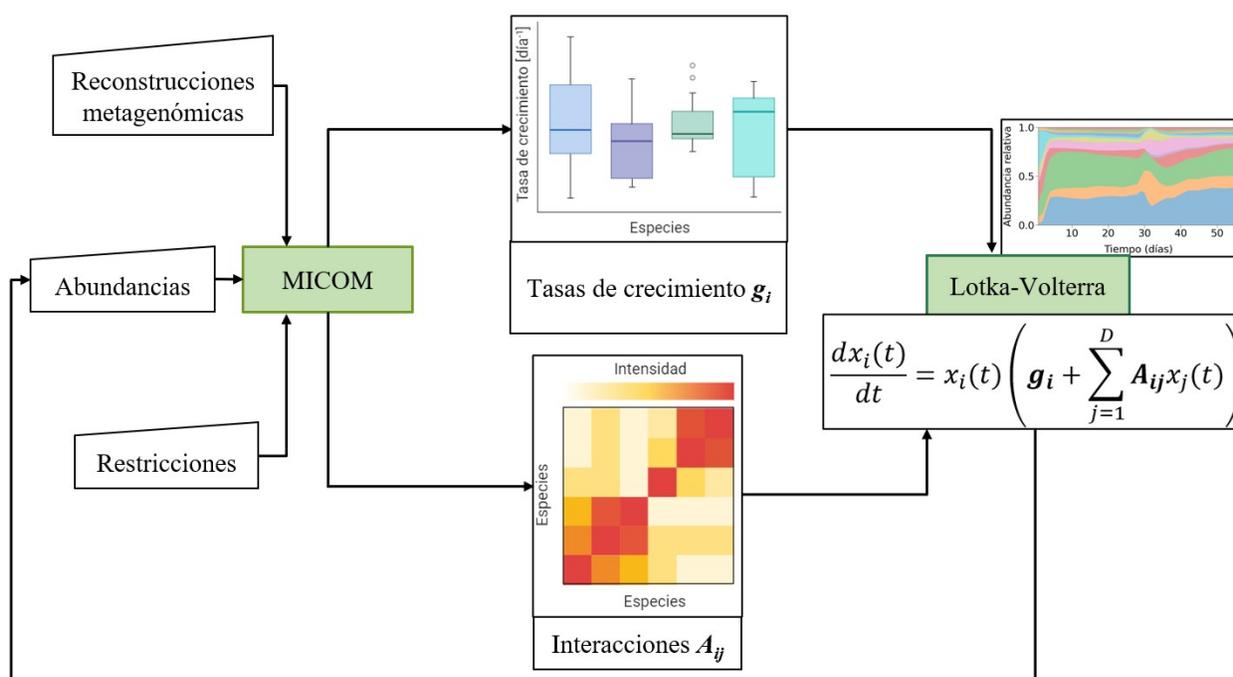


Figura 12. Modelo híbrido entre MICOM y gLV para el análisis de la dinámica del metabolismo en la microbiota de manera iterativa.

En cada iteración, MICOM fue alimentada con tres tipos de datos: (1) abundancias (concentraciones) de los taxones, (2) Reconstrucciones metagenómicas correspondientes a los GEM de los microorganismos (sección 3.5.2) y (3) restricciones sobre las velocidades de las reacciones. A partir de estos datos, se llevó a cabo la estimación de tasas de crecimiento y

coeficientes de interacción en la comunidad microbiana con MICOM. Estas tasas y coeficientes se introdujeron en los modelos ecológicos como parámetros de las ecuaciones. Utilizando los modelos ecológicos, se generaron trayectorias microbianas por un intervalo definido y las abundancias microbianas finales se usaron como valores de entrada en MICOM para la siguiente iteración. Este ciclo se repitió un número predeterminado de veces. A continuación, se describen las configuraciones, las clases y los métodos utilizados para la implementación de cada componente del modelo híbrido.

#### 4.1.1. Análisis metabólico mediante ctFBA

Los análisis de tipo ctFBA se llevaron a cabo con el paquete de Python MICOM (Diener et al., 2020), cuya documentación e instrucciones de instalación están disponibles en su respectivo repositorio en GitHub (sección 4.8). En este estudio se consideraron las reconstrucciones del proyecto AGORA por su calidad y especificidad para miembros de la microbiota intestinal humana (Magnúsdóttir et al., 2017). AGORA es un repositorio de reconstrucciones metabólicas a escala genómica generado semiautomáticamente con 773 cepas bacterianas intestinales, correspondientes a 205 géneros y 605 especies (Magnúsdóttir et al., 2017). Todas las reconstrucciones cuentan con soporte experimental.

Las comunidades de reconstrucciones metabólicas *in silico* asociadas con las bases de datos de las secciones 4.2 y 4.3 se crearon mediante la clase “Community” de MICOM. Estas comunidades y las restricciones sobre las velocidades de las reacciones asociadas con la dieta del hospedero (secciones 4.4 y 4.8.2) se introdujeron como argumentos del método “cooperative\_tradeoff” para llevar a cabo el proceso de *trade-off* cooperativo (sección 3.5.2.2). Este proceso consiste en maximizar la tasa de crecimiento comunitario, fijar una fracción o *trade-off* de ese máximo y finalmente recurrir a un proceso de regularización para encontrar las

tasas de crecimiento de los taxones individuales bajo el *trade-off* fijado. La selección de la fracción *trade-off* se realizó mediante ensayo y error. En cada análisis, se ensayaron 10 fracciones y se escogió la que permitiera el crecimiento del mayor número de miembros en la comunidad. En caso de empate, se seleccionó la fracción mayor. El criterio para determinar si un taxón se encontraba o no en crecimiento fue la tolerancia del solucionador (CPLEX de IBM). Si la tasa de crecimiento del taxón es superior a la tolerancia del solucionador, el taxón se considera en crecimiento. Las tasas de crecimiento individuales y las distribuciones de flujos metabólicos se extrajeron del marco de datos generado por el método “cooperative\_tradeoff”.

Además, la estimación de las interacciones entre los miembros de la comunidad se realizó mediante un proceso iterativo de *knockouts in silico* de taxones. Esto se obtuvo como resultado de la aplicación del método “knockout\_taxa” de MICOM. Este método elimina un taxón cada vez y estima las tasas de crecimiento de los demás miembros de la comunidad en ausencia del taxón removido. Si la tasa de crecimiento de una especie incrementa como resultado de la remoción de otra, se infiere que la interacción ejercida por la segunda sobre la primera es negativa. De lo contrario, si el resultado es una disminución en la tasa de crecimiento, la interacción es positiva. De este modo, la herramienta computacional desarrollada en este trabajo recapitula las interacciones metabólicas directas e indirectas entre los miembros de la comunidad.

El método “knockout\_taxa” permite reportar estos resultados como un cambio absoluto o relativo en la tasa de crecimiento de cada taxón. En este estudio, se consideraron como coeficientes de interacción los cambios relativos en las tasas de crecimiento, que además fueron escalados de modo que la media de los valores absolutos de los coeficientes en cada muestra

fuera igual a la media del valor absoluto de sus tasas de crecimiento. Este escalado se basó en estudios de modelado dinámico de comunidades sintéticas (Bucci et al., 2016; Stein et al., 2013).

#### 4.1.2. Modelado ecológico

Para la generación de trayectorias microbianas a partir de los parámetros estimados por ctFBA se utilizaron los modelos gLV y LRA (sección 3.5.1). Estos se incorporaron al modelo híbrido por medio del repositorio “clv” desarrollado por Joseph et al., 2020. Este repositorio se estableció como submódulo del repositorio creado para la estrategia híbrida (sección 4.8.1). Los modelos gLV y LRA se extrajeron del submódulo mediante las clases “GeneralizedLotkaVolterra” y “LinearRelAbun”, respectivamente.

Los modelos ecológicos, como clases, se alimentaron con las abundancias microbianas, los intervalos de análisis y las tasas de crecimiento y coeficientes determinados por ctFBA. Finalmente, las trayectorias se construyeron con el método “predict”, que resuelve los problemas de valores iniciales por el método de Runge-Kutta de orden 5.

#### 4.2. Bases de datos sintéticas

A lo largo del desarrollo de la herramienta computacional, se consideraron bases de datos sintéticas con el objetivo de disminuir tiempos de optimización y simulación (sección 3.3.2). Para la selección de los miembros de las comunidades se consideraron los siguientes criterios: (1) bacterias consideradas clave en la microbiota intestinal (los grupos bacterianos y las bacterias individuales más influyentes de la comunidad, los más esenciales para la estabilidad del sistema o el agente etiológico de una enfermedad) (Banerjee et al., 2018; Layeghifard et al., 2017), (2) productores de SCFA (Portincasa et al., 2022) y (3) taxones presentes en otras bases de datos sintéticas de microbiota intestinal (Bucci et al., 2016). Finalmente, se escogieron los miembros que contaran con una reconstrucción metabólica en AGORA.

Las comunidades sintéticas se generaron a partir de “bolsas de taxones”. Estas bolsas contienen miembros potenciales de las comunidades, de las cuales se extrae un número determinado de especies al azar. A continuación, se describen las dos bases de datos sintéticas generadas a partir de estas bolsas. Su asignación taxonómica y composición en detalle se encuentran en los apéndices A y B.

Para los experimentos de simulación del crecimiento de la microbiota intestinal (sección 4.5), se creó la base de datos “Comunidades sintéticas de composición aleatoria”. Para ello, se consideró una bolsa de 29 taxones posibles y, dependiendo del experimento, se escogieron 5 o 10 especies de esta. En total se generaron tres comunidades de 5 especies y tres comunidades de 10 especies.

Por otro lado, para los experimentos de estimación de flujos metabólicos (sección 4.6), se creó la base de datos “Comunidades sintéticas de composición definida”. Para ello, se consideraron seis comunidades, todas ellas con los mismos 12 taxones. Las únicas diferencias entre las seis comunidades fueron las abundancias relativas de los 12 miembros. Esta base de datos se generó con el fin de estudiar la capacidad de producción de SCFA de cada taxón suponiendo que habitan hospederos pertenecientes a diferentes comunidades humanas (sección 4.4).

#### 4.3. Base de datos longitudinales de un experimento de infección con *Clostridium difficile*

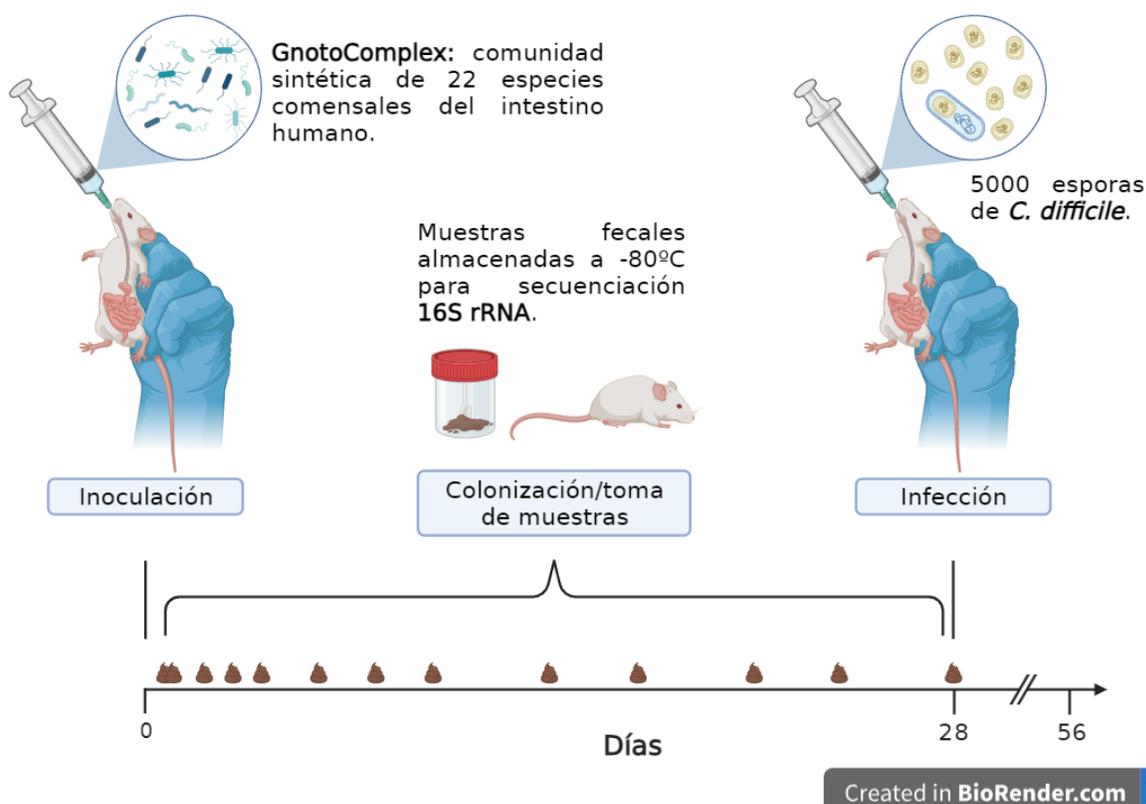


Figura 13. Esquema del estudio de infección en un modelo murino llevado a cabo por Bucci et al., 2016. En el tiempo 0, cinco ratones libres de gérmenes fueron inoculados con una comunidad de 22 especies bacterianas. Durante los 28 días posteriores a la inoculación, se recolectaron muestras fecales para análisis por secuenciación del gen 16S rRNA. Los instantes de las tomas de muestra se señalan en café. El día 28, los ratones fueron infectados con esporas de *C. difficile*. Durante los 28 días posteriores a la infección, se recolectaron muestras fecales (no se muestra). La frecuencia de muestreo posterior a la infección fue la misma que la frecuencia posterior a la inoculación. Generada con BioRender.com.

Este conjunto se recopiló de los datos públicos asociados al estudio de Bucci et al., 2016. Brevemente, estos investigadores consideraron cinco ratones libres de gérmenes de entre 8 y 10 semanas de edad (figura 13). Los ratones fueron inoculados por sonda oral con 22 especies bacterianas comensales del intestino humano y al cabo de 28 días fueron infectados con esporas de *C. difficile*. Los investigadores llevaron a cabo secuenciación de amplicones 16S rRNA a muestras generadas 28 días antes de la infección y 28 días después de esta. En total, tomaron 26

muestras y detectaron la colonización de 13 de las especies inoculadas, incluyendo el patógeno. Todas estas especies cuentan con un GEM en la base de datos de AGORA (Magnúsdóttir et al., 2017). Esta base de datos longitudinales fue utilizada para evaluar el desempeño del modelo híbrido bajo diferentes configuraciones (sección 4.7).

#### 4.4. Dietas para ctFBA

Con el propósito de evaluar diferentes ambientes de crecimiento para las comunidades microbianas de las secciones 4.2 y 4.3, se consideraron las dietas promedio de cuatro poblaciones humanas diferentes: (1) occidentales, (2) Me'phaa, (3) Hadza y (4) Chepang. Los datos con los flujos metabólicos asociados a estas dietas se tomaron de un repositorio público de GitHub perteneciente al Laboratorio de Ecología y Evolución de Sistemas Microbianos del Instituto de Biología de Sistemas en Seattle (sección 4.8).

La dieta promedio occidental se caracteriza por un bajo consumo de fibra y un alto consumo de alimentos de origen animal. Las demás dietas representan un cambio significativo en el ambiente metabólico de la microbiota intestinal con respecto a la dieta occidental derivado de estilos de vida radicalmente diferentes.

La población Me'phaa es un grupo indígena prehispánico mexicano. Aquí, se consideró la población que habita la Montaña Alta del Estado de Guerrero. Esta población se caracteriza por el consumo de un único cereal, el maíz, y por el cultivo de legumbres, como el frijol y la lenteja (Sánchez-Quinto et al., 2020). También consumen plantas silvestres y carne, que obtienen por caza y recolección. En el caso de la carne, solo la consumen en ocasiones especiales.

La población Hadza reside cerca del lago Eyasi en Tanzania y es de las últimas poblaciones africanas dedicadas a la caza y recolección (Schnorr et al., 2014). Los Hadza están sujetos a dos estaciones durante el año: húmeda y seca. Durante la temporada húmeda, de

noviembre a abril, se alimentan de bayas y miel. En la temporada seca, se dedican a la caza. El consumo de tubérculos y fruto de baobab, fuentes de fibra, ocurre durante todo el año.

Los Chepang habitan la zona rural de Nepal y viven principalmente de la caza y recolección (tubérculos, frutas, miel y pescado), que recientemente han venido complementando con agricultura (Jha et al., 2018). Sus sembradíos son primitivos y dependen del agua de la lluvia.

#### **4.5. Simulación del crecimiento microbiano**

Las trayectorias microbianas de las comunidades sintéticas de composición aleatoria de 5 y 10 especies (sección 4.2) se generaron suponiendo que habitan dos tipos de hospederos hipotéticos: un individuo occidental y un miembro de la población Me'phaa. Dependiendo del hospedero, se asignó su respectiva dieta promedio para la implementación del ctFBA (sección 4.1.1). Además, se consideraron dos modelos ecológicos, LRA y gLV, y dos intervalos de análisis (una iteración), cada uno de 5 horas. La estimación de parámetros se realizó por ctFBA y *knockouts in silico* (sección 4.1.1).

#### **4.6. Estimación de flujos metabólicos por ctFBA**

La capacidad de la herramienta computacional para estimar las distribuciones de flujos metabólicos mediante ctFBA se llevó a cabo en las comunidades sintéticas de composición definida descritas en la sección 4.2. Para este experimento, se consideraron tres hospederos hipotéticos: un miembro de la población Me'phaa, uno de la población Hadza y otro de la población Chepang. Para esta etapa del estudio, no se tuvo en cuenta la dieta promedio occidental debido a que no se consideraron comunidades microbianas representativas de cada dieta. El objetivo del experimento fue probar la capacidad de la herramienta para analizar en detalle la producción de metabolitos particulares e inferir los microorganismos responsables de

ello en diferentes ambientes. Por tanto, la inclusión de una dieta promedio occidental podría conducir erróneamente al lector a comparaciones entre flujos metabólicos de SCFA entre poblaciones no modernizadas y modernizadas.

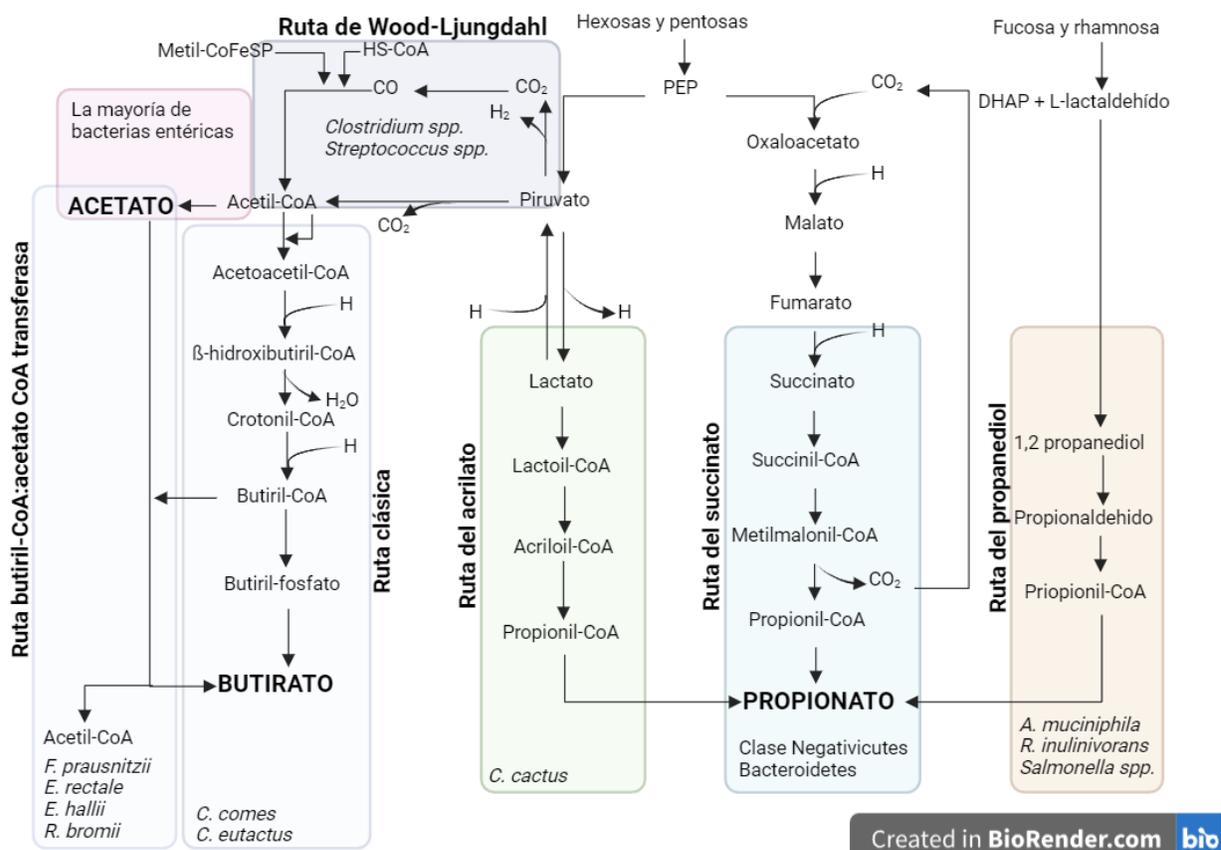


Figura 14. Vías de biosíntesis de SCFA a partir de la fermentación de carbohidratos en la dieta y las principales bacterias productoras de SCFA para cada vía. Adaptada de Nogal et al., 2021 con BioRender.com.

A partir de los flujos metabólicos en cada muestra, se seleccionaron los flujos asociados con la producción de SCFA y se calculó, para cada muestra, los flujos totales de exporte y los flujos de producción por taxón. Los SCFA se escogieron como paradigma por su relevancia en la salud del hospedero (Portincasa et al., 2022). En la figura 14, se muestran las vías de síntesis de acetato, butirato y propionato. Además, se muestran géneros y especies bacterianas responsables de cada una de las vías, así como los sustratos para estas.

#### 4.7. Evaluación del desempeño del modelo

El desempeño del modelo híbrido se validó utilizando la base de datos longitudinal publicada por Bucci et al., 2016 (sección 4.3). Específicamente, se evaluó la capacidad predictiva del modelo a partir de las condiciones iniciales de los microorganismos, comparando las abundancias reales con las generadas por el modelo mediante el error absoluto promedio. La significancia estadística de estas comparaciones se estimó mediante la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon.

Debido a la falta de una descripción detallada de la dieta de los ratones, se supuso un hospedero sometido a una dieta promedio occidental. Además, se tuvieron en cuenta las siguientes consideraciones: (1) dos modelos ecológicos, LRA y gLV, y (2) un tiempo de simulación de 48 horas dividido en tres combinaciones de subintervalos diferentes: uno solo de 48 horas, dos de 24 horas y cuatro de 12 horas.

#### 4.8. Disponibilidad de los datos

##### 4.8.1. Repositorio de DynaMICOM

Los códigos en los que se basa la herramienta computacional desarrollada en este proyecto, denominada DynaMICOM de ahora en adelante, se escribieron en Python (versión 3.7.12) y están disponibles en el repositorio en GitHub [https://github.com/resendislab/MICOM\\_Dynamic](https://github.com/resendislab/MICOM_Dynamic). Los paquetes requeridos y sus respectivas versiones se especifican en la sección “*Environment*” del documento “Readme.md” del repositorio.

El modelo híbrido en forma de función se define como “iterative\_DynaMICOM” en el código “DynaMICOM.py”. Las bases de datos sintéticos se generaron a partir de “synthetic\_communities.py” con ayuda de la clase “sample” en “cross\_sectional\_data\_pretreatment.py”. La base de datos longitudinales se generó a partir de

“bucci\_cdifff\_communities.py” con ayuda de las clases “sample” y “set” en “cross\_sectional\_data\_pretreatment.py” y “longitudinal\_data\_pretreatment.py”, respectivamente.

Los experimentos de estimación de parámetros se pueden reproducir si se implementan los códigos “growth\_rates\_vs\_tradeoff.py” y “knockouts.py” en un ambiente como el descrito en el *readme*. Así mismo, los experimentos de estimación de flujos metabólicos se pueden reproducir con “scfa\_fluxes.py”. Finalmente, las figuras de los experimentos para todas las muestras de las tres bases de datos evaluadas se encuentran en la carpeta “plots”.

#### **4.8.2. Dietas para ctFBA**

Los marcos de datos de Pandas con los flujos metabólicos asociados a cada dieta (sección 4.4) se encuentran en la carpeta “downloads/growth\_media” del repositorio de DynaMICOM. Además, se pueden consultar estos y más datos para otras dietas en el repositorio asociado al curso en MICOM del Instituto de Biología de Sistemas en Seattle ([https://github.com/gibbons-lab/isb\\_course\\_2022](https://github.com/gibbons-lab/isb_course_2022)) y en la página del proyecto VMH, una iniciativa de la Universidad de Irlanda en Galway (<https://www.vmh.life/#home>).

#### **4.8.3. Reconstrucciones metabólicas de AGORA**

Las reconstrucciones metabólicas utilizadas en este trabajo fueron las desarrolladas en el proyecto AGORA (Magnúsdóttir et al., 2017). Estas han sido curadas manualmente y se encuentran en DynaMICOM en la carpeta downloads/reconstructions. Además, se pueden consultar en [https://github.com/VirtualMetabolicHuman/AGORA/tree/master/CurrentVersion/AGORA\\_1\\_03](https://github.com/VirtualMetabolicHuman/AGORA/tree/master/CurrentVersion/AGORA_1_03).

#### **4.8.4. Repositorios de MICOM y de los modelos ecológicos**

En este estudio se instaló la versión 0.32.3 de MICOM. Su documentación e instrucciones de instalación están disponibles en <https://github.com/micom-dev/micom>. Además,

los modelos ecológicos utilizados provienen del estudio de Joseph et al., 2020 cuyo repositorio asociado es <https://github.com/tyjo/clv>. Este repositorio se incluyó en DynaMICOM como el submódulo “clv”.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. DynaMICOM: desarrollo de la herramienta computacional derivada de la estrategia híbrida entre ctFBA y modelos ecológicos

A partir del modelo híbrido descrito en la metodología (sección 4.1), se desarrolló la herramienta computacional DynaMICOM (figura 15). Para esta herramienta, se creó un repositorio en GitHub, MICOM\_Dynamic, al cual se articularon los modelos ecológicos analizados por Joseph et al., 2020 mediante el submódulo “clv” (sección 4.8.4).

Para utilizar la herramienta, se recomienda clonar de manera local el repositorio y crear un ambiente de Conda con los requisitos descritos en la sección “*Environment*” del archivo “Readme.md” del repositorio. Brevemente, además de los módulos básicos de Python, se requiere un solucionador de programación cuadrática (e.g. CPLEX de IBM), el módulo biopython para obtener los NCBI ID de los taxones analizados y MICOM, una herramienta que permite el análisis de distribuciones de flujos metabólicos en comunidades microbianas basada en FBA.

En la figura 15, se presenta un diagrama UML de DynaMICOM. En este, se muestran las clases “Sample” y “Set”, que permiten el pretratamiento de datos transversales y longitudinales, respectivamente, y su conversión en marcos de datos de Pandas para ser analizados por la herramienta. Además, se presentan las clases “GeneralizedLotkaVolterra” (uno de los modelos que se pueden utilizar desde el submódulo “clv”) y “Community”, que permite generar modelos metabólicos a escala genómica por MICOM. DynaMICOM ensambla estas clases para el análisis dinámico del metabolismo de comunidades microbianas mediante la función “iterative\_DynaMICOM”.

Aparte de las clases ejemplificadas en la figura 15, la herramienta permite llevar a cabo todos los análisis metabólicos disponibles en MICOM (Diener et al., 2020) y usar cualquiera de los cuatro modelos dinámicos disponibles en el repositorio “clv” (Joseph et al., 2020). Aunque DynaMICOM permite incorporar cualquier base de datos con reconstrucciones metabólicas de microorganismos, en este proyecto utilizamos y recomendamos el uso de AGORA por su calidad y especificidad para miembros de la microbiota intestinal humana (Magnúsdóttir et al., 2017).

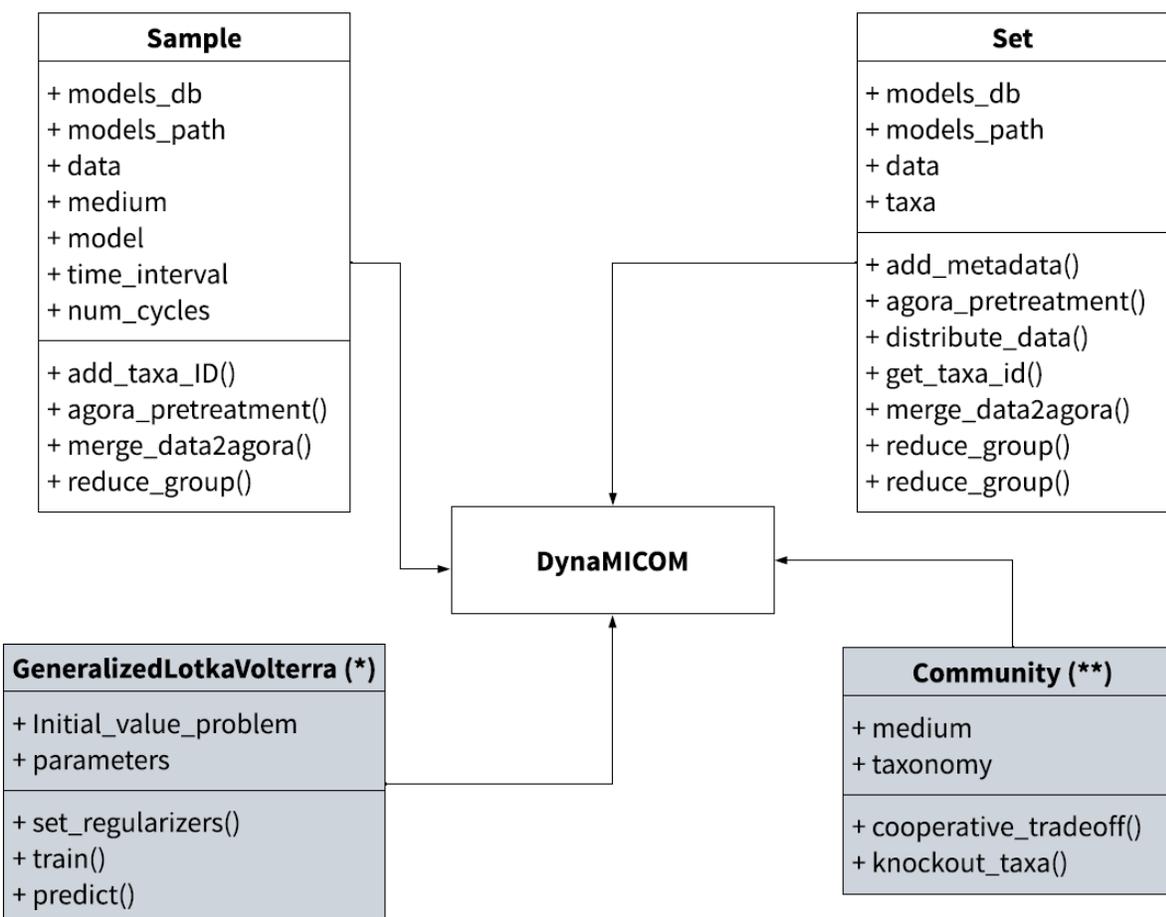


Figura 15. Diagrama de lenguaje unificado de modelado (UML) para DynaMICOM. Las clases “Sample” y “Set” son usadas para pretratar los datos antes de ejecutar la herramienta. Las clases en gris provienen de repositorios públicos: \* de T. A. Joseph et al., 2020 y \*\* de Diener et al., 2020. Para más información, consultar la sección 4.8.1.

## 5.2. FBA e inferencia de tasas de crecimiento por *trade-off* cooperativo

A partir de la base de datos sintética de comunidades de composición aleatoria (sección 4.2), se llevó a cabo la estimación de las tasas de crecimiento de los miembros de las comunidades y las distribuciones de flujos metabólicos asociados a esas tasas por FBA (sección 3.5.2.1). Estas estimaciones se realizaron para dos tipos de dieta (dieta promedio occidental y dieta de la población Me'phaa) en comunidades constituidas por 5 y 10 especies (sección 4.4).

Los FBA se llevaron a cabo bajo el principio de *trade-off* cooperativo, según el cual, la tasa de crecimiento de cada comunidad se estima a partir de una fracción de su respectiva tasa de crecimiento máxima (sección 4.1.1). Estas fracciones son valores entre 0 y 1, donde 0 corresponde a una comunidad en la que ninguno de sus miembros crece y 1 a una comunidad que crece a su tasa máxima. Para esta última, se favorece la proliferación de una pequeña subpoblación de crecimiento rápido, mientras que la mayoría de los miembros no crecen. En este trabajo, con el objetivo de alcanzar un balance entre el crecimiento comunitario y el crecimiento individual, se estableció como criterio para la selección de la fracción el valor más alto que permitiera el crecimiento de la mayor cantidad de miembros.

En la figura 16, se presenta un ejemplo de selección de valor *trade-off* para una comunidad de 10 especies perteneciente a un hospedero bajo una dieta promedio occidental. Todos los taxones con una tasa de crecimiento inferior a la tolerancia del solucionador CPLEX,  $1 \times 10^{-6}$ , fueron considerados como taxones sin crecimiento. En este caso, se seleccionó un valor *trade-off* de 0.9 para el cual todas las especies se encuentran en crecimiento. En el repositorio en GitHub, se pueden consultar las gráficas correspondientes a todas las condiciones evaluadas (sección 4.8.1).

En 2018, Gibson et al. estimaron un tiempo de duplicación promedio de la microbiota intestinal de  $2.5 \text{ h}$  a partir de la comparación de datos de velocidades de duplicación de miembros de la microbiota intestinal obtenidos a partir de secuenciación metagenómica *shotgun* y tasas de crecimiento determinadas experimentalmente. Esto es consistente con las velocidades de duplicación estimadas por Magnúsdóttir et al. 2017, por medio de análisis de tipo FBA. A partir de estos valores, podemos estimar una tasa de crecimiento promedio de la microbiota intestinal humana de  $0.28 \text{ h}^{-1}$  (Doran, 2012). Las tasas de crecimiento estimadas en este estudio se encuentran alrededor de este valor (figura 16), lo cual es un punto de partida importante para el modelo que se construirá basado en estas.

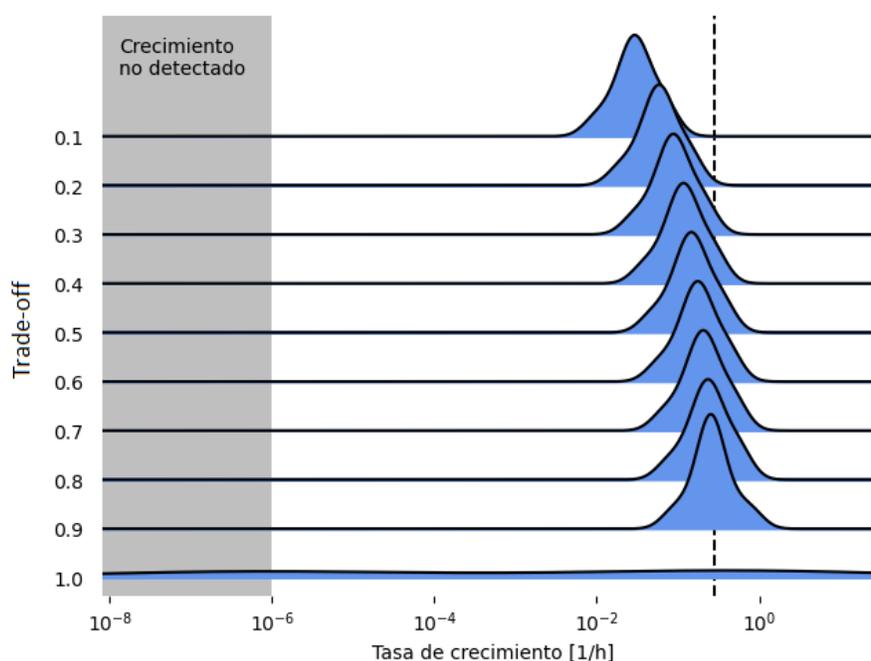


Figura 16. Selección de una fracción de la tasa de crecimiento máxima comunitaria (*trade-off*) para una comunidad constituida por 10 especies bacterianas que habitan un hospedero bajo una dieta promedio occidental. Para cada valor *trade-off* se presenta la distribución de probabilidad de las tasas de crecimiento de las especies bacterianas. La región en gris corresponde a tasas de crecimiento inferiores a la tolerancia del solucionador utilizado (CPLEX). La línea punteada corresponde a una tasa de crecimiento promedio de la microbiota intestinal humana estimada a partir de datos obtenidos de Gibson et al. 2018.

### 5.3. Inferencia de interacciones a partir de *knockouts in silico*

A partir de la base de datos sintética de comunidades de composición aleatoria (sección 4.2), se llevó a cabo la estimación de los coeficientes de interacción entre los miembros de las comunidades por *knockouts in silico*. Para ello, se analizaron los cambios relativos en las tasas de crecimiento de las especies en la comunidad cada vez que se removía una de estas (sección 4.1.1). Además, los cambios relativos se escalaron para procurar mantenerlos en un rango de valores similar al de las tasas de crecimiento. Estas estimaciones se realizaron para dos tipos de dieta (dieta promedio occidental y dieta de la población Me'phaa) en comunidades constituidas por 5 y 10 especies (sección 4.4).

Las interacciones pueden ser directas o indirectas. Por la naturaleza del modelo, las interacciones directas positivas representan mecanismos de alimentación cruzada, mientras que las interacciones directas negativas corresponden a la competencia por nutrientes. Los mecanismos asociados con interacciones indirectas son complejos y requieren de un trabajo de investigación más profundo. Esto y la clasificación de las interacciones entre directas e indirectas, aunque representan información valiosa para el estudio del metabolismo en la microbiota intestinal, están más allá del alcance de este proyecto de tesis.

En la figura 17, se presenta un ejemplo de la estimación de los coeficientes de interacción para tres comunidades constituidas cada una por 5 especies bacterianas. Las estimaciones se realizaron suponiendo que las tres comunidades habitan hospederos sometidos a una dieta promedio occidental y hospederos sometidos a una dieta característica de la población Me'phaa. En estas comunidades existen más interacciones negativas que positivas. Esta observación se repitió en comunidades de 10 especies (sección 4.8.1) y es consistente con el metaanálisis de Palmer & Foster, 2022. Estos autores compararon interacciones ecológicas determinadas *in vitro*

e *in vivo* en comunidades microbianas de diferentes ambientes, incluyendo microbiotas intestinales de humano y de ratón. Entre sus principales hallazgos, encontraron que, salvo algunas excepciones, las interacciones negativas predominaron en los estudios ecológicos de comunidades microbianas. Las excepciones corresponden a interacciones de tipo cooperativo entre parejas de microorganismos que habitan en ambientes de difícil crecimiento (Piccardi et al., 2019); sin embargo, estas interacciones positivas desaparecen cuando se incrementa el número de especies en la comunidad. Palmer & Foster, 2022 sugieren que la aparición de interacciones negativas es una consecuencia de la competencia por recursos limitantes, lo cual estimula el comportamiento competidor y/o explotador (depredador o parásito) de algunos de los miembros de estas comunidades.

En esa dirección, en 2015, Coyte et al., a partir de análisis de estabilidad no lineal de modelos ecológicos, demostraron que, si bien el incremento de la cooperación dentro de las comunidades promueve la eficiencia metabólica, esto se hace a expensas de la estabilidad ecológica. En otras palabras, las interacciones positivas promueven la inestabilidad del sistema. Estos autores hipotetizan que la cooperación exagera las retroalimentaciones positivas entre las especies, creando dependencias, lo que implica que, si una especie decrece en abundancia, potencia la disminución de muchas más especies, desestabilizando el sistema. Además, argumentaron que, si bien la cooperación puede facilitar la colonización, esto no es lo mismo que promover la estabilidad. Este razonamiento es respaldado por Palmer & Foster, 2022 quienes sostienen que las interacciones negativas explican parte de la estabilidad característica de la microbiota intestinal humana. Además, resaltan el hecho de que esa estabilidad es parcialmente responsable de la dificultad para formular probióticos que puedan colonizar este sistema y a su vez actúa como un mecanismo de protección ante posibles infecciones. Palmer & Foster, 2022

concluyeron que las interacciones ecológicas en la microbiota intestinal humana podrían ser utilizadas para el desarrollo de terapias contra patógenos independientes de antibióticos.

Teniendo en cuenta lo anterior, podría pensarse en la dieta promedio occidental como un ambiente de crecimiento más inestable para la microbiota intestinal humana que la dieta de la población Me'phaa y existen estudios que exploran la relación entre la dieta y la estabilidad de la microbiota (Moya & Ferrer, 2016; Tap et al., 2015). Sin embargo, en este ensayo en particular no se están considerando comunidades microbianas representativas de estas dos poblaciones. Por tanto, el experimento no brinda información concluyente respecto a la relación entre la dieta del hospedero y la estabilidad de la microbiota.

La recapitulación de propiedades ecológicas observadas en la literatura por medio de los coeficientes de interacción calculados en este apartado, sumada a la consistencia encontrada en las tasas de crecimiento mostradas en la sección anterior son un buen indicador del desempeño de DynaMICOM debido a que constituyen la base del modelo propuesto en la metodología (sección 4.1). Además, partiendo del silogismo de Palmer & Foster, 2022, DynaMICOM podría constituir una herramienta fundamental para estudiar holísticamente los blancos potenciales de terapias contra patógenos.

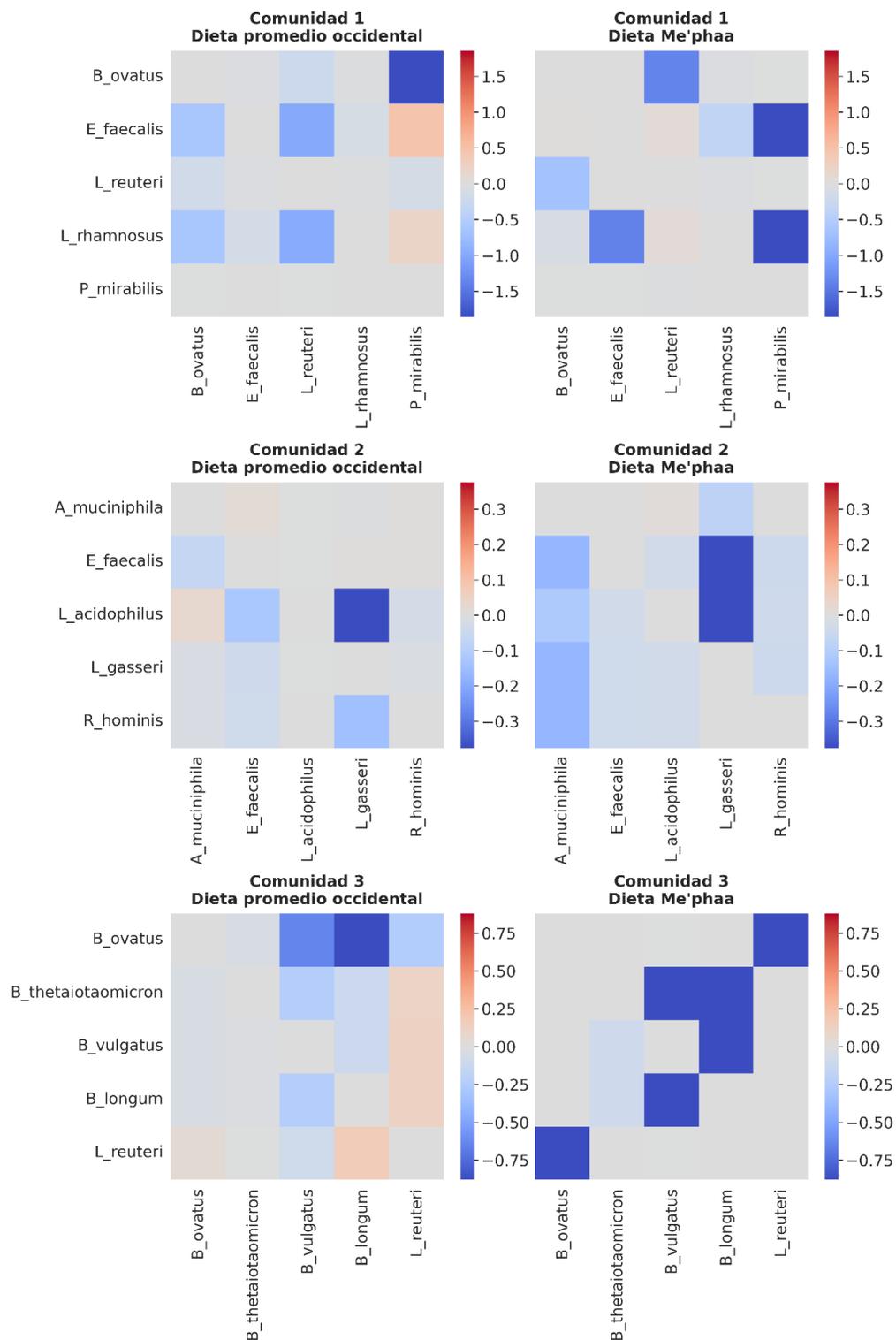


Figura 17. Coeficientes de interacción a partir de *knockouts in silico*. Las estimaciones se realizaron para tres comunidades constituidas cada una por 5 especies bacterianas que habitan hospederos bajo una dieta promedio occidental (izquierda) y bajo una dieta característica de comunidades Me'phaa (derecha).

#### 5.4. Estimación de flujos metabólicos por FBA

Todos los análisis llevados a cabo en DynaMICOM están acompañados de un FBA. Es decir, la herramienta permite estudiar los flujos metabólicos asociados a cada taxón en cada muestra analizada. En esta sección, se presenta la capacidad de DynaMICOM para la estimación de estos flujos por medio del ejemplo de los SCFA. Los SCFA son los principales productos de fermentación de fibra y almidón resistente de miembros específicos de la microbiota intestinal, con un papel destacado en la regulación de la función de estos microorganismos en la salud del hospedero mediante la modulación de la homeostasis de la glucosa, la inflamación, la función inmune, el metabolismo, entre otros mecanismos (Portincasa et al., 2022; Tan et al., 2014; Yao et al., 2022).

Los principales SCFA son los ácidos acético, propiónico, butírico, valérico y caproico. Acetato, propionato y butirato son los SCFA más abundantes en el cuerpo humano y los aniones más abundantes en el colon (Portincasa et al., 2022); por tanto, este estudio se concentra en el análisis de estos tres.

A partir de la base de datos sintética de comunidades de composición definida (sección 4.2), se llevó a cabo la inferencia de la distribución de flujos metabólicos de las comunidades. Estas comunidades están constituidas por 5 especies bacterianas en tres condiciones diferentes. Cada condición corresponde a una dieta hipotética del hospedero (dieta promedio de las poblaciones Me'phaa, Hadza y Chepang). Posteriormente, se seleccionaron los flujos asociados con la producción de SCFA a partir de los flujos totales.

En la figura 18, se presenta la producción de SCFA por tipo de dieta del hospedero. Allí, se puede observar que el ambiente en el que crece la microbiota intestinal afecta significativamente la producción de SCFA. Bajo las tres condiciones, el flujo metabólico de

acetato fue varios órdenes de magnitud superior a los de propionato y butirato. En el colon, acetato, propionato y butirato existen en una proporción molar aproximada de 60:20:20, respectivamente; sin embargo, la proporción real depende de la dieta del hospedero, de la composición de la microbiota y del tiempo de tránsito intestinal (J. Joseph et al., 2017; Macfarlane & Macfarlane, 2003).

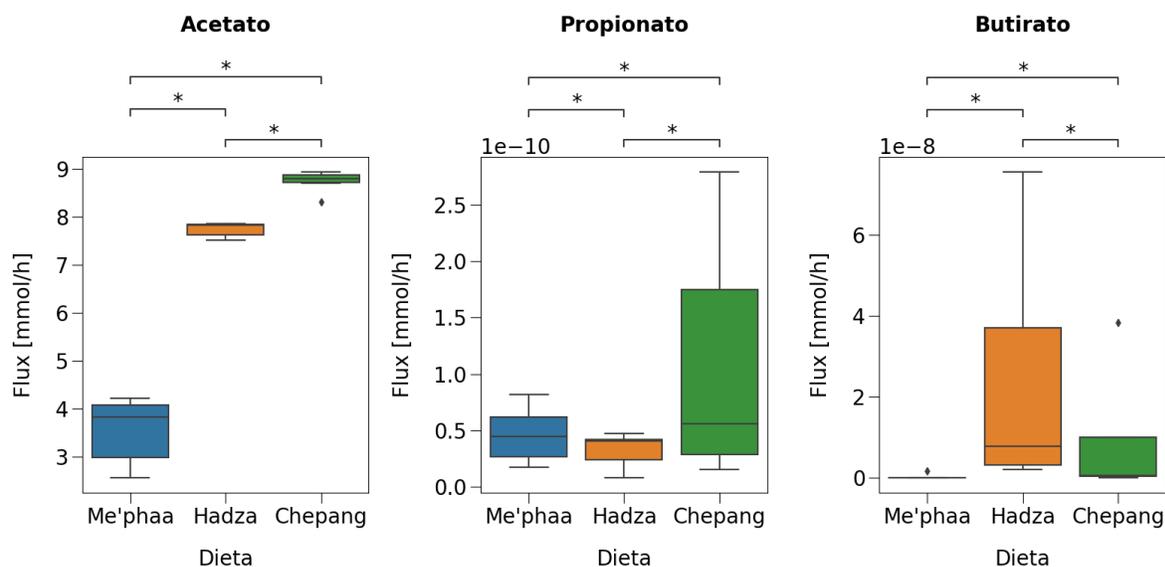


Figura 18. Flujos metabólicos de producción de SCFA estratificados por dieta del hospedero. Los flujos metabólicos fueron estimados para comunidades sintéticas de composición definida por medio de FBA en MICOM. Los flujos denotan la cantidad total de SCFA producida por 1g de biomasa bacteriana en el intestino. Los valores significativamente diferentes ( $P < 0.05$ ), de acuerdo con el test de Wilcoxon, se indican con un asterisco.

Las tres poblaciones evaluadas en esta sección se dedican a la caza-recolección complementada con una actividad agrícola en crecimiento; sin embargo, los componentes específicos de sus dietas son diferentes (Jha et al., 2018; Sánchez-Quinto et al., 2020; Smits et al., 2017). La dieta de la población Me'phaa se diferencia de las otras por su alto consumo de legumbres, la dieta de los Hadza por su consumo de miel y fruto de Baobab, mientras que la dieta de los Chepang se caracteriza por el consumo de *sisnu*. Estas diferencias podrían ser las responsables de la disimilitud en la producción de SCFA entre estas poblaciones.

Además de las distribuciones de flujo por muestra, MICOM permite analizar los flujos metabólicos por taxón. En la figura 19, se presenta la producción de SCFA por taxón para la comunidad Chepang. De acuerdo con Baotherman et al., 2016, acetato y propionato son producidos principalmente por el filo Bacteroidetes, mientras que el butirato es producido por el filo Firmicutes. Esto es consistente con este proyecto. El propionato fue producido por 8 de las 12 especies evaluadas en la base de datos, 6 de las cuales son Bacteroidetes. A pesar de que el acetato fue producido por las 12 especies, los principales productores con diferencia fueron dos Bacteroidetes, *Bacteroides thetaiotaomicron* y *Prevotella melaninogenica*.

Entre los miembros de la microbiota intestinal, *Bacteroides thetaiotaomicron* es considerado el mejor degradador de polisacáridos (Ye et al., 2021), esto podría explicar su capacidad de producción de acetato debido a que este metabolito es un producto de la degradación de carbohidratos accesibles a la microbiota (MAC). El género *Prevotella* se ha asociado con poblaciones bajo dietas basadas en vegetales (David et al., 2014; De Filippo et al., 2010). En particular, Jha et al., 2018 observaron que *Prevotella* se encontraba diferencialmente abundante en un grupo de personas Chepang en comparación con individuos estadounidenses. Por tanto, la alta productividad metabólica de *Prevotella melaninogenica* en ambientes caracterizados por la disponibilidad de fibra y almidón resistente, como lo son las dietas de las tres comunidades evaluadas, es un resultado esperado.

Finalmente, con respecto al butirato, se identificaron dos especies del filo Firmicutes con flujos metabólicos asociados a este SCFA, *Faecalibacterium prausnitzii* y *Roseburia hominis*. En estudios observacionales en los que se han evaluado individuos sanos y pacientes con prediabetes y diabetes tipo 2, se ha encontrado reiteradamente que *F. prausnitzii* y *Roseburia* spp. junto con otras productoras de butirato, como *Akkermansia muciniphila*, se encuentran

disminuidas específicamente en los grupos de prediabéticos y diabéticos (Karlsson et al., 2013; Qin et al., 2012; Zhang et al., 2013). Además, en un estudio de intervención en el cual se comparó el efecto del cambio de una dieta promedio occidental a una basada en vegetales con alto contenido de fibra se observó un incremento en la abundancia de *Roseburia* y en el butirato fecal (David et al., 2014).

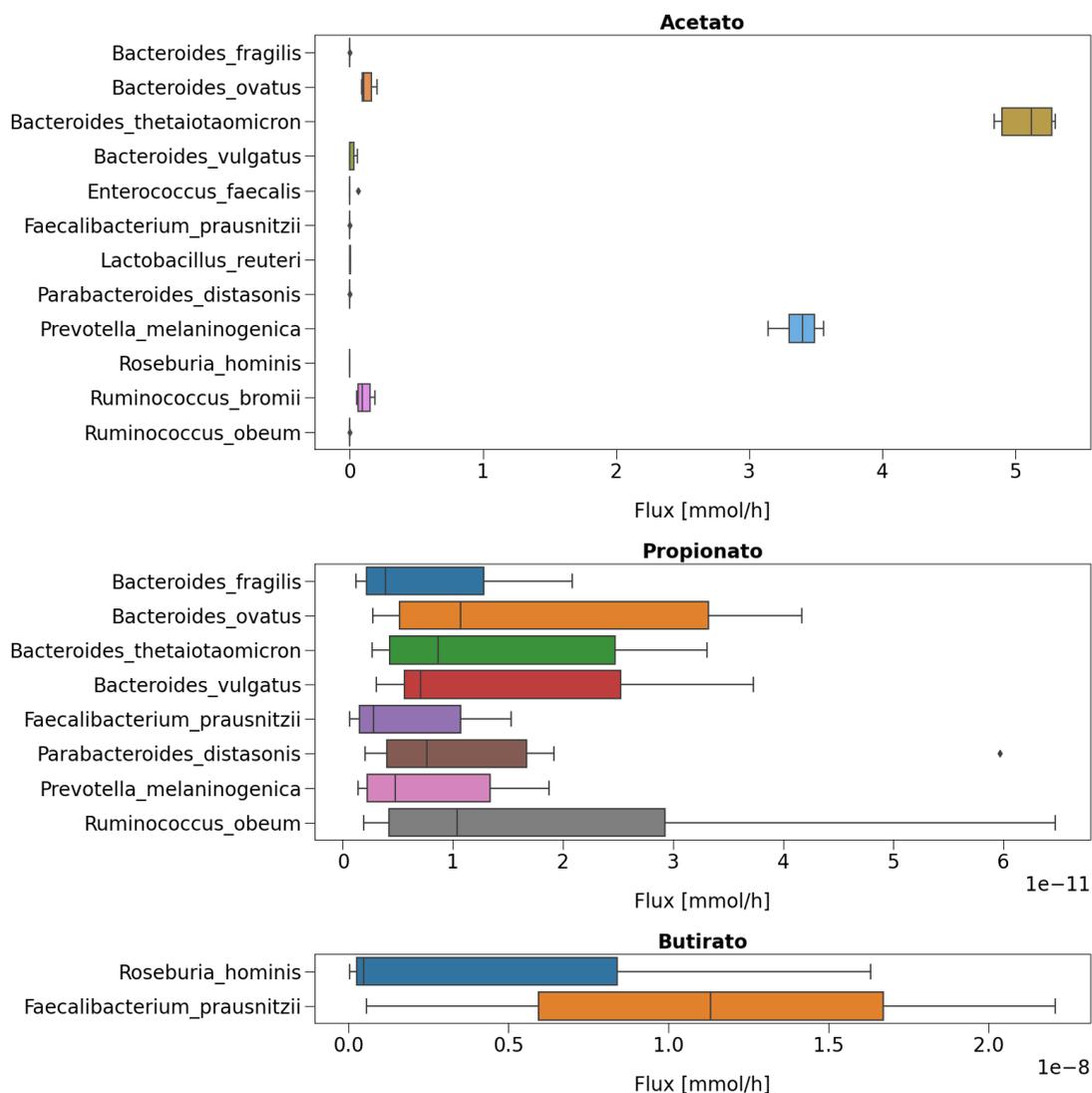


Figura 19. Flujos metabólicos de producción de SCFA estratificados por especie bacteriana. Los flujos metabólicos fueron estimados para comunidades sintéticas de composición definida habitando un hospedero hipotético de la comunidad Chepang, por medio de FBA en MICOM. Los flujos denotan la cantidad total de SCFA producido por 1g de biomasa bacteriana en el intestino.

A pesar de que se encontraron diferencias significativas en los flujos metabólicos de SCFA producidos por comunidades microbianas habitando hospederos hipotéticos de tres poblaciones no modernizadas, no se puede afirmar que una dieta sea más saludable que otra a partir de estos resultados preliminares debido a que estos análisis se basan en comunidades sintéticas, en otras palabras, no estamos considerando la composición real de la microbiota intestinal de estas comunidades. Sin embargo, en esta sección se hace énfasis en la capacidad de MICOM para analizar en detalle la producción de metabolitos particulares e inferir los microorganismos responsables de ello. Con esto, se podrían sugerir blancos de intervenciones evaluables en DynaMICOM.

### **5.5. Simulación del crecimiento microbiano con DynaMICOM**

Las tasas de crecimiento y los coeficientes de interacción estimados para las comunidades sintéticas de composición aleatoria (secciones 5.2 y 5.3) fueron utilizados para analizar la dinámica de las abundancias de los microorganismos con DynaMICOM. Las simulaciones se realizaron en comunidades constituidas por 5 y 10 especies bacterianas, que habitan hospederos hipotéticos bajo dos tipos de dieta diferentes (dieta promedio occidental y dieta de comunidades Me'phaa), utilizando dos modelos ecológicos (LRA y gLV) y dos intervalos, cada uno de 5 horas para un total de 10 horas de simulación.

Tanto en las simulaciones de 5 especies como en las de 10 especies se observa que los perfiles microbianos fueron similares para comunidades que habitan hospederos bajo la misma dieta (figuras 20 y 21). Esto se observa con mayor claridad en la figura 20 y es un resultado esperado debido a la fuerte dependencia metabólica que tienen las comunidades microbianas con respecto al ambiente que habitan (sección 5.4). Este resultado se observó en todas las comunidades evaluadas (sección 4.8.1).

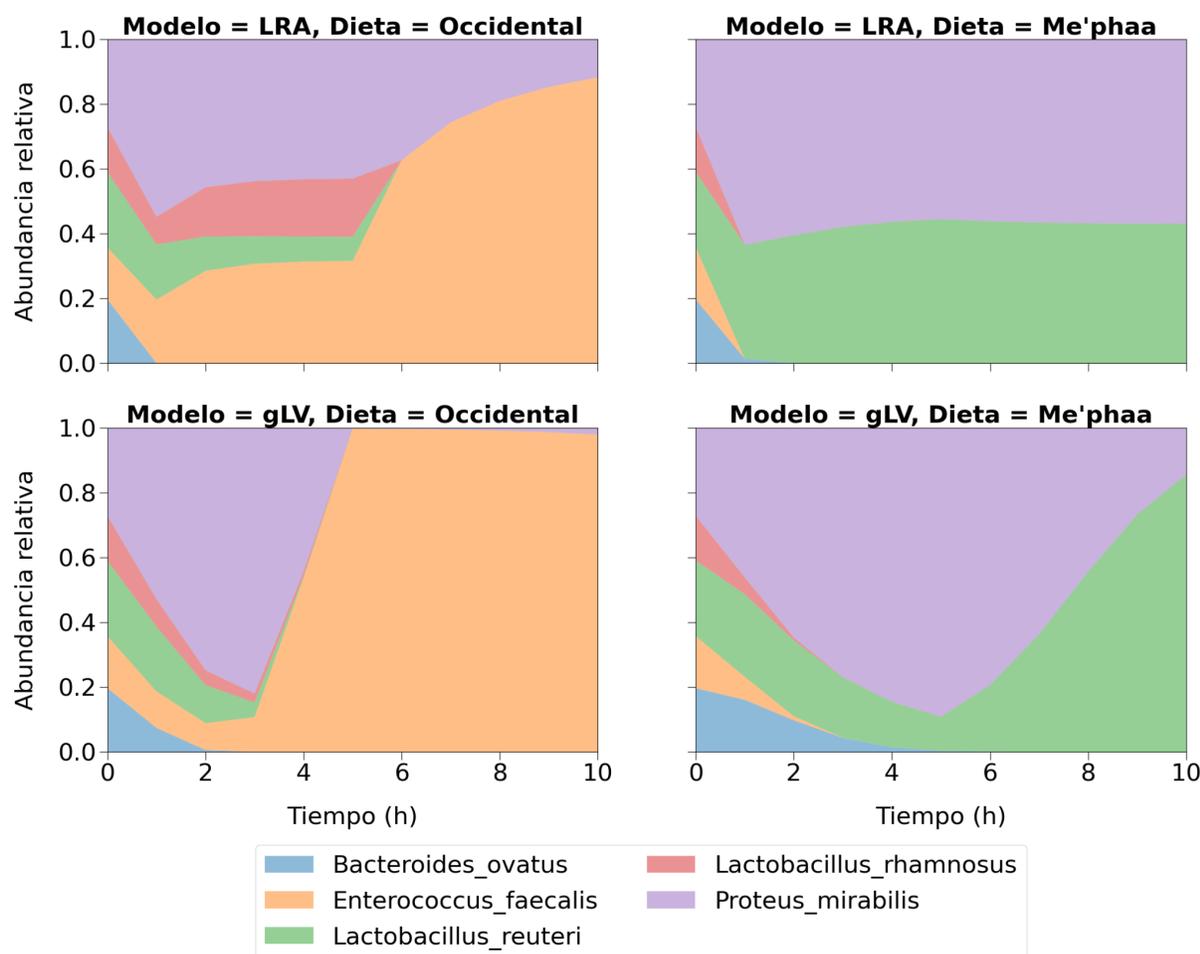


Figura 20. Dinámica de las abundancias de comunidades microbianas sintéticas de composición aleatoria constituidas por 5 especies bacterianas. Cada cuadrante corresponde a trayectorias predichas en DynaMICOM, utilizando una iteración con intervalos de 5 horas, de acuerdo con el modelo híbrido (sección 4.1). El modelo ecológico utilizado y la dieta del hospedero hipotético se enuncian en el título de cada cuadrante.

Por otro lado, se observa que las simulaciones realizadas por gLV presentaron algunos cambios abruptos en la dinámica de los microorganismos (figura 20, panel inferior izquierdo y figura 21 panel inferior derecho). De acuerdo con estas dinámicas, algunas especies de baja abundancia aceleran su crecimiento por encima del crecimiento de los demás miembros de la comunidad hasta ocupar todos los recursos disponibles en el ecosistema, mientras que otras especies de alta abundancia dejan de crecer. Esto se observó en un gran número de las comunidades sintéticas evaluadas (sección 4.8.1). Sin embargo, no es un comportamiento típico

de la dinámica de la microbiota intestinal, en donde los cambios abruptos en las abundancias debidos a terapias con antibióticos, cambios en la dieta del hospedero o infecciones se dan en escalas de tiempo superiores (figura C-1, Bucci et al., 2016; Stein et al., 2013).

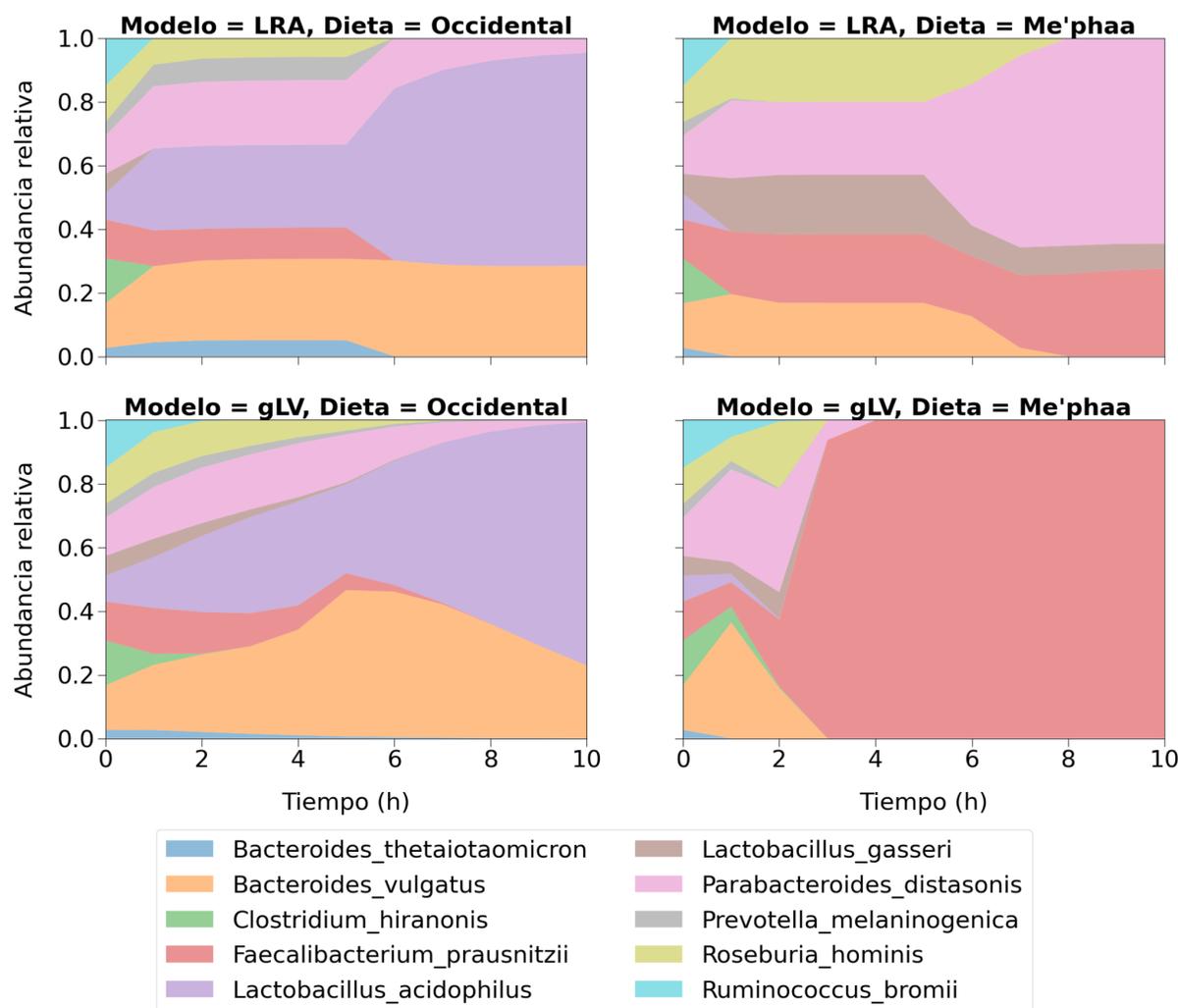


Figura 21. Dinámica de las abundancias de comunidades microbianas sintéticas de composición aleatoria constituidas por 10 especies bacterianas. Cada cuadrante corresponde a trayectorias predichas en DynaMICOM, utilizando una iteración con intervalos de 5 horas, de acuerdo con el modelo híbrido (sección 4.1). El modelo ecológico utilizado y la dieta del hospedero hipotético se enuncian en el título de cada cuadrante.

Sumado a lo anterior, la implementación de DynaMICOM, utilizando gLV dio lugar en algunas ocasiones a divergencia en la búsqueda de solución para el problema numérico, por lo que se hipotetiza que estos cambios abruptos en la dinámica de las comunidades evaluadas

pueden deberse exclusivamente al modelo. Estos resultados y los obtenidos en la sección a continuación sugieren utilizar LRA en lugar de gLV como modelo ecológico.

Finalmente, es importante mencionar que las divergencias en DynaMICOM fueron reducidas significativamente cuando se reemplazó el solucionador OSQP (utilizado inicialmente en este proyecto) por CPLEX, por lo cual la versión más reciente de la herramienta incorpora este programa para los FBA. Esto incluye todos los análisis presentados en este escrito.

#### **5.6. Validación de DynaMICOM con los ratones gnotobióticos de la base de datos de Bucci et al., 2016**

Para evaluar el desempeño de DynaMICOM, se implementó la herramienta en la base de datos longitudinal de microbiota intestinal (Bucci et al., 2016). Esta base de datos está constituida por cinco ratones libres de gérmenes de entre 8 y 10 semanas de edad que fueron inoculados por sonda oral con 22 especies bacterianas comensales del intestino humano y que al cabo de 28 días fueron infectados con esporas de *C. difficile* (sección 4.3).

Para predecir las trayectorias microbianas a partir de las abundancias iniciales en cada ratón, se simuló un hospedero sometido a una dieta promedio occidental y se llevó a cabo el análisis con dos modelos ecológicos (LRA y gLV) durante un tiempo de 48 horas. Además, el tiempo de simulación fue dividido en intervalos asociados con iteraciones de acuerdo con el modelo híbrido (sección 4.1). Es importante resaltar que, se simularon las primeras 48 horas desde la inoculación con la comunidad microbiana; es decir, *C. difficile* no hace parte de este experimento.

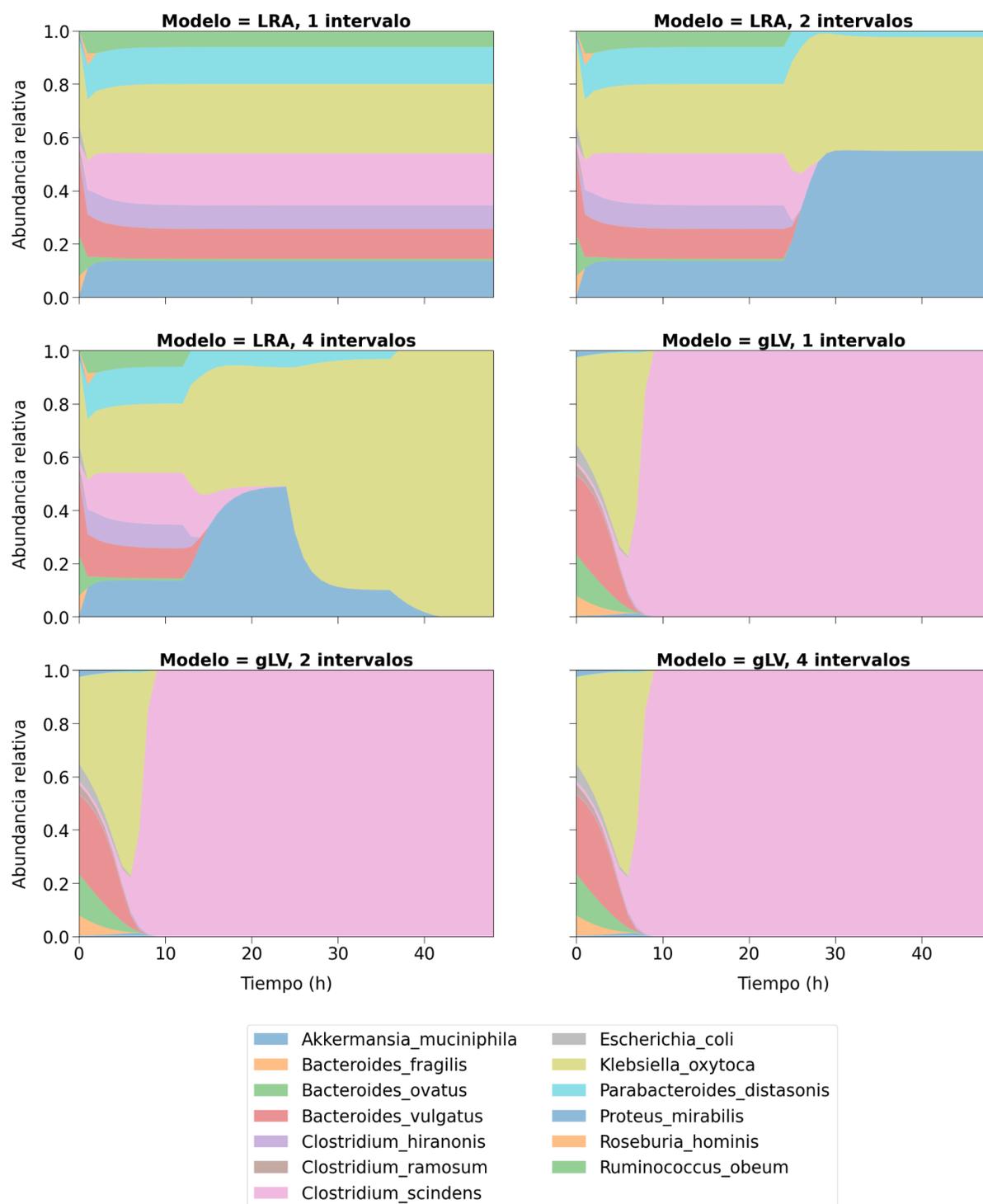


Figura 22. Dinámica de las abundancias del ratón 2 de la base de datos de Bucci et al., 2016 (sección 4.3). Cada gráfica corresponde a trayectorias bacterianas predichas en DynaMICOM bajo una selección de número de iteraciones y modelo ecológico. Se utilizó como dieta del hospedero la dieta promedio occidental.

En la figura 22, se representa la dinámica de las abundancias microbianas en el ratón 2 de la base de datos. Se puede observar que, al igual que con la base de datos sintética, el modelo gLV dio lugar a cambios abruptos en las abundancias de algunos taxones (sección 5.5). Esta característica se presentó en las predicciones de los cinco ratones y no fue observada en las trayectorias reales (figura C-1).

Por otro lado, en las trayectorias generadas por medio del modelo LRA, se observa que para un único intervalo de análisis (sin iteraciones), las especies alcanzaron el estado estacionario en cuestión de horas. Esto parece reproducir lo que ocurre en la base de datos, aunque en una escala de tiempo ligeramente menor (figuras 22 y C-1). Cuando se incrementa el número de intervalos, se observan alteraciones en las abundancias que dan lugar a nuevos estados estacionarios con una menor cantidad de especies coexistiendo.

En la figura 23, se presentan los errores absolutos promedio que se obtuvieron al comparar las concentraciones microbianas entre los datos reales y las predicciones en cada condición al cabo de 48 horas desde la inoculación con las 22 especies comensales. Estos resultados confirmaron que los mejores parámetros de DynaMICOM para la predicción de las trayectorias microbianas en la base de datos de Bucci et al., 2016, cuando la comunidad microbiana habita un hospedero hipotético bajo una dieta promedio occidental, corresponden a un modelo LRA y un número de intervalos pequeño (de uno solo o dos). Un gran número de intervalos implica parámetros dinámicos, en particular, tasas de crecimiento variables. Esto no es característico de microorganismos creciendo en fase exponencial, que puede ser el caso de la inoculación de los ratones en esta base de datos (Lim et al., 2023). Sin embargo, la ausencia de información sobre la dieta de los ratones impide una selección más adecuada de parámetros. Además, para el estudio de perturbaciones, es posible que se requiera de parámetros dinámicos y;

por tanto, de un mayor número de iteraciones. En este trabajo, se incentiva el uso de DynaMICOM para ese tipo de estudios, lo cual es relevante para la mejora de esta herramienta.

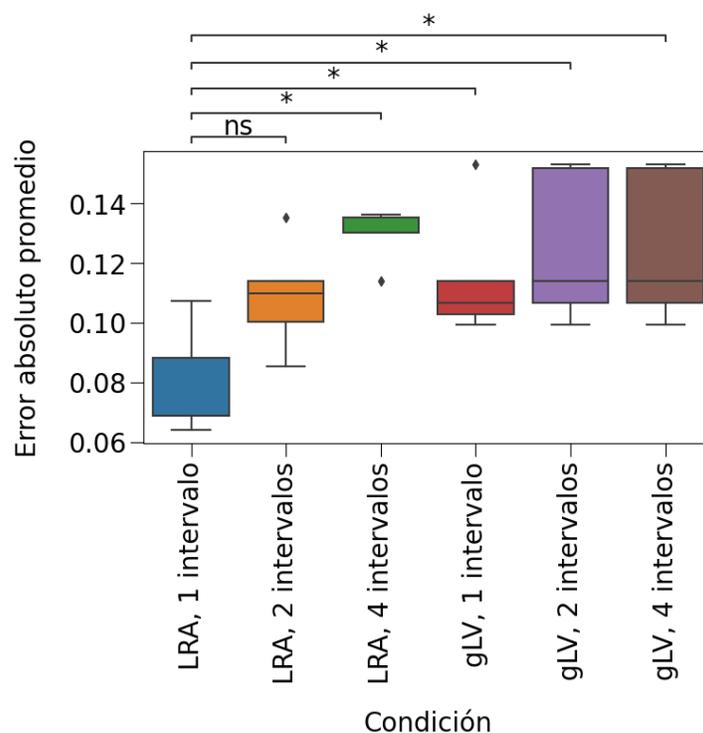


Figura 23. Evaluación del desempeño de DynaMICOM con la base de datos de Bucci et al., 2016. Se presentan las diferencias absolutas promedio entre las concentraciones reales de los microorganismos y las trayectorias predichas al cabo de 48 horas de inoculación para cada condición evaluada. Cada caja resume la centralidad y dispersión en los cinco ratones de la base de datos. Los valores significativamente diferentes ( $P < 0.05$ ), de acuerdo con el test de Wilcoxon, se indican con un asterisco.

## 6. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

En este trabajo, se desarrolló DynaMICOM, una herramienta computacional que permite estudiar la dinámica del metabolismo en comunidades microbianas, como la microbiota intestinal humana, a partir de datos de secuenciación y reconstrucciones metabólicas, lo cual constituía el objetivo general del proyecto de esta tesis. DynaMICOM es una herramienta versátil que se puede acoplar a cualquier base de datos con reconstrucciones metabólicas a escala genómica y que permite establecer ambientes específicos para el crecimiento de los microorganismos (e.g. la dieta del hospedero en el caso de la microbiota intestinal). Además, la herramienta puede ser alimentada con datos de taxonomía y abundancia bacterianas, independientemente del método por medio del cual se obtengan. Como ilustración de lo anterior, en este proyecto, se analizó una base de datos con información generada por secuenciación del gen 16S rRNA en un estudio longitudinal, utilizando ratones gnotobióticos (Bucci et al., 2016) (sección 4.3). Sin embargo, la estructura de DynaMICOM permitiría llevar a cabo este mismo análisis, con resultados similares, utilizando datos provenientes de secuenciación metagenómica *shotgun*. Se hace énfasis en la palabra “similares” en lugar de “iguales”, debido a las diferencias en resolución entre estas técnicas y sus consecuencias en la exactitud de los GEM utilizados.

La implementación de DynaMICOM se basa en un modelo híbrido iterativo entre FBA y modelos ecológicos. Es importante mencionar que, a pesar de las diferencias entre la naturaleza dinámica de los modelos ecológicos y la suposición de estado estacionario en FBA, la herramienta exhibió un buen desempeño para la predicción de trayectorias microbianas en la base de datos evaluada, como se detalla en el párrafo siguiente. Esto se puede explicar por la diferencia en las escalas de tiempo del crecimiento bacteriano (en el orden de horas) y de las

reacciones bioquímicas (en el orden de segundos), que nos permitiría suponer estado estacionario a nivel metabólico en diferentes instantes durante la ventana de análisis (Alon, 2006).

El desempeño de esta herramienta para la predicción de la dinámica de la microbiota intestinal se evaluó mediante una base de datos constituida por ratones gnotobióticos (sección 4.3). Por medio de estos experimentos, se encontró que la mejor configuración de DynaMICOM, para las condiciones evaluadas, corresponde a un modelo ecológico lineal (LRA) sin iteraciones. Con respecto a las iteraciones, se debe tener en cuenta que estas implican parámetros dinámicos, en particular, tasas de crecimiento variables. Esto no es característico de microorganismos creciendo en fase exponencial, que puede ser el caso de la inoculación de los ratones en esta base de datos (Lim et al., 2023). Sin embargo, debido a la ausencia de una dieta bien descrita para los ratones, no se puede garantizar que la selección de un único intervalo sea la mejor configuración para la herramienta. Además, para el estudio de situaciones como perturbaciones ocasionadas por cambios en la dieta o por la adición de microorganismos a la comunidad, es posible que se requiera de parámetros dinámicos y; por tanto, de iteraciones. En este proyecto, se promueve el uso de DynaMICOM para ese tipo de estudios, lo cual es relevante para la validación y mejora de esta herramienta. En el repositorio asociado, se detallan las instrucciones para su implementación (sección 4.8.1).

En la hipótesis de este proyecto, se sugirió que un modelo híbrido permitiría identificar especies bacterianas y rutas metabólicas relevantes en la microbiota intestinal bajo condiciones fisiológicas específicas del hospedero. Esto se consiguió por medio del análisis de los SCFA producidos por comunidades sintéticas en las que se determinaron microorganismos específicos y su flujo metabólico de producción asociado (e.g. *Faecalibacterium prausnitzii* y *Roseburia*

*hominis* en el caso del butirato). En estos experimentos las condiciones fisiológicas estuvieron definidas por la dieta de los hospederos hipotéticos de esos consorcios.

Sumado a lo anterior, las estimaciones de flujos metabólicos por FBA (sección 5.4) dejan ver el potencial de DynaMICOM para la exploración de la redundancia funcional del microbioma intestinal. Específicamente, con la herramienta se encontró que para todos los SCFA evaluados, existe más de una especie bacteriana responsable de su producción. En el pasado, ya se ha explorado la redundancia funcional de este sistema a nivel de metagenoma (L. Tian et al., 2020) y de metaproteoma (Li et al., 2023). Desde este estudio, se incentiva la investigación en redundancia funcional del microbioma a nivel de distribución de flujos metabólicos y su relación con la estabilidad de la microbiota intestinal humana.

A pesar de los resultados obtenidos con DynaMICOM, se debe reconocer su limitación más importante: ni AGORA, la base de datos con reconstrucciones metabólicas utilizada en este estudio (Magnúsdóttir et al., 2017); ni otras bases de datos (Machado et al., 2018) contienen microbiota no bacteriana. Pese a la relevancia de esa fracción de la microbiota (Burgess et al., 2017; Ianiro et al., 2022; Weiner et al., 2023), aún no se cuenta con reconstrucciones bien caracterizadas de esta. No obstante, la estructura de DynaMICOM permite el acople de esas reconstrucciones metabólicas una vez que se tengan. Adicionalmente, en DynaMICOM, como en otras herramientas basadas en FBA, no se consideran interacciones de naturaleza no metabólica, como las mediadas por toxinas y otros antimicrobianos (Coyte et al., 2015; Foster & Bell, 2012; Machado et al., 2021).

Dicho lo anterior, DynaMICOM contribuye a resolver dos problemas: (1) el planteado por Suzuki et al., 2022 sobre la necesidad de tener en cuenta interacciones metabólicas en los modelos dinámicos y (2) las preocupaciones de Diener & Gibbons, 2023 sobre la exigencia

computacional que normalmente requieren los FBA dinámicos. Esto es fundamental para llevar a cabo predicciones sobre la dinámica de la microbiota intestinal humana cuando es sometida a distintos tipos de perturbaciones, lo cual es esencial para la medicina de precisión y la nutrición personalizada.

Adicionalmente, la herramienta se puede fortalecer, por ejemplo, mediante la incorporación de más modelos ecológicos, como los descritos por T. A. Joseph et al., 2020 que tienen en cuenta la naturaleza composicional de los estudios de metagenoma y secuenciación de amplicones. Más aún, se podría adicionar un parámetro de dilución en los modelos ecológicos, que represente la velocidad de tránsito intestinal. Además, se podrían incluir bases de datos con reconstrucciones metabólicas más abundantes y depuradas, como la descrita por Heinken et al., 2023., que contiene más de 7000 reconstrucciones metabólicas específicas de microbiota intestinal, incluye microorganismos presentes en la microbiota de poblaciones no modernizadas y que pronto tendrá una versión disponible. También, se podría considerar la adición de clases y funciones que permitan llevar a cabo un análisis de estabilidad no lineal de los modelos ecológicos y así explorar propiedades emergentes del sistema como la resiliencia y la persistencia y su asociación con estados de salud o enfermedad en seres humanos. Desde este trabajo, se alientan todas las investigaciones que contribuyan a llevar a cabo una evaluación rigurosa de DynaMICOM y a ampliar la funcionalidad de esta herramienta.

## 7. REFERENCIAS

- Alavi, S., Mitchell, J. D., Cho, J. Y., Liu, R., Macbeth, J. C., & Hsiao, A. (2020). Interpersonal Gut Microbiome Variation Drives Susceptibility and Resistance to Cholera Infection. *Cell*, 181(7), 1533-1546.e13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.05.036>
- Alon, U. (2006). An Introduction to Systems Biology. In *An Introduction to Systems Biology*. <https://doi.org/10.1201/9781420011432>
- Banerjee, S., Schlaeppli, K., & van der Heijden, M. G. A. (2018). Keystone taxa as drivers of microbiome structure and functioning. *Nature Reviews Microbiology*, 16(9), 567–576. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0024-1>
- Baothman, O. A., Zamzami, M. A., Taher, I., Abubaker, J., & Abu-Farha, M. (2016). The role of Gut Microbiota in the development of obesity and Diabetes. *Lipids in Health and Disease*, 15(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s12944-016-0278-4>
- Barker, M., Chue Hong, N. P., Katz, D. S., Lamprecht, A. L., Martinez-Ortiz, C., Psomopoulos, F., Harrow, J., Castro, L. J., Gruenpeter, M., Martinez, P. A., & Honeyman, T. (2022). Introducing the FAIR Principles for research software. *Scientific Data*, 9(1), 1–6. <https://doi.org/10.1038/s41597-022-01710-x>
- Bauer, E., Zimmermann, J., Baldini, F., Thiele, I., & Kaleta, C. (2017). BacArena: Individual-based metabolic modeling of heterogeneous microbes in complex communities. *PLoS Computational Biology*, 13(5), 1–22. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005544>
- Blanton, L. V., Charbonneau, M. R., Salih, T., Barratt, M. J., Venkatesh, S., Ilkaveya, O., Subramanian, S., Manary, M. J., Trehan, I., Jorgensen, J. M., Fan, Y., Henrissat, B., Leyn, S. A., Rodionov, D. A., Osterman, A. L., Maleta, K. M., Newgard, C. B., Ashorn, P., Dewey, K. G., & Gordon, J. I. (2016). Gut bacteria that prevent growth impairments transmitted by microbiota from malnourished children. *Science*, 351(6275). <https://doi.org/10.1126/science.aad3311>
- Bucci, V., Tzen, B., Li, N., Simmons, M., Tanoue, T., Bogart, E., Deng, L., Yeliseyev, V., Delaney, M. L., Liu, Q., Olle, B., Stein, R. R., Honda, K., Bry, L., & Gerber, G. K. (2016). MDSINE: Microbial Dynamical Systems INference Engine for microbiome time-series analyses. *Genome Biology*, 17(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/s13059-016-0980-6>
- Bucci, V., & Xavier, J. B. (2014). Towards predictive models of the human gut microbiome. *Journal of Molecular Biology*, 426(23), 3907–3916. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2014.03.017>
- Burgess, S. L., Gilchrist, C. A., Lynn, T. C., & Petri, W. A. (2017). Parasitic Protozoa and Interactions with the Host Intestinal Microbiota. *Infection and Immunity*, 85(8). <https://doi.org/10.1128/IAI.00101-17>

- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., & Holmes, S. P. (2017). Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis. *ISME Journal*, 11(12), 2639–2643. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.119>
- Chan, S. H. J., Simons, M. N., & Maranas, C. D. (2017). SteadyCom: Predicting microbial abundances while ensuring community stability. *PLoS Computational Biology*, 13(5), 1–25. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005539>
- Charbonneau, M. R., O'Donnell, D., Blanton, L. V., Totten, S. M., Davis, J. C. C., Barratt, M. J., Cheng, J., Guruge, J., Talcott, M., Bain, J. R., Muehlbauer, M. J., Ilkayeva, O., Wu, C., Struckmeyer, T., Barile, D., Mangani, C., Jorgensen, J., Fan, Y., Maleta, K., ... Gordon, J. I. (2016). Sialylated Milk Oligosaccharides Promote Microbiota-Dependent Growth in Models of Infant Undernutrition. *Cell*, 164(5), 859–871. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.01.024>
- Cheng, A. G., Ho, P.-Y., Aranda-Díaz, A., Jain, S., Yu, F. B., Meng, X., Wang, M., Iakiviak, M., Nagashima, K., Zhao, A., Murugkar, P., Patil, A., Atabakhsh, K., Weakley, A., Yan, J., Brumbaugh, A. R., Higginbottom, S., Dimas, A., Shiver, A. L., ... Fischbach, M. A. (2022). Design, construction, and in vivo augmentation of a complex gut microbiome. *Cell*, 185(19), 3617–3636.e19. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.08.003>
- Contreras, A. V., Cocom-Chan, B., Hernandez-Montes, G., Portillo-Bobadilla, T., & Resendis-Antonio, O. (2016). Host-Microbiome Interaction and Cancer: Potential Application in Precision Medicine. *Frontiers in Physiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00606>
- Coyte, K. Z., Schluter, J., & Foster, K. R. (2015). The ecology of the microbiome: Networks, competition, and stability. *Science*, 350(6261), 663–666. <https://doi.org/10.1126/science.aad2602>
- David, L. A., Maurice, C. F., Carmody, R. N., Gootenberg, D. B., Button, J. E., Wolfe, B. E., Ling, A. V., Devlin, A. S., Varma, Y., Fischbach, M. A., Biddinger, S. B., Dutton, R. J., & Turnbaugh, P. J. (2014). Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature*, 505(7484), 559–563. <https://doi.org/10.1038/nature12820>
- De Filippo, C., Cavalieri, D., Di Paola, M., Ramazzotti, M., Poullet, J. B., Massart, S., Collini, S., Pieraccini, G., & Lionetti, P. (2010). Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(33), 14691–14696. <https://doi.org/10.1073/pnas.1005963107>
- De Vos, W. M., Tilg, H., Van Hul, M., & Cani, P. D. (2022). Gut microbiome and health: Mechanistic insights. *Gut*, 1020–1032. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2021-326789>
- Dethlefsen, L., & Relman, D. A. (2011). Incomplete recovery and individualized responses of the human distal gut microbiota to repeated antibiotic perturbation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(SUPPL. 1), 4554–4561. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000087107>

- Diender, M., Parera Olm, I., Gelderloos, M., Koehorst, J. J., Schaap, P. J., Stams, A. J. M., & Sousa, D. Z. (2019). Metabolic shift induced by synthetic co-cultivation promotes high yield of chain elongated acids from syngas. *Scientific Reports*, 9(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54445-y>
- Diener, C., & Gibbons, S. M. (2023). More is Different: Metabolic Modeling of Diverse Microbial Communities. *MSystems*, 8(2). <https://doi.org/10.1128/msystems.01270-22>
- Diener, C., Gibbons, S. M., & Resendis-Antonio, O. (2020). MICOM: Metagenome-Scale Modeling To Infer Metabolic Interactions in the Gut Microbiota. *MSystems*, 5(1), 1–17. <https://doi.org/10.1128/msystems.00606-19>
- Dillard, L. R., Payne, D. D., & Papin, J. A. (2021). Mechanistic models of microbial community metabolism. *Molecular Omics*. <https://doi.org/10.1039/D0MO00154F>
- Doran, P. M. (2012). *Bioprocess Engineering Principles*. In *Technology* (Vol. 9, Issue May). [https://doi.org/10.1016/S0892-6875\(96\)90075-8](https://doi.org/10.1016/S0892-6875(96)90075-8)
- Ericsson, A. C. (2019). The use of non-rodent model species in microbiota studies. *Laboratory Animals*, 53(3), 259–270. <https://doi.org/10.1177/0023677219834593>
- Fei, N., & Zhao, L. (2013). An opportunistic pathogen isolated from the gut of an obese human causes obesity in germfree mice. *The ISME Journal*, 7(4), 880–884. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.153>
- Fisher, C. K., & Mehta, P. (2014). Identifying keystone species in the human gut microbiome from metagenomic timeseries using sparse linear regression. *PLoS ONE*, 9(7), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102451>
- Foster, K. R., & Bell, T. (2012). Competition, Not Cooperation, Dominates Interactions among Culturable Microbial Species. *Current Biology*, 22(19), 1845–1850. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.08.005>
- Fukuda, S., Toh, H., Hase, K., Oshima, K., Nakanishi, Y., Yoshimura, K., Tobe, T., Clarke, J. M., Topping, D. L., Suzuki, T., Taylor, T. D., Itoh, K., Kikuchi, J., Morita, H., Hattori, M., & Ohno, H. (2011). Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. *Nature*, 469(7331), 543–547. <https://doi.org/10.1038/nature09646>
- Gao, B., Chi, L., Zhu, Y., Shi, X., Tu, P., Li, B., Yin, J., Gao, N., Shen, W., & Schnabl, B. (2021). An introduction to next generation sequencing bioinformatic analysis in gut microbiome studies. *Biomolecules*, 11(4), 1–22. <https://doi.org/10.3390/biom11040530>
- Gehrig, J. L., Venkatesh, S., Chang, H. W., Hibberd, M. C., Kung, V. L., Cheng, J., Chen, R. Y., Subramanian, S., Cowardin, C. A., Meier, M. F., O'Donnell, D., Talcott, M., Spears, L. D., Semenkovich, C. F., Henrissat, B., Giannone, R. J., Hettich, R. L., Ilkayeva, O., Muehlbauer,

- M., ... Gordon, J. I. (2019). Effects of microbiota-directed foods in gnotobiotic animals and undernourished children. *Science*, 365(6449). <https://doi.org/10.1126/science.aau4732>
- Gibson, B., Wilson, D. J., Feil, E., & Eyre-Walker, A. (2018). The distribution of bacterial doubling times in the wild. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 285(1880). <https://doi.org/10.1098/rspb.2018.0789>
- Glowacki, R. W. P., Engelhart, M. J., & Ahern, P. P. (2021). Controlled Complexity: Optimized Systems to Study the Role of the Gut Microbiome in Host Physiology. *Frontiers in Microbiology*, 12(September). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.735562>
- Gould, A. L., Zhang, V., Lamberti, L., Jones, E. W., Obadia, B., Korasidis, N., Gavryushkin, A., Carlson, J. M., Beerenwinkel, N., & Ludington, W. B. (2018). Microbiome interactions shape host fitness. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(51), E11951–E11960. <https://doi.org/10.1073/pnas.1809349115>
- Halfvarson, J., Brislawn, C. J., Lamendella, R., Vázquez-Baeza, Y., Walters, W. A., Bramer, L. M., D'Amato, M., Bonfiglio, F., McDonald, D., Gonzalez, A., McClure, E. E., Dunkleberger, M. F., Knight, R., & Jansson, J. K. (2017). Dynamics of the human gut microbiome in inflammatory bowel disease. *Nature Microbiology*, 2(5), 17004. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2017.4>
- Heinken, A., Hertel, J., Acharya, G., Ravcheev, D. A., Nyga, M., Okpala, O. E., Hogan, M., Magnúsdóttir, S., Martinelli, F., Nap, B., Preciat, G., Edirisinghe, J. N., Henry, C. S., Fleming, R. M. T., & Thiele, I. (2023). Genome-scale metabolic reconstruction of 7,302 human microorganisms for personalized medicine. *Nature Biotechnology*. <https://doi.org/10.1038/s41587-022-01628-0>
- Heinken, A., & Thiele, I. (2022). Microbiome Modelling Toolbox 2.0: efficient, tractable modelling of microbiome communities. *Bioinformatics*, 38(8), 2367–2368. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btac082>
- Hsiao, A., Ahmed, A. M. S., Subramanian, S., Griffin, N. W., Drewry, L. L., Petri, W. A., Haque, R., Ahmed, T., & Gordon, J. I. (2014). Members of the human gut microbiota involved in recovery from *Vibrio cholerae* infection. *Nature*, 515(7527), 423–426. <https://doi.org/10.1038/nature13738>
- Ianiro, G., Iorio, A., Porcari, S., Masucci, L., Sanguinetti, M., Perno, C. F., Gasbarrini, A., Putignani, L., & Cammarota, G. (2022). How the gut parasitome affects human health. *Therapeutic Advances in Gastroenterology*, 15, 17562848221091524. <https://doi.org/10.1177/17562848221091524>
- Jansma, J., & Aidy, S. El. (2020). Understanding the host-microbe interactions using metabolic modeling. *BioRxiv*, 1–14. <https://doi.org/10.1101/2020.06.12.147918>

- Jha, A. R., Davenport, E. R., Gautam, Y., Bhandari, D., Tandukar, S., Ng, K. M., Fragiadakis, G. K., Holmes, S., Gautam, G. P., Leach, J., Sherchand, J. B., Bustamante, C. D., & Sonnenburg, J. L. (2018). Gut microbiome transition across a lifestyle gradient in Himalaya. *PLoS Biology*, 16(11), 1–30. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2005396>
- Joseph, J., Depp, C., Shih, P. A. B., Cadenhead, K. S., & Schmid-Schönbein, G. (2017). Modified mediterranean diet for enrichment of short chain fatty acids: Potential adjunctive therapeutic to target immune and metabolic dysfunction in schizophrenia? *Frontiers in Neuroscience*, 11(MAR), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fnins.2017.00155>
- Joseph, T. A., Shenhav, L., Xavier, J. B., Halperin, E., & Pe'er, I. (2020). Compositional Lotka-Volterra describes microbial dynamics in the simplex. *PLoS Computational Biology*, 16(5), 1–22. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1007917>
- Karlsson, F. H., Tremaroli, V., Nookaew, I., Bergström, G., Behre, C. J., Fagerberg, B., Nielsen, J., & Bäckhed, F. (2013). Gut metagenome in European women with normal, impaired and diabetic glucose control. *Nature*, 498(7452), 99–103. <https://doi.org/10.1038/nature12198>
- Katz, D. S., Gruenpeter, M., & Honeyman, T. (2021). Erratum: Taking a fresh look at FAIR for research software (*Patterns* (2021) 2(3), (S2666389921000362), (10.1016/j.patter.2021.100222)). *Patterns*, 2(5). <https://doi.org/10.1016/j.patter.2021.100267>
- Knight, R., Vrbanac, A., Taylor, B. C., Aksenov, A., Callewaert, C., Debelius, J., Gonzalez, A., Kosciolek, T., McCall, L. I., McDonald, D., Melnik, A. V., Morton, J. T., Navas, J., Quinn, R. A., Sanders, J. G., Swafford, A. D., Thompson, L. R., Tripathi, A., Xu, Z. Z., ... Dorrestein, P. C. (2018). Best practices for analysing microbiomes. *Nature Reviews Microbiology*, 16(7), 410–422. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0029-9>
- Kuntal, B. K., Gadgil, C., & Mande, S. S. (2019). Web-gLV: A Web based platform for Lotka-Volterra based modeling and simulation of microbial populations. *Frontiers in Microbiology*, 10(FEB), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00288>
- Layeghifard, M., Hwang, D. M., & Guttman, D. S. (2017). Disentangling Interactions in the Microbiome: A Network Perspective. *Trends in Microbiology*, 25(3), 217–228. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.11.008>
- Li, L., Wang, T., Ning, Z., Zhang, X., Butcher, J., Serrana, J. M., Simopoulos, C. M. A., Mayne, J., Stintzi, A., Mack, D. R., Liu, Y.-Y., & Figeys, D. (2023). Revealing proteome-level functional redundancy in the human gut microbiome using ultra-deep metaproteomics. *Nature Communications*, 14(1), 3428. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-39149-2>
- Lim, J. J., Diener, C., Wilson, J., Valenzuela, J. J., Baliga, N. S., & Gibbons, S. M. (2023). Growth phase estimation for abundant bacterial populations sampled longitudinally from human stool metagenomes. *Nature Communications*, 14(1), 5682. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-41424-1>

- Liu, Y. X., Qin, Y., Chen, T., Lu, M., Qian, X., Guo, X., & Bai, Y. (2021). A practical guide to amplicon and metagenomic analysis of microbiome data. *Protein and Cell*, 12(5), 315–330. <https://doi.org/10.1007/s13238-020-00724-8>
- Macfarlane, S., & Macfarlane, G. T. (2003). Regulation of short-chain fatty acid production. *Proceedings of the Nutrition Society*, 62(1), 67–72. <https://doi.org/10.1079/pns2002207>
- Machado, D., Andrejev, S., Tramontano, M., & Patil, K. R. (2018). Fast automated reconstruction of genome-scale metabolic models for microbial species and communities. *Nucleic Acids Research*, 46(15), 7542–7553. <https://doi.org/10.1093/nar/gky537>
- Machado, D., Maistrenko, O. M., Andrejev, S., Kim, Y., Bork, P., Patil, K. R., & Patil, K. R. (2021). Polarization of microbial communities between competitive and cooperative metabolism. *Nature Ecology & Evolution*, 5(2), 195–203. <https://doi.org/10.1038/s41559-020-01353-4>
- Magnúsdóttir, S., Heinken, A., Kutt, L., Ravcheev, D. A., Bauer, E., Noronha, A., Greenhalgh, K., Jäger, C., Baginska, J., Wilmes, P., Fleming, R. M. T., & Thiele, I. (2017). Generation of genome-scale metabolic reconstructions for 773 members of the human gut microbiota. *Nature Biotechnology*, 35(1), 81–89. <https://doi.org/10.1038/nbt.3703>
- Mahadevan, R., Edwards, J. S., & Doyle, F. J. (2002). Dynamic flux balance analysis of diauxic growth. *Biophysical Journal*, 83(3), 1331–1340. <https://pdfs.semanticscholar.org/8d56/a26c56704266b5d7c426ecdfc286962f9112.pdf>
- Momeni, B., Xie, L., & Shou, W. (2017). Lotka-Volterra pairwise modeling fails to capture diverse pairwise microbial interactions. *ELife*, 6, 1–34. <https://doi.org/10.7554/elife.25051>
- Moya, A., & Ferrer, M. (2016). Functional Redundancy-Induced Stability of Gut Microbiota Subjected to Disturbance. *Trends in Microbiology*, 24(5), 402–413. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.02.002>
- Nogal, A., Valdes, A. M., & Menni, C. (2021). The role of short-chain fatty acids in the interplay between gut microbiota and diet in cardio-metabolic health. *Gut Microbes*, 13(1). <https://doi.org/10.1080/19490976.2021.1897212>
- Orth, J. D., Thiele, I., & Palsson, B. O. (2010). What is flux balance analysis? *Nature Biotechnology*, 28(3), 245–248. <https://doi.org/10.1038/nbt.1614>
- Ortiz, A., Vega, N. M., Ratzke, C., & Gore, J. (2021). Interspecies bacterial competition regulates community assembly in the *C. elegans* intestine. *ISME Journal*, 15(7), 2131–2145. <https://doi.org/10.1038/s41396-021-00910-4>
- Palmer, J. D., & Foster, K. R. (2022). Bacterial species rarely work together. *Science*, 376(6593), 581–582. <https://doi.org/10.1126/science.abn5093>

- Piccardi, P., Vessman, B., & Mitri, S. (2019). Toxicity drives facilitation between 4 bacterial species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(32), 15979–15984. <https://doi.org/10.1073/pnas.1906172116>
- Portincasa, P., Bonfrate, L., Vacca, M., De Angelis, M., Farella, I., Lanza, E., Khalil, M., Wang, D. Q. H., Sperandio, M., & Di Ciaula, A. (2022). Gut Microbiota and Short Chain Fatty Acids: Implications in Glucose Homeostasis. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(3). <https://doi.org/10.3390/ijms23031105>
- Qin, J., Li, Y., Cai, Z., Li, S., Zhu, J., Zhang, F., Liang, S., Zhang, W., Guan, Y., Shen, D., Peng, Y., Zhang, D., Jie, Z., Wu, W., Qin, Y., Xue, W., Li, J., Han, L., Lu, D., ... Wang, J. (2012). A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature*, 490(7418), 55–60. <https://doi.org/10.1038/nature11450>
- Ridaura, V. K., Faith, J. J., Rey, F. E., Cheng, J., Duncan, A. E., Kau, A. L., Griffin, N. W., Lombard, V., Henrissat, B., Bain, J. R., Muehlbauer, M. J., Ilkayeva, O., Semenkovich, C. F., Funai, K., Hayashi, D. K., Lyle, B. J., Martini, M. C., Ursell, L. K., Clemente, J. C., ... Gordon, J. I. (2013). Gut Microbiota from Twins Discordant for Obesity Modulate Metabolism in Mice. *Science*, 341(6150). <https://doi.org/10.1126/science.1241214>
- Salehi, B., Dimitrijević, M., Aleksić, A., Neffe-Skocińska, K., Zielińska, D., Kołozyn-Krajewska, D., Sharifi-Rad, J., Stojanović-Radić, Z., Prabu, S. M., Rodrigues, C. F., & Martins, N. (2021). Human microbiome and homeostasis: insights into the key role of prebiotics, probiotics, and symbiotics. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 61(9), 1415–1428. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1760202>
- Sánchez-Quinto, A., Cerqueda-García, D., Falcón, L. I., Gaona, O., Martínez-Correa, S., Nieto, J., & González-Santoyo, I. (2020). Gut microbiome in children from indigenous and urban communities in México: Different subsistence models, different microbiomes. *Microorganisms*, 8(10), 1–16. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8101592>
- Schnorr, S. L., Candela, M., Rampelli, S., Centanni, M., Consolandi, C., Basaglia, G., Turrioni, S., Biagi, E., Peano, C., Severgnini, M., Fiori, J., Gotti, R., De Bellis, G., Luiselli, D., Brigidi, P., Mabulla, A., Marlowe, F., Henry, A. G., & Crittenden, A. N. (2014). Gut microbiome of the Hadza hunter-gatherers. *Nature Communications*, 5. <https://doi.org/10.1038/ncomms4654>
- Scholz, M., Ward, D. V., Pasolli, E., Tolio, T., Zolfo, M., Asnicar, F., Truong, D. T., Tett, A., Morrow, A. L., & Segata, N. (2016). Strain-level microbial epidemiology and population genomics from shotgun metagenomics. *Nature Methods*, 13(5), 435–438. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3802>
- Schwarzer, M., Makki, K., Storelli, G., Machuca-Gayet, I., Srutkova, D., Hermanova, P., Martino, M. E., Balmand, S., Hudcovic, T., Heddi, A., Rieusset, J., Kozakova, H., Vidal, H., & Leulier, F. (2016). *Lactobacillus plantarum* strain maintains growth of infant mice during chronic undernutrition. *Science*, 351(6275), 854–857. <https://doi.org/10.1126/science.aad8588>

- Scott, W. T., Benito-Vaquerizo, S., Zimmerman, J., Bajić, D., Heinken, A., Suarez-Diez, M., & Schaap, P. J. (2023). A structured evaluation of genome-scale constraint-based modeling tools for microbial consortia. *BioRxiv*, 2023.02.08.527721. <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2023.02.08.527721v2%0Ahttps://www.biorxiv.org/content/10.1101/2023.02.08.527721v2.abstract>
- Senne de Oliveira Lino, F., Bajic, D., Vila, J. C. C., Sánchez, A., & Sommer, M. O. A. (2021). Complex yeast–bacteria interactions affect the yield of industrial ethanol fermentation. *Nature Communications*, 12(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21844-7>
- Shahi, S. K., Freedman, S. N., & Mangalam, A. K. (2017). Gut microbiome in multiple sclerosis: The players involved and the roles they play. *Gut Microbes*, 8(6), 607–615. <https://doi.org/10.1080/19490976.2017.1349041>
- Smits, S. A., Leach, J., Sonnenburg, E. D., Gonzalez, C. G., Lichtman, J. S., Reid, G., Knight, R., Manjurano, A., Changalucha, J., Elias, J. E., Dominguez-Bello, M. G., & Sonnenburg, J. L. (2017). Seasonal cycling in the gut microbiome of the Hadza hunter-gatherers of Tanzania. *Science*, 357(6353), 802–805. <https://doi.org/10.1126/science.aan4834>
- Sonnenburg, E. D., Smits, S. A., Tikhonov, M., Higginbottom, S. K., Wingreen, N. S., & Sonnenburg, J. L. (2016). Diet-induced extinctions in the gut microbiota compound over generations. *Nature*, 529(7585), 212–215. <https://doi.org/10.1038/nature16504>
- Stein, R. R., Bucci, V., Toussaint, N. C., Buffie, C. G., Rätsch, G., Pamer, E. G., Sander, C., & Xavier, J. B. (2013). Ecological Modeling from Time-Series Inference: Insight into Dynamics and Stability of Intestinal Microbiota. *PLoS Computational Biology*, 9(12), 31–36. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003388>
- Suzuki, K., Abe, M. S., Kumakura, D., Nakaoka, S., Fujiwara, F., Miyamoto, H., Nakaguma, T., Okada, M., Sakurai, K., Shimizu, S., Iwata, H., Masuya, H., Nihei, N., & Ichihashi, Y. (2022). Chemical-Mediated Microbial Interactions Can Reduce the Effectiveness of Time-Series-Based Inference of Ecological Interaction Networks. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(3), 1–14. <https://doi.org/10.3390/ijerph19031228>
- Tan, J., McKenzie, C., Potamitis, M., Thorburn, A. N., Mackay, C. R., & Macia, L. (2014). The Role of Short-Chain Fatty Acids in Health and Disease. In *Advances in Immunology* (1st ed., Vol. 121). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800100-4.00003-9>
- Tap, J., Furet, J., Bensaada, M., Philippe, C., Roth, H., Rabot, S., Lakhdari, O., Lombard, V., Henrissat, B., Corthier, G., Fontaine, E., Doré, J., & Leclerc, M. (2015). Gut microbiota richness promotes its stability upon increased dietary fibre intake in healthy adults. *Environmental Microbiology*, 17(12), 4954–4964. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13006>
- Thiele, I., & Palsson, B. (2010). A protocol for generating a high-quality genome-scale metabolic reconstruction. *Nature Protocols*, 5(1), 93–121. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.203>

- Tian, L., Wang, X.-W., Wu, A.-K., Fan, Y., Friedman, J., Dahlin, A., Waldor, M. K., Weinstock, G. M., Weiss, S. T., & Liu, Y.-Y. (2020). Deciphering functional redundancy in the human microbiome. *Nature Communications*, 11(1), 6217. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19940-1>
- Tian, S., & Bisanz, J. E. (2022). Making gut microbiomes from scratch. *Cell Host and Microbe*, 30(11), 1508–1509. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2022.10.005>
- Turnbaugh, P. J., Bäckhed, F., Fulton, L., & Gordon, J. I. (2008). Diet-Induced Obesity Is Linked to Marked but Reversible Alterations in the Mouse Distal Gut Microbiome. *Cell Host and Microbe*, 3(4), 213–223. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2008.02.015>
- Turnbaugh, P. J., Ley, R. E., Hamady, M., Fraser-Liggett, C. M., Knight, R., & Gordon, J. I. (2007). The Human Microbiome Project. *Nature*, 449(7164), 804–810. <https://doi.org/10.1038/nature06244>
- van den Berg, N. I., Machado, D., Santos, S., Rocha, I., Chacón, J., Harcombe, W., Mitri, S., & Patil, K. R. (2022). Ecological modelling approaches for predicting emergent properties in microbial communities. *Nature Ecology and Evolution*, 6(JulY), 855–865. <https://doi.org/10.1038/s41559-022-01746-7>
- Vlasova, A. N., Rajashekara, G., & Saif, L. J. (2018). Interactions between human microbiome, diet, enteric viruses and immune system: Novel insights from gnotobiotic pig research. *Drug Discovery Today: Disease Models*, 28, 95–103. <https://doi.org/10.1016/j.ddmod.2019.08.006>
- Wang, J., & Jia, H. (2016). Metagenome-wide association studies: Fine-mining the microbiome. *Nature Reviews Microbiology*, 14(8), 508–522. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.83>
- Wang, M., & Donovan, S. M. (2015). Human microbiota-associated swine: Current progress and future opportunities. *ILAR Journal*, 56(1), 63–73. <https://doi.org/10.1093/ilar/ilv006>
- Weiner, A., Turjeman, S., & Koren, O. (2023). Gut microbes and host behavior: The forgotten members of the gut-microbiome. *Neuropharmacology*, 227, 109453. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2023.109453>
- Wilkinson, M. D., Dumontier, M., Aalbersberg, Ij. J., Appleton, G., Axton, M., Baak, A., Blomberg, N., Boiten, J. W., da Silva Santos, L. B., Bourne, P. E., Bouwman, J., Brookes, A. J., Clark, T., Crosas, M., Dillo, I., Dumon, O., Edmunds, S., Evelo, C. T., Finkers, R., ... Mons, B. (2016). Comment: The FAIR Guiding Principles for scientific data management and stewardship. *Scientific Data*, 3, 1–9. <https://doi.org/10.1038/sdata.2016.18>
- Yao, Y., Cai, X., Fei, W., Ye, Y., Zhao, M., & Zheng, C. (2022). The role of short-chain fatty acids in immunity, inflammation and metabolism. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62(1), 1–12. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1854675>

- Ye, M., Yu, J., Shi, X., Zhu, J., Gao, X., & Liu, W. (2021). Polysaccharides catabolism by the human gut bacterium -*Bacteroides thetaiotaomicron*: advances and perspectives. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 61(21), 3569–3588. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1803198>
- Zhang, X., Shen, D., Fang, Z., Jie, Z., Qiu, X., Zhang, C., Chen, Y., & Ji, L. (2013). Human Gut Microbiota Changes Reveal the Progression of Glucose Intolerance. *PLoS ONE*, 8(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071108>
- Zomorodi, A. R., & Maranas, C. D. (2012). OptCom: A multi-level optimization framework for the metabolic modeling and analysis of microbial communities. *PLoS Computational Biology*, 8(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002363>
- Zucoloto, A. Z., Yu, I. L., McCoy, K. D., & McDonald, B. (2021). Generation, maintenance, and monitoring of gnotobiotic mice. *STAR Protocols*, 2(2), 100536. <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2021.100536>

## PERMISOS PARA EL USO DE FIGURAS

- Figura 1 Adaptada de STAR Protocols, 2, 100536, Zucoloto et al., "*Generation, maintenance, and monitoring of gnotobiotic mice*", Copyright 2021, con permiso de Elsevier
- Figura 2 Adaptada de Biomolecules, 11(4), 531, Gao et al., "*An Introduction to Next Generation Sequencing Bioinformatic Analysis in Gut Microbiome Studies*", Copyright 2021, con permiso de los autores bajo los términos y condiciones de la licencia Creative Commons Attribution (CC BY) (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)
- Figura 3 Adaptada de Gut Microbes 8, 6, 609, Shahi et al., "*Gut microbiome in multiple sclerosis: The players involved and the roles they play*", Copyright 2017, con permiso de Informa UK Limited, trading as Taylor & Taylor & Francis Group.
- Figura 4 Adaptada de Biomolecules, 11(4), 532, Gao et al., "*An Introduction to Next Generation Sequencing Bioinformatic Analysis in Gut Microbiome Studies*", Copyright 2021, con permiso de los autores bajo los términos y condiciones de la licencia Creative Commons Attribution (CC BY) (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)
- Figura 5 Adaptada de Biomolecules, 11(4), 536, Gao et al., "*An Introduction to Next Generation Sequencing Bioinformatic Analysis in Gut Microbiome Studies*", Copyright 2021, con permiso de los autores bajo los términos y condiciones de la licencia Creative Commons Attribution (CC BY) (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)
- Figura 6 Adaptada de Journal of Molecular Biology, 426(23), 3908, Bucci & Xavier, "*Towards Predictive Models of the Human Gut Microbiome*", Copyright 2014, con permiso de Elsevier
- Figura 7 Adaptada de Journal of Molecular Biology, 426(23), 3911, Bucci & Xavier, "*Towards Predictive Models of the Human Gut Microbiome*", Copyright 2014, con permiso de Elsevier

- Figura 8 Adaptada de Nature Biotechnology, 28(3), 247, Orth et al., 2010, "*What is flux balance analysis?*", Copyright 2010, con permiso de Springer Nature
- Figura 9 Adaptada de Nature Biotechnology, 28(3), 246, Orth et al., 2010, "*What is flux balance analysis?*", Copyright 2010, con permiso de Springer Nature
- Figura 10 Adaptada de Molecular Omics, Dillard et al., "*Mechanistic models of microbial community metabolism*", Copyright 2021, con permiso de Royal Society of Chemistry bajo los términos y condiciones de la licencia Creative Commons Attribution 3.0 (CC BY 3.0) (<https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>)
- Figura 14 Adaptada de Gut Microbes 13, 1, Nogal et al., "*The role of short-chain fatty acids in the interplay between gut microbiota and diet in cardio-metabolic health*", Copyright 2021, con permiso de los autores bajo los términos y condiciones de la licencia Creative Commons Attribution (CC BY) (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)

## APÉNDICE A

## BASES DE DATOS SINTÉTICAS DE COMPOSICIÓN ALEATORIA

**Tabla A-1.** Comunidades sintéticas de composición aleatoria de 5 especies.

Comunidad	Especie	Reacciones	Metabolitos	NCBI_ID	Abundancia
1	<i>Bacteroides ovatus</i>	2476	1408	28116	0.1965
1	<i>Enterococcus faecalis</i>	1174	868	1351	0.1608
1	<i>Lactobacillus reuteri</i>	1543	1121	1598	0.2333
1	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	1981	1284	47715	0.1381
1	<i>Proteus mirabilis</i>	1566	1109	584	0.2713
2	<i>Akkermansia muciniphila</i>	2274	1275	239935	0.2413
2	<i>Enterococcus faecalis</i>	1174	868	1351	0.1163
2	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	1287	912	1579	0.1001
2	<i>Lactobacillus gasseri</i>	1163	870	1596	0.4150
2	<i>Roseburia hominis</i>	1180	928	301301	0.1272
3	<i>Bacteroides ovatus</i>	2476	1408	28116	0.1885
3	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	2524	1428	818	0.0930
3	<i>Bacteroides vulgatus</i>	2474	1395	821	0.3026
3	<i>Bifidobacterium</i>	2043	1272	216816	0.2834

	<i>longum</i>				
3	<i>Lactobacillus reuteri</i>	1543	1121	1598	0.1325

**Tabla A-2.** Comunidades sintéticas de composición aleatoria de 10 especies.

Comunidad	Especie	Reacciones	Metabolitos	NCBI_ID	Abundancia
1	<i>Bacteroides fragilis</i>	2372	1368	817	0.0902
1	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	2524	1428	818	0.0748
1	<i>Enterococcus faecalis</i>	1174	868	1351	0.0280
1	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	1225	921	853	0.0493
1	<i>Lactobacillus casei</i>	1980	1221	1582	0.0950
1	<i>Lactobacillus reuteri</i>	1543	1121	1598	0.1776
1	<i>Prevotella melaninogenica</i>	1022	834	28132	0.2199
1	<i>Propionibacterium acnes</i>	1323	1003	1747	0.0628
1	<i>Ruminococcus bromii</i>	1078	863	40518	0.1145
1	<i>Streptococcus mitis</i>	1122	836	28037	0.0878
2	<i>Akkermansia muciniphila</i>	2274	1275	239935	0.0546
2	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	1129	872	1680	0.0506
2	<i>Clostridium hiranonis</i>	1258	1011	89152	0.1051
2	<i>Clostridium</i>	2049	1277	29347	0.0475

	<i>scindens</i>				
2	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	1287	912	1579	0.1270
2	<i>Lactobacillus gasseri</i>	1163	870	1596	0.1343
2	<i>Lactobacillus reuteri</i>	1543	1121	1598	0.1896
2	<i>Ruminococcus bromii</i>	1078	863	40518	0.0902
2	<i>Ruminococcus obeum</i>	1635	1177	40520	0.1020
2	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1393	1041	1282	0.0990
3	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	2524	1428	818	0.0263
3	<i>Bacteroides vulgatus</i>	2474	1395	821	0.1404
3	<i>Clostridium hiranonis</i>	1258	1011	89152	0.1412
3	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	1225	921	853	0.1218
3	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	1287	912	1579	0.0816
3	<i>Lactobacillus gasseri</i>	1163	870	1596	0.0619
3	<i>Parabacteroides distasonis</i>	2519	1459	823	0.1206
3	<i>Prevotella melaninogenica</i>	1022	834	28132	0.0427
3	<i>Roseburia hominis</i>	1180	928	301301	0.1139
3	<i>Ruminococcus bromii</i>	1078	863	40518	0.1497

---

## APÉNDICE B

### BASE DE DATOS SINTÉTICA DE COMUNIDAD DEFINIDA

**Tabla B-1.** Comunidades sintéticas de composición definida.

Comunidad	Especie	Reacciones	Metabolitos	NCBI_ID	Abundancia
1	<i>Bacteroides fragilis</i>	2372	1368	817	0.0876
1	<i>Bacteroides ovatus</i>	2476	1408	28116	0.0885
1	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	2524	1428	818	0.0978
1	<i>Bacteroides vulgatus</i>	2474	1395	821	0.0959
1	<i>Enterococcus faecalis</i>	1174	868	1351	0.0963
1	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	1225	921	853	0.0610
1	<i>Lactobacillus reuteri</i>	1543	1121	1598	0.0678
1	<i>Parabacteroides distasonis</i>	2519	1459	823	0.0930
1	<i>Prevotella melaninogenica</i>	1022	834	28132	0.0976
1	<i>Roseburia hominis</i>	1180	928	301301	0.0661
1	<i>Ruminococcus bromii</i>	1078	863	40518	0.0707
1	<i>Ruminococcus obeum</i>	1635	1177	40520	0.0777
2	<i>Bacteroides fragilis</i>	2372	1368	817	0.0793
2	<i>Bacteroides ovatus</i>	2476	1408	28116	0.0848
2	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	2524	1428	818	0.0731
2	<i>Bacteroides vulgatus</i>	2474	1395	821	0.0732
2	<i>Enterococcus faecalis</i>	1174	868	1351	0.1096
2	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	1225	921	853	0.0655
2	<i>Lactobacillus reuteri</i>	1543	1121	1598	0.0815
2	<i>Parabacteroides distasonis</i>	2519	1459	823	0.0812

2	<i>Prevotella melaninogenica</i>	1022	834	28132	0.0753
2	<i>Roseburia hominis</i>	1180	928	301301	0.0860
2	<i>Ruminococcus bromii</i>	1078	863	40518	0.0968
2	<i>Ruminococcus obeum</i>	1635	1177	40520	0.0938
3	<i>Bacteroides fragilis</i>	2372	1368	817	0.0758
3	<i>Bacteroides ovatus</i>	2476	1408	28116	0.0757
3	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	2524	1428	818	0.0655
3	<i>Bacteroides vulgatus</i>	2474	1395	821	0.1179
3	<i>Enterococcus faecalis</i>	1174	868	1351	0.0931
3	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	1225	921	853	0.0859
3	<i>Lactobacillus reuteri</i>	1543	1121	1598	0.0724
3	<i>Parabacteroides distasonis</i>	2519	1459	823	0.0941
3	<i>Prevotella melaninogenica</i>	1022	834	28132	0.1065
3	<i>Roseburia hominis</i>	1180	928	301301	0.0635
3	<i>Ruminococcus bromii</i>	1078	863	40518	0.0629
3	<i>Ruminococcus obeum</i>	1635	1177	40520	0.0868
4	<i>Bacteroides fragilis</i>	2372	1368	817	0.0757
4	<i>Bacteroides ovatus</i>	2476	1408	28116	0.1145
4	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	2524	1428	818	0.0973
4	<i>Bacteroides vulgatus</i>	2474	1395	821	0.0786
4	<i>Enterococcus faecalis</i>	1174	868	1351	0.0892
4	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	1225	921	853	0.0658
4	<i>Lactobacillus reuteri</i>	1543	1121	1598	0.0713
4	<i>Parabacteroides distasonis</i>	2519	1459	823	0.0967

4	<i>Prevotella melaninogenica</i>	1022	834	28132	0.0818
4	<i>Roseburia hominis</i>	1180	928	301301	0.0918
4	<i>Ruminococcus bromii</i>	1078	863	40518	0.0625
4	<i>Ruminococcus obeum</i>	1635	1177	40520	0.0750
5	<i>Bacteroides fragilis</i>	2372	1368	817	0.0894
5	<i>Bacteroides ovatus</i>	2476	1408	28116	0.0823
5	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	2524	1428	818	0.0617
5	<i>Bacteroides vulgatus</i>	2474	1395	821	0.0774
5	<i>Enterococcus faecalis</i>	1174	868	1351	0.0698
5	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	1225	921	853	0.0759
5	<i>Lactobacillus reuteri</i>	1543	1121	1598	0.0717
5	<i>Parabacteroides distasonis</i>	2519	1459	823	0.1161
5	<i>Prevotella melaninogenica</i>	1022	834	28132	0.0591
5	<i>Roseburia hominis</i>	1180	928	301301	0.0787
5	<i>Ruminococcus bromii</i>	1078	863	40518	0.1009
5	<i>Ruminococcus obeum</i>	1635	1177	40520	0.1172
6	<i>Bacteroides fragilis</i>	2372	1368	817	0.0844
6	<i>Bacteroides ovatus</i>	2476	1408	28116	0.1062
6	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	2524	1428	818	0.0955
6	<i>Bacteroides vulgatus</i>	2474	1395	821	0.0902
6	<i>Enterococcus faecalis</i>	1174	868	1351	0.0750
6	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	1225	921	853	0.0842
6	<i>Lactobacillus reuteri</i>	1543	1121	1598	0.0828
6	<i>Parabacteroides distasonis</i>	2519	1459	823	0.0628

6	<i>Prevotella melaninogenica</i>	1022	834	28132	0.0800
6	<i>Roseburia hominis</i>	1180	928	301301	0.0935
6	<i>Ruminococcus bromii</i>	1078	863	40518	0.0588
6	<i>Ruminococcus obeum</i>	1635	1177	40520	0.0865

---

## APÉNDICE C

### BASE DE DATOS LONGITUDINALES DE UN EXPERIMENTO DE INFECCIÓN CON *Clostridium difficile*

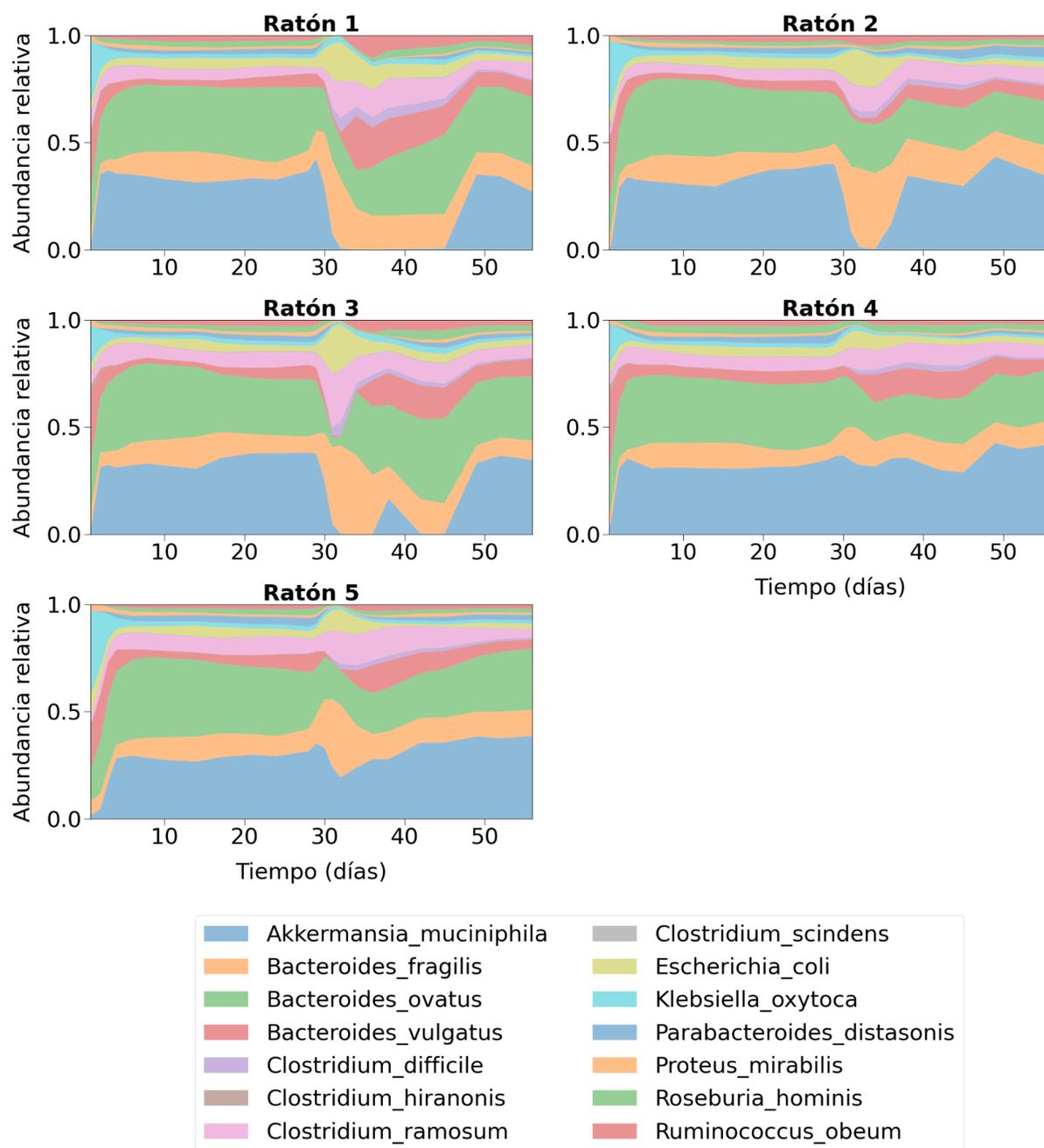
**Tabla C-1.** Composición inicial de la microbiota intestinal de cinco ratones gnotobióticos en un experimento de inoculación con *C. difficile* (Bucci et al. 2016).

Comunidad	Especie	Reacciones	Metabolitos	NCBI_ID	Abundancia
Raton_1	<i>Akkermansia muciniphila</i>	2274	1275	239935	0.0199
Raton_1	<i>Bacteroides fragilis</i>	2372	1368	817	0.0632
Raton_1	<i>Bacteroides ovatus</i>	2476	1408	28116	0.1879
Raton_1	<i>Bacteroides vulgatus</i>	2474	1395	821	0.2772
Raton_1	<i>Clostridium hiranonis</i>	1258	1011	89152	0.0213
Raton_1	<i>Clostridium ramosum</i>	1960	1242	1547	0.0640
Raton_1	<i>Clostridium scindens</i>	2049	1277	29347	0.0100
Raton_1	<i>Escherichia coli</i>	2283	1418	562	0.0438
Raton_1	<i>Klebsiella oxytoca</i>	1885	1284	571	0.2887
Raton_1	<i>Parabacteroides distasonis</i>	2519	1459	823	0.0010
Raton_1	<i>Proteus mirabilis</i>	1566	1109	584	0.0211
Raton_1	<i>Roseburia hominis</i>	1180	928	301301	0.0003
Raton_1	<i>Ruminococcus obeum</i>	1635	1177	40520	0.0016
Raton_2	<i>Akkermansia muciniphila</i>	2274	1275	239935	0.0034
Raton_2	<i>Bacteroides fragilis</i>	2372	1368	817	0.0750
Raton_2	<i>Bacteroides ovatus</i>	2476	1408	28116	0.1565
Raton_2	<i>Bacteroides vulgatus</i>	2474	1395	821	0.2970
Raton_2	<i>Clostridium hiranonis</i>	1258	1011	89152	0.0027
Raton_2	<i>Clostridium ramosum</i>	1960	1242	1547	0.0359
Raton_2	<i>Clostridium scindens</i>	2049	1277	29347	0.0124

Raton_2	<i>Escherichia coli</i>	2283	1418	562	0.0661
Raton_2	<i>Klebsiella oxytoca</i>	1885	1284	571	0.3245
Raton_2	<i>Parabacteroides distasonis</i>	2519	1459	823	0.0009
Raton_2	<i>Proteus mirabilis</i>	1566	1109	584	0.0253
Raton_2	<i>Roseburia hominis</i>	1180	928	301301	0.0001
Raton_2	<i>Ruminococcus obeum</i>	1635	1177	40520	0.0001
Raton_3	<i>Akkermansia muciniphila</i>	2274	1275	239935	0.0253
Raton_3	<i>Bacteroides fragilis</i>	2372	1368	817	0.0860
Raton_3	<i>Bacteroides ovatus</i>	2476	1408	28116	0.2120
Raton_3	<i>Bacteroides vulgatus</i>	2474	1395	821	0.3519
Raton_3	<i>Clostridium hiranonis</i>	1258	1011	89152	0.0312
Raton_3	<i>Clostridium ramosum</i>	1960	1242	1547	0.0489
Raton_3	<i>Clostridium scindens</i>	2049	1277	29347	0.0041
Raton_3	<i>Escherichia coli</i>	2283	1418	562	0.0412
Raton_3	<i>Klebsiella oxytoca</i>	1885	1284	571	0.1719
Raton_3	<i>Parabacteroides distasonis</i>	2519	1459	823	0.0012
Raton_3	<i>Proteus mirabilis</i>	1566	1109	584	0.0254
Raton_3	<i>Roseburia hominis</i>	1180	928	301301	0.0001
Raton_3	<i>Ruminococcus obeum</i>	1635	1177	40520	0.0008
Raton_4	<i>Akkermansia muciniphila</i>	2274	1275	239935	0.0263
Raton_4	<i>Bacteroides fragilis</i>	2372	1368	817	0.0645
Raton_4	<i>Bacteroides ovatus</i>	2476	1408	28116	0.2048
Raton_4	<i>Bacteroides vulgatus</i>	2474	1395	821	0.3743
Raton_4	<i>Clostridium hiranonis</i>	1258	1011	89152	0.0306
Raton_4	<i>Clostridium ramosum</i>	1960	1242	1547	0.0499

Raton_4	<i>Clostridium scindens</i>	2049	1277	29347	0.0056
Raton_4	<i>Escherichia coli</i>	2283	1418	562	0.0460
Raton_4	<i>Klebsiella oxytoca</i>	1885	1284	571	0.1744
Raton_4	<i>Parabacteroides distasonis</i>	2519	1459	823	0.0020
Raton_4	<i>Proteus mirabilis</i>	1566	1109	584	0.0195
Raton_4	<i>Roseburia hominis</i>	1180	928	301301	0.0003
Raton_4	<i>Ruminococcus obeum</i>	1635	1177	40520	0.0017
Raton_5	<i>Akkermansia muciniphila</i>	2274	1275	239935	0.0247
Raton_5	<i>Bacteroides fragilis</i>	2372	1368	817	0.0673
Raton_5	<i>Bacteroides ovatus</i>	2476	1408	28116	0.1457
Raton_5	<i>Bacteroides vulgatus</i>	2474	1395	821	0.2066
Raton_5	<i>Clostridium hiranonis</i>	1258	1011	89152	0.0022
Raton_5	<i>Clostridium ramosum</i>	1960	1242	1547	0.0342
Raton_5	<i>Clostridium scindens</i>	2049	1277	29347	0.0031
Raton_5	<i>Escherichia coli</i>	2283	1418	562	0.1044
Raton_5	<i>Klebsiella oxytoca</i>	1885	1284	571	0.3785
Raton_5	<i>Parabacteroides distasonis</i>	2519	1459	823	0.0018
Raton_5	<i>Proteus mirabilis</i>	1566	1109	584	0.0281
Raton_5	<i>Roseburia hominis</i>	1180	928	301301	0.0026
Raton_5	<i>Ruminococcus obeum</i>	1635	1177	40520	0.0008

---



**Figura C-1.** Evolución de la composición microbiana de la microbiota intestinal de cinco ratones gnotobióticos en un experimento de inoculación con *C. difficile* (Bucci et al. 2016).