



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Análisis de un modelo computacional de la microbiota en el
metabolismo de pacientes con COVID-19.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
David Giron Villalobos

TUTOR PRINCIPAL
Dr. Osbaldo Resendis Antonio
RAI-C3-UNAM-Instituto Nacional de Medicina Genómica

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
Dra. Marcia Hiriart Urdanivia
Instituto de Fisiología Celular

Dra. Rosa María Gutiérrez Ríos
Instituto de Biotecnología

Ciudad Universitaria, CD. MX., septiembre, 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.

Agradecimientos

Dentro de las experiencias que transcurrieron en estos años, fui testigo de inexplicables cambios en lo que me rodea. Se sentía que podía ser mejor y al mismo tiempo se sentía pasajero, a veces yo me sentía pasajero. Ahora se siente mejor. Ya no puedo negar quien soy y lo que me dejan las demás personas. Tampoco puedo negar lo que es oscuro y lo que es difícil de entender. Dentro de los detalles y palabras que no puedo expresar, puedo decir que esta temporada se parece más a lo que pensé que nunca sería, pero aun así fue. Y creo que así será de ahora en adelante. Gracias a todas las personas que fueron parte de esta temporada.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) (CVU: 1083058) y a la Coordinación General de Estudios de Posgrado (CGEP) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por el apoyo otorgado durante los años 2020 a 2022 para realizar mis estudios de maestría.

Agradezco al Posgrado en Ciencias Bioquímicas de la UNAM por la valiosa oportunidad de realizar mis estudios de posgrado.

Agradezco al Dr. Osbaldo Resendis Antonio por dirigir este proyecto de maestría, por su paciencia, por sus consejos, por su apoyo y por contagiarme de su interés en tratar entender lo que es complejo.

Agradezco al comité tutor, formado por la Dra. Marcia Hiriart Urdanivia y la Dra Rosa María Gutiérrez Ríos, por sus consejos y por sus aportaciones que fueron clave para realizar este proyecto.

1 Índice

1 Índice	2
2 Índice de figuras	4
3 Índice de tablas	4
4 Lista de acrónimos	5
5 Resumen	6
5.1 Abstract	6
6 Introducción	8
6.1 Microbiota intestinal	8
6.1.1 Interacciones entre miembros de la microbiota	8
6.1.2 Importancia del estudio del metabolismo de la microbiota intestinal	9
6.1.3 Modelado computacional de la microbiota intestinal	11
6.1.3.1 Microbial Community (MICOM)	13
6.2 COVID-19	14
7 Preguntas de investigación	17
8 Objetivo general	17
8.1 Objetivos particulares	17
9 Hipótesis	17
10 Metodología	18
10.1 Población de estudio.	18
10.2 Extracción de datos metagenómicos	20
10.2.1 Control de calidad	20
10.2.2 Extracción de perfiles taxonómicos	20
10.3 Análisis de datos metagenómicos	21
10.3.1 Gráficas de abundancias relativas de microorganismos.	21
10.3.2 Estimación de la alfa y beta diversidad	21
10.3.3 Identificación de bacterias diferencialmente abundantes	21
10.4 Modelado computacional del metabolismo de la microbiota intestinal	22
10.4.1 Construcción de redes de interacciones metabólicas	26
10.4.2 Obtención de flujos netos metabólicos de ácidos grasos de cadena corta	26
11 Resultados	27
11.1 Análisis de datos metagenómicos	27
11.1.1 Las gráficas de abundancia relativa indican variabilidad entre muestras	27
11.1.2 Existe menor diversidad para casos en comparación a controles sanos	27
11.1.2.1 Diversidad microbiana	27
11.1.2.2 Diversidad beta	30
11.1.3 Se encontraron géneros diferencialmente abundantes para cada grupo de estudio.	32
11.1.3.1 Análisis diferencial de bacterias abundantes	32
11.1.3.2 Análisis de reducción de dimensionalidad e imputación	36
11.2 Modelado computacional del metabolismo de la microbiota intestinal	38
11.2.1 Análisis de interacciones de competencia o cooperación	38

11.2.2 Flujos netos de exportación de ácidos grasos de cadena corta	41
12 Discusión	44
13 Conclusiones	46
14 Perspectivas	47
15 Referencias	47

2 Índice de figuras

Figura 1	Herramientas utilizadas por la biología de sistemas para el análisis de comunidades microbianas	13
Figura 2	Diferentes predicciones que se pueden realizar con los modelos basados en restricciones.	14
Figura 3	Metodología a seguir para el procesamiento y análisis de los datos	22
Figura 4	Resumen de la metodología a seguir para el análisis de balance de flujos	25
Figura 5	Métodos para modelar la comunidad utilizados por MICOM	28
Figura 6	Gráfica de barras de la abundancia relativa de las muestras correspondientes a los controles a nivel de Phylum	31
Figura 7	Gráfica de barras de la abundancia relativa de las muestras correspondientes a los casos a nivel de Phylum	31
Figura 8	Gráficas de cajas para índices de diversidad alfa Chao1, Shannon, Simpson y Fisher.	32
Figura 9	Gráfica de puntos de los resultados de la reducción de dimensiones realizado con sUMAP.	33
Figura 10	Gráficos de puntos con géneros diferencialmente abundantes	37
Figura 11	Mapa de calor de los datos de pacientes con COVID-19	38
Figura 12	Proporción de interacciones positivas o de cooperación para cada grupo de estudio	42
Figura 13	Proporción de interacciones negativas o de competencia para cada grupo de estudio	42
Figura 14	Redes de interacción metabólica del paciente 1	44
Figura 15	Redes de interacción metabólica del paciente 3	45
Figura 16	Redes de interacción metabólica para distintos pacientes de diferentes grupos de estudio.	46
Figura 17	Flujos netos de producción de butirato para pacientes con severidad crítica	48
Figura 18	Flujos netos de producción de butirato para pacientes con severidad crítica	48
Figura 19	Flujos netos de producción de acetato para pacientes con severidad moderada	49
Figura 20	Flujos netos de producción de propionato para pacientes con severidad moderada	49
Figura 21	Resumen de los principales resultados obtenidos en este estudio.	50

3 Índice de tablas

Tabla 1	Información de los grupos de estudio	20
Tabla 2	Géneros diferencialmente abundantes para la severidad severa	35
Tabla 3	Géneros diferencialmente abundantes para la severidad crítica	36
Tabla 4	Géneros diferencialmente abundantes obtenidas con el análisis de reducción de dimensiones	39

4 Lista de acrónimos

SARS-CoV-2	Coronavirus del síndrome respiratorio agudo grave de tipo 2
ACE2	Enzima convertidora de la angiotensina 2
COVID-19	Enfermedad del coronavirus 2019
AGCC	Ácidos grasos de cadena corta
GEMs	Reconstrucciones metabólicas a partir del genoma
ARN	Ácido ribonucleico
RT-PCR	Reacción de la cadena de polimerasa en tiempo real
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FBA	Análisis de balance de flujos
UMAP	Reducción dimensional mediante la aproximación y proyección uniforme múltiple
NMDS	Escalamiento multidimensional no métrico
PCoA	Análisis de coordenadas principales

5 Resumen

La actual pandemia provocada por la infección por SARS-CoV-2 plantea un problema importante de salud pública mundial. Aunque en un principio se trató como una enfermedad respiratoria, ahora se ha establecido que puede afectar a otros tejidos, por ejemplo, al intestino. Este virus se une al receptor ACE2 y al entrar en las células del huésped se encuentra con este receptor, el cuál es altamente expresado en el tejido intestinal específicamente en los enterocitos. Además, hay evidencia de que el virus se encuentra en heces de pacientes infectados, incluso después de su recuperación. Esta información incrementa el interés por conocer el papel de la microbiota intestinal en el desarrollo de la COVID-19, específicamente, sobre cómo responde la microbiota ante al virus SARS-COV-2 y cómo se podría utilizar como aliada para la recuperación del paciente son algunas de las interrogantes de gran importancia actualmente. Hoy en día la mayor parte de la investigación se centra en la composición de la microbiota intestinal y se sabe poco sobre las interacciones dentro la comunidad bacteriana que afectan al hospedero. Con la finalidad de explorar la relación microbiota-COVID-19, en este proyecto usamos datos de secuenciación metagenómica de muestras fecales de 15 pacientes, 15 controles y 6 neumonías no virales tomados de Zuo et al, 2020a. Para el análisis metabólico utilizamos el software MICOM, una herramienta computacional de modelado metabólico para predecir interacciones basadas en flujos metabólicos en un nivel comunitario. Primero, aplicamos métodos de expresión multidimensionales y diferenciales para la identificación de bacterias particulares para cada etapa de COVID-19. Luego, obtuvimos interacciones metabólicas bacterianas con MICOM, ya sea competencia o cooperación, e identificamos nodos importantes en las redes de interacción. Al comparar estos resultados con los obtenidos del análisis diferencial identificamos bacterias específicas para cada etapa del progreso del COVID-19. Por ejemplo, nuestro estudio concluyó que *Akkermansia*, *Lactobacillus* y *Parabacteroides* se encuentran en un centro de competencia metabólica en pacientes críticos. Además, obtuvimos los flujos metabólicos netos para los ácidos grasos de cadena corta y observamos que el butirato disminuyó para los pacientes con COVID-19 en comparación con el grupo sano. Este estudio nos permite plantear hipótesis de cómo las interacciones a nivel comunitario pueden participar en el desarrollo de esta enfermedad y sus diferentes etapas clínicas, desde una perspectiva metabólica.

5.1 Abstract

The current pandemic caused by SARS-CoV-2 infection poses a public health problem. Although it was first treated as a respiratory disease, it is now established that it can affect other tissues, for example the gut. This virus can bind the ACE2 receptor and enter the host cells, this receptor is highly expressed in the intestinal tissue specifically in enterocytes. Also, it was found in feces of infected patients. This information raises interest to discover the role of gut microbiota in the development of COVID-19. Nowadays, most of the research is focused on gut microbiota composition and little is known about the interactions in the bacterial community. We used metagenomic shotgun sequencing data from fecal samples of 15 patients, 15 controls and 6 non viral pneumonia taken from Zuo et al, 2020. For the metabolic analysis we used MICOM, a metabolic modeling computational tool, to predict interactions based on metabolic fluxes at a community level. First, we performed multidimensional and differential expression methods for the identification of particular bacteria for each COVID-19 stage. Then, we obtained bacterial interactions, either competition or cooperation, with MICOM, and identified important nodes in the interaction networks. Given this data we compared it with the differential analysis to identify specific bacteria for each COVID-19 stage. For example, *Akkermansia* is found as a competition hub in critical patients as well as *Lactobacillus* and *Parabacteroides*. Further, we obtained the net metabolic fluxes for short chain fatty acids and we observed that butyrate was decreased for the COVID-19 patients in comparison with the healthy group. This study allows us to better understand how interactions at community level can participate in the development of this disease and its different clinical stages, from a metabolic perspective.

6 Introducción

6.1 Microbiota intestinal

En el intestino grueso de los humanos existe una comunidad microbiana con una ecología compleja a la que aquí designaremos como la microbiota intestinal. Esta se encuentra conformada en mayor proporción por bacterias y en menor proporción por hongos, archaea y virus (Pflughoeft & Versalovic, 2012). La microbiota en conjunto con el hospedero, forman una red de interacciones dinámicas complejas de metabolismo y de señalización que determina una relación simbiótica entre estos dos sistemas. En otras palabras, la microbiota mantiene invariablemente condiciones de homeostasis con el hospedero. Los principales factores que pueden modificar la ecología de la microbiota son cambios producidos por la dieta, el uso de antibióticos, la edad y el sexo del hospedero. De forma muy notable, cuando existen variaciones en la composición de la microbiota intestinal se producen variaciones en el metabolismo de la comunidad que causan un impacto directo sobre la dinámica de estos sistemas y por lo tanto en su fenotipo metabólico (Visconti et al., 2019).

6.1.1 Interacciones entre miembros de la microbiota

La microbiota intestinal está caracterizada por una compleja red de interacciones metabólicas competitivas y colaborativas, que en conjunto se asocian al estado fisiológico del hospedero. Estas interacciones son muy importantes en la definición de la composición y el funcionamiento de la comunidad. Además, estas interacciones tienen un impacto sobre el fenotipo del hospedero y su dinámica se ve caracterizada por el ambiente exterior. Un ejemplo de esta simbiosis se da en el caso donde algunos microbios benefician al hospedero por medio de la producción de metabolitos a cambio de nutrientes y protección que el hospedero adquiere por ejemplo, mediante la dieta. Sin embargo, también la microbiota puede ocupar los recursos del hospedero sin ofrecer nada a cambio provocando efectos negativos. Otros efectos de la microbiota en el hospedero están relacionados con efectos en su desarrollo, comunicación y comportamiento. A su vez, el hospedero también puede afectar la densidad, distribución y diversidad de la comunidad microbiana (Figueiredo & Kramer, 2020).

A nivel metabólico, los microorganismos pertenecientes a una comunidad interactúan por medio de la producción y consumo de metabolitos. En la microbiota intestinal cada especie que la conforma es capaz de metabolizar sustratos que provienen del hospedero (dieta o fármacos) o de otros microorganismos utilizando distintas vías metabólicas. Por ejemplo, existe evidencia de que las especies pertenecientes al filo Bacteroidetes son capaces de producir lactato a partir de los carbohidratos provenientes de la dieta. A su vez, este metabolito puede ser metabolizado por otros microorganismos para formar propionato u otros productos de relevancia para la biomasa de la comunidad (McKee et al., 2021).

En específico, cuando se habla de interacción metabólica se habla de interacciones cooperativas o competitivas. En el primer caso, las interacciones cooperativas (o positivas) entre dos especies de una comunidad se define cuando un microorganismo puede obtener un beneficio a partir de otro sin provocar afectaciones de por medio. Por ejemplo, mediante la secreción de enzimas capaces de metabolizar compuestos inaccesibles por ciertos miembros, por ejemplo, para la degradación de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) o la producción de vitaminas (Xu et al., 2020). Mientras que competencia metabólica (interacciones negativas) se refiere a las situaciones en las que dos o más microorganismos compiten por recursos en el medio o por espacio. Este tipo de interacción afecta directamente a la cantidad de miembros pertenecientes a un grupo que puede ser susceptible a toxinas y/o cambios en la disponibilidad de nutrientes esenciales. (Coyte & Rakoff-Nahoum, 2019; Mitri & Richard Foster, 2013). Notablemente, hay evidencia computacional que el número de interacciones metabólicas en una comunidad están balanceadas entre especies que colaboran y aquellas que compiten. Desde una perspectiva colectiva, esta organización balanceada, entre colaboración y competencia, probablemente busca el uso eficiente de recursos que finalmente permite el crecimiento conjunto de los microorganismos involucrados.

6.1.2 Importancia del estudio del metabolismo de la microbiota intestinal

Actualmente, el estudio del metabolismo en la microbiota es una línea de investigación muy intensa en la biología de sistemas para identificar los componentes clave y entender su relación con el hospedero. Así, se sabe que existen productos generados por la comunidad microbiana intestinal que son esenciales para el hospedero, este es el caso de vitaminas B2, B12, K entre otras (LeBlanc et al., 2013). Además, otros metabolitos secretados por la microbiota pueden regular distintos procesos en el hospedero como la

respuesta inmune (ácidos grasos de cadena corta), la permeabilidad intestinal, y la absorción de grasas (por medio de la modificación de ácidos biliares) por mencionar algunos (Nicholson et al., 2012).

Con el afán de descubrir la naturaleza de las interacciones en la microbiota intestinal, un componente relevante para lograr entender cómo se establece la interacción microbioma-hospedero es la implementación de nuevas tecnologías de secuenciación, como la secuenciación metagenómica, que permiten caracterizar cualitativamente la distribución y abundancia de una comunidad microbiana (Hugenholtz et al., 2008). Así, la implementación de los métodos de secuenciación masiva han permitido caracterizar a la microbiota intestinal relacionada con un estado sanos o disfuncionales en varios tejidos humanos (Huttenhower et al., 2012).

En muchos de estos estudios comparativos, es comúnmente reportado que variaciones en la composición y taxonomía de estas comunidades se asocian con el estado de enfermedad. Muy particularmente, se ha observado asociaciones entre composición de microbiota y enfermedades complejas, tales como la obesidad, la depresión, el síndrome de colon irritable, cáncer de colon, entre otras (Belkaid et al., 2014). Por ejemplo, un estudio demostró que existen cambios en la composición de la microbiota en adultos con pérdida de peso, con una ganancia en bacterias productoras de butirato como *Fecaibacterium prausnitzii* y *Akkermansia*. Por otro lado, se ha observado que la microbiota intestinal de personas con obesidad tienen una menor cantidad de genes bacterianos y esto fue asociado a un fenotipo negativo caracterizado por incremento en la resistencia a la insulina, dislipidemia e inflamación, al comparar con personas con una alta cantidad de genes bacterianos. En depresión, se ha encontrado una menor concentración de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) en personas con depresión en comparación a los controles sin depresión

Debido a lo anterior, se ha postulado que el estudio de la microbiota y la caracterización de su metabolismo es un campo de estudio de gran importancia para la prevención y el tratamiento de enfermedades.

El análisis del metabolismo de la microbiota se realiza mediante el uso de la metagenómica, secuenciación del gen 16S ribosomal, la espectrometría de masas (por la metaproteómica y la metabolómica), la metatranscriptómica, la microfluídica, los bioreactores, la culturómica y las tecnologías de imagen (Cassotta et al., 2020) . Los resultados que se pueden obtener mediante estas técnicas son asociaciones que sirven como soporte para entender en futuros estudios la funcionalidad de la microbiota, así como

de interacciones entre los miembros de la comunidad microbiana.(Kumar et al., 2019). Actualmente, con la ayuda de la biología de sistemas, particularmente las reconstrucciones metabólicas y su modelación computacional, es posible sugerir los mecanismos de interacción entre microorganismos que podrían tener impacto en la salud del hospedero.

En este contexto, esta tesis aborda un estudio computacional (basado en reconstrucciones a escala genómica y modelado a través de balance de flujos) para explorar la microbiota en pacientes con la COVID-19, enfermedad que a la fecha constituye una amenaza para la población mundial. Un aspecto medular en este estudio, es evaluar si la actividad metabólica de la microbiota de pacientes COVID-19 se diferencia entre estos pacientes con distinto nivel de respuesta (moderada,severa o crítica), esto desde una modelo *in silico* a nivel de biología de sistemas.

6.1.3 Modelado computacional de la microbiota intestinal

Debido a la complejidad inherente a la microbiota intestinal, existen esfuerzos para entender las interacciones utilizando modelos computacionales y matemáticos (Kumar et al., 2019). Dichos modelos matemáticos y computacionales han demostrado su capacidad para sugerir mecanismos y develar principios que guían los complejos sistemas biológicos. Dentro de estos, se encuentran los modelos basados en características fenotípicas de los microorganismos, modelos basados en datos de secuenciación, y modelos basados en restricciones utilizando genomas anotados. En la figura 1 se presentan las herramientas que la biología de sistemas ó la bioinformática utilizan para entender la estructura y la funcionalidad de las comunidades microbianas. Mediante el uso de tecnologías ómicas (figura 1a) es posible obtener una cantidad extensa de información por ejemplo, metagenómica, metaproteómica, metabolómica entre otras. Resulta importante el desarrollo de herramientas bioinformáticas que faciliten el procesamiento y análisis de los resultados, por ejemplo, a través de análisis de composición, diversidad enriquecimiento y diferenciales (figura 1b). Sin embargo, la obtención de estos resultados no es suficiente, una alternativa en su procesamiento es mediante la formación de modelos computacionales, que a nivel sistémico permiten integrar los datos obtenidos para llegar a conclusiones que después pueden ser verificadas experimentalmente. Dentro de estos, se encuentran los modelos basados en datos de secuenciación y modelos basados en restricciones utilizando reconstrucciones de genoma completo (GEMs) (Martínez-López et al., 2022).

Los modelos basados en datos de secuenciación integran medidas de correlación para inferir redes de asociación que mediante sus parámetros topológicos, como el coeficiente de

agrupamiento, conectividad de los nodos y modularidad. Estos parámetros proporcionan información sobre las interacciones en la comunidad, por ejemplo, cuáles bacterias son predominantes en un fenotipo determinado. Figura 1c (Martínez-López et al., 2022).

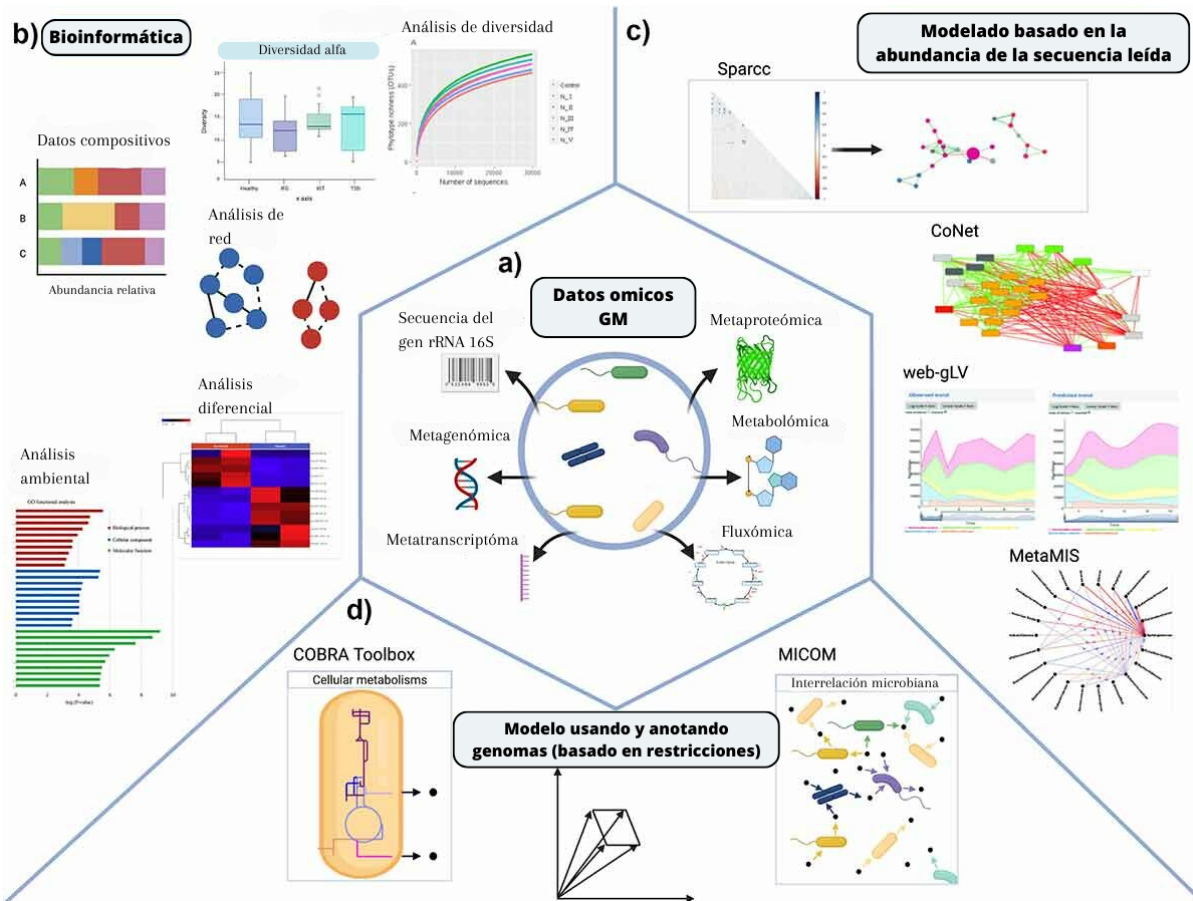


Figura 1. Herramientas utilizadas por la biología de sistemas para el análisis de comunidades microbianas. Tomado de Martínez-Lopez et. al. 2022.

Los modelos matemáticos que exploran la actividad metabólica de la microbiota son una herramienta que permiten postular sus mecanismos que subyacen en esta comunidad compleja. Entre los ejemplos de este tipo de esquemas teóricos se encuentran aquellos basados en reconstrucciones de genoma completo (GEMs), los cuales parten del genoma completo de un organismo, capaces de integrar tecnologías de alto rendimiento. El uso de este tipo de modelos permite obtener los flujos metabólicos asociados con la comunidad microbiana asociada a un fenotipo particular de salud o enfermedad. Estos esquemas teóricos permiten además predecir las reglas de interacción microbianas, como competencia y cooperación, así como los flujos de producción de metabolitos hacia el hospedero (figura 2).

Las GEMs son el conjunto de todas las reacciones bioquímicas que en potencia pueden ocurrir en un conjunto de microorganismo determinado formando una red metabólica que es equivalente a la representación más cercana a su fenotipo metabólico. Debido a la gran cantidad de reconstrucciones reportadas en la literatura, actualmente es posible modelar una comunidad microbiana utilizando varias reconstrucciones las cuales serán elegidas con base en la información taxonómica de una muestra determinada. Particularmente, en esta tesis hemos seleccionado la base de datos AGORA (Magnúsdóttir et al., 2017), la cual tiene información sobre reconstrucciones genómicas a nivel de metabolismo de bacterias que se encuentran en la microbiota intestinal humana. Metodológicamente, el estudio del fenotipo metabólico de la comunidad se construye a partir de la definición una función objetivo, como la producción de biomasa, que describe el uso de metabolitos necesarios para el crecimiento celular (como aminoácidos, ácidos nucleicos, carbohidratos y lípidos). Conceptualmente, esta función de biomasa permite realizar un vínculo con las mediciones de abundancia relativa, al postular que la producción de biomasa es proporcional a la abundancia relativa de los microorganismos que integran una comunidad (Kumar et al., 2019). Existen diversas herramientas computacionales con diferentes aproximaciones matemáticas para abordar la resolución de la función de biomasa, entre ellas se encuentra el software Microbial Community (MICOM), la cual explicaremos en la siguiente sección y será el principal herramienta computacional sustentando los resultados de esta tesis.

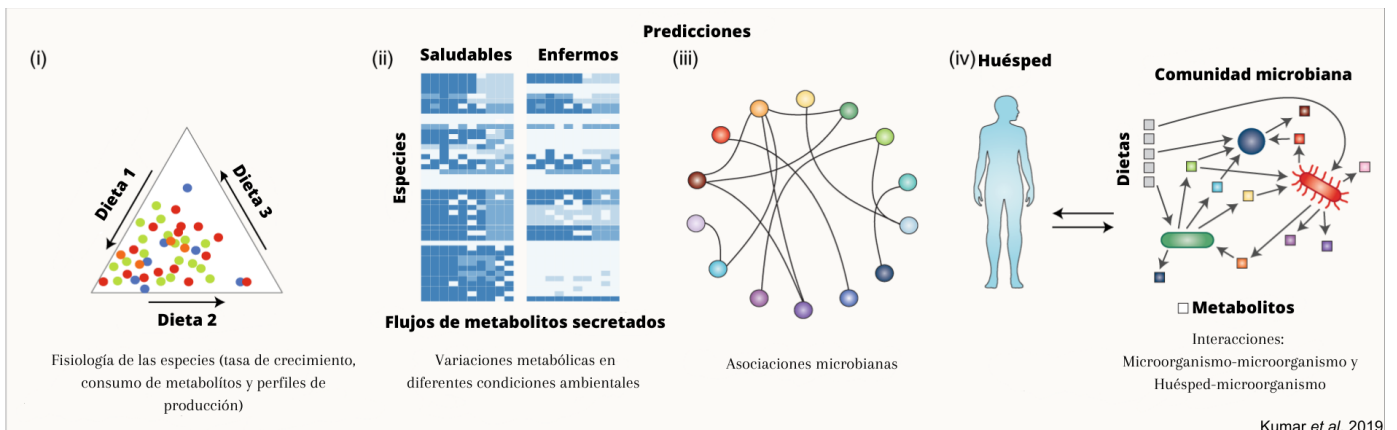


Figura 2. Diferentes predicciones que se pueden realizar con los modelos basados en restricciones. Tomada de Kumar et al. 2019

6.1.3.1 Microbial Community (MICOM)

MICOM es una herramienta computacional que permite el modelado metabólico de cualquier comunidad microbiana, por ejemplo, las que se encuentran en el suelo, en cuerpos de agua, así como de la microbiota intestinal (Diener et al., 2020). Fue desarrollada en el Laboratorio de Biología de Sistemas Aplicado a Enfermedades Humanas del Instituto Nacional de Medicina Genómica en el año 2020. De forma breve, dicha herramienta integra las clasificaciones taxonómicas y de abundancias obtenidas por metagenómica o 16S de una determinada muestra. Posteriormente, en función a las especies encontradas, se seleccionan sus reconstrucciones de genoma completo (GEMs) (que se encuentra depositada en diferentes bases de datos, por ejemplo del proyecto AGORA el cuál se hablará a detalle en la sección 10.4) y se incluye la información de los macronutrientes correspondientes a la dieta del individuo. Finalmente, con estos datos MICOM es capaz de simular el comportamiento metabólico de la comunidad y predecir la actividad metabólica a nivel de especie o de comunidad. La función objetivo de este modelo es la producción de la biomasa y está determinada por la producción de metabolitos necesarios para el crecimiento de la comunidad. A su vez, esta función depende de la abundancia de cada especie y de los precursores metabólicos suministrados por la dieta. Con la finalidad de estimar la actividad metabólica, el algoritmo considera que la suma de las tasas de producción de biomasa individuales representa la tasa de producción de biomasa a nivel comunidad. Para realizar las predicciones y maximizar el crecimiento bacteriano, MICOM utiliza un algoritmo de optimización doble (lineal y no-lineal) que identifica las vías metabólicas disponibles en cada bacteria para el procesamiento de metabolitos a nivel individual y de la comunidad.

Entre los resultados que obtiene este algoritmo se encuentran los flujos de consumo y producción para diferentes metabolitos por especie. También, MICOM puede predecir las interacciones entre microorganismos ya sea de competencia o comensalismo. Además, es posible realizar intervenciones en la microbiota como aumentar o disminuir la abundancia de cierta especie para estudiar los cambios en los metabolitos producidos. En particular, MICOM es una herramienta útil para el estudio de las interacciones del metabolismo del microbioma intestinal. Por ejemplo, recientemente se mostró a través de esta herramienta que la producción de ácidos grasos de cadena corta en pacientes con diabetes tipo 1 es menor. Esto es consistente con estudios clínicos y mediciones clínicas, donde los géneros *Faecalibacterium*, *Coprococcus*, *Roseburia*, *Anaerostipes*, y *Lachnoclostridium* fueron identificados con alta importancia en el metabolismo de butirato (Zheng et al., 2018,). En

este contexto, MICOM puede ser una herramienta coadyuvante para predecir alteraciones en el metabolismo y en la composición de la microbiota que pueden guardar una asociación con un estado de enfermedad en el hospedero (Diener et al., 2020).

6.2 COVID-19

La COVID-19 es una enfermedad causada por la infección del virus SARS-COV-2 y representa el reto más grande de salud pública en la actualidad con alrededor de 800 millones de casos a nivel mundial a junio del 2023 según la Organización Mundial de la Salud. Aunque sus síntomas son presentados mayormente en el sistema respiratorio, se calcula que aproximadamente 1 de cada 5 pacientes presenta síntomas gastrointestinales como la diarrea (Tariq et al., 2020). Por lo que estas evidencias sugieren que el tracto gastrointestinal también podría resentir los efectos en el desarrollo de la enfermedad (Villapol, 2020).

Desde el punto de vista molecular, el receptor ACE2 es reconocido por la proteína S del coronavirus para promover su entrada e infectar las células del hospedero. Este receptor está altamente expresado en el tracto respiratorio y digestivo. En este último órgano, el ACE2 participa en la regulación de la homeostasis y la ecología microbiana de la microbiota intestinal (Ye et al., 2020). Sin embargo, los mecanismos por los cuales el intestino podría participar en el desarrollo de la COVID-19 aún no están claros y es necesario profundizar en este tema (D'Amico et al., 2020).

Estudios recientes han encontrado una relación entre variaciones en la microbiota intestinal y el desarrollo de COVID-19 (Yeoh et al., 2021; Zhang et al., 2022; Zuo, Zhang, et al., 2020b, p. 19). Entre los hallazgos más relevantes, resalta una asociación entre alteraciones en los perfiles taxonómicos de los pacientes positivos a SARS-COV-2. De modo que la microbiota de pacientes con COVID-19 se caracteriza por tener mayor presencia de microorganismos patógenos y una pérdida de especies relacionadas a un microbioma saludable. La presencia de ciertas especies patógenas está asociada con un nivel alto de severidad, mientras que la presencia de especies productoras de butirato se asocian a un fenotipo menos severo, entre las especies patógenas reportadas se encuentran *Clostridium hathewayi*, *Actynomices viscosus*, *Bacteroides nordii*. Además se reportó que microorganismos del género *Bacteroides* son capaces de regular negativamente el receptor ACE2 (Zuo, et al., 2020a).

Adicionalmente, se ha reportado que el metabolismo de la microbiota de pacientes con COVID-19 presenta mayor activación de las vías metabólicas de glucólisis y la biosíntesis

de nucleótidos y aminoácidos (Zuo, Liu, et al., 2020) (Zhang et al., 2022). Estos hallazgos fueron relacionados con un aumento de la actividad metabólica producida por la infección del coronavirus. De esta manera, es cada vez más evidente que el SARS-CoV-2 podría generar alteraciones entre la relación microbiota-hospedero, afectando particularmente el metabolismo y la respuesta inmune en el hospedero (Friedland & Haribabu, 2020). Finalmente, se ha reportado que las alteraciones en la microbiota intestinal y la detección positiva del virus en heces fecales persisten incluso después de 6 días de haber superado la infección respiratoria característica de la enfermedad (Zuo, et al., 2020a). Además, otro estudio realizado en 57 pacientes de China (Tang et al., 2020), encontró que existe disbiosis y cambios en la composición de la microbiota intestinal en pacientes que fueron asociados con la severidad de la enfermedad y con parámetros hematológicos. Adicionalmente, este estudio observó una disminución significativa en pacientes severos de bacterias productoras de butirato como *Faecalibacterium prausnitzii*, *Clostridium butyricum*, *Clostridium leptum* y *Eubacterium rectale*.

Asimismo, un estudio que utilizó secuenciación de 16S del ARN ribosomal en 30 pacientes de China con COVID-19, pudo identificar diferencias en la composición de la microbiota intestinal en comparación con un conjunto de controles sanos. El estudio concluyó que la microbiota de pacientes con COVID-19 fue caracterizada por tener una menor diversidad y una alta presencia de patógenos de los géneros *Streptococcus*, *Rothia*, *Actinomyces* y *Veillonella*. Paralelamente, se ha reportado que los géneros *Fusicatenibacter*, *Romboutsia*, *Intestinibacter*, *Actinomyces* y *Erysipelatoclostridium* pueden ser cinco biomarcadores que distinguen la microbiota de pacientes con COVID-19 de controles sanos en población asiática (Gu et al., 2020). A pesar de que esto suena muy interesante, la realidad es que es necesario realizar más estudios para evaluar si esto se mantiene en otras poblaciones de zonas geográficas.

Por otra parte, Yeoh et al. realizaron un estudio con muestras fecales y de sangre de 100 pacientes con infección por SARS-CoV-2 (Yeoh et al., 2021). Adicionalmente, 27 del total de pacientes tuvieron seguimiento hasta por 30 días después de una prueba negativa al virus. Entre sus hallazgos más importantes, reportan que mediante secuenciación metagenómica tipo *shotgun* el microbioma de pacientes con COVID-19 fue significativamente diferente a los controles y que la disminución en la presencia de bacterias asociadas a roles inmunomoduladores como, *F. prausnitzii*, *Eubacterium rectale* y *Bifidobacteria*. Notablemente, las diferencias encontradas en abundancia de estos géneros permanecieron aún después de 30 días de una prueba negativa a SARS-CoV-2. También, los investigadores encontraron asociación entre los cambios en el microbioma y altas

concentraciones de citocinas proinflamatorias y marcadores sanguíneos de inflamación. (Yeoh et al., 2021).

Finalmente, el síndrome post COVID-19 es caracterizado por complicaciones y síntomas de la enfermedad por un tiempo prolongado (Nalbandian et al., 2021). Entre estas complicaciones se encuentran síntomas respiratorios, neuropsiquiátricos, gastrointestinales o dermales y aún no se entienden bien las razones por las que se desarrolla. Un estudio realizado en una cohorte de 68 pacientes de Hong Kong con COVID-19 de los cuales 50 presentaron el síndrome post-COVID-19, demostró que después de un seguimiento de 6 meses existían cambios en la microbiota en personas con el síndrome, caracterizadas por una disminución en la diversidad y riqueza bacteriana (Zhang et al., 2022).

La evidencia anterior sugiere la participación del tracto y la microbiota intestinal en la asociación del desarrollo de la COVID-19. Esta asociación se fundamenta en varios factores, uno de estos posiblemente por medio de alteraciones en el metabolismo que resultan en cambios en la respuesta inmune del hospedero y por lo tanto en la severidad de la enfermedad. Considerando esta última hipótesis, en este proyecto utilizamos una perspectiva desde la biología de sistemas utilizando MICOM para proponer un formalismo computacional capaz de explorar cuantitativamente las alteraciones metabólicas que se asocian con pacientes COVID-19 que se recuperan en distintos intervalos de tiempo. Para ello, se utilizó la información de la secuenciación metagenómica de muestras fecales de un estudio realizado a principios de 2020 en 15 pacientes chinos de Hong Kong con COVID-19 durante su hospitalización (Zuo, Zhang, et al., 2020). Las muestras fueron obtenidas a distintos tiempos durante el ingreso del paciente al hospital y durante su convalecencia (ver más detalles en la sección 5.1 metodología).

7 Preguntas de investigación

Las preguntas de investigación se resumen en las tres siguientes aspectos:

- ¿Existe una relación entre la severidad del COVID-19 y los perfiles taxonómicos y la actividad metabólica en la microbiota intestinal?
- ¿Se producirán cambios en el metabolismo de la microbiota en pacientes con COVID-19 respecto a individuos sanos?, y si es así ¿de qué tipo?

8 Objetivo general

Identificar diferencias entre los perfiles taxonómicos y la actividad metabólica de la microbiota intestinal en el desarrollo del COVID-19 entre pacientes enfermos e individuos sanos.

8.1 Objetivos particulares

- Realizar el control de calidad y la extracción de clasificaciones taxonómicas y abundancias, a partir de secuencias de metagenoma públicas crudas obtenidas de heces fecales que corresponden a la microbiota intestinal de una cohorte de personas de Hong Kong.
- Realizar el modelado computacional del metabolismo de la microbiota intestinal a partir de los perfiles taxonómicos y abundancias obtenidas para cada muestra.
- Determinar cambios metabólicos en la microbiota intestinal de pacientes con COVID-19 en función de sus perfiles taxonómicos y actividad metabólica.

9 Hipótesis

Nuestra hipótesis plantea que existen cambios metabólicos importantes en la microbiota intestinal de los pacientes con COVID-19 a distintos niveles de severidad, particularmente entre aquellos con respuesta severa y moderada. Además, postulamos que estos cambios son más exacerbados cuando estos estados metabólicos se comparan con el metabolismo de la microbiota intestinal de personas sanas.

10 Metodología

El análisis computacional de la microbiota intestinal requiere una perspectiva multidisciplinaria e interdisciplinaria. De acuerdo a esto, en este proyecto se utilizaron métodos de metagenómica, ciencias de datos, aprendizaje de máquina y biología de sistemas para entender los cambios en las interacciones y en el metabolismo de las comunidades microbianas, en la figura 3 se encuentra un resumen de las herramientas utilizadas en esta tesis.

10.1 Población de estudio.

Los datos de microbioma para este proyecto fueron tomados del estudio realizado por Zuo et. al, 2020. Se trata de un estudio piloto en pacientes de Hong Kong realizado durante su hospitalización en febrero-marzo del 2020 en los hospitales *Prince of Wales Hospital* o el *United Christian Hospital*. Ahí mismo, fueron reclutados pacientes hospitalizados con neumonía que dieron negativo a una prueba respiratoria RT-PCR a SARS-CoV-2. Adicionalmente, los individuos sanos fueron reclutados de la población de Hong Kong en general. La población de estudio consistió en 15 pacientes hospitalizados con una prueba positiva a SARS-CoV-2 y con diferente severidad de COVID-19, 15 controles sanos, y 6 pacientes con neumonía no relacionada con SARS-CoV-2 hospitalizados. Para algunos pacientes con COVID-19 se realizaron tomas de muestra a diferentes tiempos de hospitalización (Tabla 1). Los pacientes con COVID-19 fueron después divididos por severidad de acuerdo a sus signos y síntomas presentados. La clasificación por severidad se hizo de la siguiente manera: Leve, aquellos pacientes que no contaba con evidencia de neumonía en radiografía de tórax. Moderada, si contaban con neumonía con fiebre y síntomas en el tracto respiratorio. Severa si su frecuencia respiratoria era mayor a 30/min, saturación de oxígeno menor a 93% o niveles de PaO_2 / FiO_2 menor igual a 300 mm Hg (1 mm Hg = 0.133 kPa). Crítica, si tenían falla respiratoria con ayuda de ventilación mecánica, choque o falla orgánica en cuidados intensivos. Las muestras fecales fueron analizadas por secuenciación masiva con Nextera DNA Flex Library Preparation kit de Illumina (San Diego, CA) para obtener los respectivos perfiles de microbiota. Una vez con las secuencias del estudio metagenómico, se realizó el análisis bioinformático representado en la figura 3.

Tabla 1. Información de los grupos de estudio. NA es no aplica.

VARIABLES	Casos con COVID-19	Controles con neumonía	Controles sanos
Total	15	6	15
Sexo masculino	7	4	9
Sexo femenino	8	2	6
Mediana de edad	55 años	50 años	48 años
Comorbilidades	6	6	0
Fiebre	9	4	NA
Diarrea	1	2	NA
Tos	11	4	NA
Esputo	5	3	NA
Dificultad para respirar	4	3	NA
Uso de antibióticos Amoxicilina con clavulanato Cefalosporina Tetraciclina	7	6	NA
Muertes	0	0	NA
Severidad leve	1	NA	NA
Severidad moderada	9	NA	NA
Severidad severa	3	NA	NA
Severidad crítica	2	NA	NA

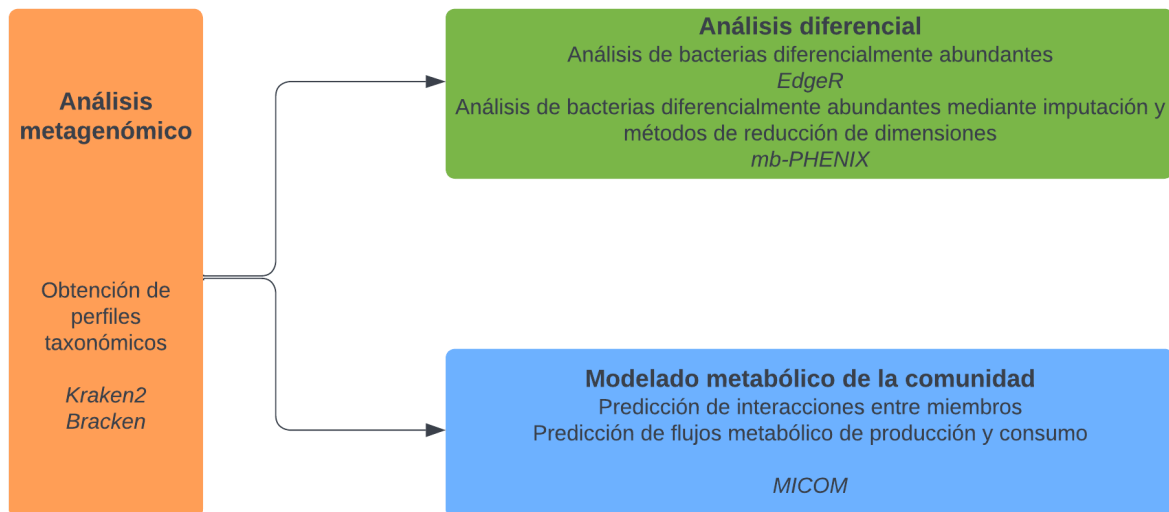


Figura 3. Metodología a seguir para el procesamiento y análisis de los datos, por el análisis metagenómico se obtuvo la composición de las muestras. Mientras que por el análisis diferencial se identificaron qué bacterias se encuentran diferencialmente abundantes entre grupos de estudio. Finalmente se realizó el modelado metabólico para predecir interacciones metabólicas entre miembros de la comunidad (competencia o cooperación) y para predecir flujos metabólicos de producción y consumo para realizar comparaciones entre grupos de estudio.

10.2 Extracción de datos metagenómicos

10.2.1 Control de calidad

Las secuencias crudas fueron descargadas del *Bioproject* PRJNA624223 del NCBI y fueron secuenciadas en la plataforma Illumina NextSeq 550. Después, fueron convertidas a formato fastq con SRA toolkit versión 2.10.8. Más adelante, para remover adaptadores y eliminar secuencias con una calidad menor a 30 se utilizó Trimmomatic versión 0.39 (Bolger et al., 2014). Finalmente, el monitoreo del control de calidad fue realizado con FastQC versión 0.11.9.

10.2.2 Extracción de perfiles taxonómicos

La extracción de los perfiles taxonómicos a nivel de especie fue obtenida con el software Kraken2 versión 2.0.9, se utilizó la base de datos Minikraken versión 8GB (Wood et al., 2019). Finalmente, se estimaron estadísticamente las abundancias con Bracken versión 2.6.0 (Lu et al., 2017).

10.3 Análisis de datos metagenómicos

Phyloseq (McMurdie & Holmes, 2013) es una herramienta en R que permite el manejo, análisis y visualización de datos taxonómicos de comunidades microbianas. Durante este proyecto, este software se utilizó para la manipulación y filtrado de datos de microbioma, creación de gráficas de abundancia, y estimaciones de la diversidad en cada muestra de los pacientes. Además, Phyloseq permitió desarrollar otros análisis complementarios, por ejemplo la identificación de bacterias diferencialmente abundantes, el cual fue realizado con EdgeR. Particularmente, en análisis diferencial, se realizó mediante comparaciones entre grupos de estudio, casos (pacientes con COVID-19), controles con neumonía (sin relación al COVID-19) y controles sanos. Es importante resaltar que de acuerdo a los autores la toma de muestras durante la hospitalización no fue realizada de manera uniforme, en consecuencia, se tienen diferentes tiempos de muestras para cada paciente con excepción de la primera toma de muestra. Por lo tanto, para el análisis metagenómico se utilizó la primera muestra de cada paciente.

10.3.1 Gráficas de abundancias relativas de microorganismos.

Con la finalidad de visualizar las abundancias de microorganismos y obtener un panorama general de la distribución de Phylum en las muestras entre los grupos de estudio, se realizaron gráficas de barras con la paquetería ggplot2 del software R.

10.3.2 Estimación de la diversidad alfa y beta

Con la finalidad de obtener el cálculo de la diversidad alfa, se utilizaron las métricas Chao1, Shannon, Simpson y Fisher para cada muestra. Posteriormente, se agruparon los resultados en grupos de estudio y se encontraron diferencias estadísticamente significativas con la prueba T de Student. En este caso, se optó por gráficas de cajas para visualizar la diversidad por muestras. Por otra parte, para encontrar la diversidad beta se utilizó UMAP de manera supervisada, se utilizaron los siguientes parámetros: vecinos cercanos igual a 4 y *random_state* igual a 32 y se asignó las etiquetas de cada grupo de estudio a las muestras correspondientes.

10.3.3 Identificación de bacterias diferencialmente abundantes

La caracterización de géneros diferencialmente abundantes fue realizada con EdgeR (Robinson et al., 2010). Primero, se eligieron las muestras del análisis comparativo, después, se filtraron las tablas de acuerdo al estado, estos fueron casos vs controles sanos, casos con severidad crítica vs controles sanos, casos con severidad moderada vs controles

sanos y casos vs controles con neumonía. Después, se realizó la normalización de las lecturas y se eliminaron los géneros con una abundancia relativa menor a 1×10^{-5} . Con esta información, se realizó una prueba estadística exacta. Esta prueba fue desarrollada por Robinson & Smyth (2007), la cual analiza la expresión diferencial entre dos grupos de recuentos de datos. Para ello, busca la diferencia en el promedio de los grupos entre dos variables binomiales. Esta prueba es adecuada para recuentos con sobredispersión y por lo tanto, se basa en una prueba binomial negativa. Finalmente los géneros con una FDR menor de 0.001 fueron elegidos como diferencialmente abundantes. Para su visualización se eligió la representación con gráfica de puntos.

10.4 Modelado computacional del metabolismo de la microbiota intestinal

Microbial Community Modeling (MICOM) es una paquetería de Python que permite el modelado metabólico de comunidades microbianas, como la microbiota intestinal. Este software obtiene los fenotipos metabólicos de microbiota a partir de los perfiles taxonómicos, las reconstrucciones metabólicas a nivel de genoma (GEMs) de las bacterias, y la información de los macronutrientes provenientes de la dieta. Básicamente, MICOM utiliza un análisis de balance de flujos aplicada a una comunidad microbiana, de manera que es posible obtener los flujos metabólicos de consumo y producción de metabolitos entre los miembros de la comunidad, así como de los exportes metabólicos hacia el hospedero. En esta sección se explican las bases que utiliza MICOM. El análisis de balance de flujos (FBA) es una herramienta útil para el estudio de redes bioquímicas, como es el caso de las GEMs. Las reconstrucciones metabólicas a nivel de genoma son una colección de todas las reacciones bioquímicas que pueden ser realizadas por un organismo para formar una red metabólica que funciona como una representación global de su metabolismo, estas son realizadas a partir de secuenciación y de resultados experimentales. El FBA parte de una matriz estequiométrica (S), la cual equivale a la representación matemática del metabolismo. Esta matriz se representa por compuestos (m) y reacciones (n), de modo que tiene dimensiones $m \times n$. También se compone de un vector de flujos (v) que representa la cantidad de masa por tiempo que es producida por cada una de las reacciones químicas en el sistema (figura 4). En el crecimiento bacteriano durante la fase logarítmica existe la producción y consumo de metabolitos a un flujo constante. Esto está de acuerdo con un modelo de estado estacionario, donde el crecimiento bacteriano está en equilibrio con un proceso que continuamente remueve biomasa del sistema, por lo tanto es posible describir el flujo del crecimiento de una bacteria en este régimen temporal con la siguiente ecuación:

$$Sv = 0$$

Ecuación 1.

Donde S es la matriz estequiométrica, la cual integra toda la información de las reacciones que ocurren en la red metabólica reconstruida para un organismo. Además, v es el vector de flujos que contiene información de las tasas de transformación de las reacciones incluidas en las reconstrucciones.

Análisis de balance de flujos

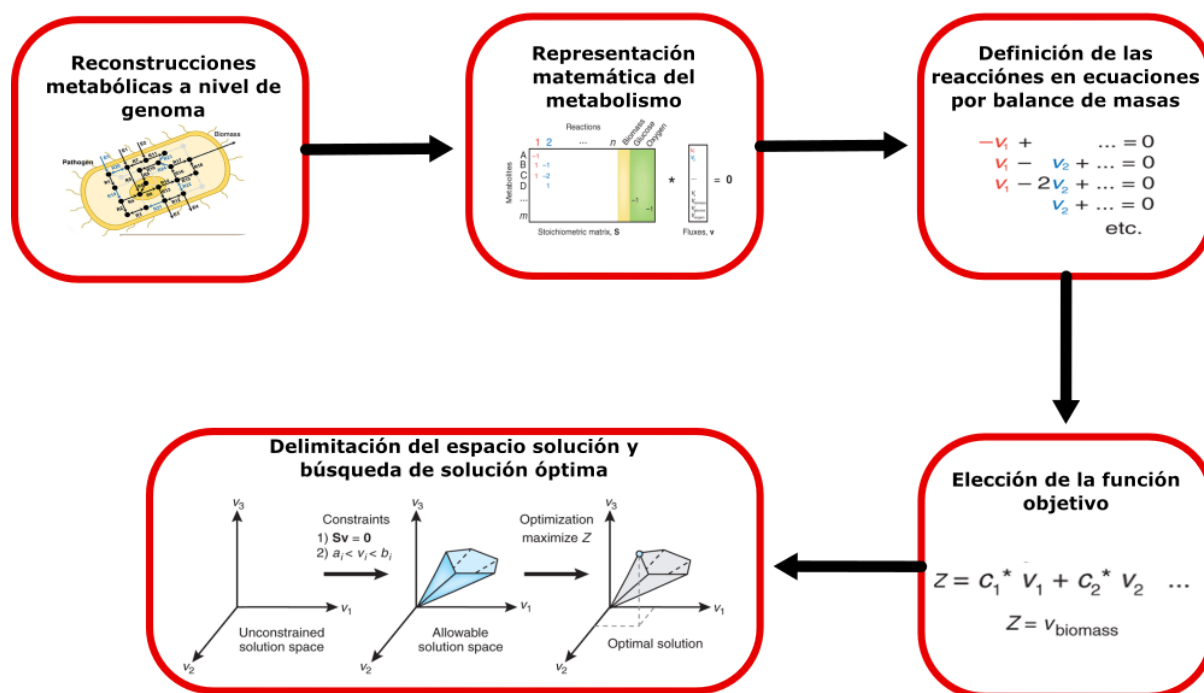


Figura 4. Resumen de la metodología a seguir para el análisis de balance de flujos.

Una característica importante de los sistemas metabólicos biológicos es que tienen más reacciones que los compuestos participantes. Como consecuencia, existen múltiples soluciones de fenotipos que cumplen el estado estacionario de la Ecuación 1. Sin embargo, con la finalidad de limitar este espacio, metodológicamente se imponen algunas restricciones físico-químicas y enzimáticas al sistema. Por ejemplo, la matriz estequiométrica impone restricciones al sistema debido a los coeficientes estequiométricos de cada reacción. En adición, las GEMs integran información adquirida experimentalmente sobre los límites enzimáticos en los flujos metabólicos en un organismo. Estas restricciones limitan el espacio de solución a un posible número de flujos que podrían caracterizar al sistema.

Para determinar una solución que sea de relevancia biológica, es importante designar una función objetivo que se asocie a una funcionalidad biológica. Entre la función de mayor uso se encuentra la producción de biomasa, la cual equivale a la producción de ciertos metabolitos necesarios para que un organismo crezca. Entre estos metabolitos se incluyen los ácidos nucleicos, aminoácidos, carbohidratos y lípidos. Una vez definida la función objetivo, se busca optimizar (al máximo) para identificar los flujos de toda la red:

$$Z = c \cdot v \quad \text{Ecuación 2.}$$

Donde Z es la función objetivo, c es un vector que determina cual es el peso de cada reacción, en otras palabras, cuanto contribuye a la función objetivo, y v es el vector de flujos original.

Así, para encontrar la solución óptima de la ecuación 2, se aplica programación lineal. Finalmente, como resultado se obtiene un conjunto de flujos específicos que minimizan o maximizan la función objetivo de acuerdo al fenotipo deseado. En la figura 3 se encuentra un diagrama que resume los pasos explicados anteriormente de FBA.

Los avances en la secuenciación masiva, especialmente en la secuenciación de genoma completo han permitido la formación de GEMs, mayormente de bacterias. En relación con eso en 2016 se presentó AGORA, un proyecto cuyo propósito es crear un recurso para el estudio del microbioma humano intestinal mediante reconstrucciones genómicas a nivel de genoma (Magnúsdóttir et al., 2017). Por lo que, ahora es posible integrar la información de varias reconstrucciones para modelar comunidades microbianas utilizando un enfoque de FBA. Con este objetivo fue creado MICOM, el cual es una herramienta computacional que permite el modelado del metabolismo de comunidades microbianas. Esto lo logra al extender FBA a un enfoque comunitario. Para este último objetivo, MICOM utiliza una optimización de dos pasos, la cual logra predecir los flujos metabólicos de producción y consumo para simular el crecimiento de una comunidad microbiana por medio de la implementación de GEMs, la dieta, y las abundancias procedentes de estudios de metagenómica o secuenciación 16S.

Se sabe que la abundancia de bacterias en el intestino oscila entre un valor fijo de mediana en el transcurso del tiempo. Esto nos indica que el crecimiento bacteriano sigue un modelo de estado estacionario donde el crecimiento bacteriano (modelado por la producción y consumo de biomasa) se encuentra constante, y por lo tanto es compatible con FBA. De esta manera, se puede establecer la función objetivo con el crecimiento a nivel de comunidad de la siguiente manera:

$$\mu_c = \sum_i \alpha_i \mu_i$$

Ecuación 3.

Donde μ_c representa la tasa de producción de biomasa de la comunidad, la cual se establece por la suma de las tasas de producción de biomasa individuales de cada miembro de la comunidad microbiana (μ), multiplicado por su correspondiente participación en la comunidad, es decir su abundancia (α).

Si se utiliza el método de FBA existen infinitas soluciones a la ecuación 2, para delimitar y escoger la solución que sea relevantemente biológica y por lo tanto identificar tasas de crecimiento reales en una comunidad microbiana, MICOM utiliza regularización cuadrática L2 que puede aplicarse a FBA para obtener una distribución real de flujos para la comunidad.

La regularización L2 permite el crecimiento de todos los miembros de la comunidad maximizando su crecimiento. Sin embargo, al maximizar el crecimiento de la comunidad se maximiza el crecimiento de las bacterias mayor abundantemente presentes, excluyendo a otras bacterias con menor abundancia, por lo tanto, carece de relevancia biológica, debido a que existen otras especies en el ambiente que son capaces de crecer sin importar su abundancia. Para superar esta limitación, MICOM utiliza dos enfoques, primero asigna un límite a una fracción del crecimiento máximo comunitario denominado *trade-off*, este límite permite obtener un balance entre optimizar el crecimiento de la comunidad y al mismo tiempo maximizar el crecimiento de todos los miembros, después aplica la regularización L2 minimizando la producción de biomasa con la siguiente ecuación:

$$\mu_i = \frac{\alpha \mu_c}{a^T a} a_i$$

Ecuación 4.

En la ecuación anterior μ_i representa la tasa de crecimiento de una bacteria en específico. α representa el valor de intercambio (trade-off), μ_c es la tasa de crecimiento de la comunidad, a es la información de las abundancias relativas, a^T es la transpuesta de las abundancias relativas y a_i es la abundancia relativa de una bacteria en específico. Esto lo hace para determinar el crecimiento de una bacteria tomando en cuenta el crecimiento de los demás miembros de la comunidad de manera que sea realista.

La minimización de esta ecuación junto a restricciones impuestos por la dieta dan como resultado las tasas de crecimiento para una comunidad de manera relevante y biológica. Ya que el crecimiento está dado por la producción de biomasa, como resultado de MICOM se

obtienen los flujos metabólicos de toda la comunidad de producción y consumo de metabolitos que permiten el máximo crecimiento individual manteniendo el crecimiento de la comunidad de manera realista. Estas tasas son expresadas en flujos metabólicos que proporcionan información sobre la producción y consumo de metabolitos entre miembros de la comunidad y hacia el hospedero. Con esta información es posible realizar otros análisis para predecir interacciones entre los miembros de la comunidad de competencia o cooperatividad, o la comparación del cambio en los flujos metabólicos cuando se analizan en grupos de estudio. En la figura 5 se presenta un resumen de los métodos que utiliza MICOM para modelar una comunidad microbiana.

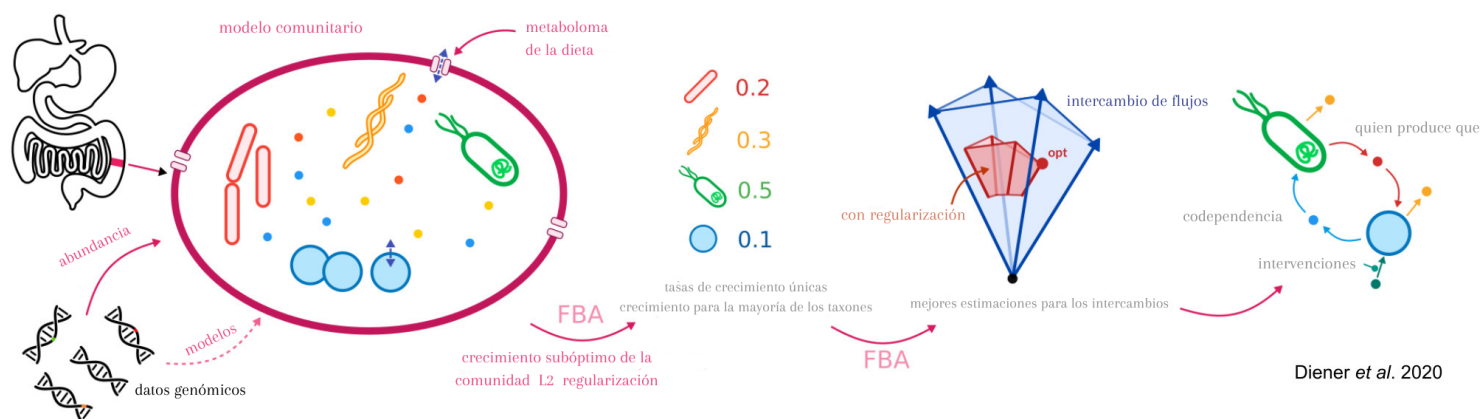


Figura 5. Métodos para modelar la comunidad utilizados por MICOM.

10.4.1 Construcción de redes de interacciones metabólicas

A partir de las comunidades formadas se realizó la predicción de posibles interacciones, ya sea cooperación o competencia, entre los miembros de la comunidad. Para realizar este análisis, MICOM ejecuta simulaciones de *knockout* para cuantificar la dependencia metabólica en el crecimiento de una bacteria en presencia de otra. Más específicamente, MICOM elige dos bacterias miembros de la comunidad y explora la velocidad de crecimiento de una, cuando la bacteria restante es eliminada en su crecimiento. Si la primera bacteria disminuye su velocidad de crecimiento, entonces se considera que tenía una relación cooperativa con la eliminada. Si la primera bacteria aumenta su crecimiento cuando se elimina la segunda, entonces se considera que tenía una relación competitiva.

Con esta información se construyeron gráficas de cajas en R usando ggplot2 para comparar el número de interacciones entre grupos de estudio. Además, se normalizaron el número de

interacciones por el método de normalización máximos y mínimos para realizar la comparación entre las diferentes poblaciones.

10.4.2 Obtención de flujos netos metabólicos de ácidos grasos de cadena corta

MICOM además es capaz de predecir los flujos metabólicos entre los miembros de la comunidad microbiana y su hospedero (exportes). Como primer análisis, se realizó la determinación de flujos netos de exportación de ácidos grasos de cadena corta (AGCC), es decir: acetato, propionato y butirato. Los flujos calculados corresponden a la tasa de producción de un metabolito que es exportado por toda la comunidad, en este caso hacia el lumen intestinal en el hospedero. Para lograr esto, los flujos netos por muestra fueron calculados y después agrupados y comparados entre grupos de estudio. Posteriormente, para su visualización, los resultados fueron graficados en gráficas de cajas en el software R con la paquetería ggplot2.

11 Resultados

A partir de los datos de la microbiota reportados por Zuo et al., 2020a, en esta tesis se realizaron análisis para determinar diferencias en la composición y en la actividad metabólica de la microbiota de pacientes con COVID-19 con respecto a una población aparentemente sana y con neumonía. En esta tesis hemos extendido el alcance de los resultados reportados por los autores originales, y se han aplicado métodos clásicos de ecología microbiana, que unidos a biología de sistemas y bioinformática, expanden el conocimiento sobre cambios en el metabolismo de la microbiota en esta serie de pacientes COVID-19 con distintas respuestas fisiológicas.

11.1 Análisis de datos metagenómicos

11.1.1 Las gráficas de abundancia relativa indican variabilidad entre muestras

En las gráficas de barras presentadas en las figuras 6 (controles) y 7 (casos), se puede observar que hay una gran variabilidad entre las abundancias de bacterias al comparar los grupos de estudio. Estas variaciones a nivel de Phylum son gruesas mayormente en los casos, aunque también se pueden observar en los controles. Por lo tanto, resulta necesario

realizar análisis estadísticos y de ecología microbiana para entender las diferencias en la composición entre muestras y grupos de estudio, así como para entender si estos cambios tendrán efectos en el metabolismo de la comunidad y hacia el hospedero.

11.1.2 Existe menor diversidad para casos en comparación a controles sanos

11.1.2.1 Diversidad microbiana

Estimar la diversidad de comunidades microbianas es importante para determinar diferencias provocadas por alteraciones en el ambiente de dichas comunidades. Para ello se utiliza principalmente los índices de diversidad alfa y beta. La diversidad alfa indica la cantidad de miembros de una comunidad determinada (riqueza) para una muestra, aunque también puede incluir información de qué tan uniforme se encuentran distribuidas las especies (uniformidad) y filogenia. Dentro de las métricas más utilizadas se encuentran Shannon, Simpson, Simpson inversa y Chao1. Para el estudio de la riqueza de una muestra se recomienda el uso de Chao1, mientras que para el estudio de la uniformidad el índice Shannon (Z. Wang, 2022).

Por lo tanto, con el objetivo de conocer de manera general el estado de la estructura de la comunidad microbiana por su riqueza y uniformidad se aplicaron 4 métricas de diversidad alfa Simpson, Shannon, Chao1 y Fisher (figura 8). Se puede observar que disminuye la diversidad en todas las métricas para los casos con COVID-19 al comparar con los controles sanos, lo mismo ocurre con los controles con neumonía no asociada a COVID-19. Sin embargo, cuando se comparan los controles con neumonía con los pacientes con COVID-19 su diversidad es mayor para las métricas Chao1 y Fisher (figura 8). Además, la prueba estadística T de estudiante arrojó que existen diferencias significativas en la diversidad entre grupos de estudios de casos con COVID-19 en comparación a los controles sanos (tabla 2). Las pruebas realizadas entre subgrupos de estudio para los casos con COVID-19, antibióticos vs no consumo de antibióticos y entre severidades, no arrojaron resultados significativamente estadísticos.

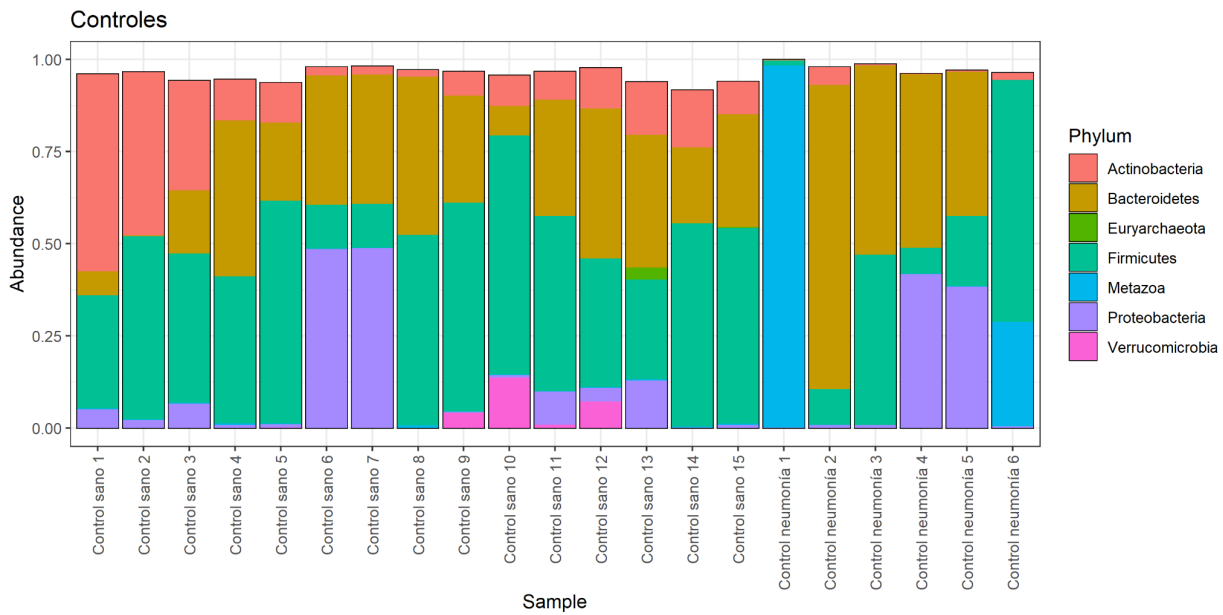


Figura 6. Gráfica de barras de la abundancia relativa de las muestras correspondientes a los controles sanos y con neumonía no relacionada a COVID-19, se muestran a nivel de Phylum.

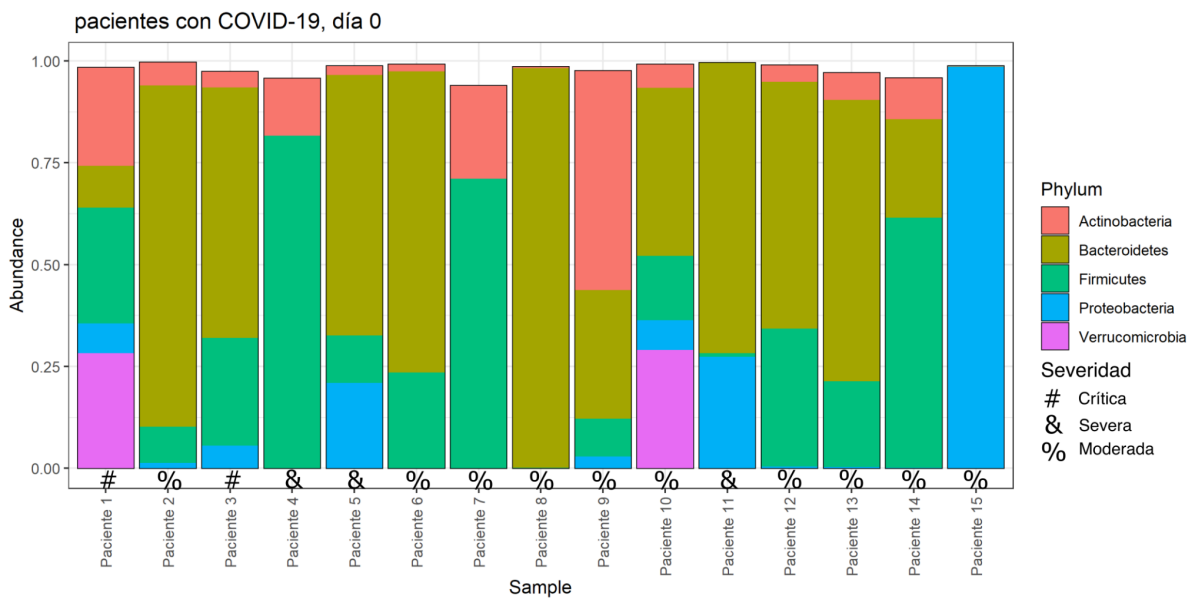


Figura 7. Gráfica de barras de la abundancia relativa de las muestras correspondientes a los casos al día 0 (primera toma de muestra), se muestran a nivel de Phylum.

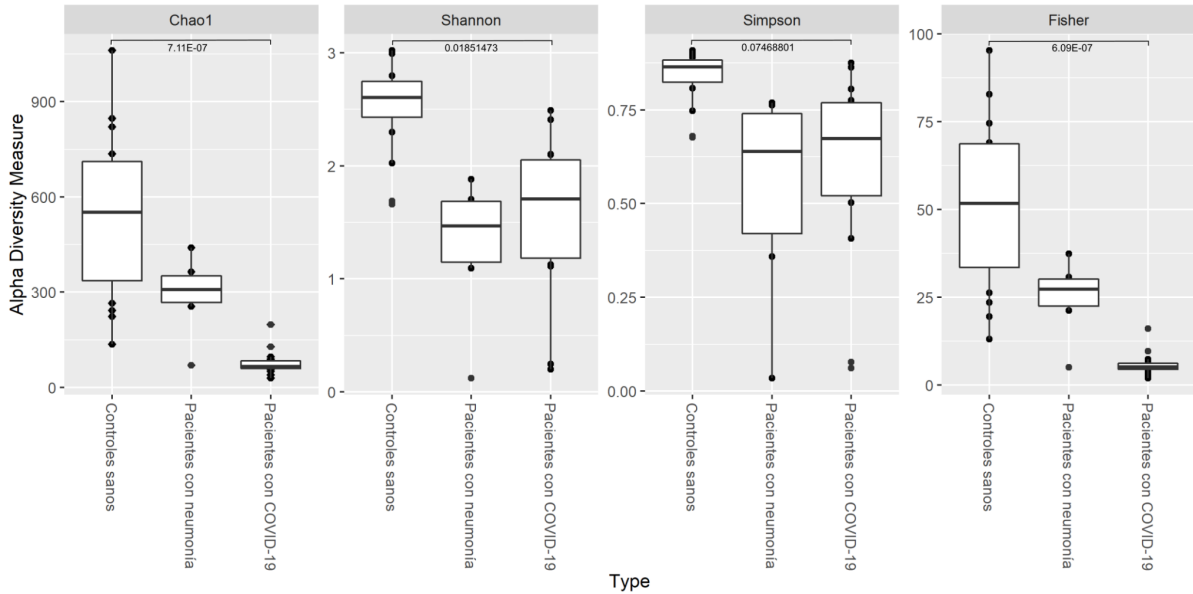


Figura 8. Gráficas de cajas para índices de diversidad alfa Chao1, Shannon, Simpson y Fisher. Se compararon 3 grupos diferentes, controles sanos, pacientes con neumonía y pacientes con COVID-19 al día 0.

11.1.2.2 Diversidad beta

Por otra parte, la diversidad beta indica las diferencias taxonómicas entre muestras para entender la heterogeneidad en la composición de distintas comunidades microbianas (Socolar et al., 2016). Existen varios métodos para visualizar las relaciones entre los miembros de una comunidad microbiana, principalmente se pueden utilizar métodos lineales para medir las diferencias entre la composición utilizando métricas de disimilitud como: Unifrac, Bray-Curtis y Jaccard que como resultado dan una matriz de distancias con una alta cantidad de datos. Ahora es preciso visualizar los resultados y para ello se requieren métodos de reducción de dimensiones que permitan entender las similitudes y diferencias entre la composición de las muestras de comunidades microbianas (Willis, 2019).

Uniform manifold approximation and projection (UMAP) es un método que utiliza una construcción no lineal gráfica y un método de incrustación para optimizar un objetivo que permita compensar la estructura local y preservar las distancias globales al mismo tiempo en datos multidimensionales (McInnes et al., 2020). Por ejemplo, en el caso del microbioma, nos permite conocer qué tan cercano se encuentran los miembros de comunidades de diferentes muestras de un cuerpo, por ejemplo de las heces, saliva, saliva, vagina etc. de tal manera que los miembros que pertenecen a cierta localización formarán un grupo de acuerdo a su origen. Comparado con otros métodos como NMDS o PCoA, UMAP trata de encontrar la representación con menor dimensiones donde los datos similares se encuentren cercanos y los no similares lejos. Este método puede utilizarse de manera supervisada o no supervisada, es decir utilizando marcadores para las muestras o sin

marcadores. UMAP tiene ventajas sobre los otros métodos porque se ha demostrado que puede capturar señales biológicas que otros métodos no, es decir cuenta con más sensibilidad.

Al aplicar UMAP de manera supervisada se observa que los grupos de controles sanos forman un grupo separado en comparación a los controles de neumonía y los pacientes con COVID-19 los cuáles se dividen en dos diferentes grupos separados (figura 9). La distancia a la que separa estos grupos nos indica que probablemente existen diferencias en la composición de estas comunidades microbianas, que podrían llevar esta diversidad de metabolismo en la comunidad.

Por lo tanto, estos resultados indican que existen diferencias importantes en la estructura ecológica de la microbiota intestinal de pacientes con COVID-19 en comparación al grupo de controles sanos. Para tener un enfoque más detallado de estas diferencias, es necesario implementar métodos de separación que permitan identificar diferencias en el perfil taxonómico de grupos de estudio. Por lo que se realizaron pruebas diferenciales de casos con respecto al grupo de controles sanos.

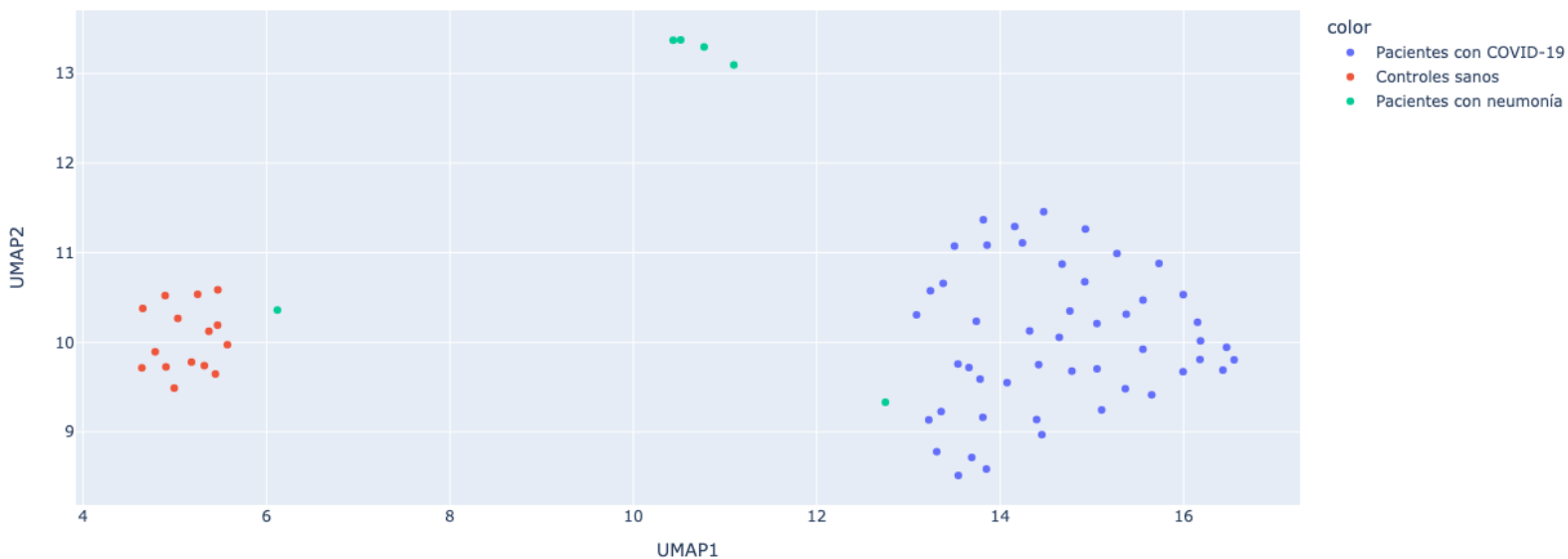


Figura 9 . Gráfica de puntos de los resultados de la reducción de dimensiones realizado con sUMAP.

11.1.3 Se encontraron géneros diferencialmente abundantes para cada grupo de estudio.

Con el objetivo de profundizar en las diferencias taxonómicas entre grupos de estudio, especialmente para los pacientes con COVID-19 y en sus diferentes severidades, se analizaron los géneros abundantemente diferenciales entre los distintos grupos de la población. Esto resultó importante para determinar bacterias particulares a un fenotipo en específico, es decir en cada estadio de la enfermedad (Robinson et al., 2010). Este análisis en conjunto a la información metabólica (explicado en la sección 6.2) fueron aspectos centrales para determinar la relación entre cambios en la estructura ecológica y asociarlas con las alteraciones en el metabolismo de la comunidad. La integración de ambos resultados es una de las contribuciones neurálgicas de esta tesis.

11.1.3.1 Análisis diferencial de bacterias abundantes

Con la finalidad de identificar los géneros que se encuentran diferencialmente abundantes para los pacientes con COVID-19 en comparación con los controles sanos utilizamos EdgeR. Este análisis a comparación del estudio original fue realizado a nivel de género, además se realizaron comparaciones entre las severidades. Lo anterior con el objetivo de entender la estructura de la comunidad microbiana la cual resulta de gran utilidad para entender cuales son los cambios metabólicos en la comunidad.

Los resultados de este estudio (figura 10) se expresaron en escala logarítmica de cambios en el incremento, es decir mientras más alto sea este número mayor es la abundancia de un género de un grupo de estudio en comparación a otro. Simultáneamente, si el cambio logarítmico es negativo, implica que menor es la abundancia del género estudiado en comparación a otro grupo. Nuestro estudio concluyó que en cada comparación para cada severidad se encontró un perfil diferentes de géneros diferencialmente abundantes en comparación a los controles sanos. En la figura 10 se presenta la comparación de casos con COVID-19 contra controles sanos. En este caso, se encontraron 19 géneros diferencialmente abundantes, 18 de manera positiva y 1 negativamente en el día 0, es decir a su ingreso al hospital. Podemos observar que los géneros *Morganella*, *Enterobacter*, *Actinomyces*, etc. Se encuentran positivamente diferencialmente abundantes en los pacientes en comparación a los controles sanos, los cuales tienen reportes previos en la literatura de alguna complicación asociada a COVID-19 (Russell et al., 2021).

Después, dividimos los pacientes con COVID-19 por severidad para ser comparados con los controles sanos. Para la enfermedad con severidad moderada (figura 10a) se encontraron 15 géneros diferencialmente abundantes, de los cuales 14 fueron de manera

positiva y 1 negativa. Dentro de estos grupos diferenciados en abundancia destacan *Enterobacter*, *Atopobium*, *Mogibacterium*, y *Rothia*, los cuáles también encontramos que tienen reportes en la literatura asociación con COVID-19 (Aishwarya & Gunasekaran, 2022). Mientras que, para los pacientes con severidad severa se encontraron 17 géneros de los cuales los géneros, *Veillonella*, *Actinomyces*, *Bacillus*, *Lactococcus*, *Citrobacter*, *Parabacteroides*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Ollsenella*, *Lachnoclostridium*, *Escherichia*, *Odoribacter*, y *Faecalitalea*, cuentan con algún reporte en la literatura para COVID-19 (tabla 3).

Tabla 2. Géneros diferencialmente abundantes para la severidad severa de COVID-19.

Género	Tipo de muestra	País	Referencias
<i>Veillonella</i>	Hisopado nasofaríngeo y esputo	China	(Meng et al., 2022)
<i>Actinomyces</i>	Fecal	China	(Lv et al., 2021)
<i>Citrobacter</i>	Fecal	China	(Ke et al., 2022)
<i>Parabacteroides</i>	Fecal	Varios	(Khan et al., 2021)(Farsi et al., 2022)
<i>Streptococcus</i>	Fecal	Varios	(Cheng et al., 2022)
<i>Ollsenella</i>	Fluidos de lavado broncoalveolar	Italia	(De Pascale et al., 2021)
<i>Lachnoclostridium</i>	Fecal	China	(Y.-Z. Wang, 2023.)
<i>Escherichia</i>	Fecal	China	(T. Zhou et al., 2023)
<i>Odoribacter</i>	Fecal	China	(Cao et al., 2021)

.Finalmente, para el grupo con severidad crítica se encontraron los géneros *Parabacteroides*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Lachnoclostridium*, *Olsenella*, *Eggertellia*, *Clostridioides*, y *Flavonifactor* como factores que aumentan en el COVID-19 respecto al control (positivos). Mientras que *Dialister* fue identificada como un género que disminuye su abundancia en el COVID-19 respecto al control. Más información de las observaciones previamente reportadas se encuentra en la Tabla 4.

Tabla 3. Géneros diferencialmente abundantes para la severidad crítica de COVID-19.

Género	Tipo de muestra	País	Referencias
<i>Parabacteroides</i>	Fecal	India	(Khan et al., 2021)
<i>Enterococcus</i>	Sanguínea	Varios	(Toc et al., 2022)
<i>Eggerthella</i>	Fecal	Japón	(Mizutani et al., 2022)
<i>Lactobacillus</i>	Esputo	China	(Han et al., 2021)
<i>Costriodioides</i>	Fecal	Varios	(Linares-García et al., 2022)
<i>Flavonifractor</i>	Fecal	China	(Ferreira-Junior et al., 2022)
<i>Dialister</i>	Fecal	Varios	(Aishwarya & Gunasekaran, 2022)

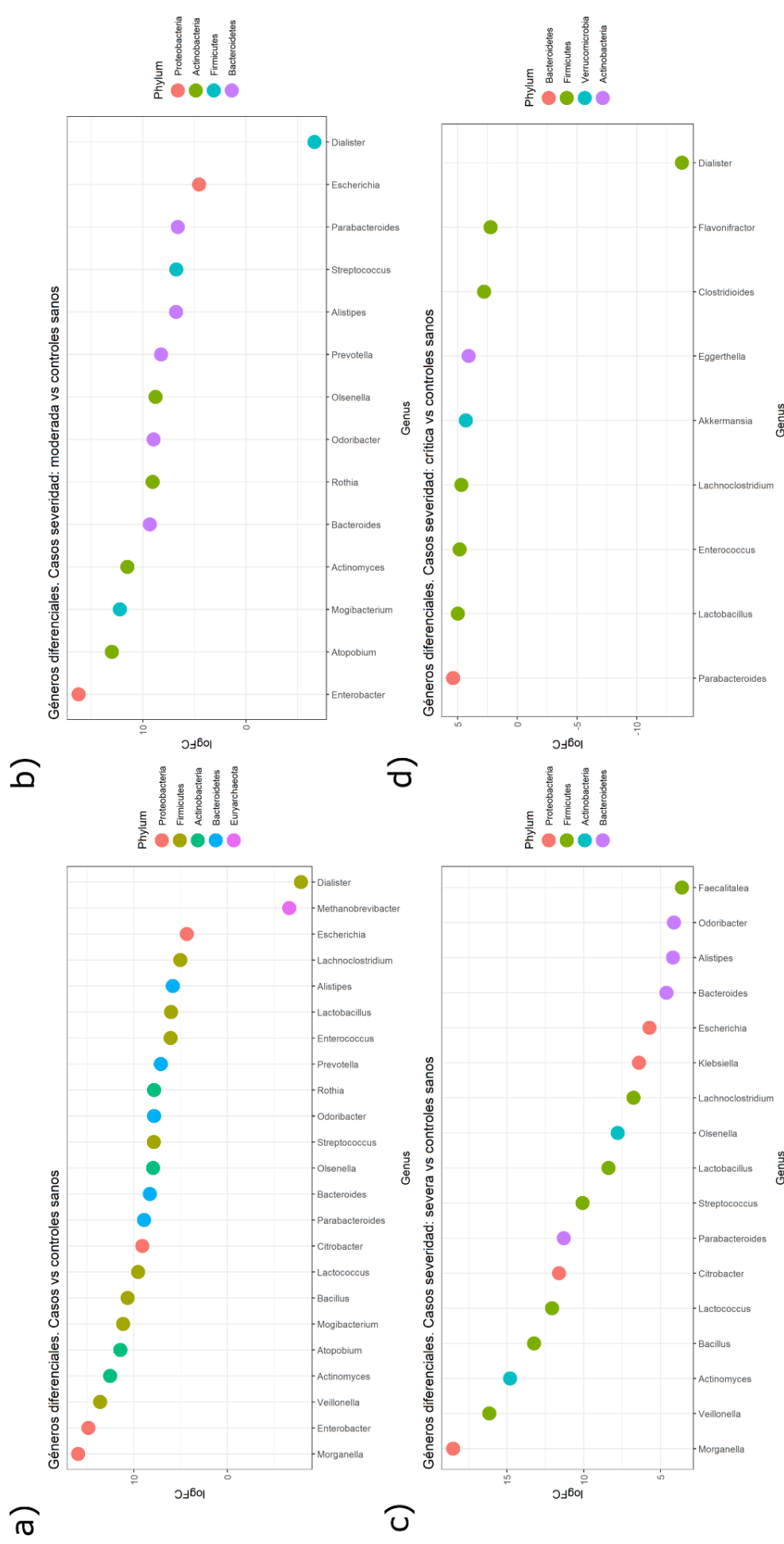


Figura 10. Gráficas de puntos para representar géneros diferencialmente abundantes para diferentes comparaciones entre grupos de estudio. Log FC indica cuántas veces más (número positivo) o menos (número negativo) abundante es un género para un grupo en comparación al otro. La figura está dividida de acuerdo a las siguientes comparaciones a) casos vs controles sanos b) casos: severidad moderada vs controles sanos c) casos: severidad severa vs controles sanos d) casos: severidad crítica vs controles sanos .

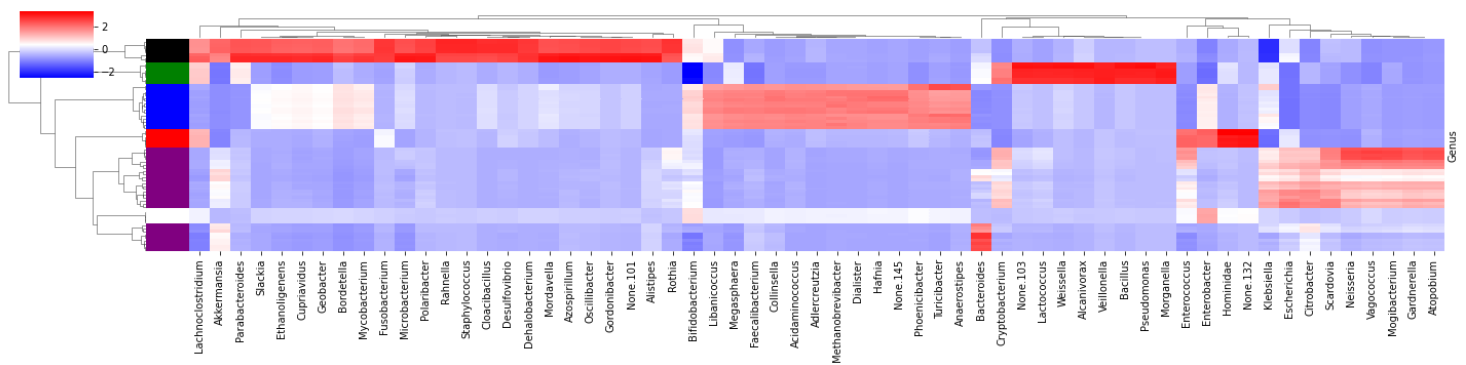


Figura 11. Mapa de calor de los datos de pacientes con COVID-19. Se compararon los siguientes grupos de estudio: controles sanos, pacientes con COVID-19 y con neumonía no relacionada a COVID-19. Los colores en la columna izquierda representan a los grupos de estudio de la siguiente manera: negro: pacientes con COVID-19 con severidad crítica, verde: pacientes con COVID-19 con severidad severa, morado: pacientes con COVID-19 con severidad moderada, azul: controles sanos, rojo: controles con neumonía no relacionada a COVID-19.

11.1.3.2 Análisis de reducción de dimensionalidad e imputación

En la secuenciación metagenómica masiva se obtiene información de múltiples microorganismos al mismo tiempo para conocer principalmente la diversidad entre muestras de un ambiente determinado. Como resultado, se obtiene una gran cantidad de datos que corresponden a secuencias de una bacteria específica, por lo tanto, el número de características de las muestras en una población es mucho mayor al número de muestras, lo que refiere a que los datos tienen una alta dimensionalidad. En general, esta situación dificulta la interpretación de los datos debido a la alta cantidad de ruido entre secuencias encontradas y la alta redundancia por la presencia de ceros en la matriz de conteo.

En nuestro laboratorio en RAI-INMEGEN desarrollamos un algoritmo denominado mb-PHENIX, que a partir de imputación puede disminuir el ruido en la matriz de abundancias mediante el uso del espacio sUMAP (*supervised Uniform Manifold Approximation Projection*) (Padron-Manrique et al., 2022). Este algoritmo, partiendo desde datos con alta dimensionalidad (con muchos atributos) como en la microbiota intestinal, es capaz de disminuir las dimensiones conservando la estructura de los datos y facilitando su análisis. Como resultado, mb-PHENIX es capaz de distinguir microorganismos diferencialmente abundantes entre grupos de estudio. Este análisis en comparación al realizado con edgeR, compara todos los grupos de estudio y determina cuáles son las bacterias diferenciales para cada grupo en comparación a los demás. En la Figura 11 podemos observar un mapa de calor con la información de los datos de abundancia después del análisis con mb-PHENIX. Observamos distintas agrupaciones que son

particulares a cada grupo de estudio, y en el caso de los pacientes con COVID-19 a cada severidad. Para la severidad crítica se encontraron 26 géneros diferencialmente abundantes positivamente para la severidad crítica, 8 en severa, 12 en moderada, 3 en controles con neumonía y 11 para los controles sanos. Al comparar las bacterias que resultaron diferencialmente abundantes entre los dos métodos podemos observar que existen coincidencias entre los dos métodos, por ejemplo, *Parabacteroides* para los pacientes con severidad crítica, *Veillonella* para severa, *Mogibacterium* para moderada. Por otro lado, se identificaron diferentes géneros con mb-PHENIX dentro de los que destacan por tener un reporte asociado a COVID-19 en la literatura. En la Tabla 5 se encuentran algunos reportes de estos géneros en relación al tipo de muestra de esta enfermedad.

Tabla 4. Géneros diferencialmente abundantes obtenidos con el análisis de reducción de dimensiones para los pacientes con COVID-19 con severidad crítica.

Género	Tipo de muestra	Población	Referencia
<i>Lachnoclostridium</i>	Fecal	China	(Y.-Z. Wang, n.d.)
<i>Akkermansia</i>	Fecal	China	(Aggarwal et al., 2022)
<i>Parabacteroides</i>	Fecal	India	(Khan et al., 2021)
<i>Slackia</i>	Aguas negras	Estados Unidos	(Brumfield et al., 2022)
<i>Cupriavidus</i>	Sanguínea	Alemania	(Kattner, 2023)
<i>Bordetella</i>	Sanguínea	Bélgica	(Chahi et al., 2023)
<i>Mycobacterium</i>	Fecal	India	(Prasad et al., 2022)
<i>Fusobacterium</i>	Nasofaríngeo	Italiana	(Nardelli et al., 2021)
<i>Microbacterium</i>	Nasofaríngeo	Arabia Saudita	(Yasir et al., 2023)
<i>Rahnella</i>	Esputo	Estados Unidos	(Kang et al., 2020)
<i>Staphylococcus</i>	Fecal	Alemania	(Maurer et al., 2022)
<i>Oscillibacter</i>	Fecal	Varios	(Nagata et al., 2023)
<i>Gordonibacter</i>	Fecal	Estados Unidos	(Lai et al., 2022)
<i>Alistipes</i>	Fecal	Europea	(Schult et al., 2022)
<i>Rothia</i>	Fecal	China	(Giannos & Prokopidis, 2022)

11.2 Modelado computacional del metabolismo de la microbiota intestinal.

El estudio del metabolismo de comunidades microbianas ha cobrado importancia en los últimos tiempos, ya que se ha encontrado su participación en el desarrollo de algunas enfermedades complejas como la diabetes tipo 2, el cáncer, y la COVID-19. Ante la alta cantidad de información que se ha formado por el uso de nuevas tecnologías de secuenciación y ómicas, ahora es posible estudiar la contribución de las comunidades microbianas y su relación con el hospedero, por ejemplo, para conocer las interacciones microbio-microbio que permiten encontrar la funcionalidad en el metabolismo a nivel de la comunidad microbiana. En las siguientes secciones presentaremos un estudio de la actividad metabólica de pacientes COVID-19 y controles en la cohorte seleccionada. El objetivo aquí será explorar si podemos sugerir cambios en el metabolismo y bacterias que potencialmente se encuentran alterados en los fenotipos asociados a los pacientes COVID-19 respecto a los controles.

11.2.1 Análisis de interacciones de competencia o cooperación

Una manera de conocer las diferencias en el metabolismo de comunidades microbianas es mediante la comparación de la producción o consumo de metabolitos para obtener una imagen de los cambios en el metabolismo debido a un fenotipo. Adicionalmente, la importancia del estudio de las interacciones metabólicas en una comunidad se encuentra en que podemos encontrar fenotipos relacionados a un patrón de interacciones específico (Ponomarova & Patil, 2015).

En este proyecto para investigar el rol metabólico de la microbiota intestinal en el desarrollo de COVID-19 utilizamos datos metagenómicos, que en combinación con MICOM se pudo realizar la predicción de interacciones metabólicas ya sea de competencia o cooperación entre la comunidad de bacterias en cada individuo. Este estudio nos permite entender la dependencia de un microbio ante otro y definir a nivel sistémico la actividad de la microbiota intestinal. La predicción de las interacciones metabólicas se realiza en pares de bacterias, de manera que determina los cambios en el crecimiento de un microorganismo cuando se elimina el otro. Si el crecimiento aumenta podemos decir que se trataba de una relación de competencia, en cambio si el crecimiento disminuye se trataba de cooperativismo. Con la finalidad de representar estas interacciones de forma conjunta, utilizaremos una notación de redes. En estas redes los nodos corresponden a especies, miembros de la microbiota

intestinal, y las líneas que hay entre ellos son el tipo de interacción (competitivas o cooperativas).

En general, logramos observar que las comunidades microbianas para los pacientes con COVID-19 en comparación con los controles sanos tienen una tendencia similar en la presencia de interacciones de competencia, mientras que para cooperación los controles sanos tienen una cantidad significativamente estadística mayor. Lo anterior se puede observar en las figuras 12 y 13 donde se representaron los datos de la normalización de los números de interacciones positivas y negativas que corresponden a cooperación y competencia respectivamente. Así también, se realizó la prueba estadística T de estudiante entre los grupos de estudio para encontrar diferencias significativas entre los grupos de estudio.

Con esta información, podemos destacar que existe mayor presencia de interacciones positivas en controles sanos que en pacientes con COVID-19, lo cual nos indica que existe mayor probabilidad en comunidades microbianas en la población sana hacia la cooperación (Machado et al., 2021). en cambio en interacciones negativas, se observó una tendencia similar a la de los controles sanos. La proporción de las interacciones competitivas similar a los controles sanos nos da información de que predominan las interacciones negativas en los pacientes con COVID-19, esto indica que existe mayor probabilidad de que las comunidades microbianas en un contexto de enfermedad por SARS-CoV-2 se polaricen hacia interacciones negativas.

Con respecto a las interacciones en la microbiota intestinal para los pacientes con neumonía no asociada a COVID-19, se puede observar que las positivas se encuentran en la misma proporción que los individuos sanos. Mientras que en las negativas se observa una proporción significativamente mayor en comparación a los otros grupos de estudio. De modo que, los pacientes con neumonía mostraron una mayor cantidad de interacciones tanto competitivas como cooperativas en comparación a los pacientes con COVID-19. Además, en la figura 8 observamos que existe una mayor diversidad de bacterias en este grupo de estudio en comparación a los casos, lo que podría aumentar las interacciones entre los miembros de la microbiota intestinal para las personas con neumonía. Por último, esta información nos sugiere que la dinámica de interacciones en este grupo de estudio es diferente a la de los pacientes con COVID-19.

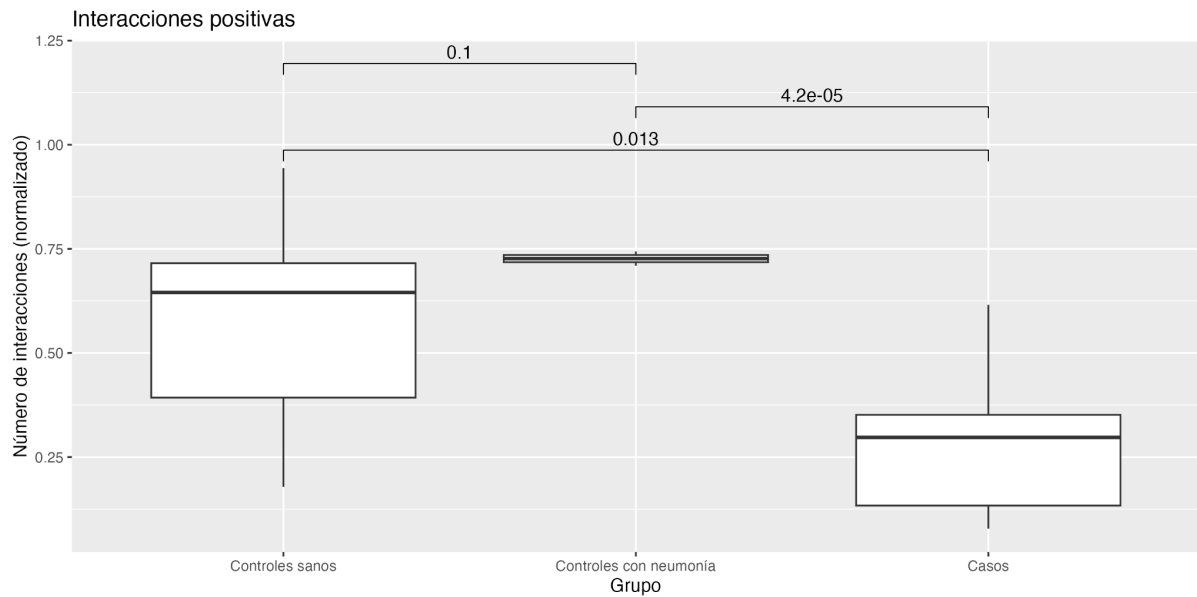


Figura 12. Proporción de interacciones positivas o de cooperación para cada grupo de estudio. Los datos fueron normalizados siguiendo la normalización mínima - máxima. Se utilizó el método estadístico T de estudiante para encontrar diferencias entre la proporción de interacciones entre grupos de estudio.

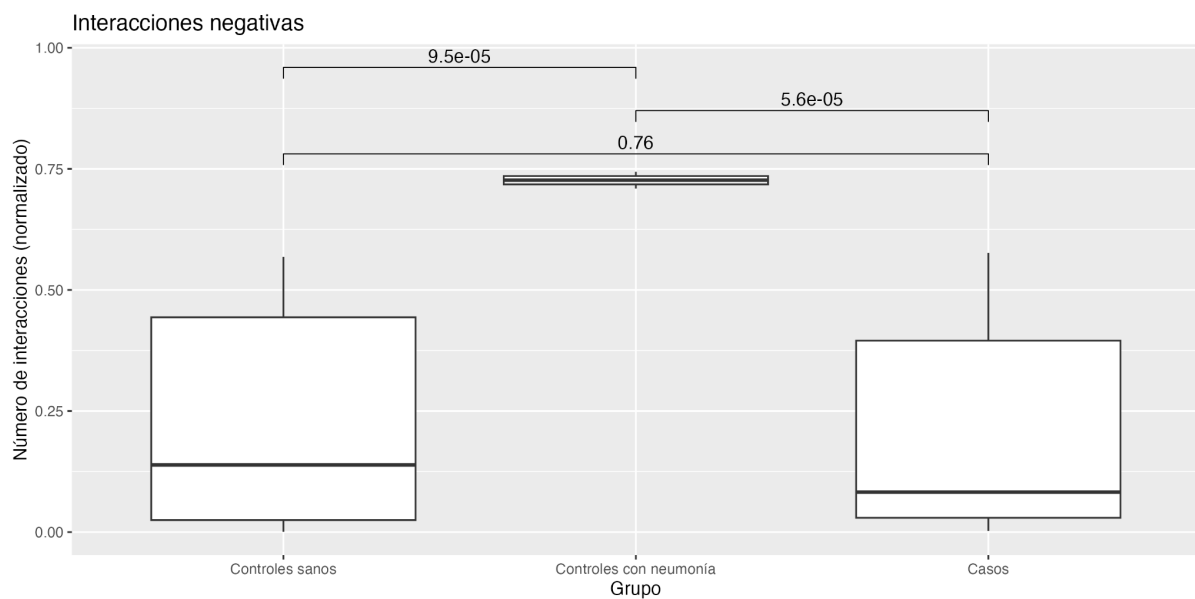


Figura 13. Proporción de interacciones negativas o de competencia para cada grupo de estudio. Los datos fueron normalizados siguiendo la normalización mínima - máxima. Se utilizó el método estadístico T de estudiante para encontrar diferencias entre la proporción de interacciones entre grupos de estudio.

En la figura 14 se presentan las redes metabólicas obtenidas en diferentes días de hospitalización del paciente 1 con severidad crítica y sin consumo de antibióticos. Para este paciente concluimos que existe una tendencia al aumento de interacciones cooperativas en comparación a las interacciones de competencia conforme el paciente recuperaba su salud. Sin embargo, este no fue un patrón repetido en otros pacientes. Por ejemplo, el paciente 3 (figura 15) tuvo una cantidad menor de interacciones cooperativas que competitivas en el curso de su hospitalización. Curiosamente, en el tratamiento del paciente 3 hubo consumo de antibióticos, contrario al paciente 1. Con esta información realizamos el análisis de las interacciones en las demás muestras (figura 16), pero no fueron identificadas tendencias en el uso de antibióticos y el aumento o disminución de interacciones competitivas o cooperativas. De manera que concluimos en diferentes aspectos.

Primero, nuestro análisis permitió identificar cierta particularidad en la actividad metabólica de la microbiota de los pacientes. Esto consecuencia del tratamiento utilizado, principalmente si consumían o no antibióticos. Segundo, resulta necesario aumentar la cantidad de muestras y tener datos clínicos de mayor profundidad para observar detalladamente las diferencias en las interacciones entre los grupos de estudio.

Adicionalmente, en las redes metabólicas se pudieron observar nodos con alta conectividad, que corresponden a especies con alta cantidad de interacciones principalmente de competencia. Interesantemente observamos la presencia de estas especies mayoritariamente en pacientes con COVID-19, algunas de estas fueron identificadas como especies diferencialmente abundantes en los estudios anteriores, por ejemplo, para la severidad crítica fueron encontrados las especies *Akkermansia muciniphila*, *Lactobacillus salivarius*, *Parabacterioides distasoiris*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, y *Staphylococcus epidermis*. Mientras que para la severidad severa fueron identificadas las especies: *Veillonella parvula*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacteroides ovatus* y *Bacteroides fragilis*. Además para los pacientes con severidad moderada destacaron las especies *Bacteroides vulgatus*, *Clostridium bolteae*, *Streptococcus parasanguis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecium* y *Faecalibacterium prausni*.

A manera de conclusión, las redes metabólicas obtenidas en este trabajo muestran tendencias hacia la presencia de interacciones competitivas para los casos en comparación a los controles sanos que cuentan con una mayor cantidad de interacciones cooperativas que competitivas. Sin embargo, debido al bajo número de muestras en cada grupo y condición, no se pudieron observar tendencias relacionadas a un fenotipo en específico, por ejemplo, en el uso de antibióticos, o entre fenotipos de severidad de la enfermedad. La heterogeneidad en las interacciones fue evidente. Sin embargo, logramos determinar que

existe una tendencia en los pacientes con COVID-19 a la formación de interacciones negativas o de competencia

Esto nos llevó a postular que probablemente el estado de salud está relacionado con un balance entre competencia y cooperatividad en las comunidades microbianas. El desequilibrio en este balance es capaz de modificar el metabolismo de la comunidad dando como resultado la producción de metabolitos que favorezcan el crecimiento de bacterias patógenas. Este desequilibrio se puede observar en la microbiota intestinal de pacientes con COVID-19 o por la injerencia de antibióticos.

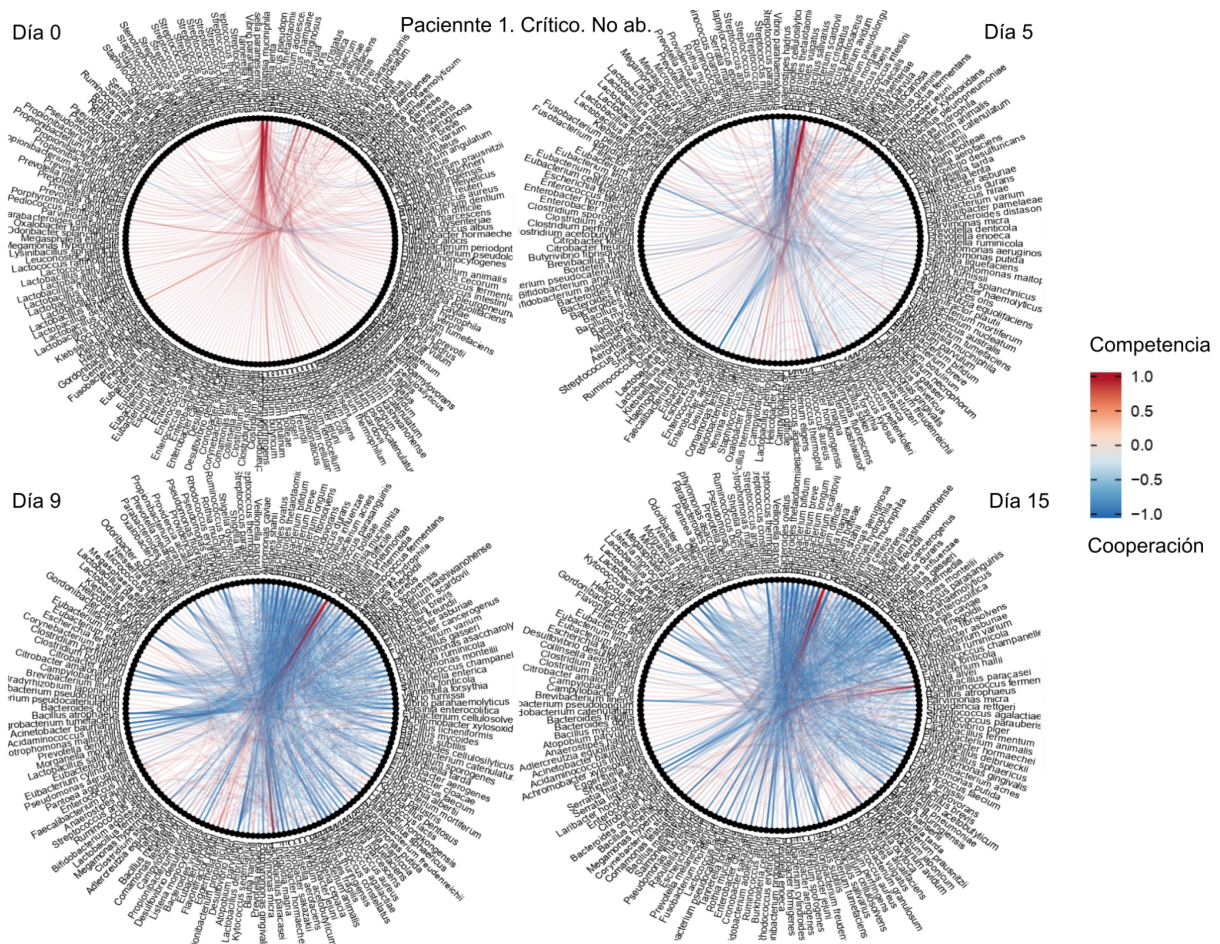
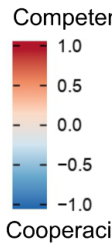
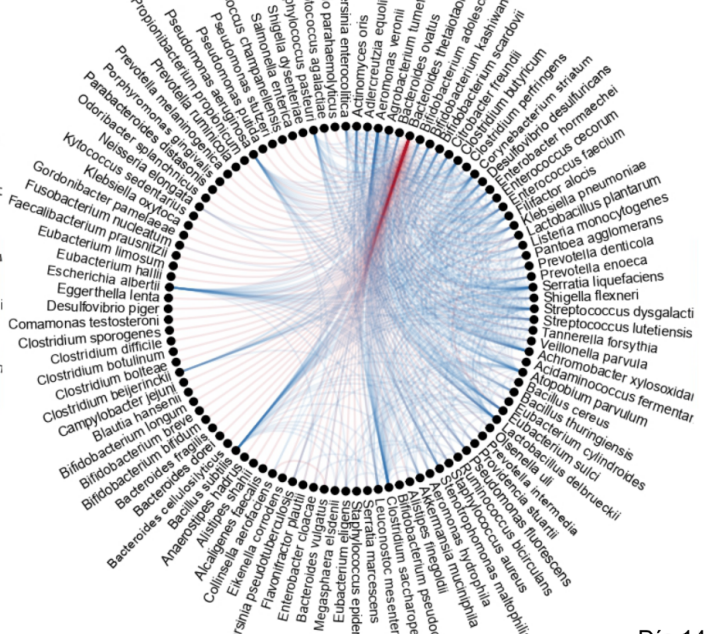


Figura 14. Redes de interacción metabólica del paciente 1. Cade red corresponde a un diferente día de toma de muestra durante la hospitalización.

Día 0

Paciente 3. Crítico. Ab

Día 3



Día 14

Día 4

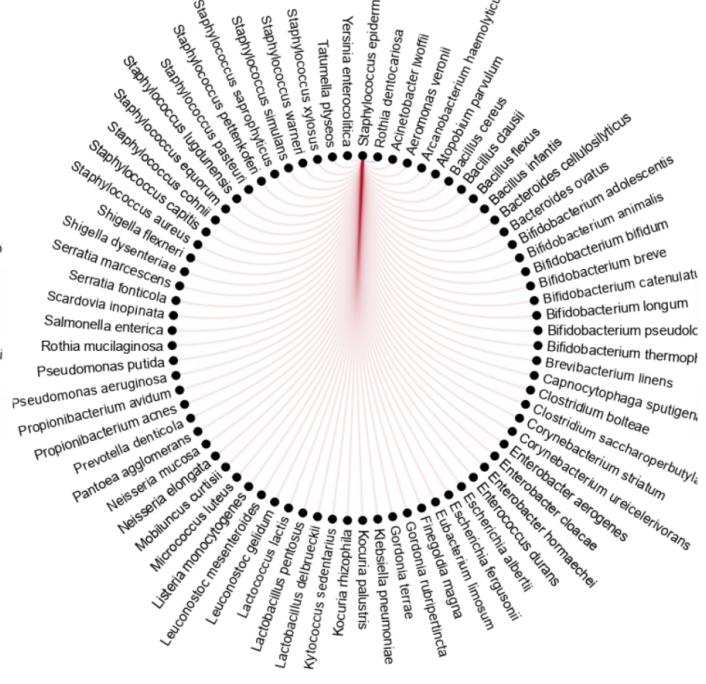
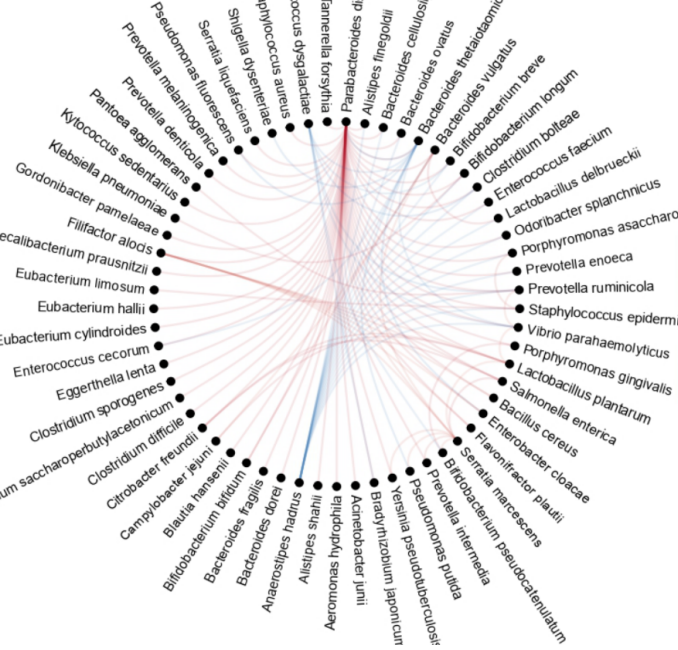


Figura 15. Redes de interacción metabólica del paciente 3. Cada red corresponde a un diferente día de toma de muestra durante la hospitalización.

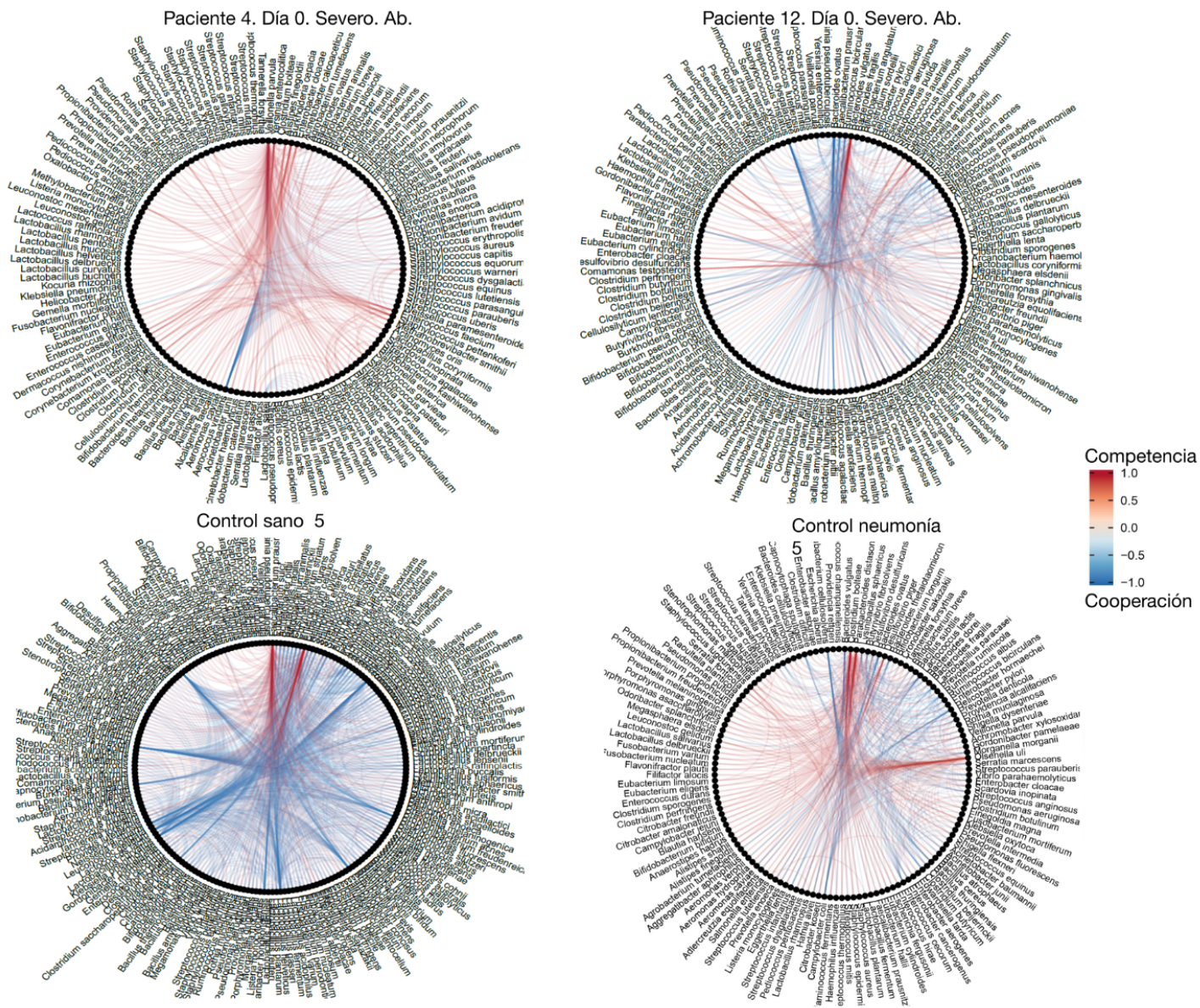


Figura 16. Redes de interacción metabólica del paciente 1. Cade red corresponde a un diferente día de toma de muestra durante la hospitalización.

11.2.2 Flujos netos de exportación de ácidos grasos de cadena corta

Con el objetivo de entender el funcionamiento y el intercambio de metabolitos que existen en la comunidad, específicamente hacia el exterior, elegimos evaluar la producción de los ácidos grasos de cadena corta en cada paciente de la cohorte. Se eligieron estos compuestos (específicamente acetato, propionato y butirato) debido a su importancia para la comunidad y para el hospedero, los cuales se sabe la relevancia de función en el estado de bienestar del paciente (Martínez-López et al., 2022). Se sabe que estos ácidos son los productos primarios de la fermentación de carbohidratos no digeribles que la microbiota intestinal consume. Por lo tanto, representan el mayor flujo de carbono de la dieta desde la microbiota hacia el hospedero. También, se ha encontrado que estos compuestos son ligandos naturales de receptores de ácidos grasos 2 y 3 FFAR2 y FFAR3 que se encuentran altamente expresados en enterocitos.

Se estudió principalmente la producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) para los grupos control sano y pacientes con COVID-19. En el diseño de este análisis no se incluyó al grupo con neumonía debido a la naturaleza compleja de la enfermedad, la cual es caracterizada por la acumulación de microorganismos en los pulmones lo que lleva a una respuesta inflamatoria y posteriormente dificultad en la respiración. En comparación con COVID-19, el diagnóstico de neumonía está limitado a la observación de daño en el tejido pulmonar (NICE, 2022). Sobre cambios en el metabolismo, existen diversos estudios que apoyan la hipótesis de la producción de ácidos grasos de cadena corta, en especial de butirato, en el desarrollo de la COVID-19 (Martín Giménez et al., 2023; Nabizadeh et al., 2023; Włodarczyk et al., 2022). Mientras que para neumonía se han reportado que existen alteraciones en la concentración de diferentes metabolitos en función del patógeno asociado a la enfermedad (Den Hartog et al., 2023).

Nuestro análisis con MICOM en la producción de AGCC nos llevó a resaltar las siguientes observaciones. Primero, observamos que el flujo de exportación para butirato fue menor en el grupo de pacientes COVID-19 críticos y moderados que los controles sanos (figuras 16 y 17). Este cambio no fue observable en otros ácidos grasos de cadena corta como acetato y propionato (figuras 18 y 19) para los pacientes con severidad moderada en comparación con los controles sanos.

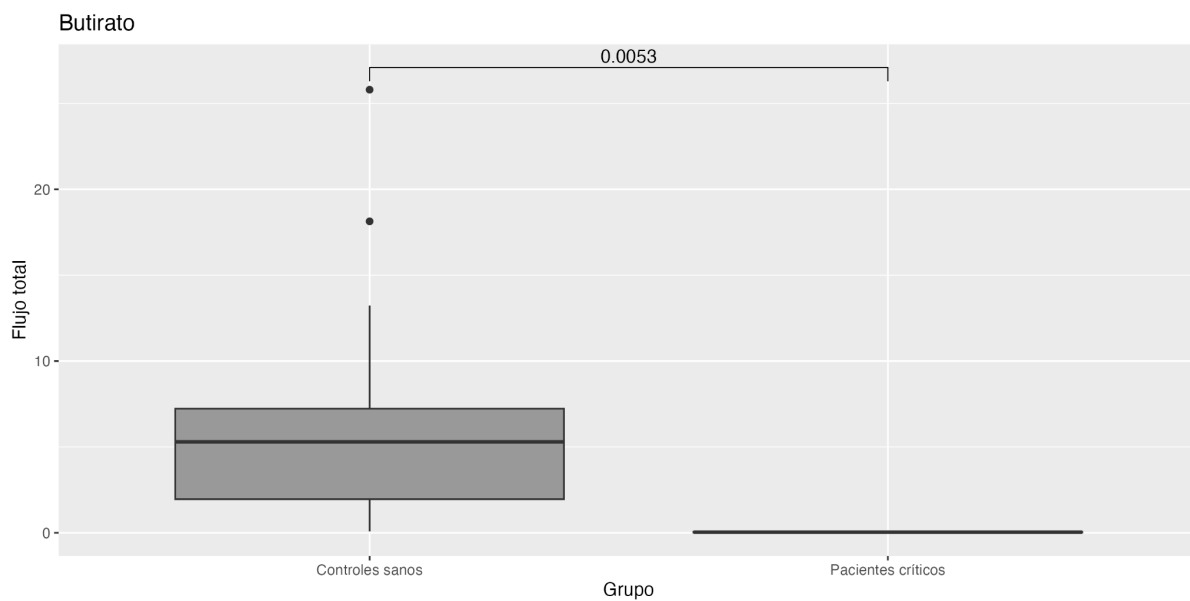


Figura 16. Flujos netos de producción de butirato para los pacientes críticos. Se realizó la prueba de T de estudiante para determinar las diferencias entre los dos grupos de estudio.

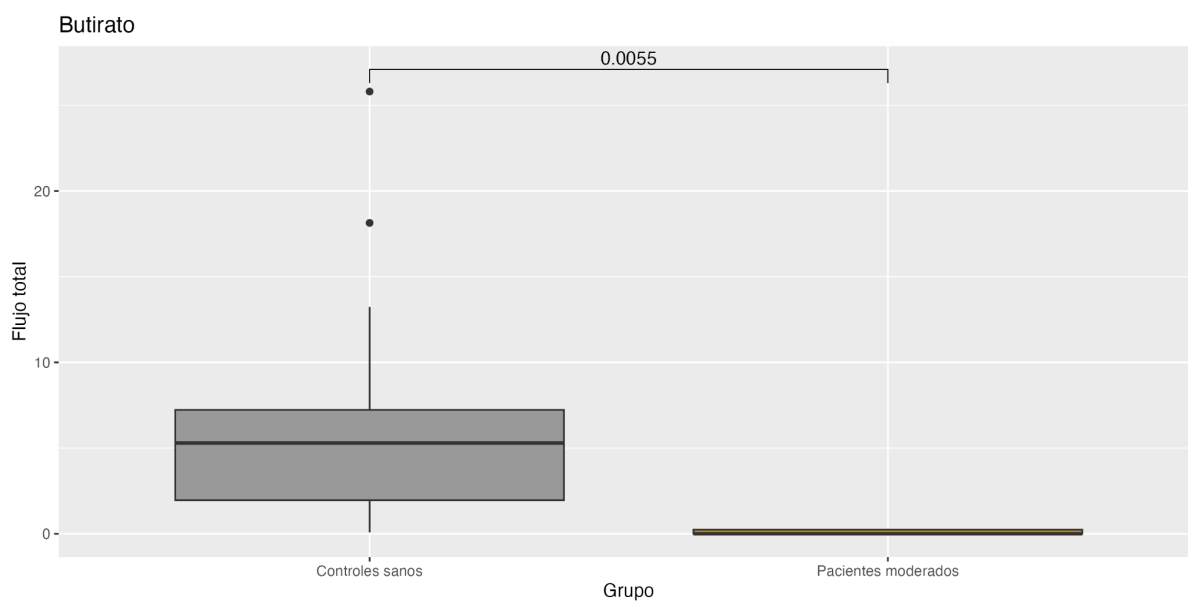


Figura 17. Flujos netos de producción de butirato para el grupo moderado. Se realizó la prueba de T de estudiante para determinar las diferencias entre los dos grupos de estudio.

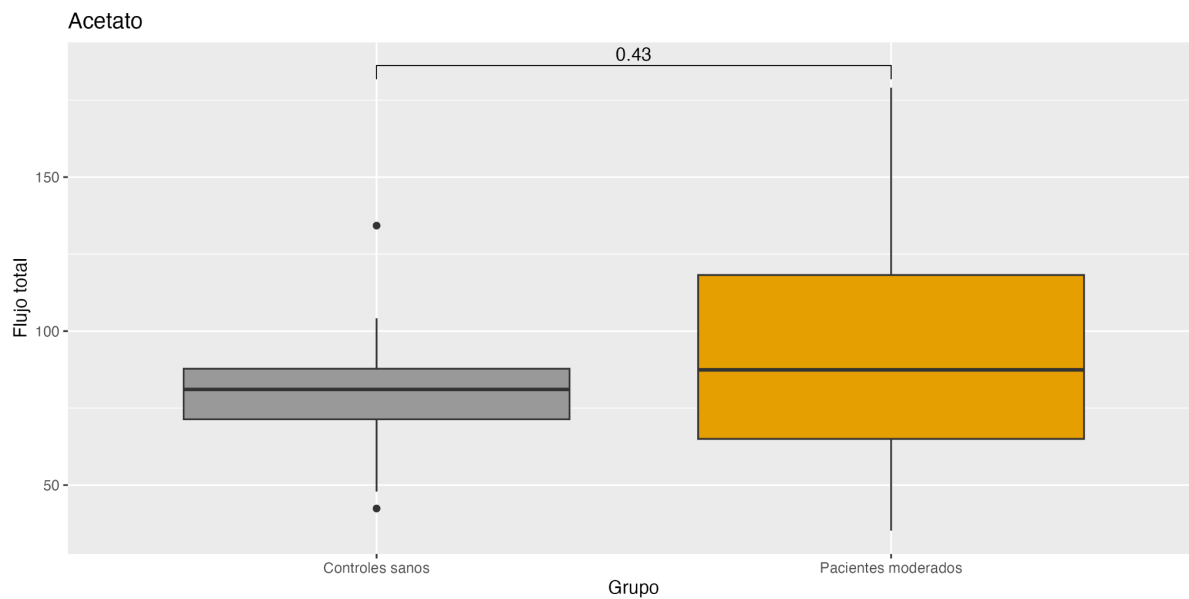


Figura 18. Flujos netos de producción de acetato para pacientes con severidad moderada. Se realizó la prueba de T de estudiante para determinar las diferencias entre los dos grupos de estudio.

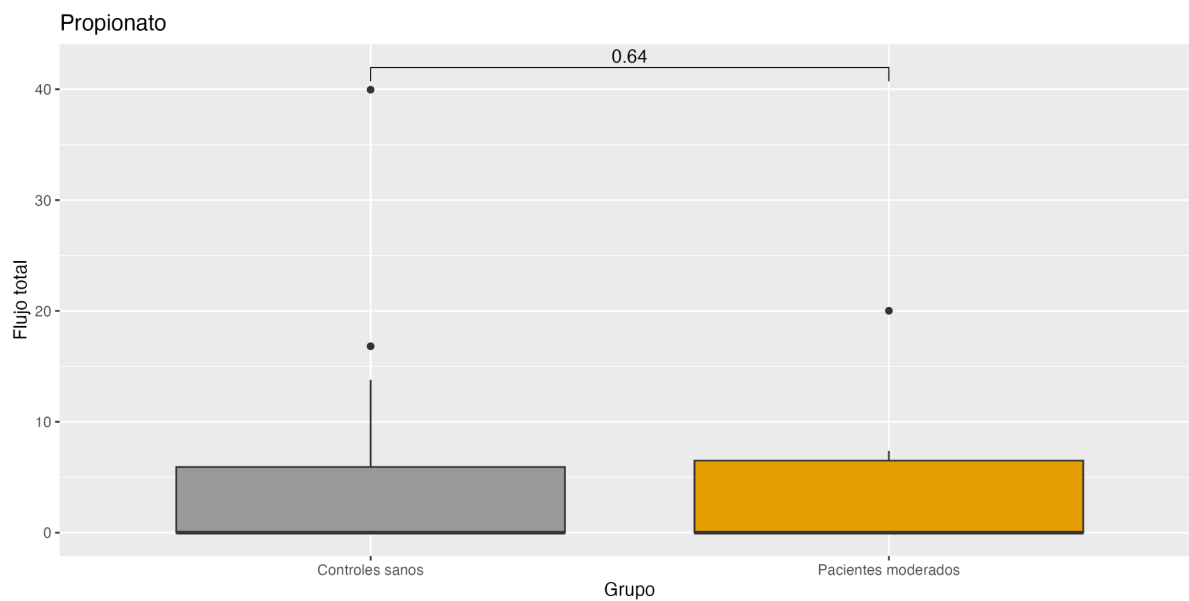


Figura 19. Flujos netos de producción de propionato para pacientes con severidad moderada. Se realizó la prueba de T de estudiante para determinar las diferencias entre los dos grupos de estudio.

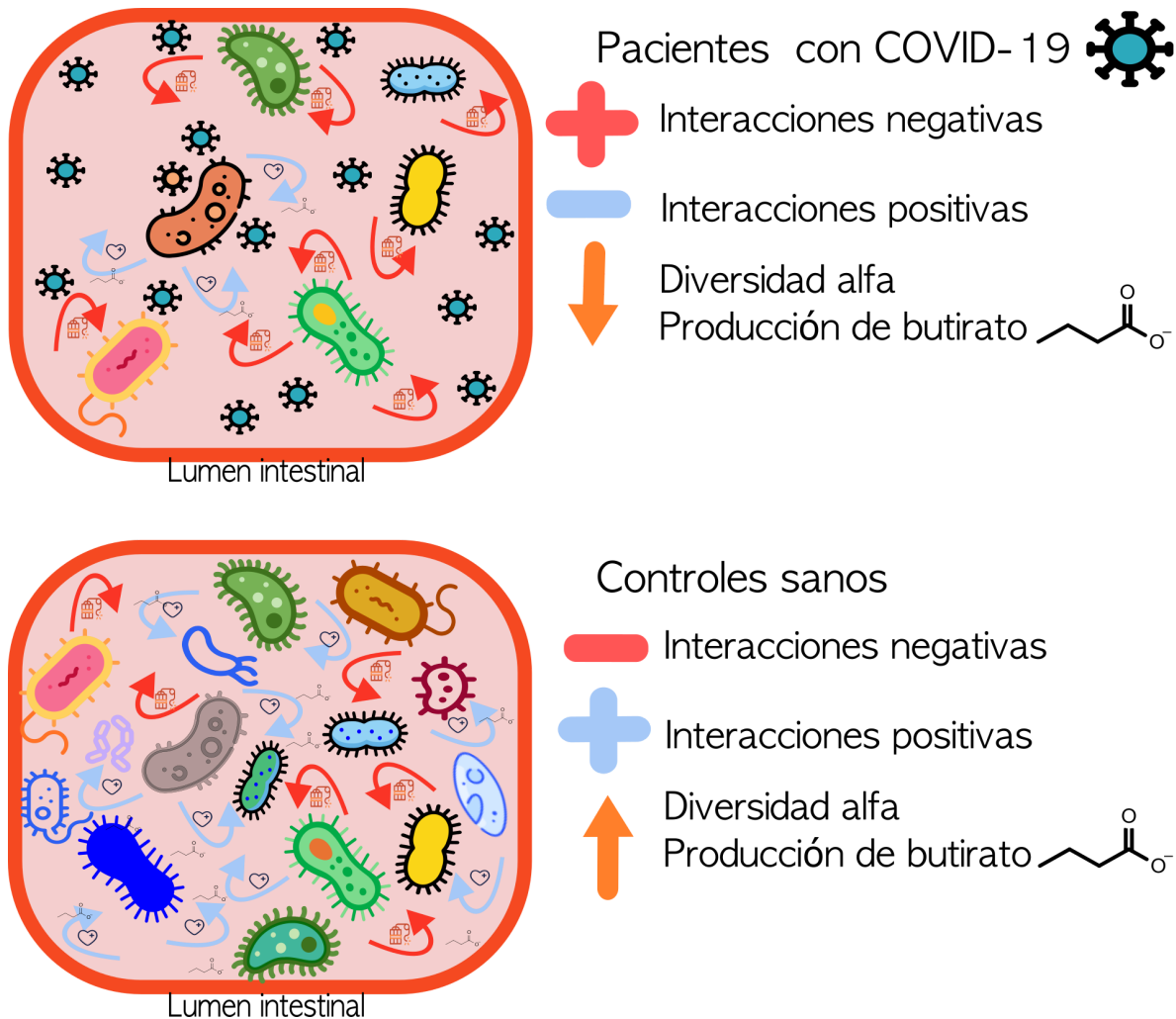


Figura 21. Resumen de los principales resultados obtenidos en este estudio. Sugerimos que cuando una persona tiene COVID-19, tiene mayor probabilidad de tener más interacciones negativas en su microbiota intestinal en comparación a una persona sana. Además, lo anterior podría dar resultado a una menor producción de butirato, un compuesto importante que guarda el equilibrio en la relación hospedero-microbiota.

12 Discusión

En este proyecto se realizó el modelado de la microbiota intestinal de pacientes con COVID-19. El proyecto discurrió al inicio de la pandemia en 2020, y los únicos datos disponibles de microbiota intestinal, que principalmente sustentan los resultados de esta tesis, fueron en población China. El proyecto se dividió en dos partes, la primera con un enfoque clásico para el estudio de la ecología microbiana para determinar qué géneros se encuentran predominantes en un determinado estado. Mientras que la segunda parte consistió en el análisis funcional con el modelado metabólico. Los análisis de diversidad arrojaron que existe menor diversidad en los pacientes con COVID-19 en comparación a los otros grupos controles (sanos y con neumonía). A diferencia del estudio realizado por Zuo et al., en este proyecto nos enfocamos en entender la estructura de las comunidades microbianas para entender a nivel funcional las interacciones y la producción

de metabolitos de interés en el desarrollo de la enfermedad. Un resumen de los resultados más importantes encontrados en el estudio se encuentra en la figura 21.

Es importante destacar que las comorbilidades (diabetes, obesidad, falla renal entre otros) en los pacientes pudieron ser un factor que apoya al desarrollo de la enfermedad como ha sido reportado por (Russell et al., 2023), así como de otros estudios donde sugieren que existe una asociación indefinida entre la presencia de comorbilidades, la severidad de COVID-19 y la mortalidad (Ambikan et al., 2022). De esta manera, en nuestro estudio dentro de la población encontramos que algunos pacientes con comorbilidades tenían severidad moderada, en comparación con otros pacientes aparentemente sin comorbilidades que contaban con severidad crítica. Por lo tanto, consideramos que es necesario contemplar un grupo de estudio más grande y con mayor número de datos clínicos para entender el efecto de las comorbilidades en el desarrollo de la enfermedad.

Se han unificado esfuerzos para entender la participación de la microbiota intestinal en el desarrollo de la enfermedad causada por SARS-CoV-2. Por ejemplo, un estudio realizado en población china en 47 pacientes con COVID-19 no reportó diferencias estadísticamente significativas en la composición de su microbiota intestinal en comparación a los controles sanos, sin embargo, los autores reportaron que los pacientes con COVID-19 tenían una cantidad menor de especies (Li et al., 2022). Otro reporte realizado en población china encontró que la diversidad alfa medida con los índices Simpson y Shannon de la microbiota intestinal del grupo con COVID-19 se encuentra disminuida en comparación al grupo control sano (Cui et al., 2022).

Otro estudio realizado en 51 pacientes chinos con COVID-19 durante su hospitalización encontró que los pacientes con severidad moderada y crítica tienen significativamente menor diversidad que los controles sanos. Respecto al uso de antibióticos, reportaron que no existen diferencias entre pacientes con severidad alta que consumieron antibióticos con respecto a los que no (Wu et al., 2021). En otro estudio realizado en población francesa con 55 pacientes de edad avanzada con COVID-19, se encontró que 65% tuvo una pérdida en la diversidad bacteriana (Cervino et al., 2022).

En pacientes noruegos encontraron que la diversidad beta o la composición global de la microbiota se encontraba alterada en pacientes con COVID-19. Además, los investigadores reportaron que el efecto de los antibióticos no se pudo observar y no observaron diferencias en la estructura de la comunidad microbiana para pacientes que consumieron y no consumieron antibióticos durante su tratamiento. (Vestad et al., 2022) En este estudio se

observó que después de 3 meses después de su hospitalización los pacientes tuvieron una diversidad alfa menor en comparación con los controles sanos.

De acuerdo a los estudios anteriores, no existe una asociación clara entre el uso de antibióticos y cambios en la composición de la microbiota intestinal de pacientes con COVID-19 en comparación a controles sanos, al menos para las poblaciones reportadas, incluyendo el grupo de estudio utilizado en este proyecto. Sin embargo, los reportes señalan que existe un cambio en la estructura de la comunidad microbiana, cuando existe un fenotipo de COVID-19 y este es más evidente en pacientes al aumentar la severidad de la enfermedad.

Los géneros identificados mediante el análisis diferencial de abundancias y los reportes anteriores en otros estudios, son valiosos para determinar cuáles son las bacterias que posiblemente participan en el desarrollo de la enfermedad. Aunque esta información resulta importante, no nos ayuda a describir la funcionalidad de la comunidad, dejando interrogantes sobre el efecto del aumento o disminución de cierta bacteria en la relación microbiota - hospedero. Por ello, resulta importante conocer el mecanismo por el cual distintas perturbaciones son capaces de modificar la dinámica de la microbiota y por lo tanto tener impacto en el hospedero. En este sentido, algunos estudios han realizado análisis funcionales para determinar los cambios en el metabolismo de la comunidad microbiana intestinal por medio de pruebas de enriquecimiento a partir de secuencias metagenómicas con diferentes resultados, por ejemplo, se ha identificado disminución en la producción de AGCC y L-isoleucina y aumento en la producción de urea, también fueron reportadas alteraciones en el metabolismo de carbohidratos y la biosíntesis de aminoácidos (B. Zhou et al., 2023). En este proyecto para abordar el estudio de la funcionalidad de la comunidad microbiana se optó por una perspectiva desde la biología de sistemas mediante el uso de modelado de sistemas microbianos con reconstrucciones genómicas que nos permite entender el papel del metabolismo en una comunidad microbiana a mayor detalle, al tomar en cuenta las interacciones y la capacidad de la comunidad de producir o consumir diferentes metabolitos que podrían tener impacto al hospedero.

El estudio de las interacciones entre miembros de una comunidad microbiana tiene un gran potencial para revelar información sobre la funcionalidad de los sistemas biológicos. Una reciente investigación con información de reconstrucciones metagenómicas sobre estas interacciones ha arrojado que existe polarización en las comunidades microbianas ya sea hacia competencia o cooperación (Machado et al., 2021). Esto resulta interesante para nuestro estudio metabólico donde observamos polarización en diferentes muestras de pacientes con COVID-19, especialmente para competencia. Además, los investigadores

reportan que una comunidad microbiana con mayor cantidad de interacciones de competencia se puede alterar fácilmente al modificar los metabolitos presentes en el ambiente, mientras que, en cooperación se modifica por el cambio en los miembros de la comunidad.

Se ha reportado que la alimentación cruzada es uno de los mecanismos por los cuales se favorece la formación de interacciones positivas o de cooperación en una comunidad microbiana (Culp & Goodman, 2023). En este contexto y de acuerdo a la disminución de la cooperación observada en el microbioma de pacientes con COVID-19 en comparación con los controles sanos, podemos proponer que la disminución en este tipo de interacciones es capaz de modificar el metabolismo primario de polisacáridos y oligosacáridos. Esto puede desencadenar efectos posteriores a otros niveles tróficos, por ejemplo, en la producción de metabolitos intermediarios que pueden utilizar otros miembros de la comunidad para producir ácidos grasos de cadena corta. En cambio, cuando existe una mayor cantidad de interacciones competitivas, disminuyen la alimentación cruzada y por lo tanto la producción de metabolitos que se podría considerar de importancia para la comunidad y por lo tanto favorecer el crecimiento de una bacteria o de un grupo de bacterias que pueden tener un impacto negativo en el hospedero.

Otro estudio realizado experimentalmente con consorcios bacterianos mediante técnicas de microfluídica reportaron que el efecto que rige en una comunidad microbiana es el de el miembro más fuerte, al menos para las interacciones negativas o competencia (Baichman-Kass et al., 2023). Este estudio representa uno de los primeros esfuerzos experimentales para entender el mecanismo por el cual las interacciones se dan en una comunidad microbiana. En esta misma línea, en nuestra investigación en las redes metabólicas de interacción fueron encontradas varias especies con alta conectividad, que corresponden a la descripción del miembro más fuerte, es decir que sus interacciones predominan en comparación a las demás del miembro de la comunidad.

Dentro de las especies encontradas como nodos conductores y que fueron identificados como miembros de los géneros diferencialmente abundantes se encuentra *Akkermansia muciniphila*, esta bacteria ha sido ampliamente estudiada con efectos positivos en la microbiota intestinal debido a su capacidad de degradar mucinas, pero investigadores hipotetizan que esta bacteria en COVID-19 debido a un ambiente caracterizado por estrés y una dieta alta en grasas y carbohidratos, podría cambiar su fenotipo a inflamatorio (Aggarwal et al., 2022). En este caso, nuestros resultados podrían apoyar esta hipótesis ya que *A. muciniphila* la identificamos como una especie importante en las redes de interacción metabólica de algunos pacientes con severidad crítica y moderada.

Además, otra especie importante fue *Ligilactobacillus salivarius*, la cual fue encontrada con abundancia alta en muestras de microbioma pulmonar de pacientes con COVID-19 en comparación con los controles sanos (Han et al., 2021). Además, los investigadores mencionan que la presencia de *L. salivarius* podría ser una respuesta antiinflamatoria causada por la infección SARS-CoV-2, mediante la producción de ácido láctico. Aunque, los resultados corresponden a muestras pulmonares, se ha propuesto que el eje pulmón-intestino es un medio de comunicación que tiene un papel importante en el desarrollo de COVID-19. Con esta información, más el efecto probiótico reportado de las bacterias lácticas junto a los resultados obtenidos en nuestro proyecto, podemos sugerir que nuestros análisis sostienen el efecto antiinflamatorio de *L. salivarius* reportado por Han et al.

Además *Parabacteroides distasonis*, *Bacteroides thetaiotaomicron* y *Bacteroides fragilis* otras especies encontradas como nodos conductores en el estudio de interacciones metabólicas con MICOM, fueron reportados como productores de derivados de triptófano e indol hacia el intestino, por ejemplo, ácido indol-propiónico, indolacetamida, metil-indol, ácido indolacético, entre otros, los cuales se ha reportado que tienen efecto en el hospedero en la permeabilidad del intestino y la inducción de la respuesta inmune inflamatoria (Hernández-Flores et al., 2022). Además, entre miembros de la comunidad microbiana se ha reportado que promueven la estabilidad de plásmidos, formación de biopelículas, tolerancia a antibióticos, división celular y virulencia. En este sentido, la producción de estos metabolitos podría estar mediando el efecto de competencia en la comunidad al favorecer el crecimiento y proliferación de estas especies bacterianas.

La modelación computacional de la actividad metabólica de la microbiota abre una ventana de oportunidades para determinar el mecanismo por el cual se desarrollan las perturbaciones metabólicas con posibles consecuencias en el hospedero. En relación con esto, se determinaron los flujos netos de producción de ácidos grasos de cadena corta debido (AGCC) a su importancia clínica y su rol en el metabolismo general de la comunidad microbiana (Louis & Flint, 2017). Nuestro estudio concluyó que la disminución en la producción de butirato, un AGCC, está ligada al desarrollo de COVID-19 en diferentes severidades, esto en consistencia a reportes en la literatura, (Włodarczyk et al., 2022). De manera interesante, este resultado concuerda con el hecho de que butirato tiene una alta importancia clínica, ya que la disminución en la concentración de este compuesto se ha visto relacionada al inicio de la tormenta de citocinas, una consecuencia de COVID-19 en su severidad crítica (M. Wang et al., 2023). Además, se han realizado estudios que han

determinado menor cantidad de butirato en circulación en pacientes con COVID-19 en comparación a los controles sanos, (Bi et al., 2022).

Con relación a esto, un estudio realizó el modelado computacional de diferentes células humanas siguiendo un enfoque de reconstrucción de genomas a nivel de metabolismo, encontraron que existen cambios a nivel metabólico en los humanos, especialmente en los transportadores scl... y scl... encargados del transporte de compuestos como el butirato, de acuerdo a esto los investigadores encontraron que el butirato es un compuesto que es esencial para covid-19 capaz de mediar respuesta inmune

De acuerdo a la menor cantidad de interacciones de cooperación encontrada en pacientes con COVID-19 la producción de butirato puede verse modificada negativamente. Como resultado no se promueve la alimentación cruzada entre los miembros de la comunidad, de manera que se favorece las interacciones negativas o de competencia (Culp & Goodman, 2023). Esto puede modificar negativamente la abundancia de las especies productoras de butirato, modificando el flujo de nutrientes en la comunidad. Finalmente, resulta de gran importancia reconocer y estudiar los efectos de los cambios en el metabolismo de la comunidad, debido a que estos pueden ir más allá de la funcionalidad metabólica de la comunidad, si no que también pueden ocasionar cambios en la estructura de la comunidad al promover el crecimiento de especies patógenas mediante la formación de mecanismos que favorezcan su desarrollo, por ejemplo, hacia la producción de un metabolito que puede ser tóxico para otros microorganismos, o al contrario, hacia la creación de tolerancia a ciertos metabolitos posiblemente dañinos a esta especie (Melkonian et al., 2022).

13 Conclusiones

La importancia del estudio del metabolismo de la microbiota intestinal ha incrementado considerablemente debido al avance de las tecnologías masivas de secuenciación, especialmente para encontrar mecanismos de intervención para prevenir o disminuir el riesgo de enfermedad. Con ayuda de métodos de metagenómica y computacionales de modelado metabólico de la microbiota intestinal pudimos identificar cambios en la actividad y estructura metabólica de la comunidad microbiana para pacientes con COVID-19 en comparación a los individuos sanos. También, determinamos bacterias diferencialmente abundantes para cada severidad de la enfermedad. El modelado computacional nos permitió conocer la estructura de las interacciones de competencia y cooperación, la cual nos permitió identificar una tendencia a la polarización hacia

interacciones competitivas, así como la presencia de especies con alta conectividad en las redes de interacción metabólica que fueron identificadas en el análisis diferencial. Con la ayuda de MICOM pudimos predecir que existe una disminución en la producción de butirato a nivel de comunidad en los casos, la cual se ha relacionado previamente al desarrollo de COVID-19.

14 Perspectivas

Finalmente, resulta importante reconocer las futuras direcciones y áreas de oportunidad que nuestro proyecto puede tomar. Primero, aumentar la población de estudio y obtener la información clínica para determinar a mayor detalle el efecto del uso de antibióticos durante el progreso del COVID-19. Segundo, incrementar la cantidad de reconstrucciones del metabolismo a nivel de genoma para realizar una aproximación con un mayor número de integrantes de la microbiota intestinal, en este sentido se ha anunciado el próximo lanzamiento de la base de datos de reconstrucciones genómicas AGORA con más de 7000 especies bacterianas que permitirán cumplir dicha perspectiva (Heinken et al., 2023). Tercero, determinar una mayor cantidad de metabolitos de interés para el hospedero y para los miembros de la comunidad, con la finalidad de entender mejor los cambios metabólicos en el desarrollo de la infección por SARS-CoV-2. Finalmente, es de nuestro interés aplicar este esquema de estudio en el futuro a población Mexicana, la cual no fue posible tener acceso a estas muestras a la fecha. Sin lugar a duda, el estudio de la especificidad en población Mexicana permitirá conocer variaciones relevantes en el comportamiento metabólico de la microbiota intestinal, para caracterizar cómo el SARS-CoV-2 altera específicamente nuestra población. A la fecha, la pandemia por COVID-19 continúa, y aunque ya no se considera como una emergencia mundial los estudios para conocer sus efectos a largo plazo que promueve en el ser humano resultan importantes para la salud pública global.

15 Referencias

- Aggarwal, V., Sunder, S., & Verma, S. R. (2022). Disease-associated dysbiosis and potential therapeutic role of *Akkermansia muciniphila*, a mucus degrading bacteria of gut microbiome. *Folia Microbiologica*, 67(6), 811–824.
<https://doi.org/10.1007/s12223-022-00973-6>
- Aishwarya, S., & Gunasekaran, K. (2022). Meta-analysis of the microbial biomarkers in the gut–lung crosstalk in COVID-19, community-acquired pneumonia and *Clostridium*

difficile infections. *Letters in Applied Microbiology*, 75(5), 1293–1306.

<https://doi.org/10.1111/lam.13798>

Ambikan, A. T., Yang, H., Krishnan, S., Svensson Akusjärvi, S., Gupta, S., Lourda, M., Sperk, M., Arif, M., Zhang, C., Nordqvist, H., Ponnann, S. M., Sönnnerborg, A., Treutiger, C. J., O'Mahony, L., Mardinoglu, A., Benfeitas, R., & Neogi, U. (2022). Multi-omics personalized network analyses highlight progressive disruption of central metabolism associated with COVID-19 severity. *Cell Systems*, 13(8), 665-681.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cels.2022.06.006>

Baichman-Kass, A., Song, T., & Friedman, J. (2023). Competitive interactions between culturable bacteria are highly non-additive. *ELife*, 12, e83398. <https://doi.org/10.7554/eLife.83398>

Bi, X., Liu, W., Ding, X., Liang, S., Zheng, Y., Zhu, X., Quan, S., Yi, X., Xiang, N., Du, J., Lyu, H., Yu, D., Zhang, C., Xu, L., Ge, W., Zhan, X., He, J., Xiong, Z., Zhang, S., ... Guo, T. (2022). Proteomic and metabolomic profiling of urine uncovers immune responses in patients with COVID-19. *Cell Reports*, 38(3), 110271. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.110271>

Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15), 2114–2120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>

Brumfield, K. D., Leddy, M., Usmani, M., Cotruvo, J. A., Tien, C.-T., Dorsey, S., Graubics, K., Fanelli, B., Zhou, I., Registe, N., Dadlani, M., Wimalarante, M., Jinasena, D., Abayagunawardena, R., Withanachchi, C., Huq, A., Jutla, A., & Colwell, R. R. (2022). Microbiome Analysis for Wastewater Surveillance during COVID-19. *MBio*, 13(4), e00591-22. <https://doi.org/10.1128/mbio.00591-22>

Cao, J., Wang, C., Zhang, Y., Lei, G., Xu, K., Zhao, N., Lu, J., Meng, F., Yu, L., Yan, J., Bai, C., Zhang, S., Zhang, N., Gong, Y., Bi, Y., Shi, Y., Chen, Z., Dai, L., Wang, J., & Yang, P. (2021). Integrated gut virome and bacteriome dynamics in COVID-19 patients. *Gut*

- Microbes*, 13(1), 1887722. <https://doi.org/10.1080/19490976.2021.1887722>
- Cassotta, M., Forbes-Hernández, T. Y., Calderón Iglesias, R., Ruiz, R., Elexpuru Zabaleta, M., Giampieri, F., & Battino, M. (2020). Links between Nutrition, Infectious Diseases, and Microbiota: Emerging Technologies and Opportunities for Human-Focused Research. *Nutrients*, 12(6), 1827. <https://doi.org/10.3390/nu12061827>
- Cervino, A. C. L., Fabre, R., Plassais, J., Gbikpi-Benissan, G., Petat, E., Le Quellenec, E., Neuberger-Castillo, L., Laurent, J.-M., Iordache, L., Bouchahda, M., Marti, G., & Chapelet, G. (2022). *Results from EDIFICE: A French pilot study on COVID-19 and the gut microbiome in a hospital environment* [Preprint]. *Gastroenterology*. <https://doi.org/10.1101/2022.02.06.22269945>
- Chahi, K., Collienne, C., Anantharajah, A., Rodriguez-Villalobos, H., & Hantson, P. (2023). *Bordetella hinzii* bacteremia in a patient with SARS-CoV-2 infection. *Emerging Microbes & Infections*, 12(1), 2147276. <https://doi.org/10.1080/22221751.2022.2147276>
- Cheng, X., Zhang, Y., Li, Y., Wu, Q., Wu, J., Park, S.-K., Guo, C., & Lu, J. (2022). Meta-analysis of 16S rRNA microbial data identified alterations of the gut microbiota in COVID-19 patients during the acute and recovery phases. *BMC Microbiology*, 22(1), 274. <https://doi.org/10.1186/s12866-022-02686-9>
- Coyte, K. Z., & Rakoff-Nahoum, S. (2019). Understanding Competition and Cooperation within the Mammalian Gut Microbiome. *Current Biology*, 29(11), R538–R544. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.04.017>
- Cui, G.-Y., Rao, B.-C., Zeng, Z.-H., Wang, X.-M., Ren, T., Wang, H.-Y., Luo, H., Ren, H.-Y., Liu, C., Ding, S.-Y., Tan, J.-J., Liu, Z.-G., Zou, Y.-W., Ren, Z.-G., & Yu, Z.-J. (2022). Characterization of oral and gut microbiome and plasma metabolomics in COVID-19 patients after 1-year follow-up. *Military Medical Research*, 9(1), 32. <https://doi.org/10.1186/s40779-022-00387-y>
- Culp, E. J., & Goodman, A. L. (2023). Cross-feeding in the gut microbiome: Ecology and

mechanisms. *Cell Host & Microbe*, 31(4), 485–499.

<https://doi.org/10.1016/j.chom.2023.03.016>

De Pascale, G., De Maio, F., Carelli, S., De Angelis, G., Cacaci, M., Montini, L., Bello, G., Cutuli, S. L., Pintaudi, G., Tanzarella, E. S., Xhemalaj, R., Grieco, D. L., Tumbarello, M., Sanguinetti, M., Posteraro, B., & Antonelli, M. (2021). Staphylococcus aureus ventilator-associated pneumonia in patients with COVID-19: Clinical features and potential inference with lung dysbiosis. *Critical Care*, 25(1), 197.

<https://doi.org/10.1186/s13054-021-03623-4>

Den Hartog, I., Karu, N., Zwep, L. B., Voorn, G. P., Van De Garde, E. M. W., Hankemeier, T., & Van Hasselt, J. G. C. (2023). Differential metabolic host response to pathogens associated with community-acquired pneumonia. *Metabolism Open*, 18, 100239.

<https://doi.org/10.1016/j.metop.2023.100239>

Diener, C., Gibbons, S. M., & Resendis-Antonio, O. (2020). MICOM: Metagenome-Scale Modeling To Infer Metabolic Interactions in the Gut Microbiota. *MSystems*, 5(1), e00606-19. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00606-19>

Farsi, Y., Tahvildari, A., Arbabi, M., Vazife, F., Sechi, L. A., Shahidi Bonjar, A. H., Jamshidi, P., Nasiri, M. J., & Mirsaeidi, M. (2022). Diagnostic, Prognostic, and Therapeutic Roles of Gut Microbiota in COVID-19: A Comprehensive Systematic Review. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12, 804644.

<https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.804644>

Ferreira-Junior, A. S., Borgonovi, T. F., De Salis, L. V. V., Leite, A. Z., Dantas, A. S., De Salis, G. V. V., Cruz, G. N. F., De Oliveira, L. F. V., Gomes, E., Penna, A. L. B., & De Oliveira, G. L. V. (2022). Detection of Intestinal Dysbiosis in Post-COVID-19 Patients One to Eight Months after Acute Disease Resolution. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(16), 10189.

<https://doi.org/10.3390/ijerph191610189>

Figueiredo, A. R. T., & Kramer, J. (2020). Cooperation and Conflict Within the Microbiota and

Their Effects On Animal Hosts. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 8, 132.

<https://doi.org/10.3389/fevo.2020.00132>

Friedland, R. P., & Haribabu, B. (2020). The role for the metagenome in the pathogenesis of

COVID-19. *EBioMedicine*, 61, 103019. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2020.103019>

Giannos, P., & Prokopidis, K. (2022). Gut dysbiosis and long COVID-19: Feeling gutted.

Journal of Medical Virology, 94(7), 2917–2918. <https://doi.org/10.1002/jmv.27684>

Gu, S., Chen, Y., Wu, Z., Chen, Y., Gao, H., Lv, L., Guo, F., Zhang, X., Luo, R., Huang, C., Lu, H., Zheng, B., Zhang, J., Yan, R., Zhang, H., Jiang, H., Xu, Q., Guo, J., Gong, Y., ... Li, L. (2020). Alterations of the Gut Microbiota in Patients With Coronavirus

Disease 2019 or H1N1 Influenza. *Clinical Infectious Diseases*, 71(10), 2669–2678.

<https://doi.org/10.1093/cid/ciaa709>

Han, Y., Jia, Z., Shi, J., Wang, W., & He, K. (2021). The active lung microbiota landscape of

COVID-19 patients through the metatranscriptome data analysis. *BioImpacts*, 12(2),

139–146. <https://doi.org/10.34172/bi.2021.23378>

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>

Hernández-Flores, T. de J., Pedraza-Brindis, E. J., Cárdenas-Bedoya, J., Ruíz-Carrillo, J. D.,

Méndez-Clemente, A. S., Martínez-Guzmán, M. A., & Iñiguez-Gutiérrez, L. (2022).

Role of Micronutrients and Gut Microbiota-Derived Metabolites in COVID-19

Recovery. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(20), 12324.

<https://doi.org/10.3390/ijms232012324>

Kang, M., Haste, N., Legaspi, J., Torriani, F. J., & Abeles, S. (2020). 374. Complication with

Bacterial Pneumonia in Hospitalized Patients with Coronavirus Disease 2019

(COVID-19). *Open Forum Infectious Diseases*, 7(Supplement_1), S257.

<https://doi.org/10.1093/ofid/ofaa439.569>

- Kattner, S. (2023). Identification of two early blood biomarkers ACHE and CLEC12A for improved risk stratification of critically ill COVID-19 patients. *Scientific Reports*.
- Ke, S., Weiss, S. T., & Liu, Y.-Y. (2022). Dissecting the role of the human microbiome in COVID-19 via metagenome-assembled genomes. *Nature Communications*, 13(1), 5235. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-32991-w>
- Khan, M., Mathew, B. J., Gupta, P., Garg, G., Khadanga, S., Vyas, A. K., & Singh, A. K. (2021). Gut Dysbiosis and IL-21 Response in Patients with Severe COVID-19. *Microorganisms*, 9(6), 1292. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9061292>
- Kumar, M., Ji, B., Zengler, K., & Nielsen, J. (2019). Modelling approaches for studying the microbiome. *Nature Microbiology*, 4(8), 1253–1267. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0491-9>
- Lai, P., Nguyen, L., Okin, D., Drew, D., Battista, V., Jesudasan, S., Kuntz, T., Bhosle, A., Thompson, K., Reinicke, T., Lo, C.-H., Woo, J., Caraballo, A., Berra, L., Vieira, J., Huang, C.-Y., Adhikari, U. D., Kim, M., Sui, H.-Y., ... Chan, A. (2022). *Metagenomic assessment of gut microbial communities and risk of severe COVID-19* [Preprint]. In Review. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1717624/v1>
- LeBlanc, J. G., Milani, C., de Giori, G. S., Sesma, F., van Sinderen, D., & Ventura, M. (2013). Bacteria as vitamin suppliers to their host: A gut microbiota perspective. *Current Opinion in Biotechnology*, 24(2), 160–168. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2012.08.005>
- Li, S., Zhou, Y., Yan, D., & Wan, Y. (2022). *An Update on the Mutual Impact between SARS-CoV-2 Infection and Gut Microbiota*.
- Linares-García, L., Cárdenas-Barragán, M. E., Hernández-Ceballos, W., Pérez-Solano, C. S., Morales-Guzmán, A. S., Miller, D. S., & Schmulson, M. (2022). *Bacterial and Fungal Gut Dysbiosis and Clostridium difficile in COVID-19 A Review*.
- Louis, P., & Flint, H. J. (2017). Formation of propionate and butyrate by the human colonic

- microbiota. *Environmental Microbiology*, 19(1), 29–41.
<https://doi.org/10.1111/1462-2920.13589>
- Lu, J., Breitwieser, F. P., Thielen, P., & Salzberg, S. L. (2017). Bracken: Estimating species abundance in metagenomics data. *PeerJ Computer Science*, 3, e104.
<https://doi.org/10.7717/peerj-cs.104>
- Lv, L., Jiang, H., Chen, Y., Gu, S., Xia, J., Zhang, H., Lu, Y., Yan, R., & Li, L. (2021). The faecal metabolome in COVID-19 patients is altered and associated with clinical features and gut microbes. *Analytica Chimica Acta*, 1152, 338267.
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2021.338267>
- 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>
- Martín Giménez, V. M., Modrego, J., Gómez-Garre, D., Manucha, W., & De Las Heras, N. (2023). Gut Microbiota Dysbiosis in COVID-19: Modulation and Approaches for Prevention and Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(15), 12249.
<https://doi.org/10.3390/ijms241512249>
- Martínez-López, Y. E., Esquivel-Hernández, D. A., Sánchez-Castañeda, J. P., Neri-Rosario, D., Guardado-Mendoza, R., & Resendis-Antonio, O. (2022). Type 2 diabetes, gut microbiome, and systems biology: A novel perspective for a new era. *Gut Microbes*, 14(1), 2111952. <https://doi.org/10.1080/19490976.2022.2111952>
- Maurer, H. C., Schult, D., Koyumdzhieva, P., Reitmeier, S., Middelhoff, M., Rasch, S., List,

- M., Janssen, K.-P., Steiger, K., Protzer, U., Schmid, R. M., Neuhaus, K., Haller, D., Quante, M., & Lahmer, T. (2022). Gut Microbial Disruption in Critically Ill Patients with COVID-19-Associated Pulmonary Aspergillosis. *Journal of Fungi*, 8(12), Article 12. <https://doi.org/10.3390/jof8121265>
- McInnes, L., Healy, J., & Melville, J. (2020). *UMAP: Uniform Manifold Approximation and Projection for Dimension Reduction* (arXiv:1802.03426). arXiv. <http://arxiv.org/abs/1802.03426>
- McKee, L. S., La Rosa, S. L., Westereng, B., Eijssink, V. G., Pope, P. B., & Larsbrink, J. (2021). Polysaccharide degradation by the Bacteroidetes: Mechanisms and nomenclature. *Environmental Microbiology Reports*, 13(5), 559–581. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12980>
- McMurdie, P. J., & Holmes, S. (2013). phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS ONE*, 8(4), e61217. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>
- Melkonian, C., Seidl, M. F., Van Der Hooft, J. J. J., & De Vos, M. G. J. (2022). Metabolic interactions shape a community's phenotype. *Trends in Microbiology*, 30(7), 609–611. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2022.05.001>
- Meng, H., Wang, S., Tang, X., Guo, J., Xu, X., Wang, D., Jin, F., Zheng, M., Yin, S., He, C., Han, Y., Chen, J., Han, J., Ren, C., Gao, Y., Liu, H., Wang, Y., & Jin, R. (2022). Respiratory immune status and microbiome in recovered COVID-19 patients revealed by metatranscriptomic analyses. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12, 1011672. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.1011672>
- Mitri, S., & Richard Foster, K. (2013). The Genotypic View of Social Interactions in Microbial Communities. *Annual Review of Genetics*, 47(1), 247–273. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-111212-133307>
- Mizutani, T., Ishizaka, A., Koga, M., Ikeuchi, K., Saito, M., Adachi, E., Yamayoshi, S., Iwatsuki-Horimoto, K., Yasuhara, A., Kiyono, H., Matano, T., Suzuki, Y., Tsutsumi, T.,

- Kawaoka, Y., & Yotsuyanagi, H. (2022). Correlation Analysis between Gut Microbiota Alterations and the Cytokine Response in Patients with Coronavirus Disease during Hospitalization. *Microbiology Spectrum*, *10*(2).
- Nabizadeh, E., Memar, M. Y., Hamishehkar, H., Ghanbari, H., Kadkhoda, H., Asnaashari, S., Kafil, H. S., Varshochi, M., Mostafazadeh, M., Hosseinpour, R., & Ghotaslou, R. (2023). Short-chain fatty acids profile in patients with SARS-CoV-2: A case-control study. *Health Science Reports*, *6*(7), e1411. <https://doi.org/10.1002/hsr2.1411>
- Nagata, N., Takeuchi, T., Masuoka, H., Aoki, R., Ishikane, M., Iwamoto, N., Sugiyama, M., Suda, W., Nakanishi, Y., Terada-Hirashima, J., Kimura, M., Nishijima, T., Inooka, H., Miyoshi-Akiyama, T., Kojima, Y., Shimokawa, C., Hisaeda, H., Zhang, F., Yeoh, Y. K., ... Ohno, H. (2023). Human Gut Microbiota and Its Metabolites Impact Immune Responses in COVID-19 and Its Complications. *Gastroenterology*, *164*(2), 272–288. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2022.09.024>
- Nalbandian, A., Sehgal, K., Gupta, A., Madhavan, M. V., McGroder, C., Stevens, J. S., Cook, J. R., Nordvig, A. S., Shalev, D., Sehwat, T. S., Ahluwalia, N., Bikdeli, B., Dietz, D., Der-Nigoghossian, C., Liyanage-Don, N., Rosner, G. F., Bernstein, E. J., Mohan, S., Beckley, A. A., ... Wan, E. Y. (2021). Post-acute COVID-19 syndrome. *Nature Medicine*, *27*(4), 601–615. <https://doi.org/10.1038/s41591-021-01283-z>
- Nardelli, C., Gentile, I., Setaro, M., Di Domenico, C., Pinchera, B., Buonomo, A. R., Zappulo, E., Scotto, R., Scaglione, G. L., Castaldo, G., & Capoluongo, E. (2021). Nasopharyngeal Microbiome Signature in COVID-19 Positive Patients: Can We Definitely Get a Role to *Fusobacterium periodonticum*? *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *11*, 625581. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.625581>
- NICE. (2022). *Pneumonia in adults: Diagnosis and management*. <https://www.nice.org.uk/guidance/cg191>
- Padron-Manrique, C., Vázquez-Jiménez, A., Esquivel-Hernandez, D. A., Martínez Lopez, Y. E., Neri-Rosario, D., Sánchez-Castañeda, J. P., Giron-Villalobos, D., &

- Resendis-Antonio, O. (2022). *mb-PHENIX: Diffusion and Supervised Uniform Manifold Approximation for denoising microbiota data* [Preprint]. *Bioinformatics*.
<https://doi.org/10.1101/2022.06.23.497285>
- Pflughoeft, K. J., & Versalovic, J. (2012). Human Microbiome in Health and Disease. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 7(1), 99–122.
<https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-011811-132421>
- Ponomarova, O., & Patil, K. R. (2015). Metabolic interactions in microbial communities: Untangling the Gordian knot. *Current Opinion in Microbiology*, 27, 37–44.
<https://doi.org/10.1016/j.mib.2015.06.014>
- Prasad, P., Mahapatra, S., Mishra, R., Murmu, K. C., Aggarwal, S., Sethi, M., Mohapatra, P., Ghosh, A., Yadav, R., Dodia, H., Ansari, S. A., De, S., Singh, D., Suryawanshi, A., Dash, R., Senapati, S., Beuria, T. K., Chattopadhyay, S., Syed, G. H., ... Parida, A. (2022). Long-read 16S-seq reveals nasopharynx microbial dysbiosis and enrichment of *Mycobacterium* and *Mycoplasma* in COVID-19 patients: A potential source of co-infection. *Molecular Omics*, 18(6), 490–505. <https://doi.org/10.1039/D2MO00044J>
- Robinson, M. D., McCarthy, D. J., & Smyth, G. K. (2010). edgeR: A Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*, 26(1), 139–140. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp616>
- Robinson, M. D., & Smyth, G. K. (2007). Small-sample estimation of negative binomial dispersion, with applications to SAGE data. *Biostatistics*, 9(2), 321–332.
<https://doi.org/10.1093/biostatistics/kxm030>
- Russell, C. D., Fairfield, C. J., Drake, T. M., Turtle, L., Seaton, R. A., Wootton, D. G., Sigfrid, L., Harrison, E. M., Docherty, A. B., de Silva, T. I., Egan, C., Pius, R., Hardwick, H. E., Merson, L., Girvan, M., Dunning, J., Nguyen-Van-Tam, J. S., Openshaw, P. J. M., Baillie, J. K., ... Young, P. (2021). Co-infections, secondary infections, and antimicrobial use in patients hospitalised with COVID-19 during the first pandemic wave from the ISARIC WHO CCP-UK study: A multicentre, prospective cohort study.

The Lancet Microbe, 2(8), e354–e365.

[https://doi.org/10.1016/S2666-5247\(21\)00090-2](https://doi.org/10.1016/S2666-5247(21)00090-2)

Russell, C. D., Lone, N. I., & Baillie, J. K. (2023). Comorbidities, multimorbidity and COVID-19. *Nature Medicine*, 29(2), 334–343.

<https://doi.org/10.1038/s41591-022-02156-9>

Schult, D., Reitmeier, S., Koyumdzhieva, P., Lahmer, T., Middelhoff, M., Erber, J., Schneider, J., Kager, J., Frolova, M., Horstmann, J., Fricke, L., Steiger, K., Jesinghaus, M., Janssen, K.-P., Protzer, U., Neuhaus, K., Schmid, R. M., Haller, D., & Quante, M. (2022). Gut bacterial dysbiosis and instability is associated with the onset of complications and mortality in COVID-19. *Gut Microbes*, 14(1), 2031840.

<https://doi.org/10.1080/19490976.2022.2031840>

Socolar, J. B., Gilroy, J. J., Kunin, W. E., & Edwards, D. P. (2016). How Should Beta-Diversity Inform Biodiversity Conservation? *Trends in Ecology & Evolution*, 31(1), 67–80. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2015.11.005>

Tang, L., Gu, S., Gong, Y., Li, B., Lu, H., Li, Q., Zhang, R., Gao, X., Wu, Z., Zhang, J., Zhang, Y., & Li, L. (2020). Clinical Significance of the Correlation between Changes in the Major Intestinal Bacteria Species and COVID-19 Severity. *Engineering*, 6(10), 1178–1184. <https://doi.org/10.1016/j.eng.2020.05.013>

Toc, D. A., Mihaila, R. M., Botan, A., Bobohalma, C. N., Risteiu, G. A., Simut-Cacuci, B. N., Steorobelea, B., Troanca, S., & Junie, L. M. (2022). *Enterococcus and COVID-19: The Emergence of a Perfect Storm?*

Vestad, B., Ueland, T., Lerum, T. V., Dahl, T. B., Holm, K., Barratt-Due, A., Kåsine, T., Dyrhol-Riise, A. M., Stiksrud, B., Tonby, K., Hoel, H., Olsen, I. C., Henriksen, K. N., Tveita, A., Manotheepan, R., Haugli, M., Eiken, R., Berg, Å., Halvorsen, B., ... the NOR-Solidarity study group. (2022). Respiratory dysfunction three months after severe COVID-19 is associated with gut microbiota alterations. *Journal of Internal Medicine*, 291(6), 801–812. <https://doi.org/10.1111/joim.13458>

- Villapol, S. (2020). Gastrointestinal symptoms associated with COVID-19: Impact on the gut microbiome. *Translational Research*, 226, 57–69.
<https://doi.org/10.1016/j.trsl.2020.08.004>
- Wang, M., Zhang, Y., Li, C., Chang, W., & Zhang, L. (2023). The relationship between gut microbiota and COVID-19 progression: New insights into immunopathogenesis and treatment. *Frontiers in Immunology*, 14, 1180336.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1180336>
- Wang, Y.-Z. (n.d.). Altered gut microbiota composition in children and their caregivers infected with the SARS-CoV-2 Omicron variant. *World Journal of Pediatrics*.
<https://doi.org/10.1007/s12519-022-00659-6>
- Wang, Z. (2022). *Introduction to computational metagenomics*. World Scientific.
- Willis, A. D. (2019). Rarefaction, Alpha Diversity, and Statistics. *Frontiers in Microbiology*, 10, 2407. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02407>
- Włodarczyk, J., Czerwiński, B., & Fichna, J. (2022). Short-chain fatty acids–microbiota crosstalk in the coronavirus disease (COVID-19). *Pharmacological Reports*, 74(6), 1198–1207. <https://doi.org/10.1007/s43440-022-00415-7>
- Wood, D. E., Lu, J., & Langmead, B. (2019). Improved metagenomic analysis with Kraken 2. *Genome Biology*, 20(1), 257. <https://doi.org/10.1186/s13059-019-1891-0>
- Wu, Y., Cheng, X., Jiang, G., Tang, H., Ming, S., Tang, L., Lu, J., Guo, C., Shan, H., & Huang, X. (2021). Altered oral and gut microbiota and its association with SARS-CoV-2 viral load in COVID-19 patients during hospitalization. *Npj Biofilms and Microbiomes*, 7(1), 61. <https://doi.org/10.1038/s41522-021-00232-5>
- Xu, Y., Zhu, Y., Li, X., & Sun, B. (2020). Dynamic balancing of intestinal short-chain fatty acids: The crucial role of bacterial metabolism. *Trends in Food Science & Technology*, 100, 118–130. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.02.026>
- Yasir, M., Al-Sharif, H. A., Al-Subhi, T., Sindi, A. A., Bokhary, D. H., El-Daly, M. M., Alosaimi, B., Hamed, M. E., Karim, A. M., Hassan, A. M., AlShawdari, M. M., Alawi, M.,

- El-Kafrawy, S. A., & Azhar, E. I. (2023). Analysis of the nasopharyngeal microbiome and respiratory pathogens in COVID-19 patients from Saudi Arabia. *Journal of Infection and Public Health*, *16*(5), 680–688.
<https://doi.org/10.1016/j.jiph.2023.03.001>
- Ye, Q., Wang, B., Zhang, T., Xu, J., & Shang, S. (2020). The mechanism and treatment of gastrointestinal symptoms in patients with COVID-19. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, *319*(2), G245–G252.
<https://doi.org/10.1152/ajpgi.00148.2020>
- Yeoh, Y. K., Zuo, T., Lui, G. C.-Y., Zhang, F., Liu, Q., Li, A. Y., Chung, A. C., Cheung, C. P., Tso, E. Y., Fung, K. S., Chan, V., Ling, L., Joynt, G., Hui, D. S.-C., Chow, K. M., Ng, S. S. S., Li, T. C.-M., Ng, R. W., Yip, T. C., ... Ng, S. C. (2021). Gut microbiota composition reflects disease severity and dysfunctional immune responses in patients with COVID-19. *Gut*, *70*(4), 698–706.
<https://doi.org/10.1136/gutjnl-2020-323020>
- Zhang, F., Wan, Y., Zuo, T., Yeoh, Y. K., Liu, Q., Zhang, L., Zhan, H., Lu, W., Xu, W., Lui, G. C. Y., Li, A. Y. L., Cheung, C. P., Wong, C. K., Chan, P. K. S., Chan, F. K. L., & Ng, S. C. (2022). Prolonged Impairment of Short-Chain Fatty Acid and L-Isoleucine Biosynthesis in Gut Microbiome in Patients With COVID-19. *Gastroenterology*, *162*(2), 548-561.e4. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2021.10.013>
- Zheng, P., Li, Z., & Zhou, Z. (2018). Gut microbiome in type 1 diabetes: A comprehensive review. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, *34*(7), e3043.
<https://doi.org/10.1002/dmrr.3043>
- Zhou, B., Pang, X., Wu, J., Liu, T., Wang, B., & Cao, H. (2023). Gut microbiota in COVID-19: New insights from inside. *Gut Microbes*, *15*(1), 2201157.
<https://doi.org/10.1080/19490976.2023.2201157>
- Zhou, T., Wu, J., Zeng, Y., Li, J., Yan, J., Meng, W., Han, H., Feng, F., He, J., Zhao, S., Zhou, P., Wu, Y., Yang, Y., Han, R., Jin, W., Li, X., Yang, Y., & Li, X. (n.d.). SARS-CoV-2

triggered oxidative stress and abnormal energy metabolism in gut microbiota.

Zuo, T., Liu, Q., Zhang, F., Lui, G. C.-Y., Tso, E. Y., Yeoh, Y. K., Chen, Z., Boon, S. S., Chan, F. K., Chan, P. K., & Ng, S. C. (2020). Depicting SARS-CoV-2 faecal viral activity in association with gut microbiota composition in patients with COVID-19. *Gut*, *gutjnl-2020-322294*. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2020-322294>

Zuo, T., Zhang, F., Lui, G. C. Y., Yeoh, Y. K., Li, A. Y. L., Zhan, H., Wan, Y., Chung, A. C. K., Cheung, C. P., Chen, N., Lai, C. K. C., Chen, Z., Tso, E. Y. K., Fung, K. S. C., Chan, V., Ling, L., Joynt, G., Hui, D. S. C., Chan, F. K. L., ... Ng, S. C. (2020). Alterations in Gut Microbiota of Patients With COVID-19 During Time of Hospitalization. *Gastroenterology*, *159*(3), 944-955.e8. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.05.048>