

# Estudio comparativo de las redes de coexistencia de la microbiota gastrointestinal humana en cuatro condiciones de salud.

Guzmán Favila Gabriela  
Hernández Luna Nora Hilda  
Rosas Paz Miguel Ángel

Junio 2020

## Introducción

La historia evolutiva de la especie humana permitió la formación asociaciones simbióticas con diferentes microorganismos, los cuales, en conjunto, representan la microbiota humana (Marchesi, 2015; Ursell, 2012; Li et al., 2008). La microbiota humana se encuentra en distintas zonas del cuerpo, tales como el sistema digestivo, el sistema respiratorio, la piel, vías urinarias, etc. y, dado que las condiciones abióticas de cada una son distintas, las poblaciones microbióticas varían dependiendo de la zona (Uzcátegui, 2016). Como es de esperarse, estos microorganismos poseen su propio material genético, el cual los permite diferenciarse de las especies con las que coexisten y, hasta de las células del hospedero. Este material genético es de particular interés, pues permite el estudio de los microorganismos que componen la microbiota. De esta forma, se puede definir como microbioma al conjunto de genomas de la microbiota de un microecosistema específico (Marchesi, 2015; Ursell, 2012).

El microbioma intestinal es uno de los más estudiados debido a su diversidad y relación con la salud. Este está constituido principalmente por especies de los phyla Firmicute, Bacteroidetes, Actinobacteria y Verrucomicrobia, cuya proporción de especies varía dependiendo del individuo y siendo los dos primeros taxa los más abundantes (Tuddenham y Sears, 2015). Así pues, se estima que presenta más de 3500 especies y se han identificado más de 1 millón de genes bacterianos con funciones no redundantes (Manasa-Jandhyala et al., 2015). Las enzimas codificadas por estos genes, así como los productos resultantes del metabolismo de la microbiota, facilitan ciertas rutas metabólicas del hospedero. De esta forma, la microbiota influye en la proporción de compuestos con diferentes funciones fisiológicas, tales como ácidos grasos de cadena corta, intermediarios de la fermentación, gases, dióxido de carbono, vitaminas, etc. (Rowland et al.,

2017).

Diversos factores pueden generar variación en las poblaciones de la microbiota, entre ellos la dieta, edad, la ingesta de antibióticos, la genética y el sistema inmune de la persona (Tuddenham y Sears, 2015). Así pues, se ha observado que algunas enfermedades o condiciones anormales presentan una disminución de diversidad bacteriana, con pérdida o incremento de taxas específicos, dependiendo del padecimiento (Durack y Lynch, 2019; Tuddenham y Sears, 2015). Si bien, se ha observado esta relación entre la diversidad y la salud, hacen falta estudios integrales del microbioma presente en diferentes enfermedades (Durack y Lynch, 2019).

Una de las principales dificultades que se presenta al querer discernir el papel de la variación de especies en los distintos microbiomas es la incapacidad de algunas metodologías (como las basadas en biomarcadores) para identificar las variaciones a nivel de cepa (Durack y Lynch, 2019). Debido a esto, metodologías como la de análisis metagenómicos se han postulado como las “técnicas estándares de oro”, ya que permiten identificar de manera más precisa el contenido microbiótico de una muestra (Anrame, et al., 2019). Los análisis metagenómicos son el estudio del material genético que se puede recuperar de una muestra ambiental, incluyendo el tracto digestivo (Mandal, et al., 2015) y trabaja bajo dos enfoques: descriptivo y funcional. El enfoque descriptivo tiene la capacidad de identificar la composición, abundancia y biodiversidad de microbios de una muestra con un alto rendimiento (D’Argenio, et al., 2014), y el enfoque funcional puede proporcionar información de las interacciones huésped-microbio y microbio-microbio (Mandal, et al., 2015). Al articular ambos enfoques, se puede generar un modelo que representa la dinámica de la comunidad. De esta forma se puede comprender algunos aspectos importantes de la dinámica que se presenta dentro de la microbiota intestinal.

El enfoque de la metagenómica nos permite vislumbrar la composición de las comunidades microbióticas. Sin embargo, si se quiere acceder a otro tipo de información como las interacciones entre organismos e incluso el peso de las especies dentro del microbioma, es necesario implementar metodologías extra (Wu, et al., 2020). En este sentido, la teoría de grafos suele ser empleada muy frecuentemente para complementar los análisis metagenómicos, ya que permite encontrar propiedades dentro del microbioma tales como conectividad, centralidad y la búsqueda de especies “clave” (Wu, et al., 2020; Barabasi, 2016). De esta forma, el estudio metagenómico se complementa de tal forma que puede adquirir otros alcances e interpretaciones emergentes.

Dicho lo anterior, este estudio plantea usar el enfoque de teoría de grafos para evaluar el comportamiento de las interacciones de la microbiota gastrointestinal humana bajo condiciones de salud y bajo condiciones patológicas. Bajo este panorama, pensamos que se puede dar un enfoque aproximado de cómo interactúan los microorganismos en diferentes condiciones. Por ello, decidimos

plantear la hipótesis de que la microbiota de individuos sanos presentará una mayor abundancia y consistencia en su composición microbiana en comparación con los fenotipos patológicos, cuya microbiota será menos abundante y presentará comportamientos antagonistas entre los interactuantes que normalmente se encontrarían en un fenotipo sano. Para probar esto, decidimos evaluar cuatro fenotipos diferentes; un fenotipo sano, un fenotipo con cáncer colorrectal, uno con diarrea y otro con colitis ulcerosa.

### **Estado gastrointestinal sano**

La microbiota intestinal ha pasado de considerarse un comensal acompañante, a considerarse un «órgano metabólico», con funciones en la nutrición, la regulación de la inmunidad y la inflamación sistémica. Los microbios y los vertebrados evolucionaron juntos a través de miles de años, y el funcionamiento normal del sistema digestivo e inmunológico depende de la presencia de la microbiota simbiótica.

Evolutivamente, en los mamíferos, los organismos que componen la microbiota son determinados por los tipos de fuentes nutricionales, siendo diferentes los perfiles de omnívoros, carnívoros y herbívoros. Las características de la dieta, junto con los factores genéticos, influyen en el predominio de unos microorganismos sobre otros.

En el útero, el ser humano carece de microbiota. Al nacer, el tracto gastrointestinal se coloniza inmediatamente. Hasta la vía de nacimiento (parto o cesárea) y el tipo de alimentación (seno materno o fórmula) ha demostrado producir diferencias en la microbiota intestinal.

### **Cáncer colorrectal**

El cáncer colorrectal es una neoplasia del colon que tiene una fuerte incidencia mundial y cuyos factores de riesgo incluyen la genética, el ambiente y el estilo de vida (Biongo y Martí-Ragué, 2003; Saus et al., 2019). Diversos estudios de tejidos tumorales, mucosas y heces han asociado la carcinogénesis colorrectal con un aumento de abundancia de algunas especies de los géneros *Fusobacterium*, *Porphyromonas*, *Bacteroides* y *Prevotella* (Jahani-Sherafat et al., 2018).

### **Diarrea**

La Diarrea es un síntoma representado por el aumento en el líquido de las deposiciones y en la frecuencia de las mismas (Acuña, 2015). Esta sintomatología se asocia a los efectos causados por toxinas de diversas especies y géneros bacterianos, tales como *E. coli*, *Clostridium difficile*, *Shigella*, *Salmonella*, *Yersinia*, *Bacteroides fragilis* y *Campylobacter* (Youmansa, 2015).

### **Colitis ulcerosa**

La colitis ulcerosa es una enfermedad inflamatoria intestinal crónica que afecta a la mucosa del colon. La afectación se inicia en el recto y, de forma continua, puede alcanzar una extensión variable en sentido proximal hasta el ciego. Típicamente, cursa en forma de brotes de actividad inflamatoria durante los cuales el paciente presenta la sintomatología clásica de la enfermedad (diarrea, rec-

torragia y dolor abdominal) acompañada o no de síntomas sistémicos y/o de manifestaciones extraintestinales y la presencia de organismos como *Ralstonia pickettii*. Estos periodos se siguen de periodos de inactividad (remisión) en los que los pacientes se hallan asintomáticos. (Lennard-Jones et al., 1989).

### **Objetivos generales**

- Comparar las redes de interacción biótica de la microbiota gastrointestinal humana.

### **Objetivos particulares**

- Identificar la composición taxonómica del metagenoma gastrointestinal humano en un fenotipo saludable, otro con cáncer colorrectal, uno con diarrea y otro con gastritis.
- Realizar un análisis de co-ocurrencia con base en las abundancias relativas de las especies para cada fenotipo.
- Realizar un análisis de redes de co-ocurrencia.

### **Hipótesis**

El microbioma del fenotipo de persona sana muestra mayor abundancia de especies que aquellos correspondiente a padecimientos, lo cual se ve representado en una red con más nodos y grado de conectividad alto.

Las redes correspondientes a las enfermedades muestran interacciones negativas entre organismos que en condiciones de buena salud interactúan positivamente, lo cual se refleja en la pérdida de diversidad.

### **Metodología**

La metodología general del trabajo se basó en la recuperación de los datos metagenómicos recopilados por Wu., et al. (2020).

#### **■ Obtención de las bases de datos, asignación taxonómica a lecturas secuenciadas procesadas y abundancias relativas**

Las bases de datos se obtuvo a partir del repositorio realizado por Wu y colaboradores (2020): <https://gmrepo.humangut.info/home> utilizando los comandos de recuperación de Python que se encuentran referenciados en Wu y colaboradores (2020) y que también se anexan en el git del proyecto ([https://github.com/Miguel1295rp/Proyecto\\_Final\\_BioCompu](https://github.com/Miguel1295rp/Proyecto_Final_BioCompu)). De dicha base de datos se buscaron metagenomas relacionados al microbioma gastrointestinal de humanos con cuatro fenotipos distintos: personas saludables (D006262), personas con cáncer colorrectal (D015179), personas con diarrea (D003967) y personas con colitis ulcerosa (D003093). A partir de estos datos recuperados, se obtuvieron los valores de abundancia relativa y de asignación taxonómica.

■ **Obtención de asignación taxonómica y abundancias relativas de las corridas individuales de cada fenotipo**

Para cada uno de los fenotipos seleccionados (personas saludables (D006262), personas con cáncer colorrectal (D015179), personas con diarrea (D003967) y personas con colitis ulcerosa (D003093)), se seleccionaron un total de 10 corridas representativas (datos del metagenoma de una persona), tomando en cuenta una proporción 1:1 de sexos, nacionalidades distintas y edades dentro del rango 16-90 años. Los datos se obtuvieron de [https:// gmrepo.humangut.info/home](https://gmrepo.humangut.info/home) para cada uno de los fenotipos; se almacenaron y procesaron individualmente. Las bases de datos ensambladas manualmente se encuentran en el repositorio Git de este trabajo dentro del directorio "Datos\_redes". Posteriormente, el archivo fue convertido al formato delimitado por tabulación (.txt)

■ **Cálculo del índice de Shannon y distribución de la abundancia relativa.**

Con los datos globales de la media de abundancia relativa para cada especie, se calculó la diversidad de cada fenotipo con el índice de Shannon. De igual forma, con base en estos datos se graficaron las distribuciones de abundancias relativas.

■ **Ensamblaje de la matriz de co ocurrencia**

Basándonos en los datos del archivo con extensión .txt, donde encontramos las abundancias relativas, se elaboró una matriz procesada en Python mediante la función `corr()`. A partir de esto, se elaboró una matriz para empatar abundancias contra abundancias, es decir, una matriz de co ocurrencia.

■ **Red de coexistencia**

A partir de la matriz de co ocurrencia, se elaborará una red de coexistencia empleando la librería `networks` y `pandas` en python. Para ello se elaboraron dos filtros para discernir si una interacción es positiva o negativa. Para ello se buscó discriminar entre correlaciones mayores a 0.5 (interacciones positivas) y menores a -0.5 (interacciones negativas).

■ **Análisis de red**

Con base en lo que proponen Berry y Widder (2014) sobre las propiedades potencialmente relevantes para los roles y el funcionamiento de una comunidad, se comenzó con los siguientes datos:

- Mean Degree
- Degree distribution
- Clustering coefficient
- Betweenness centrality
- Closeness centrality

## Resultados

### Abundancia de especies en los diferentes fenotipos

Con la finalidad de estudiar el efecto de los distintos padecimientos sobre la abundancia y diversidad de especies del microbioma intestinal, se calculó el índice de Shannon para cada uno de los fenotipos. Los resultados arrojaron al microbioma de la colitis ulcerosa como el más diverso ( $H' = 4.4995$  y 366 especies), seguido del de diarrea ( $H' = 3.8705$  y 402 especies), el fenotipo sano ( $H' = 2.0821$ , 381 especies) y cáncer colorrectal ( $H' = 2.0569$  y 479 especies) (**Tabla 1**). Dado que los fenotipos con mayor número de especies no coincidían con un índice de Shannon mayor, se graficó la distribución de la media de la abundancia relativa de cada especie en los distintos fenotipos, para evaluar si estas cambiaban a causa de las enfermedades. Todos los fenotipos presentaron una distribución parecida, donde la mayoría de nodos tuvo una abundancia relativa de 0.01-0.042, mientras que pocos de ellos presentaron abundancias mayores (**Figura 1**). No obstante, esto fue más marcado en el fenotipo sano y en el cáncer colorrectal (**Figura 1a, b**); ya que en la Diarrea y la Colitis Ulcerosa existió un mayor número de nodos con abundancia alta (**Figura 1c, d**). En conjunto, estos resultados sugieren que el número de especies del microbioma intestinal y su abundancia relativa se ven afectadas por los padecimientos, ya sea con incremento o disminución en las mismas.

Las poblaciones del microbioma pueden cambiar dependiendo de ciertos factores, tal como las enfermedades (Durack y Lynch, 2019; Tuddenham y Sears, 2015). Para corroborar lo anterior, se obtuvieron las diez especies con mayor y menor abundancia de cada fenotipo. Los resultados arrojaron variación entre los taxa de cada fenotipo, donde destaca el género *Bacteroides*, disminuido en Diarrea, y aumentado en Colitis y Cáncer, en comparación con el fenotipo sano (**Tabla 1**). De igual forma, se muestra un aumento de la abundancia relativa del género *Parabacteroides* en Cáncer; de *Escherichia coli*, *Rummeliibacillus pycnus* y *Brachyspira pilosicoli*, en diarrea (**Tabla 1**). Lo anterior podría indicar que las condiciones del microbioma de Cáncer posiblemente causan un incremento de especies, pero con baja abundancia de cada una y sobrerrepresentación de *Parabacteroides* sp.; mientras que en los microbiomas de Diarrea colitis podrían perderse especies y otras estarían aumentando su abundancia.

### Redes de co-ocurrencia

Para comparar los patrones de co-ocurrencia en los distintos fenotipos, se realizaron análisis de redes, donde las correlaciones positivas se tomaron como enlaces de co-ocurrencia y las negativas, como exclusión mutua entre dos especies. En general, las redes mostraron un bajo porcentaje de enlaces negativos (**Figura 2, Figura 4**) y un porcentaje alto de enlaces positivos (**Figura 3**). Los fenotipos de enfermedad tuvieron mayor número de enlaces en comparación con el fenotipo sano (**Figura 2, Figura 3a**;  $m=11200$ ), siendo la red de Cáncer colorrectal la superior (**Figura 2b, Figura 3b**;  $m=45552$ ). Esto sugiere que los padecimientos influyen de manera positiva en las relaciones de co-ocurrencia. En contraste, el fenotipo sano presentó un mayor número de enlaces negativos ( $n=398$ ,  $m=240$ ) que los fenotipos de cáncer ( $n=604$ ,  $m=27$ ) y diarrea ( $n=$

Fenotipo	Especies con mayor abundancia media	Especies con menor abundancia media
Fenotipo Sano N= 381 H'= 2.0821	<i>Parabacteroides</i> sp. 20_3 (7.3621) <i>Faecalibacterium</i> sp. MC_41 (6.1735) <i>Bacteroides</i> sp. 4_3_47FAA (5.7843) <i>Acidaminococcus</i> sp. HPA0509 (5.1784) <i>Melissococcus plutonius</i> (4.9197) <i>Bacteroides</i> sp. 3_1_40A (4.6114) <i>Clostridium</i> sp. L2-50 (3.5680)  <i>Coprococcus</i> sp. ART55/1 (3.3460) <i>Bacteroides</i> sp. 3_2_5 (2.7312)  <i>Dehalobacter</i> sp. DCA (2.6792)	<i>Spiroplasma culicicola</i> (0.010)  <i>Mitsuokella multacida</i> (0.010)  <i>Mycoplasma flocculare</i> (0.010)  <i>Lactobacillus</i> sp. NBRC 107208 (0.010) <i>Clostridium perfringens</i> (0.010) <i>[Eubacterium] sulci</i> (0.010) <i>Halomonas</i> sp. NBRC 100990 (0.010) <i>Staphylococcus caprae</i> (0.010)  <i>Lactobacillus</i> sp. NBRC 107174 (0.010) <i>Slackia exigua</i> (0.010)
Cáncer colorrectal N= 479 H'= 2.0569	<i>Parabacteroides</i> sp. D13 (15.27225018) <i>Bacteroides</i> sp. 4_3_47FAA (6.080699921) <i>Bacteroides</i> sp. 2_2_4 (4.672430038) <i>Alistipes</i> sp. HGB5 (4.348659992) <i>Faecalibacterium</i> sp. MC_41 (3.514454961) <i>Coprococcus</i> sp. ART55/1 (2.984960079) <i>Faecalibacterium prausnitzii</i> (2.967144966) <i>Bacteroides</i> sp. 2_1_22 (2.752594948) <i>Clostridium</i> sp. L2-50 (2.397480011) <i>Bacteroides</i> uniformis (2.205534935)	<i>Clostridium</i> sp. ATCC 29733 (0.0100428) <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (0.0100634) <i>Enhydrobacter aerosaccus</i> (0.0100922) <i>Paracoccus</i> sp. NBRC 100641 (0.010166055) <i>Kandleria vitulina</i> (0.01016645)  <i>Clostridium</i> septicum (0.0102017) <i>Blautia hydrogenotrophica</i> (0.0102045) <i>Streptococcus mutans</i> (0.0102155) <i>Bacteroides barnesiae</i> (0.0102767) <i>Pseudomonas</i> sp. NBRC 111140 (0.0102836)

Fenotipo	Especies con mayor abundancia media	Especies con menor abundancia media
Diarrea N=402 H'= 3.8705	<i>Escherichia coli</i> (15.477)  <i>Rummeliibacillus pycnus</i> (9.939) <i>Brachyspira pilosicoli</i> (8.092)  <i>Faecalibacterium</i> sp. MC_41 (7.618) <i>Enterococcus faecalis</i> (6.501) <i>Prevotella copri</i> (5.823)  <i>Bacteroides vulgatus</i> (5.444)  <i>Helicobacter fennelliae</i> (4.558) <i>Lactobacillus ruminis</i> (4.197) <i>Phascolarctobacterium succinatutens</i> (4.159)	<i>Acinetobacter oleivorans</i> (0.010)  <i>Gemella cuniculi</i> (0.010) <i>Virgibacillus</i> sp. YIM C826 (0.010) <i>Bacillus endophyticus</i> (0.010)  <i>Jonquetella anthropi</i> (0.010) <i>Spiroplasma alleghenense</i> (0.010) <i>Sphingobium xenophagum</i> (0.011) <i>Clostridium aceticum</i> (0.011) <i>Aeromonas popoffii</i> (0.011) <i>Paenibacillus</i> sp. NBRC 13630 (0.011)
Colitis Ulcerosa N=366 H'= 4.4995	<i>Bacteroides</i> sp. 9_1_42FAA (13.2929) <i>Bacteroides</i> sp. 4_3_47FAA (11.6915) <i>Acidaminococcus</i> sp. HPA0509 (10.4253) <i>Cetobacterium somerae</i> (10.2356) <i>Faecalibacterium</i> sp. MC_41 (8.6228) <i>tCoprococcus</i> sp. ART55/1 (7.7423) <i>Prevotella copri</i> (6.4738)  <i>Clostridium</i> sp. L2-50 (5.9638)  <i>Faecalibacterium prausnitzii</i> (4.3155) <i>Bacteroides vulgatus</i> (4.1057)	<i>Leucobacter aridicollis</i> (0.0095)  <i>Thalassolituus oleivorans</i> (0.0098) <i>marine gamma proteobacterium</i> HTCC2246 (0.0100) <i>Saccharomonospora paurometabolica</i> (0.0102) <i>Terasakiella pusilla</i> (0.0103)  <i>Rudanella lutea</i> (0.0106)  <i>Chryseobacterium gambrini</i> (0.0106) <i>Sporolactobacillus dextrus</i> (0.0110) <i>Bacillus</i> sp. NBRC 3527 (0.0115) <i>Actinobacillus suis</i> (0.0115)

Tabla 1: Especies con mayor y menor abundancia media para cada uno de los fenotipos. Se muestra la media de la abundancia relativa para cada especie. Se muestra el número de especies (N) y el índice de Shannon (H') de los fenotipos.



426,  $m=20$ ), pero menor al fenotipo de Colitis ulcerosa (**Figura 4**). Lo anterior podría indicar una sobrepoblación de especies en los padecimientos, que en condiciones normales de salud se excluyen mutuamente. De igual forma, la mayor cantidad de exclusiones mutuas en el fenotipo de Colitis concuerda con los resultados previos que muestran menor número de especies en el mismo (**Figura 1d**).

Con la finalidad de observar el comportamiento de los nodos, se graficaron las distribuciones de grado, es decir, del número de enlaces de cada nodo. Para el fenotipo sano, prácticamente no hubo nodos con grado bajo y la mayoría presentó un grado intermedio, con pocos nodos de grado alto (**Figura 5**).

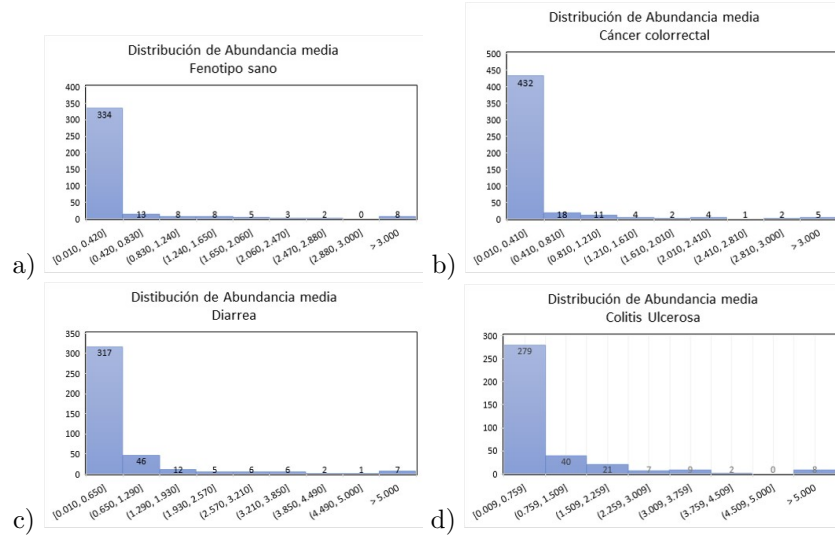


Figura 1: Histogramas de la media de abundancia relativa de las especies. **a)** Fenotipo sano, con 381 especies. **b)** Cáncer colorrectal, con 479 especies. **c)** Diarrea, con 402 especies. **d)** Colitis ulcerosa, con 366 especies.

En los fenotipos de cáncer y diarrea se mostraron más nodos con grado intermedio-alto; sin embargo, destacó una pequeña proporción de nodos con grado muy alto en el histograma de Diarrea (**Figura 5a**). Esto se ve reflejado en la **Tabla 1**, para el fenotipo de Diarrea, donde las especies catalogadas como “Unknown” presentan un mayor coeficiente de centralidad de grado y un grado mayor.

Por otra parte, la distribución del fenotipo Colitis mostró una abundancia mayor de nodos con grado alto, que disminuía conforme aumentaba el grado, pero que presentó mucho nodos con grado alto (**Figura 5a**). Los resultados sugieren que en el fenotipo de cáncer existe un mayor número de especies correlacionadas entre sí; mientras que en el fenotipo Diarrea un número bajo de especies puede

tener correlación con una gran cantidad de nodos y estas podrían tener grados de centralidad altos. Las distribuciones de grado para los enlaces negativos fueron parecidas para todos los fenotipos, teniendo muchos nodos con grado bajo y pocos nodos con grado alto ( **Figura 5b**).

### Medidas de centralidad

Las medidas de centralidad indican la posición e importancia de un nodo dentro de la red (Polanco, 2008). En el fenotipo de Colitis y Cáncer se encontraron nodos con alto grado (**Figura 5**). Con la finalidad de observar la posición de estos, así como de identificar especies importantes, se calcularon las medidas de centralidad

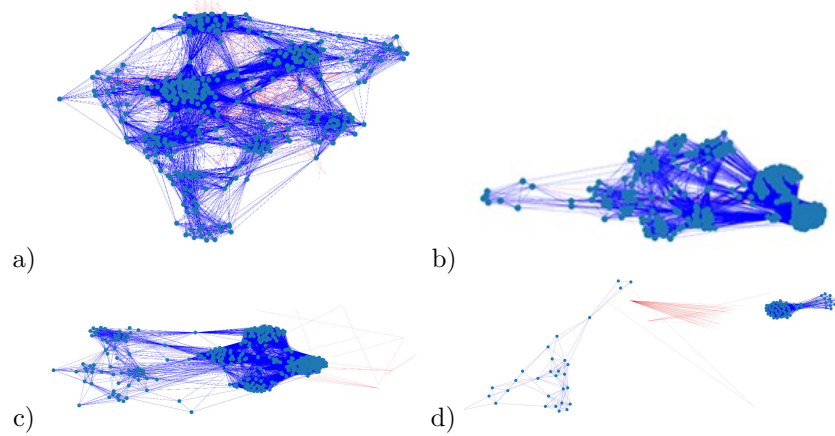


Figura 2: Redes de co-ocurrencia. **a)** fenotipo sano, con número de nodos  $n=398$ , número de enlaces  $m=11200$  y grado promedio  $\langle k \rangle = 56.28$  **b)** Cáncer colorrectal, con  $n=604$ ,  $m=45552$  y  $\langle k \rangle = 150.83$  **c)** Diarrea, con  $n=426$ ,  $m=21140$ ,  $\langle k \rangle = 99.25$ . **d)** Colitis ulcerosa, con  $n=104$ ,  $m=1640$ ,  $\langle k \rangle = 31.54$ .

Fenotipo: Sano		
Especie	Grado	Centralidad de Grado
Bifidobacterium tsurumiense	133	0.335
Streptococcus mitis	131	0.3308
Bacteroides helcogenes	122	0.308
Actinomyces sp.	120	0.303
Cellulosilyticum lentocellum	120	0.303

Fenotipo: Cáncer colorrectal		
Especie	Grado	Centralidad de Grado
[ <i>Clostridium</i> ] innocuum	408	0.6788
Anaerocolumna aminovalerica	407	0.6772
Barnesiella viscericola	407	0.6772
Bifidobacterium scardovii	407	0.6772
Blautia producta	407	0.6772

Fenotipo: Diarrea		
Especie	Grado	Centralidad de Grado
Unknown	391	0.9221
Caldilinea aerophila	245	0.5778
Bacteroides rodentium	241	0.5683
Clostridium tertium	239	0.5636
Nubsella zeaxanthinifaciens	231	0.5448

Fenotipo: Colitis		
Especie	Grado	Centralidad de Grado
Peptostreptococcus anaerobius	66	0.6470
Sutterella sanguinus	66	0.6470
Ralstonia pickettii	66	0.6470
Sutterella parvibra	65	0.6372
Mesorhizobium huakuii	62	0.6078

Tabla 2: Especies con mayor número de conectividad en la red para cada uno de los fenotipos (sólo se muestran 5 especies por fenotipo).

En primer lugar, para identificar módulos densos en las redes y explorar patrones biológicos de comunidades microbianas altamente conectados y establecidas, realizamos un análisis de componentes para la detección de comunidades en la red. Los módulos son unidades elementales de cualquier red biológica, y su identificación y caracterización nos proporciona más información sobre los patrones de interacción local en la red y su contribución a la estructura general, la conectividad y función de la red (Layeghifard, et al., 2017). Los resultados para la red con correlaciones positivas arrojaron distintos grados de conectividad en las redes de cada fenotipo, pudiéndose observar esto en los coeficientes de clustering obtenidos y en el número de componentes detectados. En la **Figura 6**, se puede observar los componentes para cada fenotipo; todos los fenotipos muestran un coeficiente de clustering alto, siendo 0.746, 0.825, 0.784 y 0.855, respectivamente, y con un número relativamente bajo de componentes (Sano: 5, Cáncer: 3; Diarrea: 4 y Colitis: 2), siendo el fenotipo de Colitis el que menor número de comunidades presentó. La formación de estos agrupamientos bien establecidos puede sugerir que en conjunto los organismos que se encuentran altamente interconectados dentro de los módulos desempeñan funciones biológicas similares dentro del fenotipo.

Por otro lado, para evaluar el comportamiento de las comunidades en las redes con correlaciones negativas, se efectuó el mismo análisis. Sin embargo, los resultados arrojados mostraron coeficientes de clustering demasiado bajos así como una cantidad de componentes mayor como resultado de la baja conectividad con otros nodos (**Figura 7**). El número alto de componentes y grado bajo de conectividad es reflejo del bajo número de nodos con correlaciones negativas (**Figura 4**). El caso del Fenotipo sano (**Figura 7a**) mostró un resultado llamativo con respecto a los otros fenotipos, pues presenta un grado de conectividad mayor y componentes un poco más definidos. Asimismo, en el caso del fenotipo de Colitis (**Figura 7d**) podemos observar que los componentes formados siguen el patrón de exclusión mutua ilustrado en la **Figura 2**.

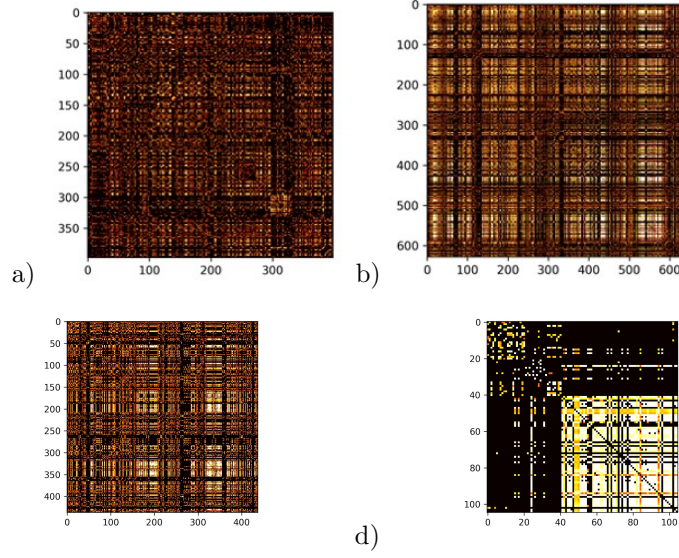


Figura 3: Mapa de calor de enlaces positivos. **a)** Fenotipo sano. **b)** Cáncer colorrectal, **c)** Diarrea. **d)** Colitis

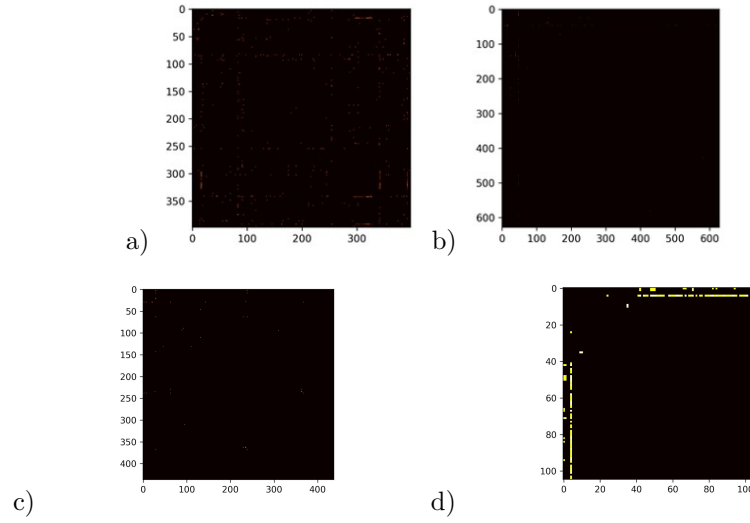


Figura 4: Mapa de calor de enlaces negativos. **a)** Fenotipo sano, con número de nodos  $n=398$ , número de enlaces  $m=240$  y grado promedio  $\langle k_i \rangle = 1.21$ . **b)** Cáncer colorrectal, con  $n=604$ ,  $m=27$ ,  $\langle k_i \rangle = 0.09$  **c)** Diarrea, con  $n=426$ ,  $m=20$  y  $\langle k_i \rangle = 0.09$  **d)** Colitis con  $n=104$ ,  $m=71$ ,  $\langle k_i \rangle = 1.37$

Las medidas de centralidad suelen revelar cuál o cuáles nodos tienen importancia dentro de la dinámica y estructura de la red. Existen diversas medidas de centralidad, pero entre ellas, las más empleadas dentro del análisis de redes son la de intermediación (betweenness centrality), de cercanía (closeness centrality) y de grado (degree centrality) (Layeghifard, et al., 2017). Algo interesante de estas medidas de centralidad aplicadas a una misma red, es que pueden arrojar resultados similares en cuanto a la importancia de un nodo dentro de la comunidad, aunque no siempre se cumple y concuerda con la denominación de especies clave (Berry y Widder, 2011). Para evaluar si bajo las diferentes medidas de centralidad nuestros nodos se comportan de forma similar, se evaluaron las redes usando la medida de centralidad Betweenness, Closeness y de Grado, ilustrados en las **Figuras 8 y 9**.

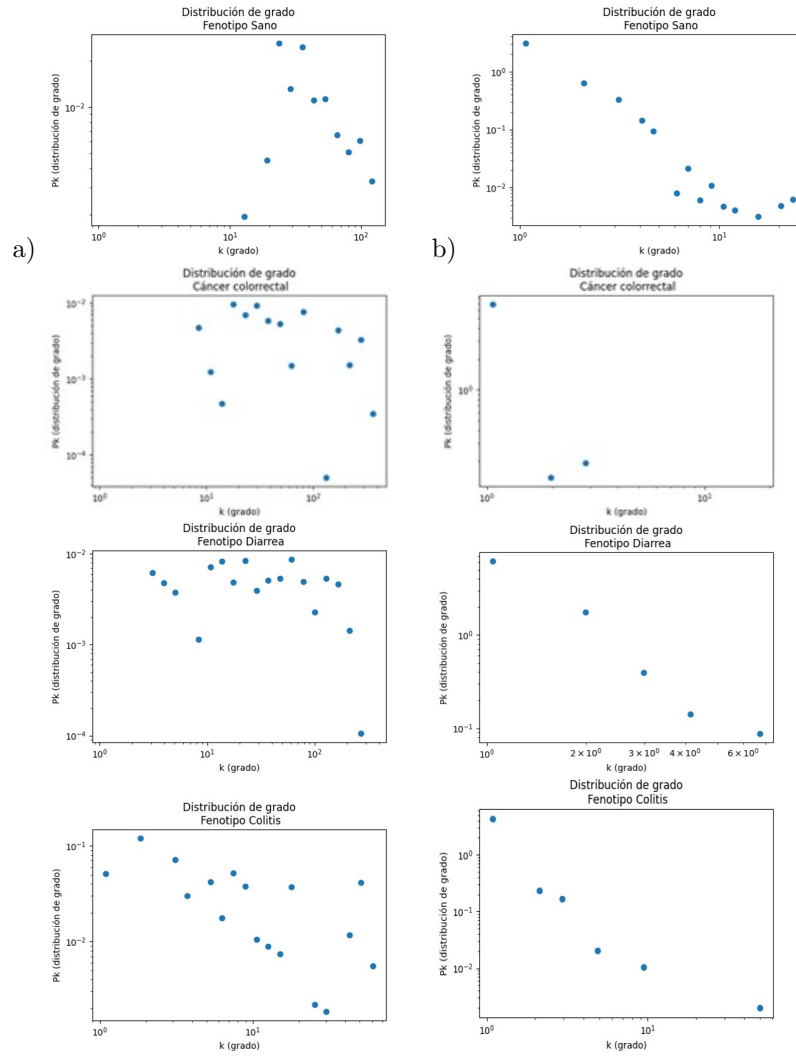


Figura 5: Distribución de grado en escala logarítmica. **a)** Distribuciones de enlaces positivos, **b)** Distribuciones de enlaces negativos.

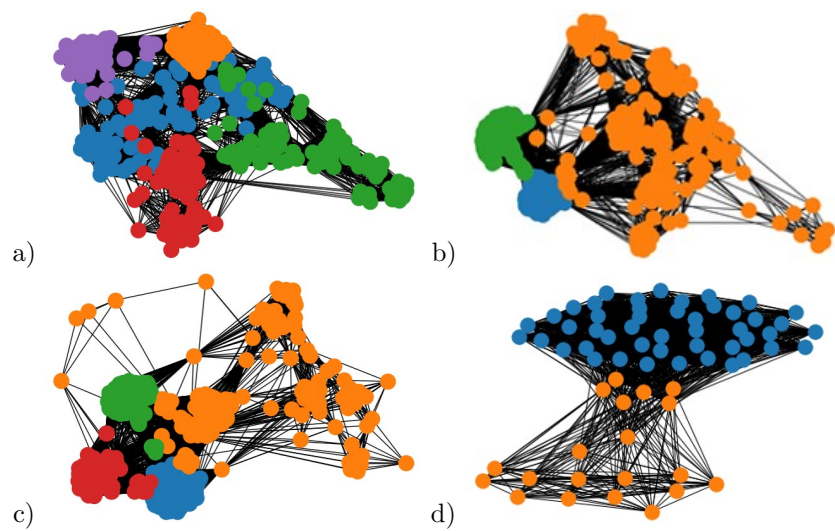


Figura 6: Componentes de red de correlación positiva. **a)** Fenotipo sano 0.746. **b)** Cáncer colorrectal. 0.825, **c)** Diarrea. 0.784. **d)** Colitis 0.855



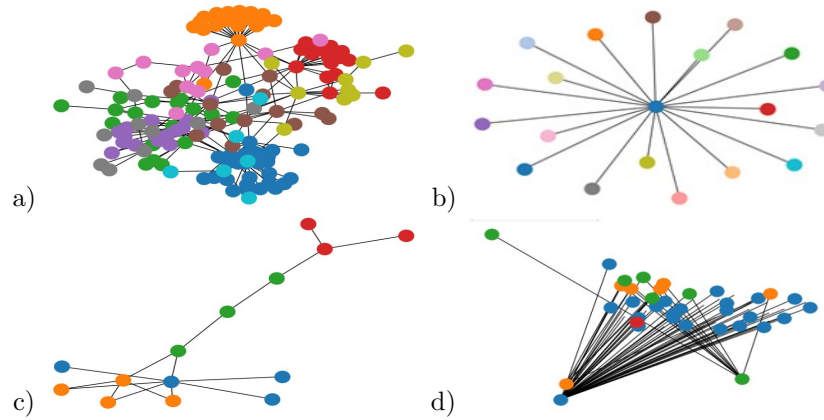


Figura 7: Componentes de red de correlación negativa. **a)** Fenotipo sano. **b)** Cáncer colorrectal, **c)** Diarrea **d)** Colitis.

Los resultados de las medidas de centralidad Betweenness para los distintos fenotipos se encuentran en la **Figura 8**. Para los fenotipos de Diarrea, Cáncer y Colitis, se puede observar que hay algunos nodos más grandes que otros, siendo este tamaño consecuencia de su alto coeficiente de centralidad (**Figura 9 b-c**). En la **Tabla 3**, se puede apreciar cuáles son las especies que más destacan en esta red bajo la medida de centralidad del tipo Betweenness, siendo [*Clostridium*] innocuum, Unknown y *Peptostreptococcus anaerobius* las que presentan un mayor coeficiente para los fenotipos de Diarrea, Cáncer colorrectal y Colitis, respectivamente. En cambio, en el fenotipo Sano (**Figura 8a**), el coeficiente de tipo Betweenness tiene valores muy similares entre los nodos, siendo *Bifidobacterium tsurumiense* y *Streptococcus mitis* las especies con los valores de coeficiente más altos (0.033 y 0.031, respectivamente).

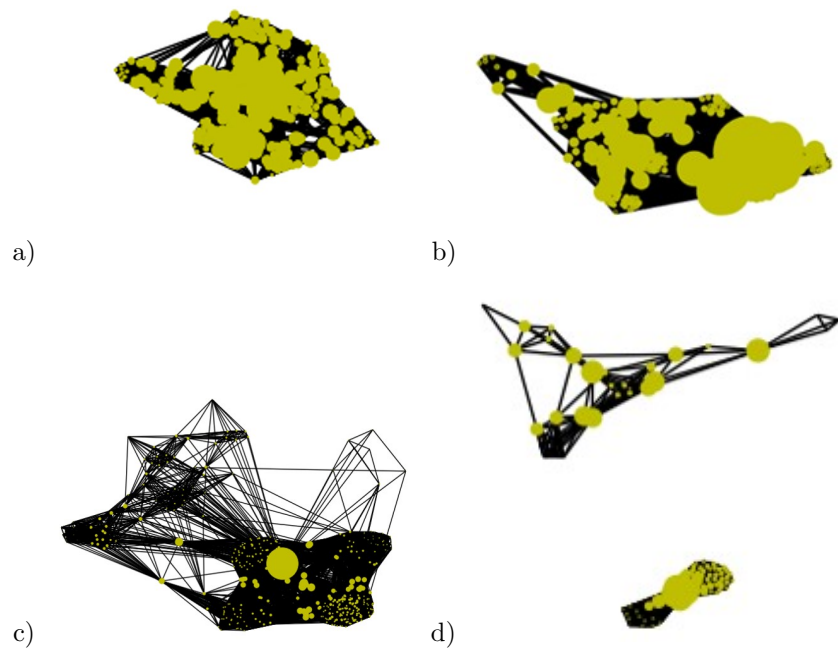


Figura 8: Red con valores de Betweenness Centrality. **a)** fenotipo sano. **b)** Cáncer colorrectal. **c)** Diarrea. **d)** Colitis Ulcerosa. (los valores de centralidad más altos están representados por el tamaño del círculo. Estos valores se encuentran en la Tabla 3. junto a las especies a las que pertenecen estos valores)

Con respecto a la medida de centralidad de tipo Closeness, los resultados arrojados fueron muy similares a los de la centralidad de tipo Betweenness, siendo las mismas especies las que obtuvieron el mayor coeficiente de centralidad, con excepción del fenotipo Sano, el cual mostró cinco especies totalmente distintas a las que se encontraban en las primeras posiciones en la centralidad de tipo Betweenness (**Tabla 4.**) (*Veillonella dispar*, *Veillonella atypica*, *Streptococcus suis*, *Rikenella microfus* y *Paraclostridium bifermentans*). En el caso del fenotipo de Cáncer colorrectal, el umbral entre los coeficientes de las cinco especies (*[Clostridium] innocuum*, *Anaerocolumna aminovalerica*, *Barnesiella viscericola*, *Bifidobacterium scardovii* y *Blautia producta*) con mayor centralidad disminuyó, dejando valores muy similares.

Fenotipo: Sano	
Especie	Betweenneess
Bifidobacterium tsurumiense	0.0333
Streptococcus mitis	0.03164
Bacteroides helco- genes	0.0284
Actinomyces sp.	0.0284
Cellulosilyticum lentocellum	0.0275

Fenotipo: Cáncer colorrectal	
Especie	Betweenneess
<i>[Clostridium]</i> innocuum	0.0707
Anaerocolumna aminovalerica	0.0362
Barnesiella visceri- cola	0.0333
Bifidobacterium scardovii	0.0312
Blautia producta	0.0309

Fenotipo: Diarrea	
Especie	Betweenneess
Unknown	0.317
Caldilinea aerophila	0.0175
Bacteroides rodentium	0.0158
Clostridium tertium	0.0157
Nubsella zeaxanthinifaciens	0.0152

Fenotipo: Colitis	
Especie	Betweenneess
Peptostreptococcus anaerobius	0.0195
Sutterella sanguinus	0.0195
Ralstonia pickettii	0.0195
Sutterella parvibra	0.0177
Mesorhizobium huakuii	0.0176

Tabla 3: Especies con mayor coeficiente de centralidad del tipo betweenneess para cada uno de los fenotipos (sólo se muestran 5 especies por fenotipo).

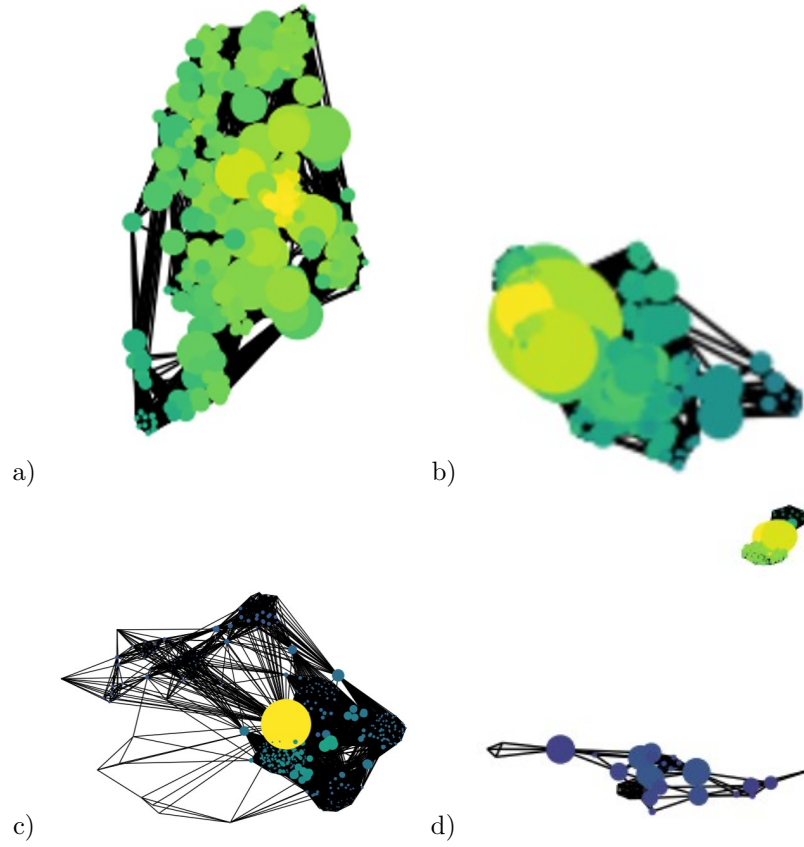


Figura 9: Red con valores de Closeness centrality. **a)** Fenotipo Sano. **b)** Cáncer colorrectal. **c)** Diarrea. **d)** Colitis Ulcerosa. (los valores de centralidad más altos están representados por el tamaño del círculo. Estos valores se encuentran en la Tabla 3. junto a las especies a las que pertenecen estos valores)

Finalmente, en cuanto al coeficiente de centralidad de Grado de cada uno de los fenotipos, se obtuvieron resultados similares a las otras medidas de centralidad (en el caso del fenotipo sano sólo es similar a la de tipo Betweenness) arrojando las mismas especies con los máximos valores de centralidad (**Tabla 2, Tabla 3 y Tabla 4**). Estos resultados sugieren que estas especies con alto coeficiente de centralidad son o desempeñan un papel fundamental dentro de la estructura y dinámica del núcleo del microbioma. Esto no quiere decir, por supuesto, que estas especies son las causantes del estado de salud o el estado patológico de los hospederos donde se encuentran.

### Discusión y conclusiones

Los resultados de este estudio refutan nuestra hipótesis de que el fenotipo sano muestra mayor abundancia de especies e interacciones positivas entre ellas. No obstante, aunque los microbiomas de padecimientos sí mostraron mayor diversidad (a excepción del Cáncer), es claro que hay una desregulación en la representación de las diferentes especies en cada fenotipo.

El Cáncer colorrectal se asocia a cambios en la diversidad de especies (Won Yu, 2019). Lu et al., (2016) demostraron que la diversidad alfa es mayor en tejidos adenomatosos colorrectales, comparado con los sanos. Esto coincide con los resultados aquí mostrados, ya que el cáncer tuvo mayor número de especies tanto en los datos globales, como en la red. De igual manera, diversos estudios sugieren que los adenoplasmas están relacionados con cambios en la abundancia relativa, especialmente de especies patógenas, dentro de las que destacan *Fusobacterium*, *Peptostreptococcus*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Parvimonas*, *Bacteroides*, *Clostridium* y *Gemella* (Ternes, 2020). El microbioma influye en el huésped a través de la interacción con el sistema inmune, el metabolismo y la producción de genotóxicos (Wong Yu, 2019). Dentro de las especies que identificamos con mayor abundancia en el fenotipo de Cáncer, se encontraban representantes de los géneros *Parabacteroides* y *Bacteroides*. Este último género se ve involucrado en la inducción de carcinogénesis, a través de mecanismos como la desencadenación de procesos inflamatorios y la producción de toxinas que dañan el DNA (Goodwin et al., 2011).

Por otra parte, las especies y géneros *Clostridium innocuum*, *Bifidobacterium* y *Barnesiella viscericola* mostraron valores altos de centralidad de grado, lo que quiere decir que están correlacionadas con muchas especies. A su vez, se encontró que estas y *Bacteroides fragilis* se correlacionan negativamente con *Ruminococcus torques*, es decir, se excluyen mutuamente. Un estudio previo de Dai et al., mostró que un grupo de bacterias enriquecidas en cáncer, entre las que se encontraba *Bacteroides fragilis*, interactúan negativamente con bacterias probióticas, cuya abundancia relativa disminuía a consecuencia del padecimiento. Lo anterior sugiere que los nodos que se encuentran en zonas de centralidad alta (betweenness y closeness), podrían representar especies muy correlacionadas entre sí, cuyas interacciones excluyen o repercuten sobre especies que en condiciones de salud normales estarían más conectadas o tendrían mayor abundancia.

Fenotipo: Sano		Fenotipo: Cáncer colorrectal	
Especie	Closeness	Especie	Closeness
<i>Veillonella dispar</i>	0.5387	<i>[Clostridium] innocuum</i>	0.7311
<i>Veillonella atypica</i>	0.5351	<i>Anaerocolumna aminovalerica</i>	0.7302
<i>Streptococcus suis</i>	0.5351	<i>Barnesiella viscericola</i>	0.7302
<i>Rikenella microfus</i>	0.5351	<i>Bifidobacterium scardovii</i>	0.7302
<i>Paraclostridium bifermentans</i>	0.5351	<i>Blautia producta</i>	0.7302
Fenotipo: Diarrea		Fenotipo: Colitis	
Especie	Closeness	Especie	Closeness
Unknown'	0.9277	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	0.6470
<i>Caldilinea aerophila</i>	0.6916	<i>Sutterella sanguinus</i>	0.6470
<i>Bacteroides rodentium</i>	0.6871	<i>Ralstonia pickettii</i>	0.6470
<i>Clostridium tertium</i>	0.6849	<i>Sutterella parvirubra</i>	0.6374
<i>Blautia obeum</i>	0.6827	<i>Mesorhizobium huakuii</i>	0.6100

Tabla4. Especies con mayor coeficiente e centralidad de tipo closeness para cada uno de los fenotipos (sólo se muestran 5 especies por fenotipo).

Por otra parte, las especies y géneros *Clostridium innocuum*, *Bifidobacterium* y *Barnesiella viscericola* mostraron valores altos de centralidad de grado, lo que quiere decir que están correlacionadas con muchas especies. A su vez, se encontró que estas y *Bacteroides fragilis* se correlacionan negativamente con *Ruminococcus torques*, es decir, se excluyen mutuamente. Un estudio previo de Dai et al., mostró que un grupo de bacterias enriquecidas en cáncer, entre las que se encontraba *Bacteroides fragilis*, interactúan negativamente con bacterias probióticas, cuya abundancia relativa disminuía a consecuencia del padecimiento. Lo anterior sugiere que los nodos que se encuentran en zonas de centralidad alta (betweenness y closeness), podrían representar especies muy correlacionadas entre sí, cuyas interacciones excluyen o repercuten sobre especies que en condiciones de salud normales estarían más conectadas o tendrían mayor abundancia.

La Diarrea es un síntoma típicamente asociado a enfermedades ocasionadas por organismos patógenos como *E. coli*, *Shigella* sp. y *Salmonella* sp (Fei, et al., 2019). Como era de esperarse, nuestros resultados arrojaron entre sus especies más abundantes a *E. coli*. No obstante, también revelaron abundancias altas de otros organismos enteros patogénicos como *Brachyspira pilosicoli*, cuya presencia en el tracto digestivo se ha asociado a la diarrea (Hampson, 2018). Con respecto al índice de diversidad de Shannon, este fenotipo mostró el valor más alto entre nuestros fenotipos seleccionados, incluso comparado con el fenotipo Sano. Este resultado podría deberse a que durante una diarrea existe una disbiosis pronunciada debido al cambio en las micro condiciones del tracto gastrointestinal, en las que se crean las condiciones ideales para que haya nueva colonización de microorganismos, pero permitiendo que se conserven los organismos del estado microbiótico saludable (Youmans, et al., 2015).

Un aspecto que resulta curioso al evaluar las redes de las medidas de centralidad de la diarrea, es que los organismos catalogados como “unknown” o desconocidos, son los que expresan los valores más altos para cada una de las medidas empleadas en este estudio. Esto sugiere que los organismos que se encuentran dentro de esta categoría se correlacionan muy estrechamente con otras especies del fenotipo. Esto resulta particularmente curioso porque estos organismos desempeñan un rol importante en la dinámica y estructura de la red, formando lo que en otros estudios se ha denominado núcleo de la microbiota (Wassermann, et al., 2019). Sin embargo, dado al desconocimiento que representan los organismos de esta categoría, es difícil discernir otros aspectos sobre ellos, como si su presencia sólo se limita a esta condición patológica o si también se presenta en fenotipos sanos.

La colitis ulcerosa es una enfermedad inflamatoria intestinal crónica que afecta a la mucosa del colon. La afectación se inicia en el recto y, de forma continua, puede alcanzar una extensión variable en sentido proximal hasta el ciego. (Lennard-Jones et al., 1989). Al obtener los resultados nos encontramos con que los organismos *Peptostreptococcus anaerobius*, *Sutterella sanguinis*, *Ralstonia pickettii* están bastante presentes en el estudio; al final se obtuvieron menos organismos en el fenotipo a comparación del fenotipo sano.



A partir de nuestros resultados podemos concluir que la composición y la diversidad microbiótica puede variar de manera sustancial entre los distintos fenotipos de los hospederos. Asimismo, es de resaltar, que esta variación se puede deber a distintos procesos y fenómenos intrínsecos de cada padecimiento y del estado de salud.

Por otro lado, el análisis del microbioma empleando teoría de redes, puede brindar un panorama general de la dinámica y estructura de la red, como la detección de comunidades establecidas y especies clave. Sin embargo, no permite discernir el papel o el tipo de interacción que llevan a cabo los organismos interactuantes dentro de ella, así como otros factores que podrían intervenir en la dinámica de la comunidad. Para poder abarcar esto, es necesario implementar un enfoque holístico que permita discernir las incógnitas envueltas dentro de la microbiota.

### Referencias

- Acuña, R. (2015) Diarrea Aguda. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 26(5), 676-686.
- Amrane, S., Hocquart, M., Afouda, P., Kuete, E., Dione, N., Ngom, I. I., ... y Lagier, J. C. (2019). Metagenomic and culturomic analysis of gut microbiota dysbiosis during *Clostridium difficile* infection. *Scientific reports*, 9(1), 1-8.
- Barabási, A. L. (2016). *Network science*. Cambridge university press.
- Berry, D., y Widder, S. (2014). Deciphering microbial interactions and detecting keystone species with co-occurrence networks. *Frontiers in microbiology*, 5, 219.
- Dai, Z., Coker, O., Nakatsu, G., Wu, W., Zhao, L., Chen, Z., Chan, F., Kristiansen, K., Sung, J., Wong, S., y Yu, J. (2018) Multi-cohort analysis of colorectal cancer metagenome identified altered bacteria across populations and universal bacterial markers. *Microbiome*, 6(70),
- D'Argenio, V., Casaburi, G., Precone, V., y Salvatore, F. (2014). Comparative metagenomic analysis of human gut microbiome composition using two different bioinformatic pipelines. *BioMed research international*.
- Durack, J. y Lynch, S. (2019) The gut microbiome: Relationships with disease and opportunities for therapy. *Journal of Experimental Medicine*, 216(1), 20-40.
- Fei, Z., Lijuan, Y., Xi, Y., Wei, W., Jing, Z., Miao, D., y Shuwen, H. (2019). Gut microbiome associated with chemotherapy-induced diarrhea from the CapeOX regimen as adjuvant chemotherapy in resected stage III colorectal cancer. *Gut pathogens*, 11(1), 18.
- Frazier, T., DiBaise, J. y McClain, C. (2011) Gut microbiota, intestinal permeability, obesity-induced inflammation, and liver injury. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 35, 14-20.
- Goodwin, A., Destefano, C., Wu, S., Huso, D., Wu, X., Murray, T., Hacker, A., Rabizadeh, S., Woster, P., Sears, C. y Casero, R. (2011) Polyamine catabolism contributes to enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*-induced colon tumorigenesis. *PNAS*, 108(37) 15354-15359.
- Jahani-Sherafat, S., Alebouyeh, M., Moghim, S., Amoli, H. y Ghasemian-Safei, H. (2019) Papel de la microbiota intestinal en la patogénesis del cáncer colo-

rectal; un artículo de revisión. *Gastroenterology and Hepatology from Bed to Bench*, 11 (2), 101-109.

Layeghifard, M., Hwang, D. M., y Guttman, D. S. (2017). Disentangling interactions in the microbiome: a network perspective. *Trends in microbiology*, 25(3), 217-228.

Lennard-Jones, J. E. (1989). Classification of inflammatory bowel disease. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 24(sup170), 2-6.

Li, M. Wang, B., Shang, M., Rantalainen, M. Wang, S., Zhou, H. Zhang, Y., Shen, J. Pang, X., Zhang, M., Wei, H., Chen, Y., Lu, H., Zuo, J., Su, M., Qiu, Y., Jia, W., Xiao, C., Smith, L., Yang, S., Holmes, E., Tang, H., Zhao, G., Nicholson, J., Li, L. y Zhao, L. (2008) Symbiotic gut microbes modulate human metabolic phenotypes. *PNAS*, 105(6) 2117-2122

Macpherson, A. J., Hunziker, L., McCoy, K. y Lamarre, A. (2001) IgA responses in the intestinal mucosa against pathogenic and non-pathogenic microorganisms. *Microbes and infection*, 3(12), 1021-1035.

Mai, V. (2004). Dietary modification of the intestinal microbiota. *Nutrition reviews*, 62(6), 235-242.

Manasa-Jandhyala, S., Talukdar, R., Subramanyam, C., Vuyyuru, H., Sasikala, M. y Reddy, N. (2015) Role of the normal gut microbiota. *World Journal of Gastroenterology*, 21(29), 8787-8803.

Marchesi, J. y Ravel, J. (2015) The vocabulary of microbiomal research: a proposal. *Microbiome*, 3:31.

Maslowski, K. M., y Mackay, C. R. (2011). Diet, gut microbiota and immune responses. *Nature immunology*, 12(1), 5-9.

Müller, H., de Toledo, F. W., y Resch, K. (2001). Fasting followed by vegetarian diet in patients with rheumatoid arthritis: a systematic review. *Scandinavian journal of rheumatology*, 30(1), 1-10.

O'Hara, A. M., y Shanahan, F. (2006). The gut flora as a forgotten organ. *EMBO reports*, 7(7), 688-693.

Penders, J., Thijs, C., Vink, C., Stelma, F. F., Snijders, B., Kummeling, I., y Stobberingh, E. E. (2006). Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. *Pediatrics*, 118(2), 511-521.

Polanco, X. (2006) Análisis de redes: introducción. *Redes de conocimiento: Construcción, dinámica y gestión*. Buenos Aires, pp.77-112, 2006

Roldán, M. (2011) Gastritis y gastropatías. *Revista de Gastroenterología de Perú*, 31, 38-48.

Rowland, I., Gibson, G., Heinken, A., Scott, K., Swann, J., Thiele, I. y Tuohy, K. (2017) Gut microbiota functions: metabolism of nutrients and other food components. *European Journal of nutrition*, 5(1), 1-24.

Scheppach, W. (1994). Effects of short chain fatty acids on gut morphology and function. *Gut*, 35(1 Suppl), S35-S38

Ternes, D., Karta, J., Tsenkova, M., Wilmes, P., Haan, S. y Letieller, E. (2020) Microbiome in Colorectal Cancer: How to Get from Meta-omics to Mechanism?. *Cell*, 28(5), 401-423.

Tuddeham, S y Sears, C. (2015) The intestinal microbiome and health. *Current opinion in infectious diseases*, 28(5), 464-470

Turnbaugh, P., Ley, R., Mahowald, M, Magrini, V., Mardis, E. y Gordon, J.

- (2006) An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *nature*, 444(7122), 1027.
- Ursell, L., Metcalf, J., Vegener, L. y Knight, R. (2012) Defining the human microbiome. *Nutrition Reviews*, 70(Suppl 1), S38–S44.
- Uzcátegui, O. (2016) Microbioma humano. *Revista de Obstetricia y Ginecología de Venezuela*, 76(1), 1-3.
- Wassermann, B., Cernava, T., Müller, H., Berg, C., y Berg, G. (2019). Seeds of native alpine plants host unique microbial communities embedded in cross-kingdom networks. *Microbiome*, 7(1), 108.
- Wong, S. y Yu, J. (2019) Gut microbiota in colorectal cancer: mechanisms of action and clinical applications. *Nature Reviews Gastroenterology Hepatology*, 16, 690-704.
- Wolever, T. M., Spadafora, P., y Eshuis, H. (1991). Interaction between colonic acetate and propionate in humans. *The American journal of clinical nutrition*, 53(3), 681-687.
- Wu, S., Sun, C., Li, Y., Wang, T., Jia, L., Lai, S., ... y Luo, Q. (2020). GMrepo: a database of curated and consistently annotated human gut metagenomes. *Nucleic acids research*, 48(D1), D545-D553.
- Youmans, B. P., Ajami, N. J., Jiang, Z. D., Campbell, F., Wadsworth, W. D., Petrosino, J. F., ... Highlander, S. K. (2015). Characterization of the human gut microbiome during travelers' diarrhea. *Gut Microbes*, 6(2), 110-119.