

Proyecto Final

Genómica Computacional 2021-1

Interacciones de la comunidad bacteriana asociada al Microbioma intestinal diferenciado por sexo.

Integrantes:

- Muñoz Barón Luis Miguel	(315116663)
- Acosta Daniel Enrique	(315124772)
- Hernández Leyva Mirén Jessamyn	(315309452)
- Avella Villalobos Mario Alberto	(419003296)
- Conde Alonzo Vanessa Xochitl	(316105408)
- Austria López Astrid	(316115607)

1. Introducción

El metabarcoding aprovecha la determinación de primers “barcode” para taxa específicos que permiten recuperar información de solo un grupo de organismos y llegar a determinar la representación de estos en la comunidad. Esto presenta muchas ventajas ya que el desarrollo de primers “barcode” para taxones de distinto nivel ha aumentado durante las últimas décadas permitiendo que se lleven a cabo cada vez más estudios ecológicos y funcionales de este tipo. (Ficetola et al, 2014).

La estandarización de los métodos de análisis de DNA ambiental por medio de la secuenciación de amplicones (metabarcoding) se ha realizado de manera muy general al igual que otras ramas de la bioinformática. Esto se debe al desarrollo constante de nuevos softwares que a menudo se encuentran optimizados para un tipo de estudio o de datos. A partir del análisis de la calidad de las secuencias crudas y del filtrado de estas mismas, se debe realizar un agrupamiento de los reads que formen unidades taxonómicas operacionales (OTU's) bajo un criterio de similitud para finalizar con la determinación taxonómica, a menudo en contra de bases de datos especializadas para determinados taxa. Es importante destacar que el nivel de umbral de identidad mínimo para asignar la identidad taxonómica a un OTU's es de 97% (Galhardo *et al.*, 2018)

El enfoque convencional para inferir una red de interacciones microbianas consistía en observar el comportamiento de crecimiento en cultivos mixtos de muy pocos microorganismos. Actualmente los programas diseñados para la construcción de redes de interacción a partir de datos de secuenciación de alto rendimiento se apoyan de softwares de computo numérico para optimizar el cálculo de las estimaciones temporales, en el caso de MetaMIS (Shaw et al., 2016) fue diseñado a través de MATLAB R2015b. Las interacciones entre OTU's se infieren por medio de la implementación del modelo de Lotka-Volterra en tiempo discreto junto con métodos estadísticos para manejar datos discretos altamente correlacionados (en este caso por regresión de mínimos cuadrados parciales). A partir del valor obtenido mediante la estimación del modelo se predice qué tipo de interacción se presenta.

El análisis topológico de este tipo de redes a partir de redes reales y aleatorias ha sido empleado para hacer inferencias sobre el origen de este tipo de interacciones, en este proyecto se realizó por medio de la pipeline NetAn (De Anda et al., 2018). A partir de las redes dirigidas calculadas por

MetaMIS, NetAn extrae propiedades clave como la densidad, los nodos con máximo grado de entrada y salida y el coeficiente de agrupamiento, para posteriormente asumir a las redes como aleatorias y calcular la modularidad y el número de comunidades que las integran (Blondel, 2018)

El tracto gastrointestinal humano alberga una población compleja y dinámica de microorganismos que ejercen una influencia marcada sobre el huésped durante la homeostasis y la enfermedad. Múltiples factores contribuyen al establecimiento de la microbiota intestinal humana durante la infancia, considerándose la dieta como uno de los principales impulsores en la configuración de la microbiota intestinal a lo largo de la vida (Danneskiold-Samsøe *et al.*, 2019; Fan & Pedersen, 2021). Es interesante notar que existen diferencias geográficas en cuanto al contenido y riqueza de la microbiota (Yatsunenکو *et al.* 2012). A pesar de que el estudio de estas se ha extendido durante los últimos años, la dificultad de coleccionar muestras bajo series temporales se ha presentado como un obstáculo, el desarrollo de los métodos para la recopilación y el procesamiento de los datos ha permitido conocer cada vez más sobre las características más generales y variables de estas comunidades en diferentes poblaciones humanas. A medida que la composición del microbioma cambia, también lo hace la composición de las proteínas bacterianas producidas en el intestino. En los microbiomas de adultos, se ha encontrado una alta prevalencia de enzimas implicadas en la fermentación, la metanogénesis y el metabolismo de la arginina, el glutamato, el aspartato y la lisina. En cambio, en los microbiomas de los lactantes las enzimas dominantes están implicadas en el metabolismo de la cisteína y en las vías de fermentación (Gerritsen *et al.*, 2011).

Dominant gut phyla:

Bacteroidetes, Firmicutes, Actinobacteria, Proteobacteria, Verrucomicrobia

Predominant families in the:

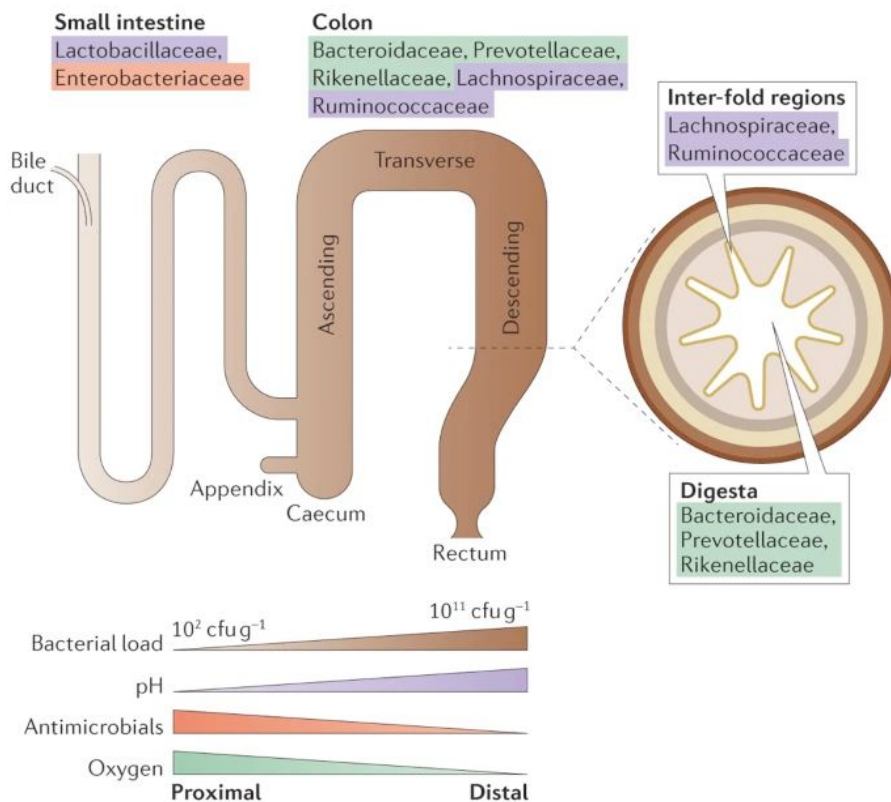


Fig. 1. Las familias de bacterias dominantes del intestino delgado y el colon reflejan diferencias fisiológicas a lo largo del intestino. Los phyla bacterianos dominantes en el intestino son Bacteroidetes, Firmicutes, Actinobacteria, Proteobacteria y Verrucomicrobia. Imagen proveniente de Donaldson et al. (2015).

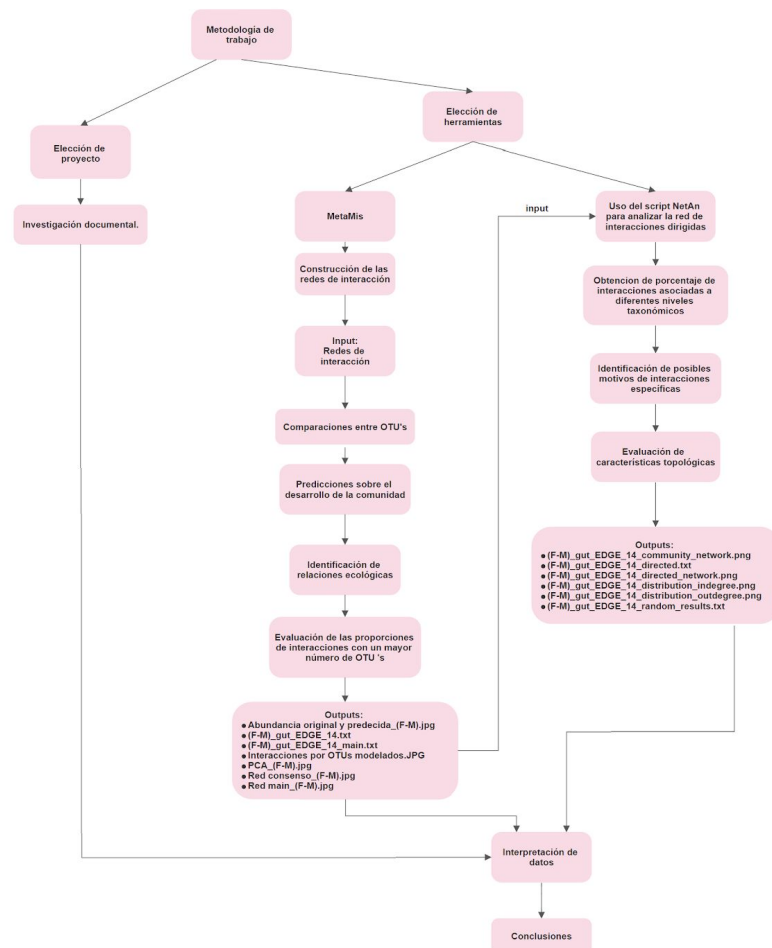
2. Objetivos

- Modelar la red de interacciones ecológicas de la comunidad bacteriana del microbioma intestinal de un sujeto de cada sexo
- Identificar motivos de interacción en las comunidades bacterianas del sistema digestivo mediante el análisis de muestras de 16S rRNA.
- Determinar la estructura de las redes asociadas con el origen de las interacciones entre taxa bacterianos.

3. Hipótesis

Al modelar las interacciones entre la comunidad bacteriana de taxa más abundantes se observará una dinámica de interacción estructuralmente similar en el sujeto mujer y en el hombre.

4. Método



Se utilizaron datos provenientes del artículo de Caropaso y colaboradores de 2011. En ellos se estudió a la microbiota intestinal (a partir de heces) de un hombre y una mujer sanos por 15 meses y por 6 meses respectivamente. Usando la taxonomía de Greengenes, el número total de taxones asignados a nivel Familia fue 92 para el hombre y de 69 para la mujer. Los dos conjuntos de datos se comprobaron más a fondo mediante el programa de corrección del número de copias del gen (Gregory-Carposo *et al.*, 2011).

Tras construir las redes de interacción con el software MetaMIS para los 14 OTU's más abundantes, con los cuales se puedan realizar comparaciones a pesar de las diferencias metodológicas para cada sujeto, se realizarán predicciones sobre el desarrollo de la comunidad y se buscarán relaciones ecológicas tales como mutualismo, depredación o parasitismo, comensalismo y amensalismo. También se evaluaron las proporciones de interacciones positivas y negativas al modelar las redes con un mayor número de OTU 's en cada sujeto y se reportaron las redes consenso generadas por MetaMIS a partir de todas las redes con distinto número de OTU's en la carpeta *outputs* del repositorio.

A partir de la red de interacciones dirigidas, se correrá el script NetAn (De Anda *et al.*, 2018) para analizar esta red, obtener el porcentaje de interacciones asociadas a diferentes niveles taxonómicos, identificar posibles motivos de interacciones específicas y evaluar varias características topológicas como densidad, grado medio, concentradores, componentes conectados, modularidad del coeficiente de agrupamiento asociado a las comunidades.

5. Resultados

Análisis de la red interacción por medio de MetaMIS

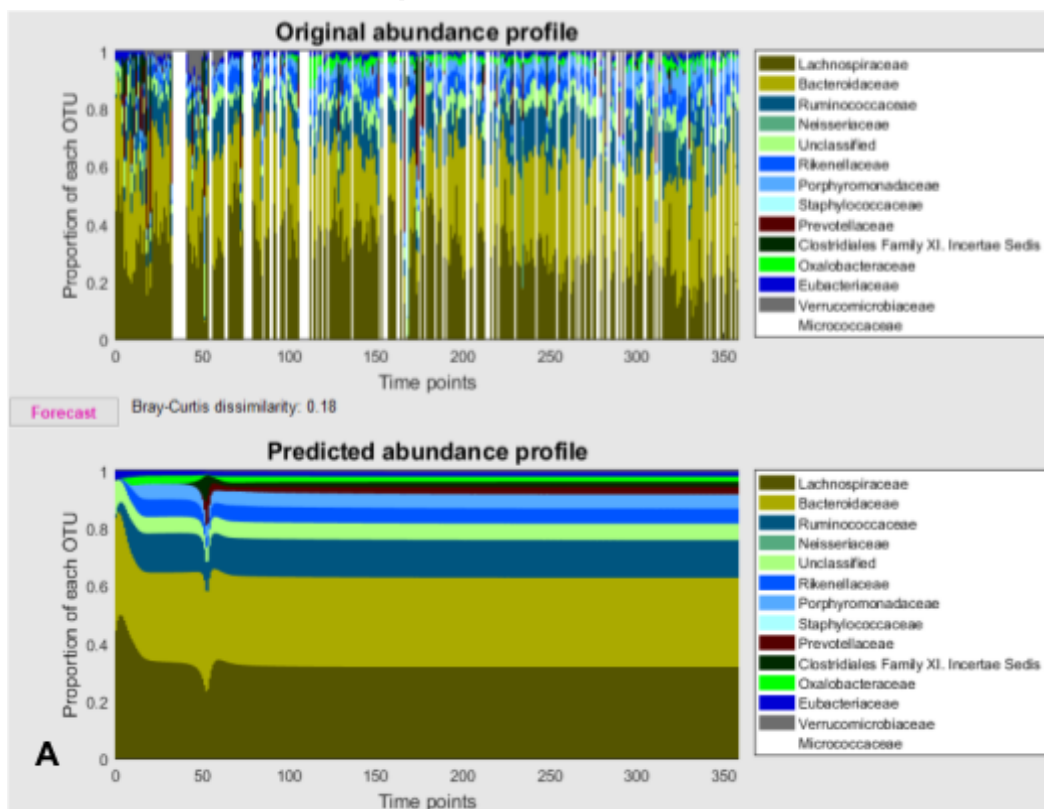


Fig 2. Perfil de abundancia original y predecida en sujeto hombre (A)

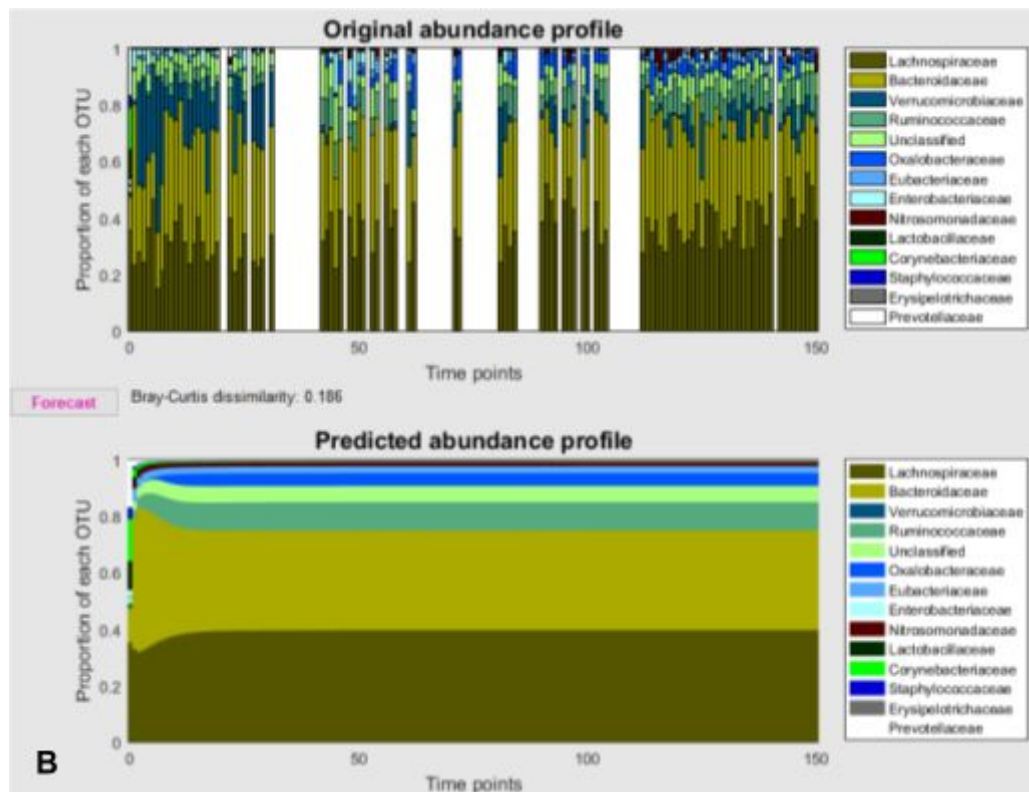


Fig. 3 Perfil de abundancia original y predecida en sujeto femenino (B)

A lo largo del tiempo se observa que los OTU's de las familias Lachnospiraceae y Bacteroidaceae, tanto en la mujer como en el hombre son las más abundantes, formando parte del 80% de la comunidad de la mujer y de más del 60% del total de la diversidad de la comunidad del hombre. Esto era de esperarse porque en múltiples estudios (Segata *et al.*, 2013; Saxena *et al.*, 2016; Kusada *et al.*, 2017) se han reportado estas dos familias como las más abundantes en el tracto intestinal y rectal humano. Resultando incluso que Lachnospiraceae tenga una asociación importante con un estado antiinflamatorio y producción de células T reguladoras en el cuerpo humano (Scher *et al.*, 2013). La mayoría de los taxones observados se encuentran también representados en ambas comunidades (10 de estos).

Las gráficas resultantes no muestran una diferencia entre la predicción y la abundancia real, reflejada en el índice de Bray-Curtis, por lo que se propone que la diversidad de la microbiota es estable considerando que la persona en cuestión no se encontraba en un ambiente totalmente controlado. .

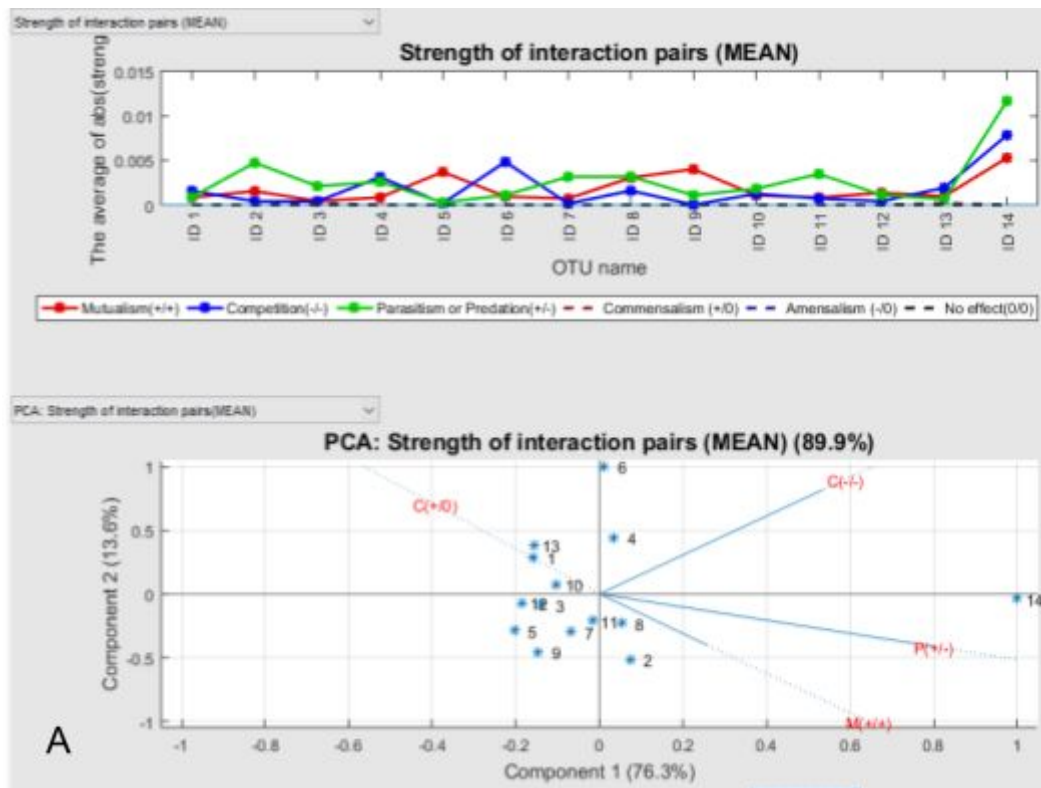


Fig. 4 Análisis de Principales Componentes de los diferentes tipos de interacción en la red del hombre

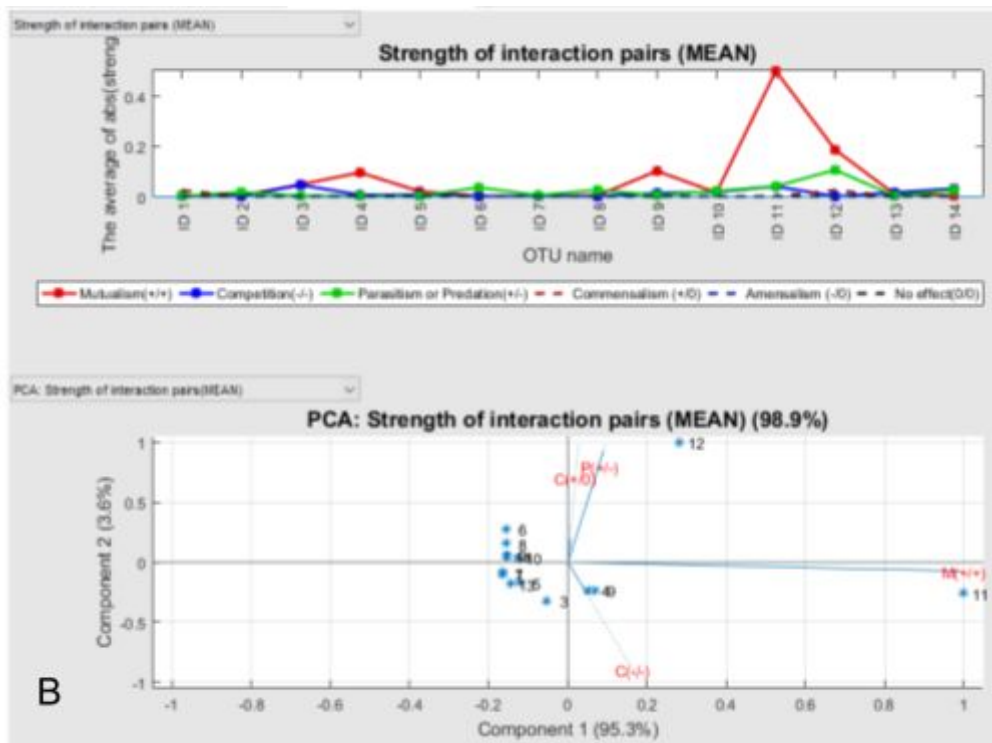


Fig.5 Análisis de Principales Componentes de los diferentes tipos de interacción en la red de la mujer

La interacción más fuerte dentro de la comunidad fue el parasitismo o depredación donde uno de los OTUs se ve beneficiado a expensas de otro, los OTUs ejemplificado por la familia Neisseriaceae y Prevotellaceae que se caracteriza por contener al género Prevotella, estos se alojan en la cavidad bucal produciendo placa, halitosis, y enfermedad periodontal, fueron los que presentaron una

mayor cantidad de parasitismo o depredación, por el contrario, el OTU de la familia Oxalobacteraceae tuvo menor interacción negativa. Otra de las interacciones más destacables dentro de la comunidad fue la competencia, la cual se caracteriza porque los OTUs involucrados en esta interacción biológica disputan por los mismos recursos del ambiente, en general el nivel de competencia es relativamente similar en todos los OTUs, a excepción de de la familia Neisseriaceae y, particularmente, la familia Clostridiales Family XI. Incertae Sedis pues no tuvo ninguna interacción de competencia. La tercera interacción más importante fue la del mutualismo, en este caso en OTU en cuestión se beneficia de la presencia de otros y viceversa puesto que se pueden conferir ciertas ventajas ante otros organismos de la microbiota, uno de los OTUs que resalta sobre los demás es el de Oxalobacteriaceae en el cual, de entre todas sus demás interacciones, el mutualismo formó parte de más de la mitad de sus interacciones. El OTU 14, Micrococcaceae, parece contener la mayoría de las interacciones, por lo que se infiere que su influencia es determinante para la construcción de la red.

Al diferencia que en la red del hombre la interacción predominante parece ser el mutualismo, reflejada con más fuerza en la familia Staphylococcaceae (OTU 11). Al igual que en la comunidad del hombre, a pesar de no ser una familia tan abundante esta tiene una influencia relevante por sus interacciones con el resto de los taxa. Cabe destacar que su baja abundancia puede ser un indicador de la buena salud del hospedero, ya que esta se ha detectado en abundancias altas en casos de cáncer colorrectal junto con otros taxa, por lo que su rol como mutualista fuerte puede tener un efecto importante en la composición de la comunidad asociada a la enfermedad (Marques *et al.*, 2016). La siguiente familia con interacciones más fuertes, Corynebacteriaceae, cuya abundancia elevada ha sido confirmada por otros estudios como un indicador de una microbiota intestinal sana en adultos de edad avanzada (45 - 70), por lo que, a pesar de no ser tan abundante en la comunidad estudiada, la gran intensidad sus interacciones mutualistas con el resto de familias pueden tener relación con esto (Spinner, 2015). Otra de las familias cuyas interacciones mutualistas resaltan en el PCA de la mujer es la número 9, Lactobacillaceae. Se ha encontrado que esta tiende a mantener relaciones metabólicas íntimas con otros taxa e incluso tiene un impacto funcional en el hospedero. La abundancia de esta familia a menudo se ha relacionado con la dieta y el buen funcionamiento del sistema digestivo (p. ej: asimilación de carbohidratos y señalización de factor de crecimiento de insulina), además de que su papel en las comunidades se ha relacionado con el consumo de probióticos (Matos y Leullier, 2014)

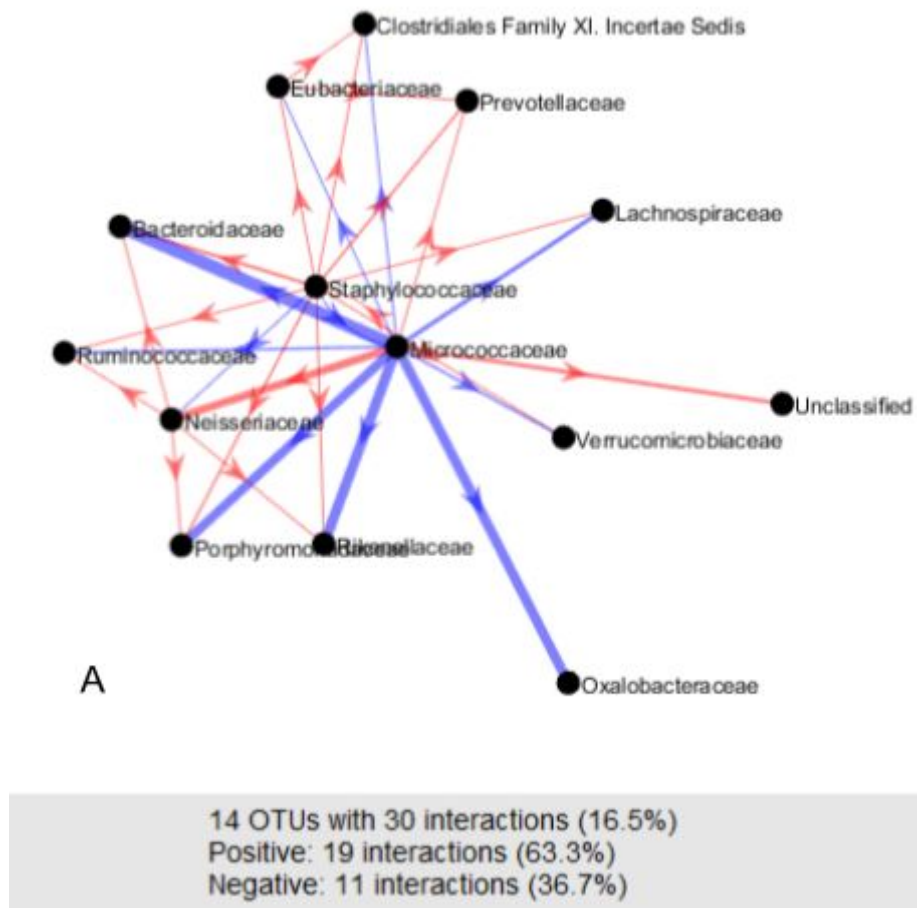


Fig 6. Red de interacción a partir de los OTU's más abundantes del sujeto hombre. Las flechas rojas indican interacciones positivas y las azules negativas.

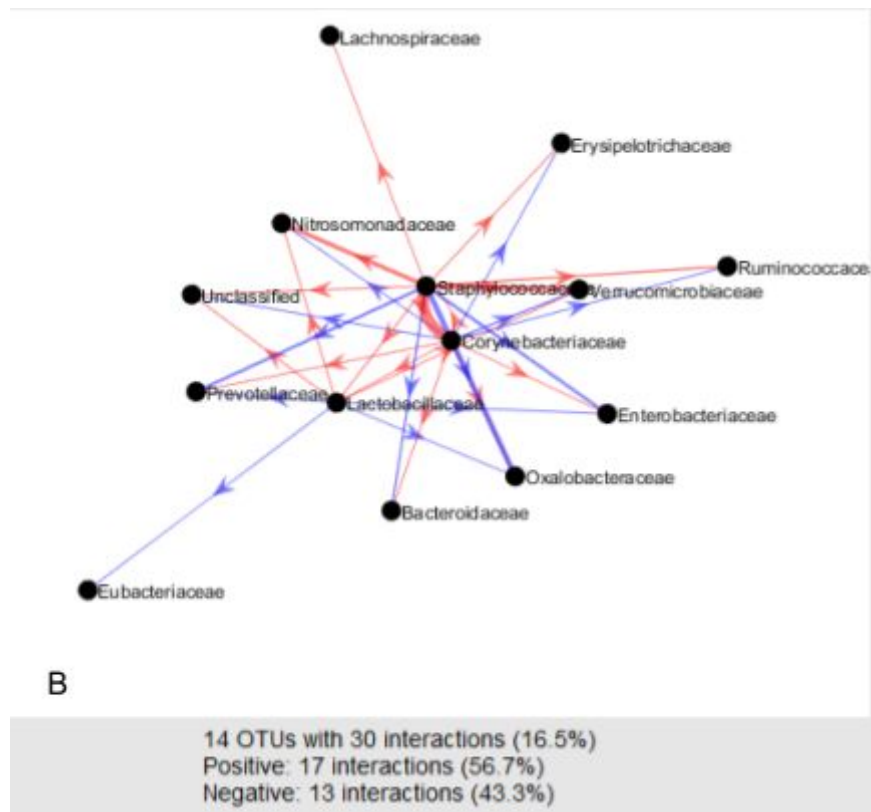


Fig 7. OTU's consenso a partir de todas las redes del sujeto mujer

Al recuperar sólo las 30 interacciones más fuertes se observó en la red del hombre que a pesar de que Micrococcaceae no está entre las familias más abundantes, es la familia que tiene más interacciones fuertes con las otras, presentando 13 interacciones por lo que se infiere que tiene un papel como organizadora a pesar de sólo presentarse en la red del hombre. Esta familia se ha encontrado en otros estudios como un componente activo de la microbiota intestinal y fecal debido a su capacidad de adaptarse a los diferentes taxa que pueden integrar a la comunidad, además de que se ha demostrado que presentan una actividad antibacteriana considerable y una capacidad de resistencia a los antibióticos (Peris-Bondia, 2011; Shaw *et al.*, 2011).

Al contrastar la red generada para la comunidad del hombre y de la mujer podemos observar que a pesar de que no observamos a los mismos taxa como organizadores, se observa una proporción similar de relaciones positivas y negativas. Cabe destacar que en nuestro estudio esto puede verse fuertemente relacionado con la simplicidad del modelo elegido (sólo 14 OTU's), ya que se ha reportado que la exclusión de OTU's raros en la construcción de redes puede tener un efecto importante en las predicciones sobre el comportamiento de la comunidad.

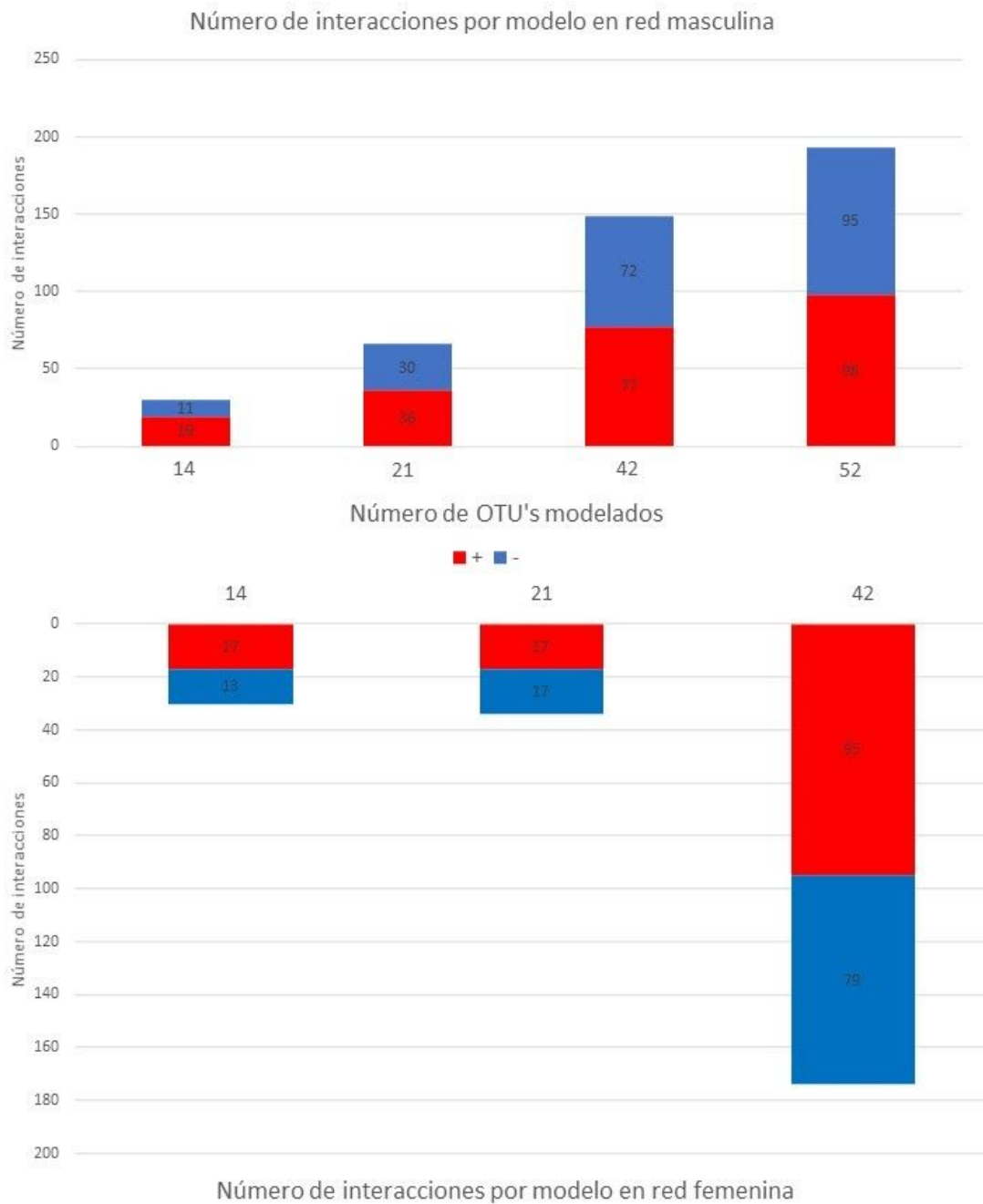


Fig 8. Proporción de interacciones al modelar distinto número de OTU's en cada red

NetAn

Para concluir el análisis de las redes de interacción que MetaMis nos proporciona se corrieron ambas (masculina y femenina) con el script NetAn el cual permite ver estadísticas elementales que nos brindan mayor comprensión sobre la dinámica y la información retratada por la interacción en la comunidad.

Red Femenina

F_gut_EDGE_14 communities

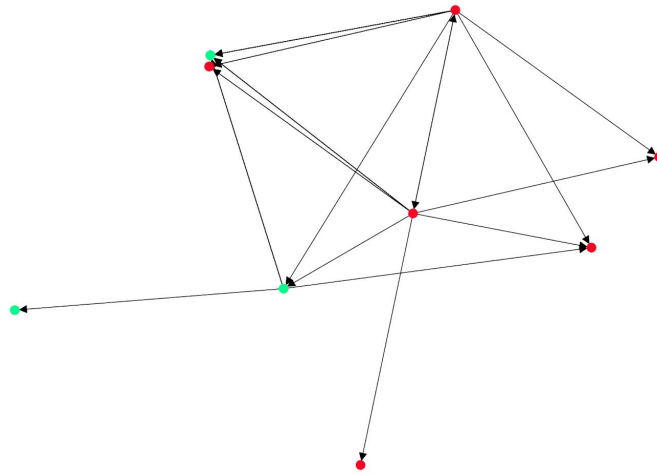


Fig 9. Red de interacción femenina filtrada por NetAn.

Random Analysis Results, Mean Measures:

runs(100)

- [/] order: 14
- [/] size: 30
- [u] diameter: 3.17
- [u] radius: 1.93
- [d] density: 0.1648351648351646
- [d] mean degree: 2.1428571428571406
- [d] clustering coefficient: 0.15575586768389907
- [/] maximum in degree: 4.55
- [/] maximum out degree: 4.67
- [d] hubs with max in degree: 1.65
- [d] hubs with max out degree: 1.6
- [u] modularity: 0.23909913055044274
- [u] coverage: 0.5956093245196693
- [u] performance: 0.7710989010989004
- [u] number of communities: 3.35
- [/] number of connected components: 1.14
- [d] number of strongly connected components: 3.96
- [u] number of cycles in cycle basis: 14.7

[u] undirected associated graph

[d] directed graph

[/] both undirected and directed

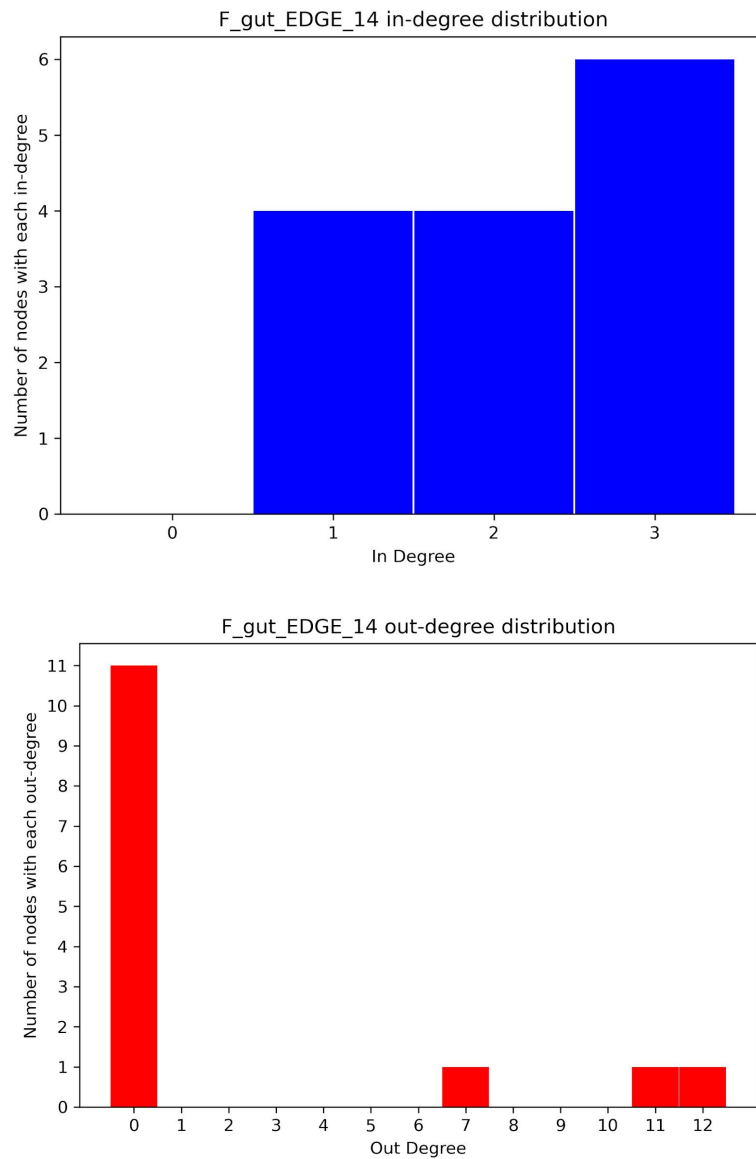


Fig 10. Estadísticas de out/in degree de la gráfica femenina.

La mayoría de los vértices de nuestra gráfica no interactúan con otras especies (dado que tenemos 11 vértices con out-degree 0) y 3 vértices con out-degree 7, 11 y 12 respectivamente.

De lo anterior podemos interpretar que 2 de los vértices que si interactúan presentan comportamientos dominantes en la red, mientras que el tercero solo lo hace con la mitad.

De las estadísticas anteriores podemos notar que hay una especie en nuestra interacción que muestra un comportamiento dominante con respecto al out-degree que la conecta con el resto de los vértices (a saber hay un vértice que interactúa con 12 de los 14 que hay presentes en la red).

El *clustering coefficient* en este análisis es bajo, nos indica la ausencia de algún nodo “acaparador” en el que recaigan todas las interacciones, por lo que éstas están distribuidas.

El valor *density* (0.164...) nos indica que la red no es robusta contra perturbaciones, ya que al ser un valor bajo nos indica la ausencia de clados o nodos altamente conectados (entre más cercano a 1 más densa y por ende más estable la red es).

Interpretando el valor de *modularidad* (0.2390...) que sugiere una preferencia por interacciones competitivas dentro del mismo sistema (entre más cercano a 1 mayor es la estabilidad en la red y entre más cercano a 0 significa que más elementos de la red interactúan entre sí).

Red Masculina

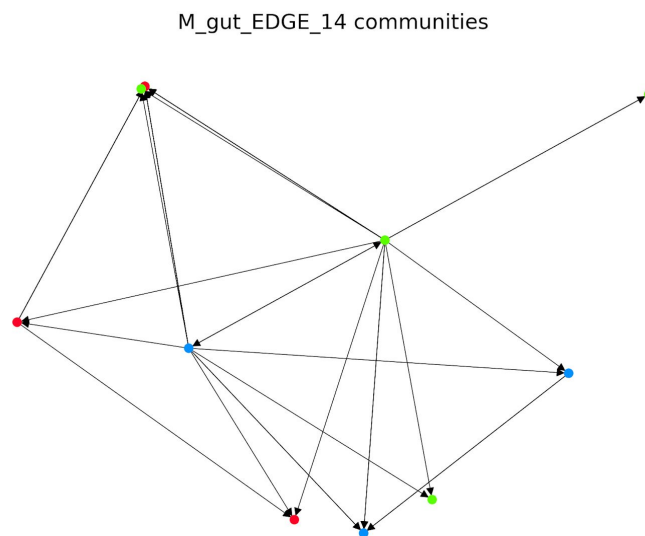


Fig 11. Red de interacción masculina filtrada por NetAn.

Random Analysis Results, Mean Measures:

runs(100)

- [/] order: 14
- [/] size: 30
- [u] diameter: 3.28
- [u] radius: 1.93
- [d] density: 0.1648351648351646
- [d] mean degree: 2.1428571428571406
- [d] clustering coefficient: 0.1533276633536706
- [/] maximum in degree: 4.59
- [/] maximum out degree: 4.73
- [d] hubs with max in degree: 1.77
- [d] hubs with max out degree: 1.56
- [u] modularity: 0.23874454027679082
- [u] coverage: 0.6077017051913604
- [u] performance: 0.7683516483516479
- [u] number of communities: 3.25
- [/] number of connected components: 1.12
- [d] number of strongly connected components: 4.49
- [u] number of cycles in cycle basis: 14.85

[u] undirected associated graph
[d] directed graph
[/] both undirected and directed

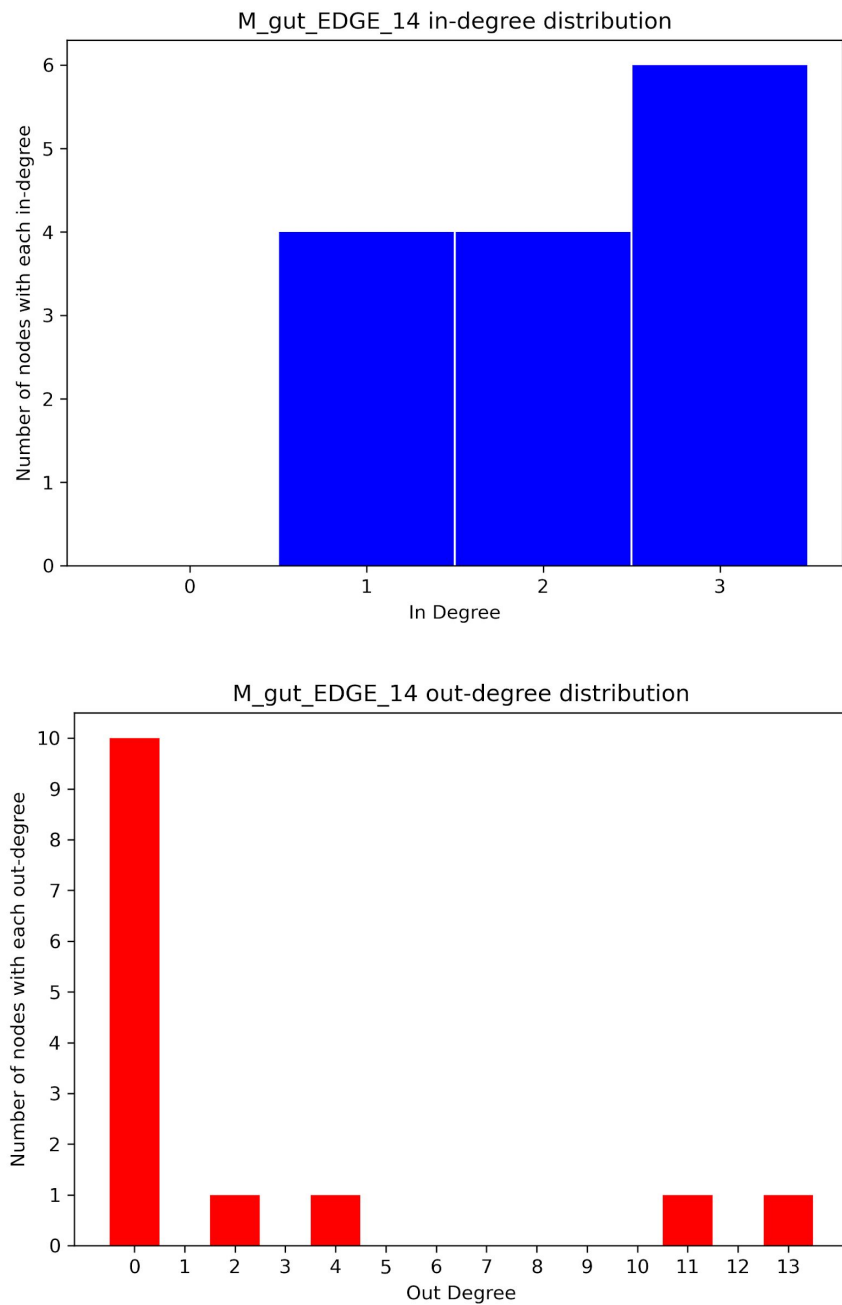


fig 10. estadísticas del out/in degree de la gráfica masculina

Para el caso de la red de interacciones en el tracto masculino se tiene un comportamiento distinto, 10 de los 14 vértices no poseen aristas dirigidas hacia ninguna otra familia, mientras que hay 4 que poseen 2, 4, 11 y 13 aristas dirigidas respectivamente.

De nueva cuenta, hay una especie que tiene un comportamiento dominante en la red ya que esta está conectada con 13 de los 14 vértices. Una familia con un comportamiento menos agresivo conectada a 11 de los 14 vértices y 2 pequeñas familias conectadas a 2 de los 14 vértices y 4 de los 14 vértices respectivamente (estas últimas dos familias tienen un comportamiento menos prominente).

El valor del coeficiente de agrupamiento (*clustering coefficient*) se asocia con redes que presentan un mayor número de focos nodales o taxa organizadores, por lo que las perturbaciones de estos pueden tener un efecto desequilibrador en la comunidad. En el caso de red de las dos redes este valor bajo denota que los taxa previamente considerados como determinantes en la red pueden no tener un efecto tan fuerte.

A partir del análisis realizado por NetAn mediante la reconstrucción de redes aleatorias no dirigidas podemos observar que la modularidad (o el grado en el que los bordes se distribuyen dentro, en lugar de entre distintos conjuntos de nodos) asignado para ambas comunidades tuvo un valor positivo, el cual a menudo se asocia con interacciones restringidas a ciertos grupos de la comunidad.

Como se puede observar las estadísticas de la red aleatoria generada tanto para la muestra del tracto masculino como femenino presentan en los mismos comportamientos y más aún valores similares en los coeficientes y estadísticos.

El valor similar de las métricas entre ambas redes es congruente con resultados previamente reportados sobre una correlación significativa que presentan estas medidas topológicas entre sí (particularmente aquellas sobre la centralidad) y entre redes de interacción de comunidades del mismo origen, sin embargo esto no refleja que dos métricas tienen propiedades idénticas y aún puedan divergir en diferentes modelos.

6. Conclusiones

De la información recopilada y procesada de ambas muestras intestinales pudimos observar variación entre ellas, probablemente debido a un número limitado de elementos y tiempos distintos de muestreo (15 meses para la muestra masculina y 6 meses para la muestra femenina).

Sin embargo la dinámica de interacción y estadísticas observadas tanto por *MetaMis* y *NetAn* nos brindaron una perspectiva mucho más completa para poder compararlas.

Por lo que los resultados del análisis de ambas comunidades bacterianas nos permite afirmar que se presenta una dinámica de interacción estructuralmente similar en el sujeto mujer y en el hombre.

Los datos proporcionados de los grupo de mujeres y hombres mostraron proporciones similares en familias que se han reportado anteriormente como parte de nuestro tracto digestivo, por lo que las diferencias marcadas entre las familias probablemente sean por la falta de control en la toma de los datos y la diferencia de tiempo.

7. Referencias

- Blondel, V. D., Guillaume, J. -L., Lambiotte, R., & Lefebvre, E. (2008). Fast unfolding of communities in large networks. *Journal of Statistical Mechanics: Theory and Experiment*, 2008(10), 1–12.
- Caporaso, J. G., Lauber, C. L., Costello, E. K., Berg-Lyons, D., Gonzalez, A., Stombaugh, J., Knights, D., Gajer, P., Ravel, J., Fierer, N., Gordon, J. I., & Knight, R. (2011). Moving pictures of the human microbiome. *Genome biology*, 12(5), R50. <https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-5-r50>
- Danneskiold-Samsøe, N. B., Dias de Freitas Queiroz Barros, H., Santos, R., Bicas, J. L., Cazarin, C. B. B., Madsen, L., Kristiansen, K., Pastore, G. M., Brix, S., & Maróstica Júnior, M. R. (2019). Interplay between food and gut microbiota in health and disease. In *Food Research International* (Vol. 115, pp. 23–31). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.07.043>
- Donaldson, G. P., Lee, S. M., & Mazmanian, S. K. (2015). Gut biogeography of the bacterial microbiota. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 14, Issue 1, pp. 20–32). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3552>
- Fan, Y., & Pedersen, O. (2021). Gut microbiota in human metabolic health and disease. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 19, Issue 1, pp. 55–71). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0433-9>
- Ficetola, G. F., Pansu, J., Bonin, A., Coissac, E., Giguët-Covex, C., De Barba, M., ... Taberlet, P. (2014). Replication levels, false presences and the estimation of the presence/absence from eDNA metabarcoding data. *Molecular Ecology Resources*, 15(3), 543–556. doi:10.1111/1755-0998.12338
- Galhardo, M., Foneca, N., Egeter, B., Paupério, J., Ferreira, S., Oxelfelt, F., ... & Beja, P. (2018). Deliverable 4.5 (D4. 5): Protocol for the processing of DNA sequence data generated by next-gen platforms, EnMetaGen project (Grant Agreement No 668981).
- Gerritsen, J., Smidt, H., Rijkers, G. T., & de Vos, W. M. (2011). Intestinal microbiota in human health and disease: the impact of probiotics. *Genes & nutrition*, 6(3), 209–240. <https://doi.org/10.1007/s12263-011-0229-7>
- Huttenhower, C., Gevers, D., Knight, R., Abubucker, S., Badger, J. H., Chinwalla, A. T., Creasy, H. H., Earl, A. M., Fitzgerald, M. G., Fulton, R. S., Giglio, M. G., Hallsworth-Pepin, K., Lobos, E. A., Madupu, R., Magrini, V., Martin, J. C., Mitreva, M., Muzny, D. M., Sodergren, E. J., ... White, O. (2012). Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*, 486(7402), 207–214. <https://doi.org/10.1038/nature11234>
- Kusada, H., Kameyama, K., Meng, X. Y., Kamagata, Y., & Tamaki, H. (2017). *Fusimonas intestini* gen. nov., sp. nov., a novel intestinal bacterium of the family Lachnospiraceae associated with diabetes in mice. *Scientific reports*, 7(1), 1–9.
- Matos, R. C., & Leulier, F. (2014). Lactobacilli-Host mutualism: "learning on the fly". *Microbial cell factories*, 13(1), 1–8.
- Peris-Bondia, F., Latorre, A., Artacho, A., Moya, A., & D'Auria, G. (2011). The active human gut microbiota differs from the total microbiota. *PloS one*, 6(7), e22448.
- Saxena, R., & Sharma, V. K. (2016). A Metagenomic Insight into the Human Microbiome: Its Implications in Health and Disease. In *Medical and Health Genomics* (pp. 107–119). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420196-5.00009-5>
- Scher, J. U., Sczesnak, A., Longman, R. S., Segata, N., Ubeda, C., Bielski, C., Rostron, T., Cerundolo, V., Pamer, E. G., Abramson, S. B., Huttenhower, C., & Littman, D. R. (2013). Expansion of intestinal *Prevotella copri* correlates with enhanced susceptibility to arthritis. *eLife*, 2, e01202. <https://doi.org/10.7554/eLife.01202>

- Segata, N., Boernigen, D., Tickle, T. L., Morgan, X. C., Garrett, W. S., & Huttenhower, C. (2013). Computational meta'omics for microbial community studies. *Molecular systems biology*, 9, 666. <https://doi.org/10.1038/msb.2013.22>
- Spinler, J. K. (2015). Corynebacteriaceae. In *Encyclopedia of Metagenomics* (pp. 112–119). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4899-7475-4_444
- Yatsunenko, T., Rey, F. E., Manary, M. J., Trehan, I., Dominguez-Bello, M. G., Contreras, M., Magris, M., Hidalgo, G., Baldassano, R. N., Anokhin, A. P., Heath, A. C., Warner, B., Reeder, J., Kuczynski, J., Caporaso, J. G., Lozupone, C. A., Lauber, C., Clemente, J. C., Knights, D., ... Gordon, J. I. (2012). Human gut microbiome viewed across age and geography. In *Nature* (Vol. 486, Issue 7402, pp. 222–227). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nature11053>

Software

- Shaw, G. T. W., Pao, Y. Y., & Wang, D. (2016). MetaMIS: A metagenomic microbial interaction simulator based on microbial community profiles. *BMC Bioinformatics*, 17(1), 488. <https://doi.org/10.1186/s12859-016-1359-0>
- De Anda, V., Zapata-Peñasco, I., Blaz, J., Poot-Hernández, A. C., Contreras-Moreira, B., González-Laffitte, M., Gámez-Tamariz, N., Hernández-Rosales, M., Eguiarte, L. E., & Souza, V. (2018). Understanding the Mechanisms Behind the Response to Environmental Perturbation in Microbial Mats: A Metagenomic-Network Based Approach. *Frontiers in microbiology*, 9, 2606. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02606>
- <https://github.com/valdeanda/NetAn>