

**CONTRIBUCIÓN FUNCIONAL Y
METABÓLICA DE LA MICROBIOTA
INTESTINAL A LA INGESTA ENERGÉTICA
EN EL DESARROLLO DE LA OBESIDAD**



Inmaculada Acuña Morales

Universidad de Granada

Facultad de Farmacia

Programa de Doctorado en Nutrición y Ciencias de los Alimentos

2022

Dirigida por:

Dr. Antonio Suárez García
Dra. Margarita Aguilera Gómez
Dra. Cristina Campoy Folgoso

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Inmaculada Acuña Morales
ISBN: 978-84-1117-342-1
URI: <http://hdl.handle.net/10481/74969>

*A veces sentimos que lo que hacemos
es tan solo una gota en el mar,
pero el mar sería menos si le faltara esa gota.*

Madre Teresa de Calcuta

Índice

<i>Índice de Tablas</i>	7
<i>Índice de Figuras</i>	9
<i>Abreviaturas</i>	11
<i>Resumen</i>	14
<i>Summary</i>	15
<i>Introducción</i>	17
Relación de la microbiota con el huésped	17
Microbiota y salud	17
Microbiota y enfermedad	19
Microbiota y obesidad.....	23
Microbiota y alteraciones neurológicas.....	27
Intervenciones que modifican la microbiota.....	31
Intervenciones en la dieta o el ejercicio.....	31
Prebióticos, probióticos y posbióticos.....	32
Probióticos de nueva generación.....	33
Trasplante de microbiota fecal.....	37
Microbiota y metabolismo microbiano	38
<i>Objetivos</i>	45
<i>Objectives</i>	46
<i>Material y métodos</i>	48
Sujetos, diseño experimental y aspectos éticos	48
Estudios <i>in vivo</i> con modelos murinos.....	52
Modelos gnotobióticos	52
Modelos SPF.....	55
Técnicas de laboratorio	56
Extracción y cuantificación de proteínas de origen microbiano.....	56
Electroforesis de proteínas en geles de acrilamida.....	56
Medida de actividad glicosidasa bacteriana.....	57
Medida del metaboloma por UHPLC-MS/MS.....	60
Extracción y cuantificación del DNA microbiano de muestras de heces.....	67
Electroforesis de DNA en geles de agarosa	68
Secuenciación del gen 16S rRNA	69
Análisis de datos bioinformático y estadístico	69
Clasificación taxonómica y cálculo de la abundancia relativa	70

Cálculo de α -diversidad.....	70
Cálculo de β -diversidad.....	70
Análisis estadístico.....	71
<i>Resultados y Discusión</i>	74
1. Microbiota y obesidad.....	74
1.1. La actividad glicosidasa de la microbiota intestinal infantil asocia con el índice de masa corporal materno.....	74
1.2. Trasplante de microbiota fecal en ratones germ-free.....	81
1.3. La obesidad mediada por la microbiota se traslada a modelos murinos.....	85
2. Microbiota y neurodesarrollo.....	90
2.1. Asociación de la microbiota intestinal infantil con la motricidad fina.....	90
2.2. La microbiota intestinal está asociada con el desarrollo cognitivo infantil.....	102
2.3. El neurodesarrollo de ratones gnotobióticos se ve afectado por la microbiota y se asocia con el perfil cognitivo del donante humano.....	109
3. Determinación rápida y simultánea de intermediarios del metabolismo de la histidina en microbiota y biomatrices humanas y de ratón.....	114
4. Discusión global.....	127
<i>Conclusiones</i>	148
<i>Conclusions</i>	150
<i>Referencias</i>	153
<i>Anexos</i>	174

Índice de Tablas

Tabla 1. Enfermedades que presentan disbiosis en la microbiota. Los estudios muestran un desequilibrio en la abundancia relativa de los taxones en la microbiota intestinal ...	21
Tabla 2. Ensayos clínicos y variaciones de los principales taxones de microbiota encontrados en muestras de pacientes con obesidad y enfermedades metabólicas.....	25
Tabla 3. Estudios y variaciones de los principales taxones de microbiota encontrados en muestras de pacientes con alteraciones neurológicas del comportamiento.	28
Tabla 4. Cepas probióticas de nueva generación utilizadas en ensayos clínicos y estudios preclínicos relacionados con la obesidad.	34
Tabla 5. Soluciones y reactivos para el análisis de proteínas mediante SDS-PAGE	57
Tabla 6. Transiciones y potenciales optimizados para el análisis UHPLC-MS/MS de los metabolitos de la histidina.....	64
Tabla 7. Resumen de los ajustes de HPLC	65
Tabla 8. Resumen de los ajustes de MS.....	66
Tabla 9. Características generales de la población de estudio. Valores totales (porcentaje del valor total) o Medias (SD).....	74
Tabla 10. Asociaciones entre la composición de la microbiota intestinal (gen 16S rRNA) y otras variables de interés. Análisis UniFrac (unweighted).....	76
Tabla 11. Características de la población en función de la dicotomización entre las puntuaciones de motricidad fina de la escala de Bayley®-III.....	91
Tabla 12. Asociación entre los índices de α -diversidad y cada escala Bayley®-III. Análisis de.....	94
Tabla 13. Asociaciones entre la composición de la microbiota intestinal (secuencias del gen 16S rRNA) y las escalas Bayley®-III.	95
Tabla 14. Asociaciones entre la composición de la microbiota intestinal (secuencias del gen 16S rRNA) y otras variables de interés. Análisis de las distancias UniFrac (weighted)	96
Tabla 15. Efecto matriz. Comparación de las curvas de calibrado en H ₂ O+ACN (patrones) y cada una de las matrices medidas para el ATAA.....	117
Tabla 16. Efecto matriz. Comparación de las curvas de calibrado en H ₂ O+ACN (patrones) y cada una de las matrices medidas para el atenolol.....	117
Tabla 17. Parámetros analíticos y estadísticos de la medida de los metabolitos de la histidina.	119
Tabla 18. Exactitud del método. Ensayo de recuperación, precisión y veracidad	121
Tabla 19. Distribución total del pool de histidina ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	123

Índice de Figuras

Figura 1. Criterios para la estrategia de búsqueda de NGP	36
Figura 2. Influencia de los metabolitos microbianos en el huésped. (Nicolas & Chang, 2019).....	39
Figura 3. Perfil del estudio PREOBE.....	50
Figura 4. Muestras fecales analizadas.....	51
Figura 5. Estación de ratones germ-free.....	54
Figura 6. Medidas cinéticas de las actividades glicosidasas detectadas en el lector de placas espectrofotométrico de los extractos bacterianos de la microbiota intestinal de niños.....	58
Figura 7. Esquema de la medida de la actividad glicosidasa bacteriana intestinal	59
Figura 8. Análisis de coordenadas principales (PCoA) de las comunidades intestinales de microbiota de los grupos normopeso, sobrepeso y obesidad	76
Figura 9. Abundancia relativa en porcentaje de los taxa presentes de la microbiota intestinal de los niños de 6 meses en función del BMI de sus madres	77
Figura 10. Capacidades metabólicas potenciales de la microbiota infantil.	79
Figura 11. Distribución de las actividades glicosidasa específicas de la microbiota intestinal de niños de 6 meses en función de los grupos de BMI de sus madres (U/g)..	80
Figura 12. Distribución de las abundancias relativas de los distintos filos en los grupos de estudio (H: humano, R: ratón).....	82
Figura 13. Análisis de coordenadas principales (PCoA) de las comunidades intestinales de microbiota de humanos y ratones GF humanizados.	83
Figura 14. Cluster jerárquico de la composición de la comunidad microbiana intestinal humana y de ratón.....	84
Figura 15. Ganancia de peso (mg) a las dos semanas del FMT en ratones gnotobióticos divididos en los grupos de BMI de la madre del donante.....	85
Figura 16. La glucosa en sangre determinada como AUC (mg h/dL) se correlaciona positivamente con el peso del ratón.....	86
Figura 17. Análisis de coordenadas principales (PCoA) de las comunidades intestinales de microbiota de ratones GF humanizados.....	87
Figura 18. Abundancia relativa en porcentaje de los taxa presentes de la microbiota intestinal de los ratones que recibieron la microbiota de los niños de 6 meses en función del BMI de su madre.....	88
Figura 19. Distribución de las actividades glicosidasa (U/g) de la microbiota intestinal de ratones trasplantados con microbiota de niños de 6 meses en función de los grupos de BMI de sus madres.	89
Figura 20. Composición y estructura microbiana intestinal en 71 niños sanos nacidos a término a los 18 meses de edad.....	92
Figura 21. Composición y estructura microbiana intestinal en 71 niños sanos nacidos a término a los 18 meses de edad.....	95

Figura 22. El modelo probabilístico con Dirichlet Multinomial Mixtures de muestras fecales reveló 2 enterotipos en 71 niños sanos nacidos a término a los 18 meses de edad.	99
Figura 23. Abundancia diferencial de microbiota intestinal entre niños con grupos de motricidad fina por encima y por debajo de la mediana.	101
Figura 24. Rutas enzimáticas del metabolismo de la histidina (Acuña et al., 2021)....	102
Figura 25. El incremento de la actividad HAL (U/g) se correlaciona positivamente con el valor de la escala de Cognición Compuesta (COGCOM) de la escala de Bayley®-III.	103
Figura 26. Los metabolitos fecales e intracelulares microbianos están en correlacionados de manera positiva.	104
Figura 27. La concentración en orina del compuesto ImP (A) y del ratio ImP/His (B) correlacionan positivamente con su concentración en heces.	105
Figura 28. Medida de los metabolitos (A-B) y ratios (C-D) en heces y metaboloma intracelular de niños de 6 meses por grupos de COGCOM.	106
Figura 29. Medida del ratio Him/ImP en heces de niños de 6 meses por grupos de COGCOM.	106
Figura 30. Medida de la concentración de His (A), concentración de Uro (B) y del ratio His/Uro (C) en orina de niños de 6 meses por grupos de COGCOM.	107
Figura 31. Esquema del test de reconocimiento de objetos. A. Familiarización.	109
Figura 32. El rendimiento cognitivo de los ratones humanizados (Discrimination index, d_2) asocia de forma significativa ($p < 0,05$) con los grupos de COGCOM de los niños de los que recibieron la microbiota intestinal.	110
Figura 33. Análisis de coordenadas principales (PCoA) de las comunidades intestinales de microbiota de ratones GF humanizados.	111
Figura 34. Abundancia relativa de la microbiota de los ratones entre grupos de COGCOM de los donantes a nivel de filo.	112
Figura 35. Medida de los metabolitos Hid en orina(A) y Uro en el metaboloma intracelular microbiano (B) de las muestras de ratones por grupos de NORT.	113
Figura 36. Cromatograma UHPLC–MS/MS de una muestra de ratón con columna HSS T3.	120
Figura 37. Cromatograma UHPLC–MS/MS de una muestra de ratón con columna BEH Amide.	120
Figura 38. La histidina y sus metabolitos bioactivos en muestras biológicas.	123

Abreviaturas

AAA	Aminoácidos aromáticos	GSH	Glutatón reducido
ACN	Acetonitrilo	HAL	Histidina amonio-liasa
AN	Anorexia nervosa	HDC	Histidina descarboxilasa
ATAA	2-amino-4-thiazoleacetic acid	HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietyl)-1-piperazinetanesulfónico
BCA	Ácido bicinconínico	HF	Heces humanas
BCAA	Aminoácidos de cadena ramificada	Him	Histamina
BH	Benjamini-Hochberg	His	Histidina
BMI	Índice de masa corporal	HM	Metaboloma microbiano humano
CagA	Antígeno A asociado a citotoxina	HU	Orina humana
CDI	Infección refractaria por Clostridium difficile	IgE	Inmunoglobulina E
CE	Energía de colisión	IL	Interleucina
CIC	Centro de Instrumentación Científica	ImA	Imidazol-4-acetato
COGCOM	Cognición Compuesta	ImP	Imidazol-propionato
CV	Voltaje de cono	IS	Patrones internos
DC	Células dendríticas	LOD	Límite de detección
DM1	Diabetes Mellitus tipo 1	LOQ	Límite de cuantificación
DM2	Diabetes Mellitus tipo 2	LPS	Lipopolisacárido
DMM	Dirichlet Multinomial Mixture	ME	Efecto matriz
DNA	Ácido desoxirribonucleico	MetS	Síndrome metabólico
DTT	Ditiotreitol	MF	Heces de ratón
EU	Unión Europea	MM	Metabolom microbiano de ratón
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations	MRM	Multiple reaction monitoring mode
FDA	US Food and Drugs Administration	mTORC1	Vía de la diana de mamíferos del complejo de rapamicina 1
FDR	False Discovery Rate	MU	Orina de ratón
FMT	Trasplante de Microbiota Fecal	NAH	N-Acetilhistamina
GF	Germ-free	NAFLD	Enfermedad del hígado graso no alcohólico
Glu	Glutamato	NGP	Probióticos de nueva generación

NGS	Secuenciación de nueva generación
NORT	Novel Object Recognition Test
OF	Open Field
OGTT	Oral Gavage Glucose Tolerance Test
OTU	Unidad taxonómica operativa
PBS	Tampón fosfato salino
Plof	Probability level of the lack-of-fit test
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
pNP	P-nitro-fenil
PSA	Persulfato amónico
Rec	Recovery rates
RNA	Ácido ribonucleico
rRNA	Ácido ribonucleico ribosomal
RSD	Desviación estándar relativa
SCFA	Ácidos grasos de cadena corta
SD	Desviación típica
SDS-PAG	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
SPF	Libres de patógenos específicos
TEMED	Tetrametiletildiamina
TLR2	Toll-like receptor 2
TMAO	N-óxido de trimetilamina
TNF	Tumor necrosis factor
TRP	Triptófano
UHPLC-MS/MS	Cromatografía líquida de ultra-alto rendimiento asociado a espectrometría de masas
Uro	Urocanato
UV	Ultravioleta
VacA	Citotoxina vacuolizante
VB	Vaginosis bacteriana
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
WGS	Secuenciación del genoma completo
WHO/OMS	World Health Organization / Organización Mundial de la Salud

Resumen

La microbiota intestinal humana es una comunidad microbiana densa y diversa que contribuye en gran medida a la salud y enfermedad del organismo. Las comunidades microbianas intestinales han coevolucionado con el huésped para desarrollar una relación mutualista, lo que influye en la homeostasis metabólica, el sistema endocrino, la función cerebral y la disponibilidad de macronutrientes. Las etapas tempranas de la vida son de especial interés, donde el establecimiento y la influencia de la microbiota intestinal puede tener consecuencias a largo plazo. El conocimiento acumulado sobre la microbiota intestinal está produciendo un cambio en el enfoque de los estudios, que previamente trataban de contestar a la pregunta de ¿qué microorganismos la componen?, hacia la pregunta ¿qué función tienen esos microorganismos? Para intentar contestarlas se han realizado estudios metabólicos y enzimáticos que permitan describir mejor los efectos de la microbiota intestinal sobre la salud/enfermedad del huésped, concretamente en obesidad y en alteraciones cognitivas, y diseñar una estrategia racional para clasificar, identificar y ensayar consorcios de microbiota humana en modelos murinos gnotobióticos. Concretamente, el estudio se ha centrado en la actividad enzimática glicosidasa y su impacto en el metabolismo de carbohidratos en relación a la obesidad. Asimismo, se ha estudiado la relación de la microbiota con el neurodesarrollo infantil a través del metabolismo de la histidina, y ha sido posible gracias al desarrollo de un método rápido, preciso y simultáneo para medir la histidina y sus metabolitos bioactivos usando UHPLC-MS/MS. Los hallazgos muestran que el fenotipo de obesidad se transmite madre-hijo-ratón a través de transferencia efectiva de la microbiota. Además, el metabolismo microbiano asocia con el perfil de neurodesarrollo de niños, y la asociación se mantiene en los ratones receptores de la microbiota, mostrando diferencias significativas en el metabolismo de la histidina. Conocer mejor las vías de comunicación entre la microbiota y el huésped es el camino para entender su influencia en la salud y en multitud de trastornos metabólicos y neurológicos con el fin de encontrar posibles enfoques terapéuticos y diagnósticos.

Summary

Human gut microbiota is a dense and diverse microbial community that contributes greatly to the health and disease balance. Gut microbial communities have co-evolved with the host to develop a mutualistic relationship, influencing metabolic homeostasis, the endocrine system, brain function, and macronutrient availability. Early life stages are of exceptional interest, because the establishment and influence of the gut taxa microbiota can trigger long-term health consequences. The increased knowledge about the intestinal microbiota is producing a change of paradigm and focus of the studies, which were previously used to answer the question of what intestinal microbiota is producing?, towards the question what function do these microbes have? To try to answer these questions, a metabolic and enzymatic study has been carried out to better describe the effects of the intestinal microbiota on the host health/disease equilibrium, specifically in obesity and cognitive alterations; and to design a rational strategy to classify, identify and test microbiota consortia in gnotobiotic murine models. Specially, the study has focused on glycosidase enzymatic activity, its impact on carbohydrate metabolism, in relation to obesity. Likewise, the relationship of the microbiota with childhood neurodevelopment through histidine metabolism has been studied. That has been facilitated through the development of a specific, rapid, precise and simultaneous method to measure histidine and its bioactive metabolites using UHPLC-MS/MS. The overall results show that the obesity phenotype is transmitted from mother-child-mouse through the effective transfer of the microbiota. In addition, specific microbial metabolism is associated with the neurodevelopmental profile of children, and the association was maintained in microbiota recipient mice, showing significant differences in the histidine metabolism. Therefore, contribution and more scientific evidence for knowing the communication pathways between the microbiota and the host is the way to better understand their influence on metabolic and neurological disorders and ultimately on health in order to find new therapeutic and diagnostic approaches.

Introducción

Relación de la microbiota con el huésped

En 1885, Louis Pasteur planteó la hipótesis de que ciertos microbios eran esenciales para la supervivencia de la vida compleja debido a la coexistencia y coevolución de micro y macroorganismos (Pasteur, 1885). De hecho, se ha descrito que el cuerpo humano contiene diez veces más microorganismos que células humanas (Savage, 1977). Estudios epidemiológicos, fisiológicos y ómicos, complementados con estudios celulares y experimentos en animales, muestran que una parte considerable de la influencia ambiental sobre la salud humana y el riesgo de enfermedad puede ser mediada o modificada por comunidades microbianas. Estos microorganismos, denominados colectivamente *microbiota*, incluyen una gran cantidad de bacterias, arqueas, bacteriófagos, virus eucariotas y hongos que interactúan y coexisten en las superficies humanas y en todas las cavidades corporales. La mayoría de ellos son microorganismos comensales o mutualistas, residen en el tracto gastrointestinal y están influenciados por el modo de nacimiento, la alimentación infantil, el estilo de vida, la medicación y la genética del huésped. La microbiota intestinal tiene funciones importantes en la maduración de la inmunidad, la digestión de los alimentos, la regulación de la función endocrina intestinal y la señalización neurológica, la modificación de la acción y el metabolismo de los fármacos, la eliminación de toxinas y la producción de numerosos compuestos que influyen en el huésped.

Microbiota y salud

La microbiota entabla un equilibrio con el huésped en condiciones de salud en el que la conexión entre ambos está mediada por un metabolismo óptimo y saludable. En la literatura, no hay consenso sobre cómo definir la salud metabólica. Sin embargo, una definición tentativa es tener un metabolismo general (según se estima a partir de una serie de diversas medidas de las funciones de los órganos del cuerpo) que esté relacionado con una buena calidad de vida y longevidad. No obstante, una parte considerable de la

población, principalmente debido al excesivo consumo de alimentos procesados de alta densidad energética, el sedentarismo y a menudo combinados con la adicción al tabaco, tiene una salud metabólica deficiente. Las implicaciones son una alta prevalencia de trastornos metabólicos, incluida la obesidad, la enfermedad hepática no alcohólica, la diabetes mellitus tipo 2 (DM2), así como la enfermedad cardiometabólica, trastornos neurológicos y la muerte prematura (Jaacks et al., 2019; Lakka et al., 2002; Reddy & Yusuf, 1998; Younossi et al., 2016; Y. Zheng et al., 2018).

Las patologías de los trastornos metabólicos suelen tener en común una asociación con anomalías en la composición y funcionalidad de la microbiota intestinal (Koeth et al., 2013; Qin et al., 2014). Se ha debatido ampliamente si una microbiota alterada durante la enfermedad puede estar involucrada en la causa (es decir, predisposición, inicio o progresión) o supone una consecuencia de la misma.

Para afirmar la alteración de la microbiota intestinal en los trastornos metabólicos, es fundamental el conocimiento de la composición y funcionalidad de la microbiota intestinal de personas sanas. Desafortunadamente, tampoco se ha definido una microbiota intestinal saludable en relación a la composición taxonómica, debido a que la abundancia relativa de las bacterias, la diversidad de cepas y las variantes de genes microbianos, así como la influencia de la genética del huésped y las exposiciones ambientales son exclusivas de cada individuo. Sin embargo, de forma general, comunidades microbianas intestinales sanas se caracterizan por tener una gran diversidad de taxones, una gran riqueza de genes microbianos y núcleos funcionales del microbioma estables. No obstante, la alta diversidad y riqueza de bacterias intestinales por sí solas no son indicadores de una microbiota saludable, porque estas características se pueden ver afectadas por factores que interfieran en sus componentes principales.

En general, el modo de nacimiento y el acceso a la lactancia dan forma a la microbiota intestinal infantil, y madura gradualmente durante la infancia en respuesta a las exposiciones ambientales (Jakobsson et al., 2014). Posteriormente, permanece relativamente estable en la adolescencia y la edad adulta hasta que se produce una

disminución de la diversidad a una edad avanzada, probablemente debido a un cambio en las funciones inmunitarias (Rodríguez et al., 2015). Las funciones de una microbiota saludable permiten el metabolismo de compuestos no digeribles, como los xiloglucanos, que se encuentran comúnmente en los vegetales y pueden ser digeridos por una especie específica de *Bacteroides* (Larsbrink et al., 2014), otras fibras no digeribles, como los fructooligosacáridos y los oligosacáridos, conocidos como prebióticos, y pueden ser utilizadas por microorganismos beneficiosos, como *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* (Goh & Klaenhammer, 2015). La microbiota también permite la adquisición de nutrientes o procesamiento de xenobióticos, la producción de ácidos grasos de cadena corta (SFCA) a través de la fermentación de polisacáridos complejos y la síntesis de lipopolisacáridos específicos (LPS) y la biosíntesis de algunos aminoácidos esenciales y vitaminas, como folatos, vitamina K, biotina, riboflavina (B2), cobalamina (B12) y posiblemente otras vitaminas B. (Flint, Scott, Louis, et al., 2012). Por último, entre sus funciones también se incluye la defensa del huésped contra la colonización por patógenos oportunistas (Round & Mazmanian, 2009). Sin embargo, no toda la microbiota por sí sola conduce a beneficios netos para la salud.

Microbiota y enfermedad

Muchos estudios han revelado desde hace años el papel central de la simbiosis microbiana en el desarrollo de muchas enfermedades, como infecciones (Sartor, 2008), enfermedades hepáticas (Q. Liu et al., 2004), enfermedad gastrointestinal (GI) (Scanlan et al., 2008), trastornos metabólicos (Ley et al., 2006), enfermedades respiratorias (Verhulst et al., 2008), enfermedades mentales o psicológicas (Finegold et al., 2002) y enfermedades autoinmunes (Wen et al., 2008). En la Tabla 1 se recogen enfermedades descritas que cursan con alteraciones en la composición de la microbiota. En los siguientes apartados se comentará en profundidad la relación de la microbiota con la obesidad y la microbiota y los trastornos neurológicos.

Tabla 1. Enfermedades que presentan disbiosis en la microbiota. Los estudios muestran un desequilibrio en la abundancia relativa de los taxones en la microbiota intestinal

	Enfermedad	Variaciones en la microbiota	Referencias
Enfermedades infecciosas	Infección por <i>Clostridium difficile</i>	Relacionado con diarrea post-antibióticos ↑ <i>C. difficile</i> y patógenos oportunistas ↓ Bacterias productoras de butirato ↑ Bacterias productoras de lactato	(Gu et al., 2016)
	Infección por <i>Helicobacter pylori</i>	Empeoramiento del progreso de la periodontitis crónica ↑ <i>P. gingivalis</i> , <i>P. intermedia</i> , <i>F. nucleatum</i> y <i>T. denticola</i> ↓ <i>A. actinomycetemcomitans</i>	(Z. Hu et al., 2016)
	Vaginosis bacteriana	Asociación significativa de la VB con tres filos (Bacteroidetes, Actinobacteria y Fusobacteria) y ocho géneros (<i>Gardnerella</i> , <i>Atopobium</i> , <i>Megasphaera</i> , <i>Eggerthella</i> , <i>Aerococcus</i> , <i>Leptotrichia/Sneathia</i> , <i>Prevotella</i> y <i>Papillibacter</i>)	(Ling et al., 2010)
	Infección con VIH	<i>Gardnerella</i> presente de forma inusual en la vagina. <i>Gardnerella</i> “engulle” el tenofovir → fracaso en el tratamiento	(Lynch & Pedersen, 2016)
Enfermedades hepáticas	Cirrosis hepática	Complicaciones: infecciones, peritonitis bacteriana espontánea, encefalopatía hepática e insuficiencia renal ↓ Bacteroidetes ↑ Proteobacteria y Fusobacteria; <i>Veillonella</i> , <i>Streptococcus</i> y <i>Clostridium</i>	(Y. Chen et al., 2011; Qin et al., 2014)
	NAFLD	NAFLD: característica del síndrome metabólico ↑ <i>Bacteroides</i> y <i>Ruminococcus</i> ↓ <i>Prevotella</i>	(B. Wang et al., 2016)
Neoplasias gastrointestinales	Cáncer gástrico	↑ CagA y VacA de <i>H.pylori</i> → ↑ riesgo de cáncer	(Rhead et al., 2007)
	Cáncer colorrectal	Progresión cáncer: ↑ <i>Pseudomonas</i> , <i>Helicobacter</i> , <i>Acinetobacter</i> , <i>F. nucleatum</i> , <i>B. massiliensis</i> , <i>B. ovatus</i> , <i>B. vulgatus</i> , <i>E. coli</i> y <i>B. fragilis</i> enterotoxigénico ↓ Bacterias productoras de butirato Reducción cáncer: ↑ SCFA: acetato, propionato y butirato (<i>Lachnospiraceae</i> y <i>Ruminococcaceae</i>)	(Feng et al., 2015; Keku et al., 2013; Sanapareddy et al., 2012)
	Cáncer de esófago	↑ Inflamación por reflujo gastroesofágico ↑ Por uso de antibióticos	(Pei et al., 2004)

CagA: antígeno A asociado a citotoxina; DM2: Diabetes tipo 2; IgE: Inmunoglobulina E; NAFLD: Enfermedad del hígado graso no alcohólico; SCFA: Ácidos grasos de cadena corta; VacA: citotoxina vacuolizante; VB: Vaginosis bacteriana; VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana.

Tabla 1. *Continuación*. Enfermedades que presentan disbiosis en la microbiota. Los estudios muestran un desequilibrio en la abundancia relativa de los taxones en la microbiota intestinal.

	Enfermedad	Variaciones en la microbiota	Referencias
Trastornos metabólicos	Obesidad	Microbiota de humanos obesos induce obesidad en ratones Microbiota de humanos delgados protege de obesidad en ratones Microbiota modula interacción dieta-enfermedades metabólicas Obesidad → disbiosis microbiota intestinal Alteración de: - Vías metabólicas - Función de barrera epitelial intestinal - Homeostasis intestinal e inmune - Metabolismo energético - Acetato - Metabolismo de los ácidos biliares - Hormonas intestinales	(Camilleri, 2015; Perry et al., 2016; Ridaura et al., 2013; Sonnenburg & Bäckhed, 2016)
	Diabetes tipo 2	↓ Diversidad microbiana <i>P. copri</i> y <i>B. vulgates</i> → Resistencia insulina ↑ Imidazol-propionato producido por la microbiota de DM2 → resistencia metformina	(Koh et al., 2018; Molinaro et al., 2020; Pedersen et al., 2016)
Otras enfermedades	Alergia	↓ Diversidad microbiana en la infancia (uso antibióticos) ↑ <i>Clostridium sensu stricto</i> → ↑ IgE específica de la leche de vaca	(Ling et al., 2014; Russell et al., 2012)
	Alteraciones neurológicas	Autismo: ↓ <i>A. muciniphila</i> y <i>Bifidobacterium spp</i> Depresión: ↑ <i>Enterobacteriaceae</i> y <i>Alistipes</i> ↓ <i>Faecalibacterium</i>	(Jiang et al., 2015; M. Wang et al., 2019)

CagA: antígeno A asociado a citotoxina; DM2: Diabetes tipo 2; IgE: Inmunoglobulina E; NAFLD: Enfermedad del hígado graso no alcohólico; SCFA: Ácidos grasos de cadena corta; VacA: citotoxina vacuolizante; VB: Vaginosis bacteriana; VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana.

Como muestra la Tabla 1, en el curso de muchas enfermedades se han descrito modificaciones en la composición de la microbiota a nivel taxonómico, pero también en el metaboloma microbiano generado por este desequilibrio, afectando directamente a la salud del huésped. Debido al especial interés de las enfermedades que pueden verse influenciadas por la microbiota desde las etapas iniciales de la vida, como son la obesidad y los trastornos cognitivos, se ha profundizado en la relación que existe entre la microbiota y ambas enfermedades.

Microbiota y obesidad

La obesidad y el sobrepeso se definen como una acumulación anormal o excesiva de grasa que puede ser perjudicial para la salud (OMS, 2022). Un índice de masa corporal (BMI) superior a 25 se considera sobrepeso, y superior a 30, obesidad. La obesidad es un problema de salud pública de primer orden, siendo un factor de riesgo de enfermedades cardiovasculares, diabetes, trastornos del aparato locomotor como la artritis y algunos cánceres como el de mama y colon. La obesidad reduce la esperanza de vida entre 6 y 20 años. El problema ha adquirido proporciones de epidemia; más de cuatro millones de personas mueren cada año por causas relacionadas con el sobrepeso o la obesidad, según estimaciones de 2017 (OMS, 2022). Actualmente España cuenta con más de un 60% de ciudadanos con exceso de peso y casi un 25% de obesos (AESAN, 2019).

Por otro lado, en comparación con las poblaciones que llevan estilos de vida tradicionales, la mayoría de las sociedades en los países técnicamente desarrollados del mundo muestran una diversidad microbiana intestinal reducida (Smits et al., 2017). Estas poblaciones microbianas tienen, además, grandes diferencias en el metabolismo de proteínas y carbohidratos, estando enormemente influido por la dieta (Rampelli et al., 2015). A nivel de grupos microbianos taxonómicos, el biomarcador más claro relacionado con la obesidad parece ser la relación *Firmicutes-Bacteroidetes*. Se ha observado un mayor ratio en poblaciones obesas o con síndrome metabólico en comparación con las sanas (Munukka et al., 2012; Riva et al., 2017). Algunos taxones específicos parecen contribuir a esta proporción en pacientes obesos, como los géneros *Staphylococcus*

(Bervoets et al., 2013; Santacruz et al., 2010) y *Clostridium* (Collado et al., 2008), dentro del filo *Firmicutes*, que han mostrado tener una asociación positiva con la obesidad. Además, un aumento en la síntesis de butirato y acetato puede contribuir a un aumento en la extracción de energía en personas obesas, y muchas especies productoras de butirato pertenecen al filo *Firmicutes* (Schwiertz et al., 2010).

Un número creciente de estudios *in vivo* y en humanos han indicado que las interacciones entre la microbiota intestinal y el genotipo del huésped o los cambios en la dieta pueden ser factores cruciales que contribuyen a la obesidad y los trastornos metabólicos relacionados. Un grupo de investigadores (Ridaura et al., 2013), demostraron que la microbiota de gemelos dispare (uno delgado y otro obeso) induce adiposidad y fenotipos metabólicos similares en ratones. Además, la microbiota del gemelo delgado puede prevenir el aumento de adiposidad en ratones receptores de microbiota de obesos, si los ratones se alimentan con una dieta adecuada. La evidencia muestra que la microbiota intestinal es un importante modulador de la interacción entre la dieta y el desarrollo de enfermedades metabólicas (Sonnenburg & Bäckhed, 2016). La disbiosis de la microbiota intestinal y las vías metabólicas activadas en la obesidad inducen a una función de barrera epitelial intestinal alterada y tiene influencias significativas en los procesos fisiológicos, como la homeostasis intestinal e inmunitaria (de Vos & Nieuwdorp, 2013), la liberación de hormonas intestinales (Camilleri, 2015), el metabolismo energético (Delzenne & Cani, 2008), metabolismo de acetato (Perry et al., 2016) y el metabolismo de los ácidos biliares (Wahlström et al., 2016).

Las principales variaciones de taxones de microbiota encontradas en pacientes que padecen obesidad, síndrome metabólico y trastornos relacionados con el sistema metabólico y endocrino se resumen en la Tabla 2.

Tabla 2. Ensayos clínicos y variaciones de los principales taxones de microbiota encontrados en muestras de pacientes con obesidad y enfermedades metabólicas

Enfermedad	Variaciones en la microbiota	Referencias
Obesidad	↑ <i>Lachnospiraceae</i> , <i>Bacteroidaceae</i> , <i>Methanobacteriaceae</i> y <i>Pasteurellaceae</i> en delgados sanos y delgados enfermos	(Zhong et al., 2020)
Obesidad	↑ <i>Prevotella</i> en casi todos los individuos	(Jonduo et al., 2020)
Obesidad	↓ <i>Akkermansia</i> , <i>Faecalibacterium</i> , <i>Oscillibacter</i> , y <i>Alistipes</i> en individuos obesos ↓ <i>Faecalibacterium prausnitzii</i> en individuos obesos	(Thingholm et al., 2019)
Obesidad	↑ <i>Bacteroides</i> en sobrepeso vs. controles sanos ↓ <i>Ruminococcus flavefaciens</i> en sobrepeso y obesos ↓ <i>Bifidobacterium</i> y <i>Clostridium leptum</i> en obesos ↓ <i>Methanobrevibacter</i> en sobrepeso y obesos	(Schwiertz et al., 2010)
Obesidad	↑ <i>Lachnoclostridium</i> , <i>Fusobacterium</i> , <i>Escherichia-Shigella</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Bacillus</i> , y <i>Pseudomonas</i> en sobrepeso y obesos ↑ <i>Clostridia</i> , <i>Faecalibacterium</i> , <i>Ruminococcus</i> , <i>Bifidobacterium</i> , y <i>Lachnospiraceae_UCG_008</i> en controles sanos	(Gao et al., 2018)
Obesidad Anorexia nerviosa	↑ <i>Lactobacillus</i> en obesos	(Armougom et al., 2009)
Síndrome metabólico	↑ <i>Lactobacillus</i> , <i>Sutterella</i> y <i>Methanobrevibacter</i> en síndrome metabólico ↓ <i>Parabacteroides</i> , <i>Bifidobacterium</i> , <i>Odoribacter</i> , <i>Akkermansia</i> y <i>Christensenella</i> en síndrome metabólico	(Lim et al., 2017)

Curiosamente, los niveles de probióticos tradicionales del género *Lactobacillus* parecen estar más altos en las enfermedades relacionadas con la obesidad y el sistema endocrino (Tabla 2). Por el contrario, las especies *Akkermansia*, *Faecalibacterium*, *Parabacteroides* y *Christensenella*, probióticos de nueva generación, parecen ser menos abundantes en pacientes con obesidad.

Como ya se ha mencionado, la ingesta dietética se considera uno de los factores determinantes que modulan la composición microbiana y la diversidad de la microbiota intestinal, lo que podría promover efectos beneficiosos o negativos sobre la salud y las funciones fisiológicas del huésped (Arumugam et al., 2011; Singh et al., 2017). Una dieta de estilo occidental, rica en alimentos de origen animal, puede aumentar los niveles de bacterias tolerantes a la bilis del paciente, incluidas Bacteroidetes (p. ej., *Bacteroides* y *Alistipes*) y Proteobacteria (*Bilophila*), y disminuir los niveles de bacterias que degradan la fibra, como Firmicutes (p. ej., *Eubacterium* y *Ruminococcus*) (David et al., 2014). Por el contrario, la dieta mediterránea y las dietas basadas en plantas pueden promover bacterias que degradan la fibra, principalmente géneros del filo Firmicutes, junto con una mayor diversidad general de la microbiota intestinal (Filippis et al., 2016).

Microbiota y alteraciones neurológicas

Durante los primeros años de vida, tienen lugar dos procesos biológicos simultáneos: el período de colonización microbiana intestinal y la formación y perfeccionamiento de las redes neuronales responsables de un amplio repertorio de comportamientos característicos de las etapas iniciales de la vida. El ensamblaje de la microbiota intestinal comienza desde el nacimiento, caracterizado por una rápida tasa de colonización y expansión de bacterias intestinales dominada por *Actinobacteria* y *Proteobacteria* cambiando hacia una comunidad dominada por *Firmicutes* y *Bacteroidetes*, proceso de maduración que coincide en el tiempo con la intensa sinaptogénesis así como un proceso de poda sináptica en la corteza cerebral, finalizando en la adolescencia. Los experimentos en modelos animales han demostrado que estos dos procesos están conectados fisiológicamente. En humanos, la ausencia de *Bifidobacterium* a los 30 días de vida en recién nacidos prematuros se asocia con deterioro del neurodesarrollo en la infancia, que podría ser revertido por la administración de determinadas cepas de *Bifidobacterium* (Beghetti et al., 2021). Las alteraciones neurológicas están causadas por una combinación de factores biológicos, psicológicos y ambientales. Trastornos como la depresión mayor, la ansiedad, el estrés y patologías como la esquizofrenia o el autismo cursan con alteraciones en neurotransmisores y compuestos hormonales cuyo impacto se traduce a nivel de todo el organismo. Además, la existencia de un eje intestino-cerebro ha sido reconocida desde hace décadas. La microbiota intestinal se ha convertido en un regulador crítico de este eje. El concepto de este eje se ha extendido al “eje microbiota-intestino-cerebro”, y ahora se considera que involucra una serie de sistemas, incluidos el sistema endocrino, el sistema neural, el sistema metabólico y el sistema inmunitario, todos los cuales están en constante interacción (Cryan et al., 2019). La disbiosis de la microbiota intestinal puede aumentar el paso de bacterias intestinales a través de la pared intestinal y hacia el tejido linfoide mesentérico, lo que provoca una respuesta inmunitaria que puede conducir a la liberación de citoquinas inflamatorias y la activación del nervio vago y las neuronas aferentes espinales (Maes et al., 2013). En la Tabla 3 se recogen los principales estudios de trastornos neurológicos asociados a variaciones de la microbiota.

Tabla 3. Estudios y variaciones de los principales taxones de microbiota encontrados en muestras de pacientes con alteraciones neurológicas del comportamiento.

Enfermedad	Variaciones en la microbiota	Referencias
Síndrome de fatiga crónica	↑ <i>Lactobacillus</i> y <i>Bifidobacterium</i> en pacientes con fatiga crónica	(Rao et al., 2009)
Trastorno depresivo mayor	↑ Firmicutes, Actinobacteria y Bacteroidetes en pacientes con depresión	(P. Zheng et al., 2016)
Trastorno depresivo mayor	↑ <i>Enterobacteriaceae</i> y <i>Alistipes</i> y ↓ <i>Faecalibacterium</i> en pacientes con depresión	(Jiang et al., 2015)
Depresión	Correlación de <i>Faecalibacterium</i> con depresión e irascibilidad Correlación de <i>Parasutterella</i> con tensión	(L. Li et al., 2016)
Depresión	↑ Bacteroidales y ↓ Lachnospiraceae en pacientes con depresión	(Naseribafrouei et al., 2014)
Esquizofrenia	↑ <i>Ascomycota</i> , <i>Lactobacillus</i> y <i>Bifidobacterium</i> en pacientes con esquizofrenia	(Castro-Nallar et al., 2015)
Trastorno de ansiedad	Asociación entre infección y aparición del trastorno de ansiedad	(Bruch, 2016)
Estrés materno prenatal	Microbiota alterada en niños de madres estresadas durante el embarazo	(Zijlmans et al., 2015)
Autismo	↑ Bacteroidetes en el grupo con autismo severo	(Finegold et al., 2010)
	↑ Firmicutes en el grupo control.	
	↑ <i>Desulfovibrio</i> y <i>Bacteroides vulgatus</i> en niños con autismo severo	
Autismo	↓ <i>Akkermansia muciniphila</i> y <i>Bifidobacterium spp.</i> en niños con autismo	(L. Wang et al., 2011)
Autismo	↓ Bacteroidetes/Firmicutes y ↑ <i>Lactobacillus spp</i> y <i>Desulfovibrio spp.</i> en niños con autismo	(Tomova et al., 2015)

Por otro lado, se han descrito varias asociaciones entre la microbiota intestinal y el comportamiento. Se ha reportado que existe una alteración de la composición microbiana del intestino en niños relacionada con el carácter entre los 18 y los 27 meses de edad utilizando el *Early Childhood Behavior Questionnaire* (ECBQ) (Christian et al., 2015), con la cognición a los 2 años utilizando las *Mullen Scales of Early Learning* (MSEL) (Carlson et al., 2018), y a las habilidades comunicativas, motrices, personales y sociales a los 3 años utilizando el *Ages and Stages Questionnaire third edition* (ASQ-3) (Sordillo et al., 2020).

Las manipulaciones experimentales en ratones que alteran la microbiota intestinal afectan los comportamientos relacionados con la ansiedad y la depresión (De Palma et al., 2015; Diaz Heijtz et al., 2011; P. Zheng et al., 2016) y tienen efectos cognitivos (Fröhlich et al., 2016; Savignac et al., 2015). También se han reportado estudios de ratones que recibieron microbiomas de niños con trastorno del espectro autista y exhibieron comportamientos similares al autismo, mostrando también diferencias en los metabolomas respecto a los controles (Sharon et al., 2019). El establecimiento temprano en el intestino parece ser de importancia crítica porque la colonización bacteriana de ratones libres de gérmenes no normaliza los fenotipos de ansiedad a las 10 semanas de edad (Neufeld et al., 2011), pero sí los normaliza cuando la microbiota se introduce anteriormente, a las 3 semanas de edad (Clarke et al., 2013). Los cambios de comportamiento van acompañados de cambios en la neuroquímica, la expresión génica, la morfología dendrítica y los volúmenes cerebrales subcorticales (Bercik et al., 2011; Clarke et al., 2013; Desbonnet et al., 2009; Diaz Heijtz et al., 2011; Luczynski, Whelan, et al., 2016; Neufeld et al., 2011; Sudo et al., 2004). Los ratones germ-free (GF) también muestran una mayor tasa de renovación de noradrenalina, dopamina y 5-HT en el cerebro (Diaz Heijtz et al., 2011), posiblemente responsable de su bien documentado aumento de la actividad motora, ya que estos neurotransmisores

tienen funciones en el aumento del flujo de sangre al músculo y control motor central, respectivamente.

Finalmente, en los últimos años muchos estudios han reportado la asociación entre la obesidad y un peor rendimiento cognitivo. Así, Liu et al. (X. Liu et al., 2021) han demostrado que la obesidad materna está relacionada con trastornos del neurodesarrollo de sus hijos, asociada con un descenso en la cognición y la sociabilidad. Sin embargo, añaden que una dieta alta en fibra restaura los trastornos conductuales inducidos por la obesidad materna a través de la mediación del eje microbiota-SCFA-cerebro y mejora las deficiencias sinápticas y los defectos de maduración de la microglía en la descendencia. Por otro lado, Hasebe et al. (Hasebe et al., 2021) realizaron una revisión sistemática donde concluyeron que la obesidad materna, el exceso de alimentación y patrones dietéticos poco saludables tienen efectos adversos duraderos en la salud física y mental de la descendencia. Asimismo, los estudios en humanos y animales indican que la microbiota intestinal puede contribuir directa e indirectamente a estos efectos de la dieta materna.

Intervenciones que modifican la microbiota

Debido al conocimiento a partir de estudios epidemiológicos y experimentales sobre el impacto de la microbiota intestinal en la salud metabólica, existe un interés creciente en probar intervenciones que modifiquen al microbioma alterado en humanos (Fan & Pedersen, 2021). Las técnicas más novedosas incorporan fármacos y suplementos con microorganismos modificados con efecto antiobesogénico, así como la posibilidad de utilizar la terapia con bacteriófagos y la edición génica con CRISPR-Cas9. A continuación, nos centraremos en las intervenciones clásicas en la modificación de la microbiota.

Intervenciones en la dieta o el ejercicio

En roedores, se ha visto cómo diferencias en las concentraciones de determinados nutrientes en la alimentación cambian el microbioma intestinal y el metabolismo. En particular, la alimentación alta en grasas saturadas causa endotoxemia y resistencia a la insulina. Una revisión sistemática ha resumido los resultados de quince estudios que investigaron la efectos de la grasa en la dieta sobre la microbiota intestinal en humanos (Wolters et al., 2019), y demostraron que la dieta rica en grasas saturadas o monoinsaturadas influyen negativamente en la microbiota, mientras que las dietas ricas en grasas poliinsaturadas parecían ser neutrales con respecto a la microbiota. De manera similar, las intervenciones dietéticas ricas en polisacáridos han dado como resultado una microbiota intestinal alterada relacionada con un aumento de las concentraciones biológicas de ácidos grasos de cadena corta, pérdida de peso y mejoras en los perfiles de citocinas. Asimismo, las intervenciones con mayor actividad física han mostrado cambios adaptativos y, en algunos casos transmisibles, del microbioma intestinal vinculados con una mayor capacidad para degradar el lactato o aminoácidos de cadena ramificada, un

mayor potencial para la síntesis de ácidos grasos de cadena corta y mejoras en la aptitud cardiorrespiratoria y la sensibilidad a la insulina.

Prebióticos, probióticos y posbióticos

Algunos polisacáridos no digeribles llamados prebióticos cambian la abundancia relativa de la microbiota con capacidad fermentadora en el colon de roedores e inducen funciones de metabolismo mejorado (Everard et al., 2011). Ensayos aleatorios controlados probaron varios prebióticos que demostraron que los fructanos de tipo inulina cambian la composición de la microbiota intestinal en mujeres adultas con obesidad, lo que provoca cambios modestos en el metabolismo del huésped (Dewulf et al., 2013). En niños con sobrepeso u obesidad, se reporta que los prebióticos de inulina enriquecida con oligofructosa alteran la microbiota intestinal y reducen modestamente el peso corporal, la adiposidad y los marcadores inflamatorios (Nicolucci et al., 2017).

Los probióticos, conocidos como “microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un beneficio para la salud del huésped” por la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) (FAO & WHO, 2001), han sido seleccionados empíricamente debido a su amplio uso en alimentos fermentados durante siglos y su historial de seguridad. Por el contrario, debido a esta amplia definición, su uso se ha generalizado, haciéndolos menos efectivos contra enfermedades específicas (Chang et al., 2019). Desde entonces, se han publicado numerosos estudios con el fin de demostrar los beneficios de los probióticos en una extensa lista de trastornos y/o enfermedades, correspondiendo los probióticos tradicionales a cepas o especies generalmente dentro de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, y algunos de otros géneros (Tan et al., 2019). Los probióticos tradicionales para las intervenciones clínicas en los trastornos relacionados con la obesidad se han utilizado en gran medida, con un impacto diferencial enorme en los parámetros y resultados clínicos, en base a la microbiota individual.

Además, es bien sabido que los efectos biológicos positivos funcionales y específicos de los probióticos dependen de la cepa. Por lo tanto, los estudios clínicos validados deben definir bien las cepas específicas administradas a los sujetos. (Azaïs-Braesco et al., 2010; Rijkers et al., 2011).

Los posbióticos representan la versión pasteurizada de los probióticos o partes de cepas microbianas que poseen efectos que promueven la salud (Tsilingiri et al., 2012). La combinación de varias cepas de probióticos y prebióticos, a menudo llamados simbióticos, también han demostrado una mejora metabólica.

Probióticos de nueva generación

Los nuevos avances en tecnologías ómicas y de alto rendimiento permitieron a la comunidad científica caracterizar e identificar nuevos microorganismos llamados probióticos de nueva generación (NGP) de acuerdo con la definición básica beneficiosa de un probiótico, pero que se caracterizan mejor al enfocarse en enfermedades específicas y resultados clínicos. Los NGP que han sido inicialmente bien diseñados y probados para los trastornos relacionados con la obesidad se muestran en la Tabla 4.

Es posible que algunos probióticos de nueva generación, por ejemplo, las cepas de *A. muciniphila*, ni siquiera necesiten colonizar el intestino para proporcionar efectos metabólicos beneficiosos para la salud. La proteína Amuc_1100, expresada en su membrana externa, mejora la función de barrera intestinal con una mayor densidad de células caliciformes a través del receptor tipo Toll 2 (TLR2) y mimetiza parcialmente el efecto beneficioso de la bacteria viva sobre el metabolismo energético y la sensibilidad a la insulina (Cani & de Vos, 2017).

Tabla 4. Cepas probióticas de nueva generación utilizadas en ensayos clínicos y estudios preclínicos relacionados con la obesidad.

Cepa NGP, especie dirigida y enfermedad	Aspectos dietéticos	Efectos clínicos y funcionalidad	Referencias
<i>Akkermansia muciniphila</i> Muc [CIP 107961] Humano Síndrome metabólico	Ingesta dietética y actividad física normales durante el período de estudio	↑ Sensibilidad a la insulina, ↓ insulinemia y ↓ colesterol total plasmático	(ClinicalTrials.gov, NCT02637115; Depommier et al., 2019)
<i>Hafnia alvei</i> HA4597 Humano Sujetos con sobrepeso	Dieta hipocalórica (-20%) y mantenimiento de la actividad física habitual	↑ Pérdida de peso en sujetos con sobrepeso, ↑ sensación de saciedad, ↑ pérdida de la circunferencia de la cadera, ↓ glucemia en ayunas	(ClinicalTrials.gov, NCT03657186; Déchelotte et al., 2021)
<i>Lactococcus lactis</i> NRRL-B50571 Humano Sujetos prehipertensos	Se pidió a los participantes que no cambiaran su dieta o estilo de vida durante la intervención	↓ Presión arterial sistólica y diastólica, ↓ Triglicéridos, colesterol total y lipoproteínas de baja densidad	(Beltrán-Barrientos et al., 2019; ClinicalTrials.gov, NCT02670811)
<i>Akkermansia muciniphila</i> —Muc [CIP 107961] Ratón Obesidad	Dieta rica en grasa/dieta estándar	↓ Ganancia de masa grasa, ↑ sensibilidad a la insulina, restauración de la función de barrera intestinal al actuar sobre TLR2, ↑ grosor de la capa mucosa; efectos similares por una sola proteína de membrana purificada (<i>Amuc 1100</i>)	(Cani & de Vos, 2017; Everard et al., 2013)
<i>Clostridium butyricum</i> CGMCC0313.1 Ratón Obesidad	Dieta rica en grasa/dieta estándar	↓ Acumulación de lípidos en hígado y suero, ↓ niveles de insulina, ↑ tolerancia a la glucosa, ↑ sensibilidad a la insulina, ↓ TNF- α y ↑ IL-10 e IL-22 en colon	(Shang et al., 2016)
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i> VPI C13-20-A Ratón Obesidad	Dieta rica en grasa/dieta estándar	↑ Salud hepática, ↓ inflamación del tejido adiposo	(Munukka et al., 2017)
<i>Bacteroides uniformis</i> CECT 7771 Ratón Obesidad	Dieta rica en grasa/dieta estándar	↓ Ganancia de peso; ↓ absorción de grasas en la dieta; ↓ esteatosis hepática; ↓ colesterol sérico, triglicéridos, glucosa, insulina y leptina; ↑ tolerancia a la glucosa; ↑ TNF- α por DC después de la estimulación con LPS; ↑ fagocitosis	(Cano et al., 2012)

DC: células dendríticas; IL: interleucina; NGP: probióticos de nueva generación; TLR2: receptor tipo toll 2; TNF: factor de necrosis tumoral.

Tabla 4. *Continuación.* Cepas probióticas de nueva generación utilizadas en ensayos clínicos y estudios preclínicos relacionados con la obesidad.

Cepa NGP, especie dirigida y enfermedad	Aspectos dietéticos	Efectos clínicos y funcionalidad	Referencias
<i>Parabacteroides goldsteinii</i> JCM 13446 Ratón Obesidad	Dieta rica en grasa/dieta estándar	↓ Obesidad por ↑ termogénesis del tejido adiposo, ↑ integridad intestinal ↓ inflamación, ↑ sensibilidad a la insulina	(Wu et al., 2019)
<i>Christensenella minuta</i> Ratón Obesidad	Dieta rica en grasa/dieta estándar	↓ Ganancia de peso, ↓ adiposidad. Altamente heredable en un fenotipo de huésped delgado	(Goodrich et al., 2014)
<i>Eubacterium hallii</i> DSM 1763 Ratón Diabetes	Dieta rica en grasa/dieta estándar	↑ Metabolismo energético y ↑ sensibilidad a la insulina a través de la conversión de glicerol 3hidroxipropionaldehído	(Engels et al., 2016)
<i>Hafnia alvei</i> HA4597 Ratón Obesidad	Dieta rica en grasa/dieta estándar	↑ Efectos beneficiosos contra la obesidad y metabólicos, ↓ ingesta de alimentos, ↓ peso corporal y ↓ ganancia de masa grasa	(Lucas et al., 2019)
<i>Lactococcus lactis</i> (GMM) LL-pCYT: HSP65-6P277 y LL-pHJ Ratón Obesidad	Dieta rica en grasa/dieta estándar	↓ Inmunidad celular antígeno-específica	(Y. Ma et al., 2014)
<i>Escherichia coli</i> Nissle 1917 (EcN-GMM) Ratón Obesidad	Dieta rica en grasa/dieta estándar	Modulación de la expresión de neuropéptidos de consumo y gasto de energía en el hipotálamo	(J. Ma et al., 2020)

DC: células dendríticas; IL: interleucina; NGP: probióticos de nueva generación; TLR2: receptor tipo toll 2; TNF: factor de necrosis tumoral.

La estrategia de búsqueda de NGP que sean capaces de modular los efectos de los compuestos obesogénicos y disruptores de la microbiota requerirá la información y evidencia científica de acuerdo con los criterios siguientes (Figura 1).

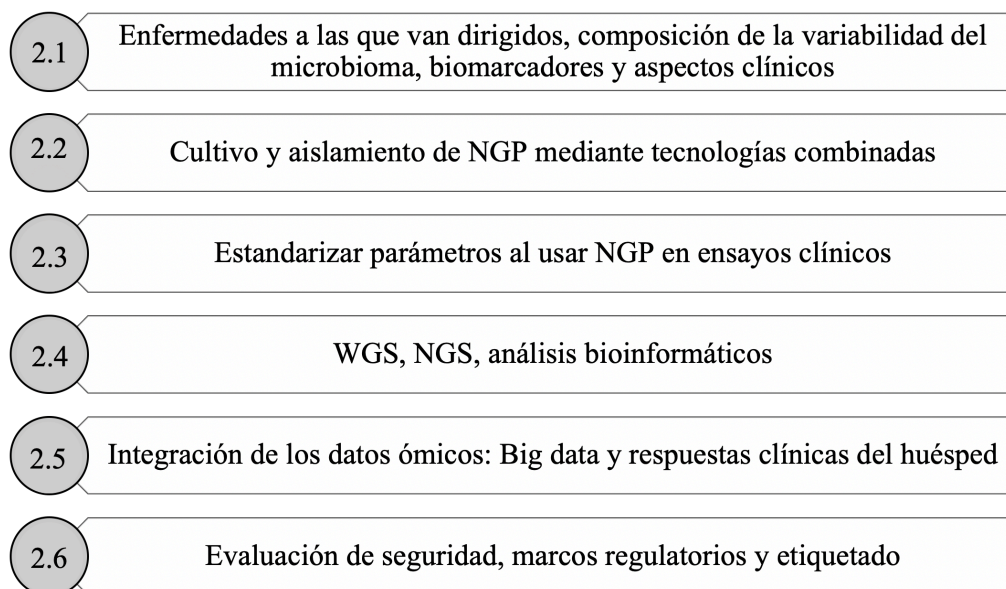


Figura 1. Criterios para la estrategia de búsqueda de NGP
Whole Genome Sequencing (WGS), Next Generation Sequencing (NGS)

De cara a validar su eficacia y seguridad, es necesario la realización de un análisis previo y posterior exhaustivo de la modulación de la composición de la microbiota individual a través de metodologías representativas y validadas. Se necesita además la estandarización de los análisis de bioinformática y los contenidos de las bases de datos para el análisis del conjunto de datos globales de microbiomas. Esto permitirá comparaciones de los efectos significativos de estudios armonizados y metanálisis. Además, los NGP deben tener beneficios documentados atribuibles que confirmen su seguridad durante la administración. En resumen, se necesitan directrices armonizadas e internacionales sobre NGP y su impacto en microbiota para abordar la prevención o tratamientos de la obesidad y de enfermedades relacionadas.

Trasplante de microbiota fecal

El trasplante de microbiota fecal (FMT) es un procedimiento que implica la transferencia de microbiota intestinal de un individuo a otro, comúnmente realizado mediante la administración oral de material fecal en roedores o colonoscopia en humanos. Cuando es efectiva, esta técnica establece inicialmente un microbioma similar al de un donante en el tracto gastrointestinal del receptor, lo que permite hacer inferencias más sólidas con respecto a las relaciones causales entre la microbiota intestinal y los resultados del huésped. El uso de FMT en el tratamiento médico humano está ganando popularidad, aunque no es novedoso, pues se han descrito estudios de su uso en la medicina tradicional china de hace más de 1700 años. El procedimiento FMT se ha vuelto más conocido por su notable tasa de éxito en el tratamiento de la infección refractaria por *Clostridium difficile* (CDI) (Han et al., 2016). Pasando de la clínica al laboratorio, el FMT ha abierto posibilidades para investigaciones más mecanicistas del papel de la microbiota en varias condiciones clínicas a través de la "humanización" de la microbiota de roedores GF.

Dichos estudios han encontrado que el FMT puede transferir varios fenotipos conductuales, incluido el comportamiento similar a la ansiedad y aspectos de la sintomatología depresiva, lo que sugiere que la microbiota intestinal es un componente clave para regular la ansiedad y la depresión (P. Zheng et al., 2016). Además, la composición de la microbiota intestinal se ha relacionado con la obesidad y la resistencia a la insulina (Tai et al., 2015). Se ha demostrado que los ratones GF tenían un peso corporal reducido y, cuando se los convencionalizó con microbiota intestinal normal, los animales experimentaron un aumento del 60 % en el contenido de grasa corporal y la resistencia a la insulina, combinados con una reducción consumo de alimentos (Bäckhed et al., 2004). Además, la humanización de ratones GF con microbiota de individuos obesos resultó en un aumento significativo en el peso corporal en comparación con

individuos colonizados con microbiota de individuos delgados (Turnbaugh et al., 2006), lo que ilustra la importancia de las características del donante.

Utilizar animales GF como receptores de FMT proporciona un entorno más fácil para que la microbiota introducida colonice y elimina la posible necesidad de un tratamiento con antibióticos antes de FMT, pero viene con la advertencia de que los animales GF están notablemente alterados antes de FMT (de Groot et al., 2017). No obstante, han sido un punto de partida importante para responder a la pregunta de si la microbiota está involucrada o no en un proceso determinado. El potencial del FMT en la investigación y como terapia médica es prometedor para el tratamiento de enfermedades y afecciones relacionadas con el tracto GI (Luczynski, McVey Neufeld, et al., 2016).

Microbiota y metabolismo microbiano

Como se ha descrito anteriormente, existe una estrecha relación entre la microbiota y el huésped, cuyo equilibrio finalmente tiene un gran impacto en la salud. De hecho, más del 50% de los metabolitos presentes en las heces y la orina son derivados de la microbiota intestinal o son modificados por ella. (X. Zheng et al., 2011). Este hecho proporciona la justificación de la intensa búsqueda actual de compuestos microbianos intestinales que vinculan la microbiota intestinal con el metabolismo energético, así como su impacto en el sistema nervioso central. Son muchas las vías de comunicación que pueden existir entre la microbiota y el organismo, por lo que resulta de gran importancia entender el metabolismo microbiano y los compuestos que actúan directa o indirectamente en los receptores endocrinos del huésped. En la figura 2 se muestran los compuestos microbianos que actúan a nivel de los órganos implicados en la regulación de los trastornos metabólicos.

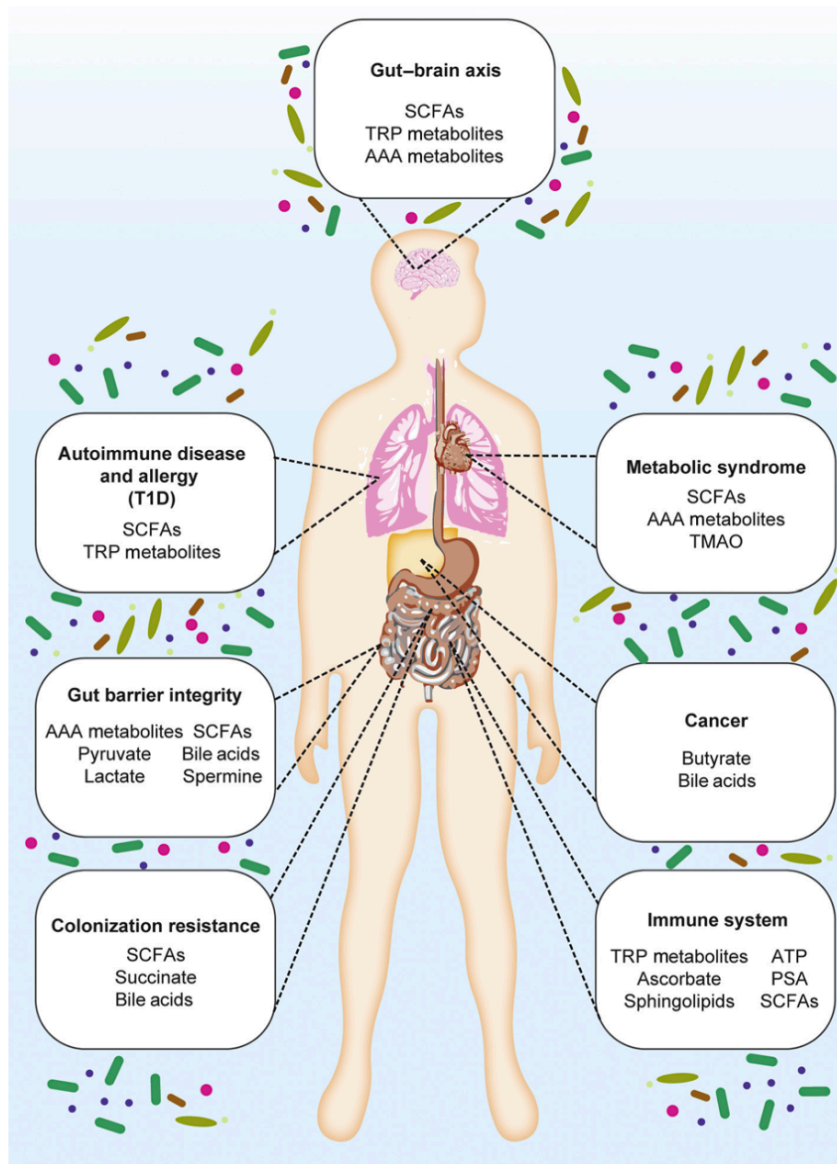


Figura 2. Influencia de los metabolitos microbianos en el huésped. (Nicolas & Chang, 2019)

Los metabolitos producidos por la microbiota intestinal pueden modular innumerables procesos fisiológicos en el huésped, influyendo en la enfermedad en trastornos inflamatorios, incluido el síndrome metabólico, el cáncer, las enfermedades autoinmunes como la diabetes tipo 1 (DM1), la alergia y las enfermedades inflamatorias del intestino. Además, estos metabolitos también pueden influir en el eje intestino-cerebro y regular el sistema inmunitario y la susceptibilidad del huésped a infecciones gastrointestinales a través de la resistencia a la colonización.

La fermentación de la fibra dietética por parte de Firmicutes y Bacteroidetes produce butirato, propionato y acetato, ácidos grasos de cadena corta (SCFA) que influyen en el metabolismo del huésped. Tanto el propionato como el butirato son predominantemente

antiobesogénicos a través de su estimulación de las hormonas anorexigénicas y la síntesis de leptina (Lin et al., 2012). El acetato y el butirato estimulan la liberación de péptidos con efectos en el páncreas (inducen la biosíntesis de insulina) y en el cerebro (inducen saciedad). Por otro lado, los lipopolisacáridos (LPS) son compuestos proinflamatorios derivados de las membranas bacterianas Gram-negativas que promueven la inflamación. Los aminoácidos de cadena ramificada (BCAA) derivados de bacterias intestinales se correlacionan, en casos de ingesta elevada de grasas, con la resistencia a la insulina tanto en humanos como en roedores. Otro compuesto interesante, el imidazol-propionato, es un compuesto microbiano que altera la señalización de la insulina (Koh et al., 2018). En sangre portal y periférica de individuos con DM2, el imidazol-propionato estaba presente en concentraciones más altas que en individuos sanos. Especies de bacterias intestinales como *Streptococcus mutans* y *Eggerthella lenta* fueron verificadas como productoras de imidazol-propionato. En experimentos con ratones, el imidazol-propionato empeoró la tolerancia a la glucosa y la señalización de insulina a través de la activación de la vía de la diana de mamíferos del complejo de rapamicina 1 (mTORC1). De acuerdo con estos hallazgos, se encontró sobreexpresión de la vía de señalización de insulina mediada por mTORC1 en tejido hepático aislado de individuos con DM2.

Por último, el 10% de nuestras necesidades energéticas diarias proviene de la fermentación colónica microbiana de polisacáridos de la dieta. Varios estudios sugieren que la contribución relativa de las glicosidasas microbianas es un indicativo de la capacidad para el metabolismo de azúcares y la producción de energía (Cantarel et al., 2009; Tasse et al., 2010) y que su alteración puede estimular la ganancia de peso (Payne et al., 2012). Por otro lado, Hernández et al. (Hernández et al., 2013) comprobaron que la actividad específica total de 23 glicosidasas diferentes era 40 veces superior en individuos

obesos y que correlacionaba positivamente con BMI, la glucemia en ayunas y la resistencia a la insulina.

A nivel del eje microbiota-intestino-cerebro, el metabolismo del huésped también está influenciado por neurotransmisores sintetizados por bacterias intestinales destacando los SCFA y los aminoácidos. Específicamente, la microbiota intestinal puede proporcionar formas únicas del metabolismo de aminoácidos, con impacto inmunológico, metabólico y neurológico (Agus et al., 2018; H. Chen et al., 2019; Yano et al., 2015). Tal comunicación química entre el huésped y su microbiota intestinal también alcanza al metabolismo de la histidina. La histidina juega un papel importante en la anemia, la eritropoyesis, el metabolismo de la hemoglobina, las lesiones cutáneas, el malestar general, la anorexia y la carga mental (Kopple & Swendseid, 1975), y se ha demostrado que mejora la sensibilidad a la insulina, induce la pérdida de grasa corporal con la reducción de la circunferencia de la cintura, reduce el apetito y disminuye el estrés oxidativo y los niveles plasmáticos de marcadores de inflamación sistémica (DiNicolantonio et al., 2018). La disfunción en la ruta metabólica de la histidina se ha relacionado con trastornos vasculares, dermatológicos, metabólicos, digestivos, inmunológicos y neurológicos. La histamina es un neurotransmisor con funciones en las secreciones gástricas y la motilidad del colon y relacionada con múltiples trastornos del sistema nervioso central, incluidos el insomnio, la narcolepsia, la enfermedad de Parkinson, la esquizofrenia, la enfermedad de Alzheimer y la isquemia cerebral. Además, la histamina muestra efectos tanto proinflamatorios como antiinflamatorios en los procesos inmunorreguladores y es un importante mediador en las enfermedades alérgicas. (Branco et al., 2018; W. Hu & Chen, 2017; Pugin et al., 2017; Schubert & Peura, 2008). La histamina se oxida posteriormente a imidazol-4-acetato, un agonista del receptor tipo A del ácido γ -aminobutírico y un antagonista del receptor tipo C, cuya administración a

animales reduce la actividad motora, aumenta las convulsiones y la alodinia y conduce a un estado similar al sueño con convulsiones. (Chu et al., 2020; Krall et al., 2016; Tunnicliff, 1998; Valembois et al., 2017). La histamina puede progresar alternativamente a N-acetilhistamina que actúa como un poderoso estimulante de la secreción gástrica, un constrictor del músculo liso bronquial, un regulador de la temperatura corporal, un vasodilatador y un neurotransmisor de acción central. (Canadian Institutes of Health Research, Canada Foundation for Innovation, 2019). El exceso de histidina en la dieta se degrada irreversiblemente a *trans*-urocanato por la acción limitante de la histidina amonio-liasa (HAL) o histidasa, una enzima altamente expresada en la capa superficial (estrato córneo) de la piel y en el hígado (Hart & Norval, 2020). El *trans*-urocanato es un intermediario importante en la vía metabólica de la histidina al glutamato que se ha asociado con un aumento de la neurotransmisión excitatoria (Zhu et al., 2018). En la piel, el *trans*-urocanato sirve como filtro solar natural ya que la fotoisomerización a *cis*-urocanato absorbe la radiación UV. (Stipanuk & A., 2006). Muchos estudios *in vivo* e *in vitro* han revelado las propiedades antiinflamatorias e inmunosupresoras locales y sistémicas del *cis*-urocanato, la regulación negativa de las reacciones de hipersensibilidad, la supresión de la inmunidad celular, la atenuación de la esclerosis y la enfermedad inflamatoria intestinal inducida por el sulfato de dextrano y la protección de las células de las lesiones ocasionadas por la radiación UV (Albert et al., 2010; Correale & Farez, 2013; Korhonen et al., 2020; Menezes et al., 2016). En el hígado, después de dos etapas en la reacción, el *trans*-urocanato finalmente se convierte en glutamato, un aminoácido no esencial con funciones vitales en el metabolismo intermediario y en la biosíntesis de ácidos nucleicos, proteínas y aminoácidos como la prolina y la arginina. El glutamato, el aminoácido más abundante en el cerebro de los mamíferos, actúa como un importante neurotransmisor excitatorio a través de una amplia variedad de receptores que regulan la comunicación neuroinmune, el lenguaje, la plasticidad sináptica, el

aprendizaje, la memoria, la actividad motora, el desarrollo neuronal y la enfermedad de Alzheimer (Bukke et al., 2020; Fischer et al., 2021; Hodo et al., 2020; Ibrahim et al., 2020; W. Li et al., 2020). Por último, pero no menos importante, el *trans*-urocanato también puede reducirse a imidazol-propionato (dihidrourocanato o deaminohistidina), mencionado anteriormente en su papel en la diabetes tipo 2 (Koh et al., 2018), mediante la urocanato reductasa, una ruta metabólica proporcionada por la microbiota intestinal a los mamíferos.

En resumen, una gran cantidad de datos generados tanto en humanos como en animales indican importantes implicaciones de los productos generados por la microbiota en el metabolismo del huésped.

El conocimiento acumulado sobre la microbiota intestinal está produciendo un cambio en el enfoque de los estudios, que previamente trataban de contestar a la pregunta de ¿qué microorganismos la componen?, hacia la pregunta ¿qué están haciendo esos microorganismos? Para intentar contestarla, se realizan estudios desde un punto de vista metabólico y enzimático que permitan describir mejor los efectos de la microbiota intestinal sobre la salud/enfermedad del huésped, concretamente en obesidad y en alteraciones neurológicas, y es en esta línea donde encajan nuestros trabajos de investigación.

Objetivos

Objetivo general

Demostrar el papel de los biomarcadores enzimáticos/metabólicos de la microbiota en la obesidad y el neurodesarrollo y diseñar una estrategia racional para clasificar, identificar y ensayar los consorcios de microbiota humana en modelos murinos gnotobióticos.

Objetivos específicos

1. Estudiar la actividad enzimática glicosidasa en las colecciones de microorganismos de la microbiota humana infantil en relación a la obesidad.
2. Establecer un modelo gnotobiótico para demostrar el papel de las glicosidasas microbianas en el desarrollo de la obesidad.
3. Establecer un modelo gnotobiótico para evaluar los efectos de microorganismos en el desarrollo cognitivo.
4. Analizar mediante UHPLC-MS/MS el metaboloma microbiano relacionado con la histidina en muestras humanas y murinas y su potencial asociación con el neurodesarrollo.

Objectives

General objective

To demonstrate the role of the enzymatic/metabolic biomarkers from microbiota in obesity and neurodevelopment and to design a rational strategy to classify, identify, and test human microbiota consortia in gnotobiotic murine models.

Specific objectives

1. To study the glycosidase enzymatic activity from the microorganisms consortia of the infant human microbiota related to obesity.
2. To establish a gnotobiotic murine model to demonstrate the role of microbial glycosidases in the development of obesity.
3. To establish a gnotobiotic murine model to evaluate the effects of microorganisms on cognitive development.
4. To analyze by UHPLC-MS/MS the microbial metabolome related to histidine in human and murine samples and its potential association with neurodevelopment.

Material y métodos

Sujetos, diseño experimental y aspectos éticos

Estudio PREOBE: Las muestras del presente trabajo corresponden al estudio PREOBE, que se basa en una cohorte observacional prospectiva madre-hijo, con el objetivo de obtener marcadores genéticos, nutricionales, bioquímicos, microbiológicos, inmunológicos, antropométricos, neuropsicológicos y de neuroimagen para clarificar influencias a largo plazo de la programación temprana en el desarrollo de la adiposidad, la cognición y el comportamiento.

El reclutamiento del estudio se realizó entre 2008 y 2012, a través de la colaboración con el Hospital Clínico Universitario San Cecilio y el Hospital Universitario Materno Infantil de Granada, Granada, España y sus centros de salud periféricos. La cohorte se estableció con 331 gestantes reclutadas entre las 12 y 20 semanas de gestación; de ellas 265 completaron el seguimiento hasta el parto, conformando la cohorte actual basada en 4 grupos de parejas madre-hijo: 1) Sanas y normopeso ($18,5 \leq \text{BMI} < 25$), 2) Sobrepeso ($25 \leq \text{BMI} < 30$), 3) Obesidad ($\text{BMI} \geq 30$), 4) Diabetes Gestacional (incluyendo mujeres con normopeso, sobrepeso y obesas). Las madres fueron incluidas en el estudio cuando tenían entre 18 y 45 años, tenían embarazos únicos y no complicados y no participaban en otro estudio. Los criterios de exclusión del estudio para las madres fueron: cualquier tipo de tratamiento farmacológico, enfermedades diagnosticadas (p. ej., hipertensión o preeclampsia, retraso del crecimiento intrauterino, infección materna, hipo/hipertiroidismo, enfermedad hepática o renal) y dieta vegetariana. El estudio incluyó medidas antropométricas, cuestionarios de salud y evaluaciones médicas del niño. Este proyecto siguió los estándares éticos reconocidos por la Declaración de Helsinki (revisada en Hong-Kong 1989 y en Edimburgo 2000) y las recomendaciones de Buenas Prácticas

Clínicas de la CEE (documento 111/3976/88 1990), y la legislación española vigente que regula la investigación clínica en humanos (Real Decreto 561/ 1993). El estudio se explicó a los participantes antes de comenzar, y los padres firmaron un consentimiento informado por sí mismos y dieron su consentimiento por escrito en nombre de sus hijos. Las gestantes fueron supervisadas durante toda la gestación hasta el parto y luego hasta los 18 meses posparto. Se realizó antropometría fetal estandarizada, así como en los neonatos; los lactantes y niños fueron seguidos hasta los 8 años (3, 6, 12 y 18 meses, y a los 2; 3,5; 6,5 y 8 años) (Figura 3). Se recogieron heces frescas tras los 6 y 18 meses del parto y se almacenaron inmediatamente a -80°C , hasta su procesamiento. Se ha obtenido información importante, como la composición corporal materna y el aumento de peso durante el embarazo, la ingesta dietética materna e infantil, el estilo de vida que incluye la actividad física, los biomarcadores bioquímicos e inmunológicos maternos y del cordón umbilical, el crecimiento y el neurodesarrollo de la descendencia, entre otros. El desarrollo cognitivo infantil se evaluó a los 6 y 18 meses de edad mediante las Bayley Scales of Infant and Toddler Development®, Third Edition (Bayley, 2006), por psicólogos capacitados en presencia de la madre del niño. Estas escalas miden el nivel de desarrollo motor, del lenguaje y cognitivo o mental.

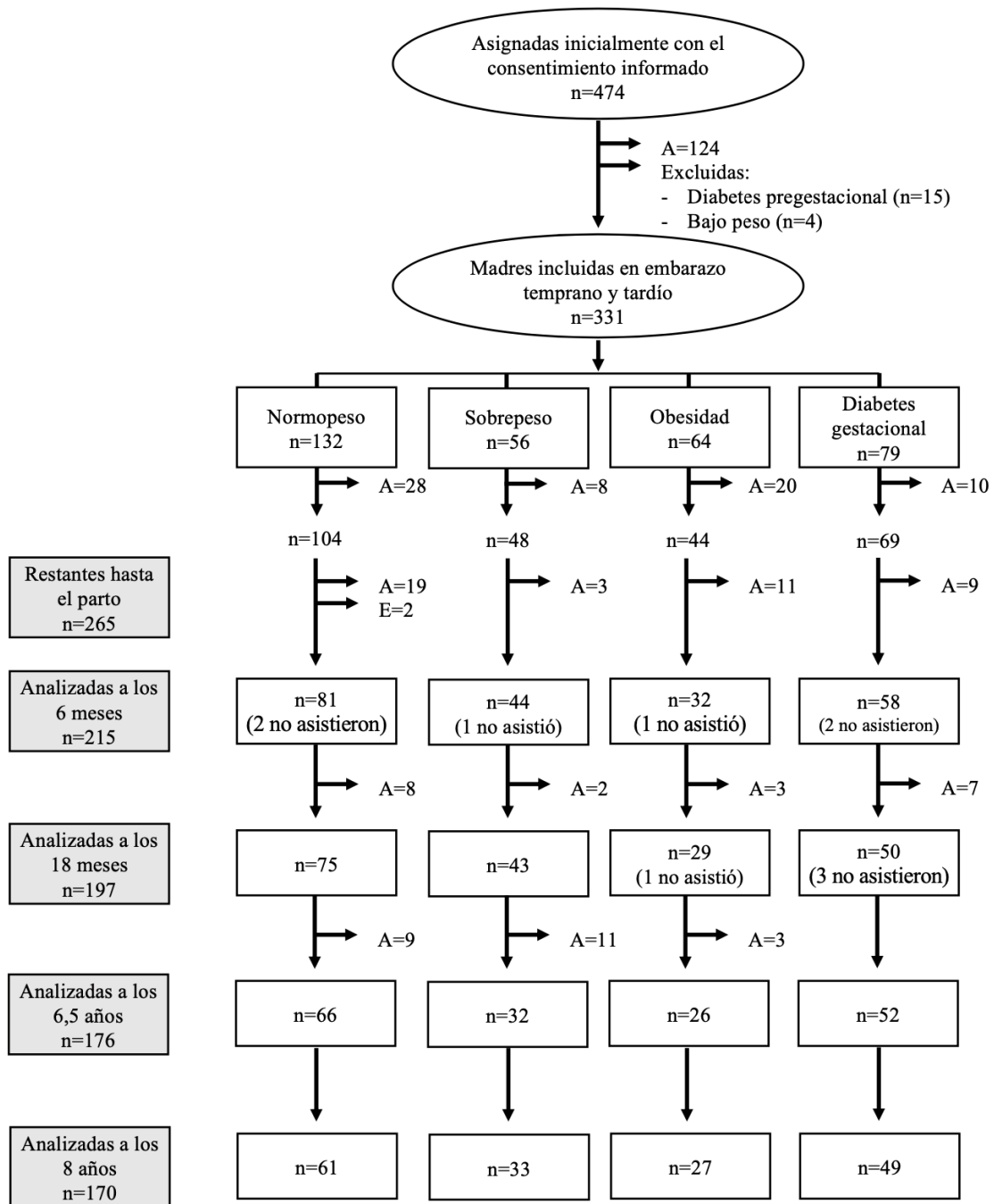


Figura 3. Perfil del estudio PREOBE.

El estudio incluyó a 331 mujeres embarazadas en diferentes etapas del embarazo, antes de las 34 semanas de gestación. Las madres incluidas se asignaron a cuatro grupos diferentes según su BMI pregestacional y su estado de diabetes gestacional. Los lactantes fueron seguidos en diferentes visitas hasta los 8 años. A=abandonos. E=exclusiones.

En el marco de este proyecto, la presente investigación se centra en el análisis de la microbiota intestinal durante los primeros 18 meses de vida. Se establecieron asociaciones entre los datos maternos e infantiles recopilados durante el seguimiento y la composición y funcionalidad de la comunidad bacteriana intestinal a los 6 y 18 meses de edad (Figura 4). Estos periodos de vida temprana son relevantes en el desarrollo de la microbiota intestinal, ya que a los 6 meses se produce un cambio de alimentación de leche, ya sea lactancia o fórmula, a alimentación complementaria y alimentos sólidos. Por otra parte, los 18 meses de edad es un período en el que se han instaurado los alimentos sólidos en casi el 90% de las dietas infantiles, determinando una comunidad microbiana más parecida a la que se encuentra en los adultos.

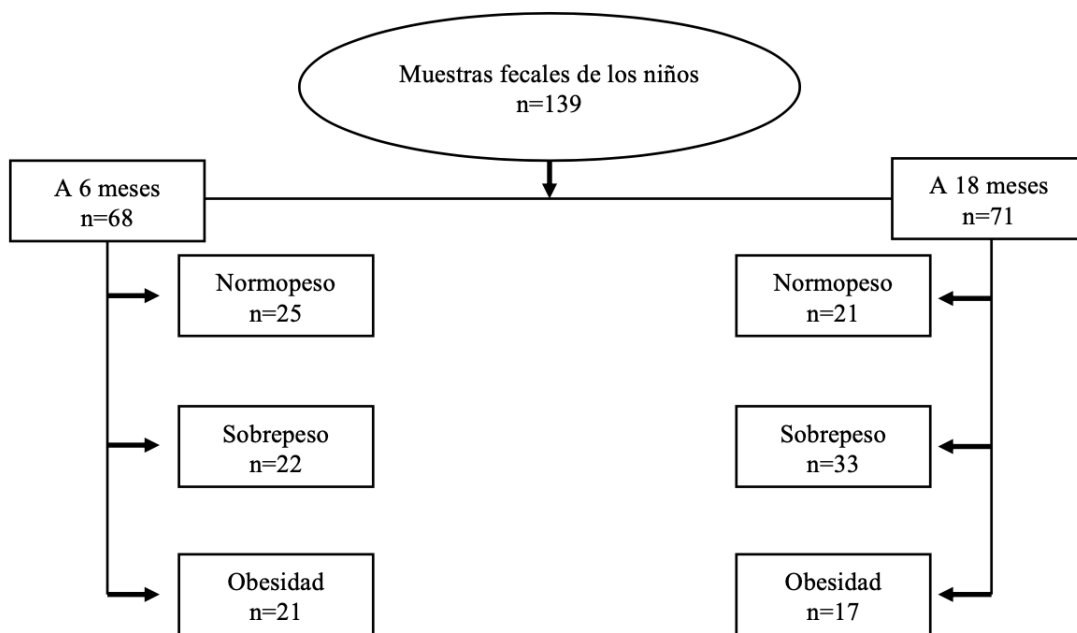


Figura 4. Muestras fecales analizadas.

Las muestras de heces se obtuvieron de 139 niños que participaron en el estudio de seguimiento PREOBE; se recogieron 68 muestras a los 6 meses y 71 a los 18 meses.

Estudios *in vivo* con modelos murinos

Modelos gnotobióticos

La experimentación con los modelos gnotobióticos, es decir ratones GF que reciben una microbiota concreta y conocida, también considerados como ex-GF humanizados, se realizó en la Unidad de Animales Gnotobióticos del Centro de Instrumentación Científica (CIC) de la Universidad de Granada (UGR). Los ratones recibieron atención y cuidados adecuados, todos los protocolos experimentales se realizaron de acuerdo con las regulaciones nacionales e institucionales, y previamente fueron aprobados por el Comité de Ética en Experimentación Animal de la UGR y por la Consejería de Agricultura, Ganadería, Pesca y Desarrollo Sostenible.

Se trabajó con una muestra total de 31 ratones C57BL/6 germ-free (GF), machos, repartidos en tres tandas: tanda 1, en febrero de 2020 (n=7); tanda 2, en mayo de 2020 (n=12); y tanda 3 (n=12), que recibieron la microbiota de 16 muestras fecales de niños de 6 meses.

La inoculación de la microbiota se realizó entre las 9 y 11 semanas de edad de los ratones. El método de FMT se puso a punto para el experimento tras realizar un profundo análisis de la bibliografía disponible, y se realizó de acuerdo a Goodrich et al. (Goodrich et al., 2014) en las siguientes condiciones: en la cabina de anaerobiosis, se pesaron 0,3g de heces de 16 niños y cada muestra se diluyó en 1mL de tampón fosfato salino (PBS) reducido con ditioneitol (DTT) 2mM. Se cerraron los tubos y se aislaron con parafilm, y se agitaron en vortex 10 seg. Se centrifugaron a 500g durante 1,5min. Se volvieron a introducir en la cabina de anaerobiosis y se tomó el sobrenadante, envolviendo el tubo de nuevo con parafilm para utilizarlo inmediatamente en la inoculación a los ratones GF. Ya en las instalaciones de la Unidad de Experimentación Animal, se trabajó en condiciones de

esterilidad dentro de la cabina, limpiando con Virkon® y etanol al 70% todas las superficies. Se introdujo todo el material autoclavado y esterilizado en la cabina, y se realizó el *oral gavage* con 200µL de cada inóculo de microbiota fecal cada dos ratones, contando finalmente con un total de 31 ratones.

Durante las siguientes dos semanas, se mantuvieron en cubetas de tipo Isocage® en un rack ventilado con presión positiva y ambiente totalmente aislado y estéril, con dieta chow y agua esterilizadas, manipulándolos solo para la recogida de muestras fecales y la medida del peso en la cabina de seguridad biológica, en la que las cubetas solo eran abiertas una vez que habían pasado por un baño de desinfección química con Virkon®. Pasados 14 días, se pesó a los ratones y se les realizó en día sucesivos las pruebas psicológicas de Open Field (OF, campo abierto) y Novel Object Recognition Test (NORT, reconocimiento de objetos), por el equipo de psicólogos formado por el doctorando Sergio Menchén y el Dr. Fernando Gámiz, del grupo de la Dra. Milagros Gallo. Por último, se tomaron medidas de glucosa en sangre de los ratones y se les sacrificó para la recogida de muestras biológicas.

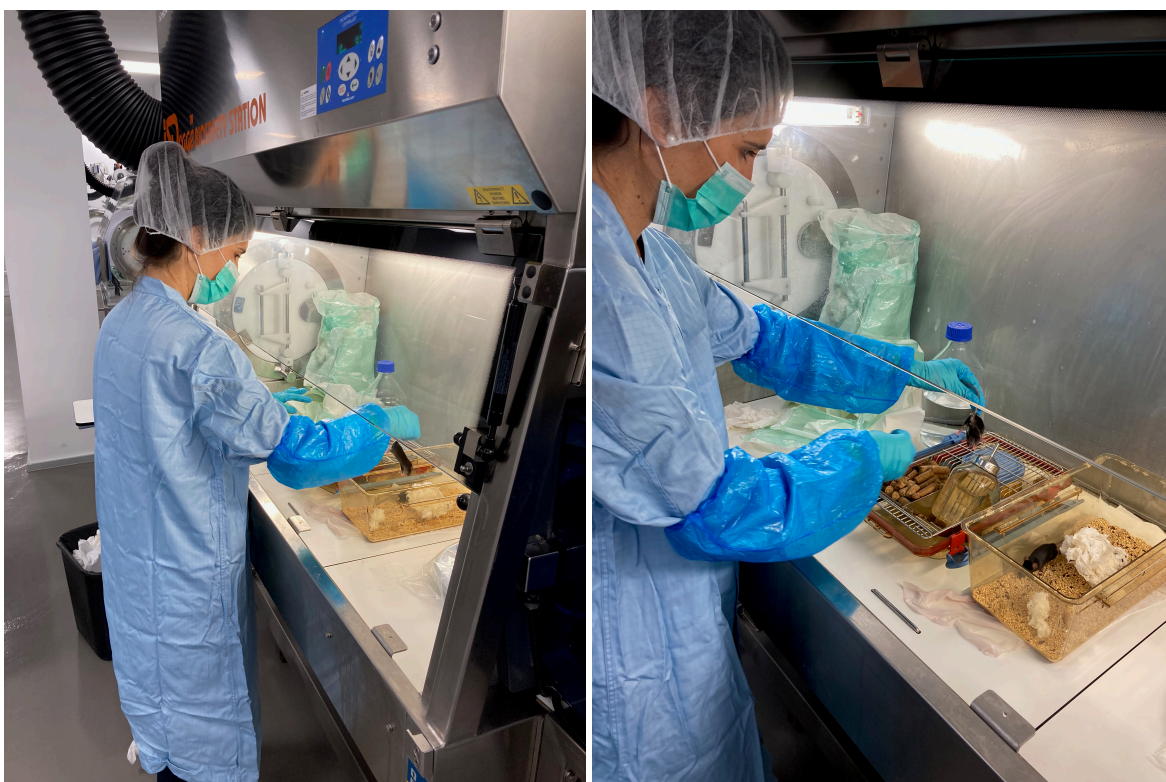


Figura 5. Estación de ratones germ-free.

Proceso de trabajo en la cabina de seguridad biológica de la Unidad de Animales Gnotobióticos del Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada. (Fotografía de Mayo de 2020).

Test de tolerancia a la glucosa

También denominado Oral Gavage Glucose Tolerance Test (OGTT). Se siguió el protocolo del Mouse Metabolic Phenotyping Centers ([MMPC Protocols, 2016](#)). Para ello, se preparó una solución de glucosa al 20% (20g glucosa en 100ml de agua). Se esterilizó mediante filtración con filtros de jeringa de nailon de 0,2 μm . Se inocularon 10 μL de esta solución por cada gramo de peso de ratón.

El día de la medida, se dejó en ayuno 5-6h a los ratones. Se retiró la comida y la viruta y se mantuvo el agua.

Se pesó a cada ratón. Para la medida de glucosa en ayunas, se limpió la cola de cada ratón con etanol, se hizo un corte de 1mm en el extremo de la cola y se midió la glucosa con un glucómetro Contour®XT y tiras reactivas Contour®Next.

Seguidamente, se realizó el *oral gavage* con el volumen correspondiente de glucosa al 20% para cada ratón. Se midió la glucosa en sangre a los 15min, 30min, 60min, 120min. Tras las medidas, se volvió a poner el pienso y la viruta.

Modelos SPF

Además del trabajo con modelos gnotobióticos, realizamos un estudio en ratones libres de patógenos específicos (SPF) como experimento piloto previo al de ratones GF. En este caso, se trabajó en la Unidad de Animales del CIC pero sin necesidad de ambiente estéril. Se inoculó por vía intraperitoneal un metabolito de la histidina en el grupo experimental (ciego a los psicólogos), y se realizaron las mismas medidas psicológicas descritas en la sección anterior. Se observó que el grupo experimental bioquímico fue muy similar a uno de los grupos que los psicólogos organizaron para presentar los objetos, por lo que esta coincidencia podía causar un sesgo en la preferencia por los objetos, y suponer un error estadístico. No obstante, las muestras de los controles se utilizaron en las medidas metabolómicas que sirvieron para establecer un nuevo método de determinación por UHPLC-MS/MS de los metabolitos de la histidina de forma simultánea.

Técnicas de laboratorio

Extracción y cuantificación de proteínas de origen microbiano

Las muestras fecales se descongelaron y se pesó una alícuota de cada una de 0,05g. Se diluyeron en 1 mL de PBS suplementado con L-cisteína al 0,05% pH 7,5 y se resuspendieron a 37°C. Después se centrifugaron a baja velocidad (500 g, 3 min), el sobrenadante se recogió y se centrifugó a 14000 g durante 1 min para obtener las bacterias fecales. Las bacterias fecales se lavaron con PBS suplementado con L-cisteína. Se añadió al sedimento resultante de bacterias 100 µL del reactivo BugBuster de extracción de proteínas (Novagen, Darmstadt, Alemania), 0,5µL de Lysonase Bioprocessing Reagent (Novagen) y 1 µL de PMSF 1mM, y las bacterias se lisaron durante 30 min, 100 rpm a 37°C. Después, las bacterias fecales fueron sometidas a 15 ciclos de frío-calor (hielo seco-28°C) de 15 seg, y se sometieron a sonicación (Bandelin Sonopuls, HD 2070) con un ajuste de amplitud del 30 %, durante 2 min en hielo. Por último, el extracto se centrifugó a 4°C durante 10 min a 14000 g para separar los restos celulares y las células intactas. El sobrenadante se aspiró cuidadosamente (para evitar perturbar el sedimento) y se transfirió a un nuevo tubo.

Para la cuantificación de las proteínas, se utilizó el reactivo BCA o ácido bicinónico (Thermo Fisher Scientific®), siguiendo las condiciones del fabricante, con la preparación extemporánea de la mezcla de reactivos A-B (50:1). Se realizó una curva patrón con una solución de albúmina a distintas concentraciones conocidas. Por último, se midió la absorbancia a 562 nm en el lector multiplacas Synergy HT (BioTek).

Electroforesis de proteínas en geles de acrilamida

El análisis de calidad de la extracción de proteínas se llevó a cabo mediante electroforesis en geles de acrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) al 10% (p/v). Los geles utilizados fueron geles preparados en el propio laboratorio siguiendo la metodología

descrita en el laboratorio y el siguiente protocolo. Las muestras se mezclaron con tampón de carga y se cargaron en los pocillos del gel. Tras la electroforesis, el gel se tiñó con azul Coomassie durante 2-3h y posteriormente se lavó varias veces con la solución de desteñido (ácido acético glacial 10% (v/v), metanol 30%) hasta la definición de las bandas de proteínas.

Solución tampón de electroforesis (running buffer): Tris base 25mM, Glicina 200mM, SDS 0,1%, agua bidestilada

Tabla 5. Soluciones y reactivos para el análisis de proteínas mediante SDS-PAGE

Stacking Gel (para 10 ml)		Resolving Gel (para 10 ml)	
Agua bidestilada	6,1 ml	Agua bidestilada	3,35 ml
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	2,5 ml	1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	2,5 ml
10% (p/v) SDS	0,1 ml	10% (p/v) SDS	0,1 ml
Acrilamida/Bis-acrilamida (30% / 0,8% p/v)	1,3 ml	Acrilamida/Bis-acrilamida (30% / 0,8% p/v)	4 ml
10%(p/v) PSA	0,075 ml	10%(p/v) PSA	0,075 ml
TEMED	0,0075 ml	TEMED	0,0075 ml

Medida de actividad glicosidasa bacteriana

Las actividades glicosidasa se cuantificaron por triplicado en placas de 96 pocillos usando un espectrofotómetro BioTek Sinergy HT. El ensayo colorimétrico se realizó con extractos de proteínas de bacterias fecales purificadas o bacterias control cultivadas, midiendo la liberación de 5 azúcares estructuralmente distintos (como derivados *p*-nitrofenil (*p*NP): *p*-nitrofenol- α -D-glucósido, *p*-nitrofenol- β -D-glucósido, *p*-nitrofenol- α -D-galactósido, *p*-nitrofenol- β -D-galactósido y *p*-nitrofenol- α -L-fucósido (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EE. UU.) que representan una selección de los de glicanos más comunes y medidos anteriormente en colaboración con nuestro grupo (Hernández et al., 2013). Para la cuantificación se siguió el siguiente protocolo: las reacciones contenían 35

μg de proteínas totales y 1 mg/mL de sustrato de azúcar en un tampón HEPES 50 mM pH 7 en un volumen final de 100 μL . Las reacciones se siguieron cada 10 min mediante la medición de la liberación de *p*NP a 410 nm durante 130 min a 37°C (Figura 6). En todos los casos, una unidad (U) de actividad enzimática se define como la cantidad de proteína que produce 1 mol de azúcares reducidos durante 1 min bajo las condiciones de ensayo. El procedimiento experimental global de la medida de actividad glicosidasa bacteriana se puede ver en la Figura 7.

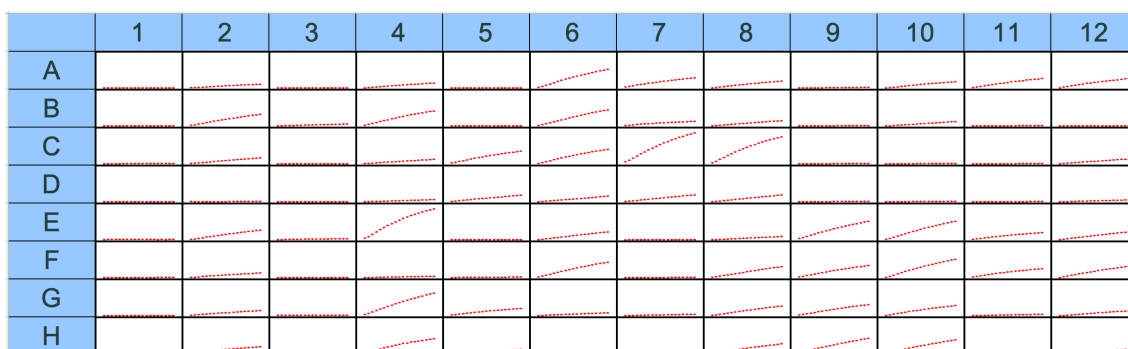
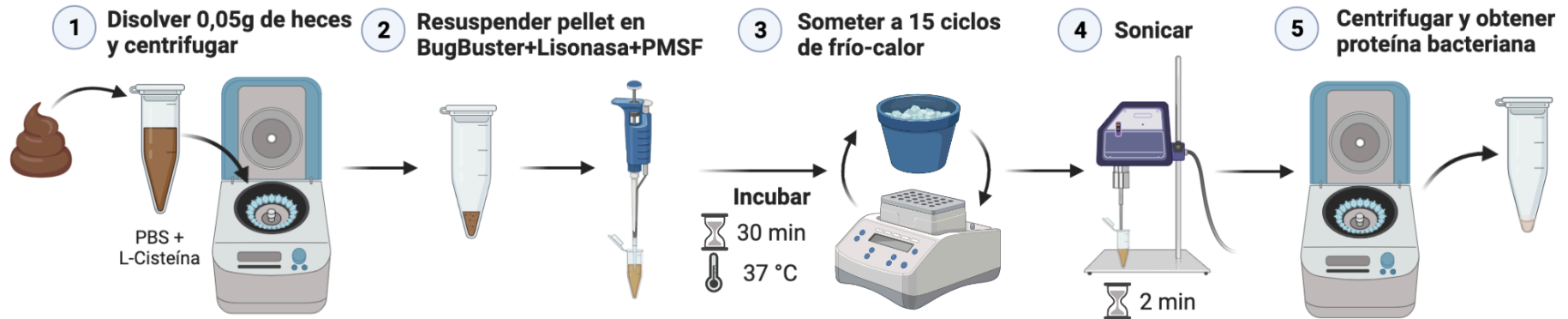


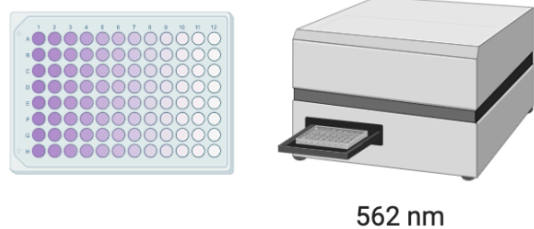
Figura 6. Medidas cinéticas de las actividades glicosidasas detectadas en el lector de placas espectrofotométrico de los extractos bacterianos de la microbiota intestinal de niños.

Extracción de proteínas de origen microbiano



Medida de concentración

- 6 Cuantificar la concentración de proteínas con BCA en espectrofotómetro



Medida de la actividad glicosidasa

- 7 Añadir HEPES, proteína bacteriana y por último, sustrato
- 8 Lectura cinética en espectrofotómetro
- 9 Calcular la actividad glicosidasa

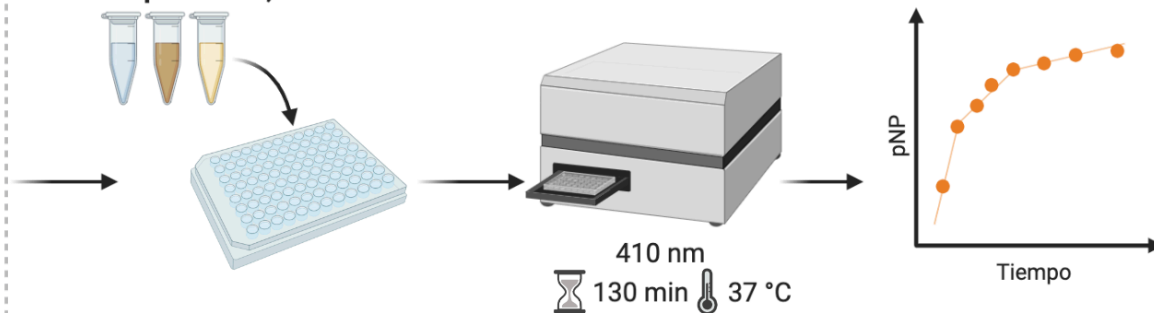


Figura 7. Esquema de la medida de la actividad glicosidasa bacteriana intestinal

Medida del metaboloma por UHPLC-MS/MS

Sustancias químicas y reactivos

El agua ($18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$) se purificó con un sistema Milli-Q Plus® (Millipore, Madrid, España). El disolvente de LC-MS (acetonitrilo, ACN) y el aditivo (ácido fórmico) eran de grado UHPLC-MS y se adquirieron en Scharlau (Scharlab S.L., Barcelona, España). El L-glutamato, imidazol-4-acetato, N-acetilhistamina, *cis*-urocanato, imidazol-propionato y ácido 2-amino-4-tiazolacético eran de Sigma-Aldrich Chemie GmbH. El *trans*-urocanato, la histamina y el atenolol se obtuvieron de Acros Organics (Geel, Bélgica). La L-histidina era de VWR International Ltd (Reino Unido). Otros productos químicos utilizados para medir las actividades enzimáticas fueron el reactivo de extracción de proteínas BugBuster (Novagen, Darmstadt, Alemania), cloruro de magnesio, glutatión reducido, piridoxal-5'-fosfato y aminoguanidina (Sigma-Aldrich, Chemie GmbH).

Preparación de las muestras de orina

Las muestras de orina se descongelaron y se transfirió una alícuota de 10 μL mediante pipeteo a un tubo Eppendorf de 1,5 ml. Se agregaron 990 μL de ACN/H₂O (50/50; v/v) a las muestras de orina. Los tubos se centrifugaron a 13.000 rpm a 4°C durante 10 min. Los sobrenadantes de orina se retiraron, se filtraron a través de filtros de jeringa de nailon de 0,2 μm y se congelaron en viales analíticos a -20°C hasta el análisis UHPLC-MS/MS.

Extracción de los metabolitos fecales e intracelulares microbianos

Las células de la microbiota se separaron de la matriz fecal mezclando 0,1 g de muestra fecal con 2 ml de PBS y L-cisteína al 0,05 %. Después de la resuspensión (mediante 1 min de vórtex vigoroso), las muestras se centrifugaron a 500 g durante 1 min a 4 °C para eliminar los restos fecales. El sobrenadante se transfirió a un tubo Eppendorf de 2 ml y se

centrifugó a 14.000 g a 4°C durante 1 min para sedimentar las células. Se mezclaron 500 µL de este sobrenadante con 500 µL de ACN de grado UHPLC-MS para precipitar las proteínas. A continuación, esta solución se centrifugó a 13.000 rpm a 4 °C durante 10 min para separar las impurezas sólidas. Los sobrenadantes se retiraron, se filtraron a través de filtros de jeringa de nailon de 0,22 µm y se congelaron en viales analíticos a -20°C hasta el análisis UHPLC-MS/MS.

Las células de la microbiota sedimentadas se resuspendieron en 300 µl de PBS y se dividieron en dos alícuotas. Para la determinación de metabolitos bioactivos de histidina intracelular, las células microbianas se lisaron con quince ciclos consecutivos de congelación-descongelación en nitrógeno líquido y un termobloque (28°C). Las muestras se sonicaron durante 2 min en hielo (Bandelin Sonopuls, HD 2070) con un ajuste de amplitud del 30 %. El precipitado final se retiró tras centrifugar a 14.000 g durante 10 min a 4°C. Los sobrenadantes se mezclaron con 150 µL de ACN de grado UHPLC-MS y se centrifugaron a 13.000 rpm durante 10 min a 4°C. Los sobrenadantes se retiraron, se filtraron a través de filtros de jeringa de nailon de 0,2 µm y se congelaron en viales analíticos a -20 °C hasta el análisis UHPLC-MS/MS.

Medida de actividades microbianas histidina amonio-liasa (HAL) e histidina descarboxilasa (HDC)

La alícuota restante de células de microbiota resuspendidas se mezcló con el mismo volumen de reactivo de extracción de proteínas BugBuster, se agitó suavemente durante 30 min a 37°C y posteriormente se rompieron las membranas mediante ciclos de congelación-descongelación y sonicación como se describió anteriormente. Los extractos de proteínas se centrifugaron a 14.000 g durante 10 min a 4°C para separar los restos celulares. La síntesis del producto por las enzimas HAL y HDC se midió en extractos proteicos usando 1 mg mL⁻¹ de sustrato de histidina. Las reacciones HAL se determinaron

en tampón Tris HCl 200 mM pH 9 con MgCl₂ 10 mM y GSH 100 mM. Las reacciones de HDC se midieron en acetato de sodio 80 mM pH 6,5 con piridoxal-5'-fosfato 61 mM y aminoguanidina 10 mM.

Soluciones estándar y curvas de calibrado

Las soluciones estándar se prepararon individualmente en 1 mg mL⁻¹ ACN/H₂O, (50/50 v/v). Se utilizaron los mismos disolventes de dilución para las soluciones madre de patrones internos (IS). Las soluciones madre estándar y los patrones internos se almacenaron a -20°C durante un máximo de 2 semanas. Las soluciones de trabajo se prepararon semanalmente diluyendo las soluciones madre con el mismo disolvente.

El proceso de calibración se realizó mediante la dilución de soluciones madre estándar en ACN/H₂O (50/50; v/v) para obtener seis soluciones en el rango de ng mL⁻¹ para los analitos a determinar. Cada punto de la curva estándar se preparó por triplicado y cada extracto se analizó tres veces. Los patrones internos, atenolol para urocánatos y ATAA para los demás analitos, se agregaron después de la extracción a una concentración final de 10 ng mL⁻¹. Las curvas de calibrado se trazaron utilizando la relación del área del pico del analito/estándar interno frente a la concentración del analito.

Instrumentación y condiciones analíticas

Se desarrolló un método de alto rendimiento utilizando UHPLC–ESI–MS/MS. Todas las mediciones se realizaron en el Centro de Instrumentación Científica (Universidad de Granada). La cromatografía se realizó con un Waters Acquity UPLC™ System I-Class (Waters, Reino Unido). Se ejecutaron dos análisis de cromatografía líquida de alto rendimiento diferentes: (i) análisis genérico, la separación se realizó mediante una columna Acquity UPLC HSS™ T3 (1,8 μm, 2,1 × 150 mm; Waters) (*Columna HSS T3*); y (ii) análisis de los isómeros del urocánato, la separación se llevó a cabo utilizando una

columna de cromatografía líquida de alto rendimiento Acquity BEH™ Amide (1,7 μm, 2,1 × 100 mm; Waters) (*Columna BEH Amide*). Los parámetros instrumentales se muestran en la Tabla 6. En ambos métodos analíticos, la fase móvil A fue agua con ácido fórmico al 0,1 % y la fase móvil B fue ACN con ácido fórmico al 0,1 %. La columna se usó a temperatura ambiente. El volumen de inyección de la muestra fue de 10 μL y el caudal fue de 0,3 mL min⁻¹ y 0,35 mL min⁻¹, respectivamente. La espectrometría de masas se realizó con un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo Waters (XevoTQ-XS, Waters, Reino Unido). El espectrómetro de masas se hizo funcionar en el modo ESI positivo con las siguientes condiciones de funcionamiento: tensión capilar, 2,90 kV; temperatura de la fuente de iones, 150 °C; temperatura de desolvatación, 600 °C; caudal de gas de desolvatación, 500 L h⁻¹; caudal de gas del cono, 150 L h⁻¹. Los iones moleculares protonados [M+H]⁺ de los metabolitos bioactivos de histidina se eligieron como iones precursores, debido a su mayor optimización de los parámetros del instrumento. Se seleccionó una transición de masa específica (m/z) para cada analito usando la función de modo de monitorización de múltiples reacciones (MRM) del instrumento para calificación y cuantificación. Los parámetros de masa optimizados dependientes del compuesto (voltaje de cono y energía de colisión) y las transiciones MRM se muestran en la Tabla 6. Los detalles de cromatografía de cada método y la configuración de MS se proporcionan en la Tabla 7 y Tabla 8. Se utilizó el software Masslynx versión 4.2 para el control del instrumento y la adquisición de datos.

Tabla 6. Transiciones y potenciales optimizados para el análisis UHPLC-MS/MS de los metabolitos de la histidina

	Fórmula química	tR (min)	Transiciones	CV	CE
Columna HSS T3					
Histidina	C ₆ H ₉ N ₃ O ₂	0,9	156,04 → 82,33 ^a	6	18
			156,04 → 92,48 ^b	6	18
N-Acetilhistamina	C ₇ H ₁₁ N ₃ O	1,49	154,06 → 67,38 ^a	4	24
			154,06 → 94,49 ^b	4	14
Glutamato	C ₅ H ₉ NO ₄	1,05	148,02 → 101,51 ^a	6	8
			148,02 → 83,43 ^b	6	12
Imidazol propionato	C ₆ H ₇ N ₂ O ₂	1,49	141,09 → 80,43 ^a	2	18
			141,09 → 94,51 ^b	2	10
Imidazol acetato	C ₅ H ₆ N ₂ O ₂	1,31	127,14 → 53,30 ^a	28	20
			127,14 → 80,38 ^b	28	4
Histamina	C ₅ H ₉ N ₃	0,83	112,11 → 40,31 ^a	12	18
			112,11 → 82,41 ^b	12	8
ATAA	C ₅ H ₆ N ₂ O ₂ S	1,49	159,05 → 70,33 ^a	4	26
			159,05 → 112,51 ^b	4	22
Columna BEH Amide					
Cis-uocanato	C ₆ H ₅ N ₂ O ₂	1,5	139,07 → 65,29 ^a	32	18
			139,07 → 92,48 ^b	32	16
Trans-uocanato	C ₆ H ₅ N ₂ O ₂	1,92	139,07 → 65,29 ^a	32	18
			139,07 → 92,48 ^b	32	16
Atenolol	C ₁₄ H ₂₂ N ₂ O ₃	1,81	267,19 → 144,67 ^a	6	26
			267,19 → 189,83 ^b	6	16

CV: Voltaje de cono (V); CE: Energía de colisión (eV).^a Transición MRM usada para cualificación. ^b Transición MRM usada para cuantificación.

Tabla 7. Resumen de los ajustes de HPLC

<i>Columna HSS T3</i>	Columna Acquity UPLC HSS™ T3 2,1 x 150 mm, 1,8 µm		
Temperatura de la columna de CL	Temperatura ambiente		
Volumen de inyección	10µL		
Fase móvil	A: Agua con 0,1% de ácido fórmico B: Acetonitrilo con 0,1% de ácido fórmico		
Flujo de la fase móvil	0,35 mL/min		
Gradiente	Inicial: 0% B, T ₅ : 90% B, T ₃ : 30% B, T _{3.1} : 100% B, T ₄ : 100% B, T _{4.1} : 0% B		
	Tiempo (min)	%A	%B
	0	100	0
	0,5	10	90
	3	70	30
	3,1	0	100
	4	0	100
	4,1	100	0
Tiempo total de ejecución (min)	6,5 min		
<i>Columna BEH Amide</i>	Columna Acquity UPLC BEH™ Amide 2,1 x 100 mm, 1,7 µm		
Temperatura de la columna de CL	Temperatura ambiente		
Volumen de inyección	10µL		
Fase móvil	A: Agua con 0,1% de ácido fórmico B: Acetonitrilo con 0,1% de ácido fórmico		
Flujo de la fase móvil	0,30 mL/min		
Gradiente	Inicial: 20% B, T _{0.5} : 20% B, T _{1.5} : 40% B, T _{3.5} : 40% B, T ₅ : 20% B		
	Tiempo (min)	%A	%B
	0	80	20
	0,5	80	20
	1,5	60	40
	3,5	60	40
	5	80	20
Tiempo total de ejecución (min)	6,5 min		

Tabla 8. Resumen de los ajustes de MS

Tipo de fuente	ESI+
Temperatura de desolvatación	600°C
Temperatura de la fuente	150°C
Flujo de gas del cono	150 (L/Hr)
Flujo de gas de desolvatación	500 (L/Hr)
Flujo de gas de colisión	0,15 (mL/min)
Flujo de gas del nebulizador	7,00 (Bar)
Capilaridad	2,90 (Kv)

Efecto matriz y validación

Para verificar el efecto de matriz para los patrones internos y, en consecuencia, para los metabolitos bioactivos de histidina, se realizó una comparación de pendiente entre varias curvas de calibración. Se preparó una curva de seis niveles de concentración para atenolol y ATAA en agua destilada y ACN. De manera similar, se realizó una segunda curva de calibrado agregando a cada matriz la misma cantidad de patrón interno que se usó en la calibración estándar (seis niveles de calibración).

Validamos el método desarrollado en términos de linealidad, límite de detección (LOD), límite de cuantificación (LOQ), selectividad, exactitud (veracidad y precisión) y recuperación de acuerdo con la guía para la validación de métodos bioanalíticos de la Administración Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (FDA) (CDER & CVM, 2018). Las curvas de calibrado se prepararon calculando la relación del área del pico cromatográfico del analito y el patrón interno para cada metabolito en cada nivel de concentración. LOD es la cantidad mínima de compuesto detectable en la muestra, mientras que LOQ es la cantidad mínima cuantificada. Ambos se determinaron para comprobar la sensibilidad del método analítico. En este trabajo, estos parámetros se calcularon siguiendo el método definido por Currie (Currie, 1999). Obtuvimos sus valores

de la función de calibrado, usando la desviación estándar del residual, $S_{y/x}$, la pendiente de la curva, b , y una estimación de la desviación estándar del blanco (S_0). El LOD se define como $3 \cdot S_0$ y el LOQ como $10 \cdot S_0$. La selectividad se evaluó comparando el cromatograma del blanco con el mismo blanco añadiendo una concentración conocida de los patrones internos. La exactitud (veracidad y precisión) se evaluó añadiendo muestras a niveles bajos, medios y altos (5, 50 y 100 ng mL⁻¹, respectivamente) en tres réplicas para cada compuesto durante tres días consecutivos. Usamos blancos de procedimiento con disolvente cada diez muestras para controlar la contaminación de fondo y no encontramos cantidades cuantificables de los analitos de estudio.

Extracción y cuantificación del DNA microbiano de muestras de heces

La extracción del DNA de las bacterias fecales se realizó según el protocolo publicado por Zoetendal et al. (Zoetendal et al., 1998) con pequeñas modificaciones. Las muestras se descongelaron en agua helada y 0,05g de muestra se resuspendieron en 1 mL de TN150 (Tris-HCl 10 mM pH 8,0 y NaCl 150 mM). Posteriormente se paso la suspensión a un tubo con 0,3 g de bolitas de 0,1 mm de zirconio/sílice. La mezcla se incubó a 80°C durante 30 minutos en un baño, volteando el tubo cada 5 minutos. Pasados los 30 minutos el tubo se enfrió a temperatura ambiente y se añadieron 10 µL de lisozima de una concentración de 100mg/mL y se incubó a 37°C durante 30 minutos. Después se agregaron 150 µL de fenol tamponado (Panreac Applichem®) y se procedió a realizar la lisis celular en un equipo inductor de ruptura celular (Beadbeater, Biospec Products, EE. UU) durante 10 segundos a 5000g. Las muestras se enfriaron inmediatamente en hielo y se centrifugaron durante 5 min a 4°C y 14000g. La fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo para comenzar con la extracción con disolventes orgánicos. Se añadió 750µL de fenol tamponado y se mezcló por inversión suave. Después se centrifugaron los tubos 5 min a 4°C y 14000 g y de nuevo la fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo. A continuación se agregaron 400

μL de fenol y 400 μL de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1) (Panreac Applichem®) y se centrifugaron los tubos 5 min a 4°C y 14000 g. Se añadieron 750 μL de cloroformo/alcohol isoamílico y se mezcló por inversión suave. Después se centrifugaron los tubos 5 min a 4°C y 14000 g y de nuevo la fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo. Se volvió a transferir la fase acuosa a un tubo nuevo para proceder a la precipitación de los ácidos nucleicos. Se añadió 1/10 del volumen de acetato sódico 3 M y pH 5,2 y dos volúmenes de etanol absoluto frío. Los tubos se mantuvieron en frío al menos 30 min. Después se centrifugaron a 4°C durante 5 min a 10000rpm. Se desechó el sobrenadante y se agregaron 500 μL de etanol frío al 70% agitando suavemente. Los tubos se centrifugaron a 4°C a 7500rpm durante 5 min. Se descartó el sobrenadante y se secó el sedimento a 55°C. Por último se resuspendió el precipitado en 25 μL de agua estéril y se incubó a 37°C durante 15 minutos tras añadir RNAsa.

Para la cuantificación del DNA extraído se utilizó el kit Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay Kit (ThermoFisher) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras se excitaron a 485 nm y la intensidad de fluorescencia se midió a 520 nm en un lector multiplacas Synergy HT (BioTek).

Electroforesis de DNA en geles de agarosa

Para comprobar de la calidad del DNA, las muestras de DNA bacteriano extraído fueron sometidas a electroforesis en geles horizontales de agarosa. La concentración de agarosa en los geles fue de 0,8% (p/v).

El tampón utilizado para la preparación de los geles así como para la electroforesis fue TAE 1X (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM, pH 8. Las muestras de DNA se mezclaron con el tampón de carga de electroforesis (6X Loading Dye, Fermentas) para monitorizar el estado de la electroforesis por la posición relativa del indicador del frente. A continuación se aplicó un voltaje de 60 V/cm con una fuente de alimentación BIO-RAD.

Terminada la electroforesis, el gel se tiñó en una solución de bromuro de etidio (0,5 µg/mL) durante 20 min para permitir visualizar y tomar una foto del DNA al iluminar el gel con luz UV utilizando un equipo Quantum-ST4.

Secuenciación del gen 16S rRNA

Se usó DNA genómico de bacterias fecales para la amplificación del gen 16S rRNA usando cebadores universales 27F y 338R y dos reacciones de PCR consecutivas para integrar secuencias multiplexadas de Illumina como se describió anteriormente (Camarinha-Silva et al., 2014). La biblioteca se preparó agrupando proporciones equimolares de amplicones y se secuenciaron utilizando una plataforma Illumina MiSeq (Servicio de Genética, Universidad de Granada). Los encargados de este proceso fueron técnicos especializados.

Análisis de datos bioinformático y estadístico

El análisis bioinformático de los datos generados en la secuenciación masiva se llevó a cabo mediante el array en la plataforma MiSeq. Se realizó el filtrado de las secuencias generadas, el “demultiplexing” (que consiste en adjudicar cada secuencia a la muestra de la que procede) y la formación de las unidades taxonómicas operativas (OTUs). Los extremos pareados se emparejaron para dar lecturas de 250 nt. El conjunto de datos se filtró y las OTUs se definieron con un 99 % de similitud con los programas MOTHUR unique.seqs y pre.cluster (Schloss et al., 2009).

Clasificación taxonómica y cálculo de la abundancia relativa

Se asignaron clasificaciones taxonómicas a las OTUs que habían superado los filtros de calidad utilizando el algoritmo naïve Bayesian desarrollado por Ribosomal Database Project (RDP) (Cole et al., 2003). Este algoritmo proporciona un nivel de confianza para cada nivel taxonómico en cada OTU. Se usó un valor umbral de confianza del 80% en todos los niveles taxonómicos. Las OTUs con un valor de confianza menor al 80% fueron anotadas utilizando rangos superiores. La abundancia relativa de los taxones microbianos se calculó a nivel de género, familia y filo. Para ello se sumaron las lecturas con la misma anotación taxonómica, teniendo en cuenta el umbral de confianza mencionado anteriormente.

Cálculo de α -diversidad

Se considera α -diversidad a la riqueza de especies de una comunidad dada y puede venir expresada por diferentes índices. Los más comunes son el índice de Shannon, índice de Chao-1, OTUs observadas. El índice diversidad filogenética de Faith (PD-whole tree), es el único que tiene en cuenta la filogenia, por lo que es el más correcto. Para el cálculo de este parámetro se ha utilizado el software PAST (PAleontological STatistics) (Hammer et al., 2001) y el software libre R (R Core Team, 2018).

Cálculo de β -diversidad

Se considera β -diversidad al grado de cambio o reemplazo en la composición de especies entre diferentes comunidades. También existen diferentes índices que miden este tipo de diversidad, en este trabajo se ha utilizado la medida Unifrac, que está ampliamente aceptada y utilizada en estudios de microbiota intestinal (Lozupone et al., 2007). UniFrac es una medida de β -diversidad que utiliza información filogenética para comparar muestras ambientales. UniFrac, junto con las técnicas estadísticas multivariantes,

incluyendo análisis de coordenadas principales (Principal Coordinates Analysis, PCoA), identifica los factores que explican las diferencias entre las comunidades microbianas.

La distancia Unifrac se ha calculado con el paquete informático *GUnifrac* (J. Chen, 2012) de R. Este paquete permite calcular diferentes tipos de distancia *Unifrac*, que son *Unifrac weighted* (tiene en consideración la abundancia de los taxa/OTUs), *Unifrac unweighted* (es sensible a la presencia de taxa raros). La representación gráfica se realizó mediante métodos de ordenación con el paquete *ade4* (Chessel et al., 2004).

Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando SPSS versión 26.0 (IBM SPSS, Inc., Chicago, IL) y el software libre R. En general, para los datos que seguían una distribución normal se analizaron mediante la prueba de ANOVA dentro del grupo de intervención. El análisis post-hoc se llevó a cabo mediante comparaciones por pares de pruebas *t* para muestras pareadas (Bonferroni y Tukey) de los diferentes momentos de la intervención y se aplicó la corrección de Benjamini-Hochberg (BH) para comparaciones múltiples. También se realizó la prueba *t* de Student para comparar dos grupos con distribución normal. La prueba de Friedman, una versión no paramétrica de ANOVA de dos vías, se aplicó para establecer diferencias en los datos que no seguían una distribución normal. El análisis post-hoc se llevó a cabo mediante la prueba no paramétrica de Wilcoxon para muestras pareadas con corrección de BH. Para establecer diferencias entre dos grupos con distribución no normal, se aplicó el test U de Mann-Whitney con la corrección de BH.

Para investigar similitudes y diferencias entre variables cuantitativas, se calcularon los coeficientes de correlación de Pearson y de Spearman para estimar las asociaciones de la

distribución. Para introducir covariables confusoras en los análisis por grupos, se utilizó el Modelo Lineal General multivariado.

Con el fin de establecer diferencias significativas a nivel de β -diversidad, se realizó un análisis de PERMANOVA sobre las matrices de distancia Unifrac con 999 permutaciones con la función *adonis* del paquete *vegan*. Ésto se realizó para las diferentes matrices de distancia generadas con el paquete *GUnifrac*.

Para identificar las agrupaciones de comunidades microbianas o enterotipos a nivel de género se utilizó Dirichlet Multinomial Mixture (DMM), un método de agrupamiento no supervisado que utiliza la aproximación de Laplace (Holmes et al., 2012). Los taxones no clasificados a nivel de género o presentes en menos del 20 % de las muestras se excluyeron del agrupamiento DMM. Se utilizó la prueba exacta de Fisher para determinar si los grupos de los niños estaban asociados con los enterotipos. Se construyó una abundancia significativa de filotipos diferenciales en varios niveles de taxonomía diferentes a partir de tablas de abundancia sin procesar no normalizadas con el paquete DESeq2 utilizando una prueba de Wald bilateral con ajuste para comparaciones múltiples mediante el método BH (Anders & Huber, 2010). Para todas las determinaciones, el límite de significancia estadística se fijó en $p \leq 0,05$.

Resultados y Discusión

1. Microbiota y obesidad

1.1. La actividad glicosidasa de la microbiota intestinal infantil asocia con el índice de masa corporal materno

En este primer capítulo, estudiamos la composición y funcionalidad microbiana intestinal a los 6 meses de edad y su asociación con el BMI materno antes del embarazo.

Se definieron tres grupos en función del BMI de la madre previo al embarazo calculado a partir del peso corporal y la altura: normopeso $\text{BMI} \leq 25 \text{ kg/m}^2$, sobrepeso $30 \text{ kg/m}^2 \leq \text{BMI} \leq 25 \text{ kg/m}^2$ y grupo obeso $\geq 30 \text{ kg/m}^2$ (Tabla 9). Las características generales fueron similares entre los tres grupos de estudio.

Tabla 9. Características generales de la población de estudio. Valores totales (porcentaje del valor total) o Medias (SD).

Características de la población			
Características de las madres		Características de los niños	
BMI pre-embarazo		Sexo	
Normopeso	25 (36,76%)	Masculino	39 (57,35%)
Sobrepeso	21 (30,88%)	Femenino	29 (42,65%)
Obesidad	22 (32,35%)		
Educación		Alimentación a los 3 meses	
Primaria/Secundaria	36 (52,94%)	Lactancia materna	41 (60,29%)
Universidad	32 (47,06%)	Mixta	11 (16,18%)
Tabaco durante el embarazo		Fórmula artificial	16 (23,53%)
Sí	4 (5,88%)		
No	64 (94,12%)		
Alcohol durante el embarazo		Alimentación a los 6 meses	
Sí	2 (2,94%)	Lactancia materna	15 (22,06%)
No	66 (97,06%)	Mixta	26 (38,24%)
Tipo de parto		Fórmula artificial	27 (39,71%)
Vaginal	51 (75%)		
Cesárea	17 (25%)		

De las 68 muestras se obtuvieron un total de 4.536.643 secuencias de 16S rRNA de alta calidad. Las secuencias se agruparon en 679 OTUs y se clasificaron en 89 grupos bacterianos a nivel de género. Primero examinamos la α -diversidad (diversidad ecológica dentro de la de la muestra) de las comunidades microbianas intestinales. Usamos la diversidad de Shannon (SDI) ($p=0,151$), los índices Chao-1 (estima la riqueza) ($p=0,608$) y el número de taxones (calcula OTU únicos) ($p=0,492$). Estos valores de diversidad no fueron significativamente diferentes entre la microbiota intestinal de los niños nacidos de madres normopeso, sobrepeso y obesas.

Calculamos distancias Unifrac (β -diversidad) para determinar la diversidad entre muestras en las comunidades microbianas intestinales de grupos de niños. Las cuantificaciones de varianzas se calcularon utilizando PERMANOVA con la función *adonis* en el paquete R *vegan* (Oksanen et al., 2019). Se observó que, de forma significativa, la estructura de la comunidad intestinal de los niños nacidos de madres obesas era más similar entre ellos que entre los niños nacidos de madres con sobrepeso y a su vez, ambas diferían de la comunidad microbiana de los niños nacidos de madres con normopeso ($p=0,002$ para distancias UniFrac weighted y $p=0,015$ para distancias unweighted). Las tres poblaciones distintas que representan muestras de los grupos normopeso, sobrepeso y obesidad se agrupan en el gráfico de análisis de coordenadas principales (PCoA) (Figura 8).

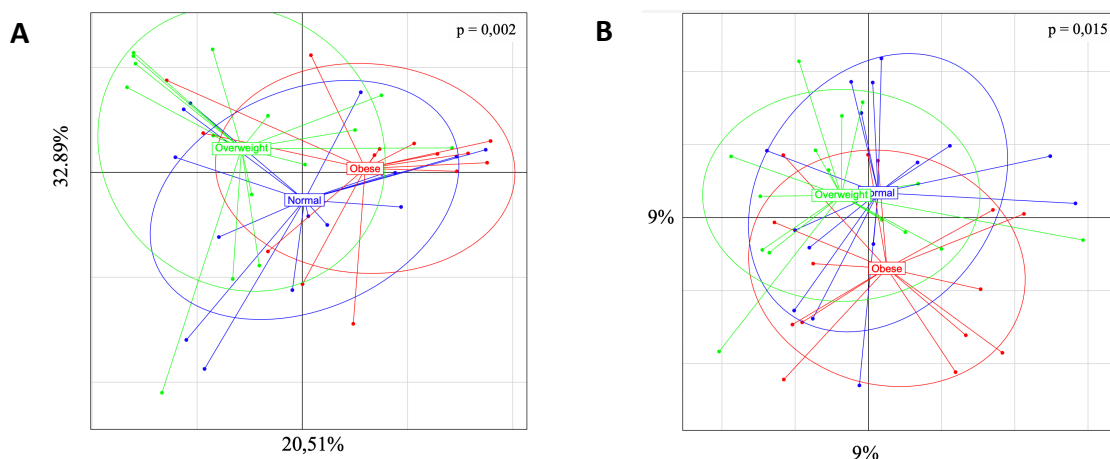


Figura 8. Análisis de coordenadas principales (PCoA) de las comunidades intestinales de microbiota de los grupos normopeso, sobrepeso y obesidad

A. Weighted UniFrac ($p=0,002$), B. Unweighted UniFrac ($p=0,015$)

Para excluir variables de confusión que pueden afectar la relación entre el BMI materno antes del embarazo y la composición de la microbiota intestinal de los niños, examinamos el efecto del sexo, el tipo de parto, la educación de la madre, el consumo de tabaco y alcohol durante el embarazo y el tipo de alimentación a dos tiempos durante el estudio utilizando la prueba PERMANOVA basada en la distancia UniFrac. El análisis mostró un efecto explicativo significativo asociado al tipo de parto (vaginal/cesárea) y la alimentación hasta los 3 meses (lactancia materna, fórmula o mixta) en la β -diversidad (Tabla 10). Estas asociaciones significativas se consideraron en análisis estadísticos posteriores para evitar el efecto de las variables confusoras.

Tabla 10. Asociaciones entre la composición de la microbiota intestinal (gen 16S rRNA) y otras variables de interés.

	F model	R²	p valor
Tipo de parto	1,336	0,029	0,048*
Sexo del bebé	1,131	0,025	0,239
Educación de la madre	0,872	0,019	0,721
Tabaco durante el embarazo	1,050	0,023	0,381
Alcohol durante el embarazo	0,980	0,021	0,499
Lactancia materna hasta los 3 meses	1,385	0,061	0,014*
Lactancia materna hasta los 6 meses	1,075	0,047	0,257

Análisis UniFrac (unweighted). *Valores de $p \leq 0,05$ resaltados en negrita

A nivel de composición microbiana o abundancias relativas de los taxones, la microbiota intestinal de los niños fue diferente entre nuestros grupos de estudio. En los niños nacidos con normopeso, Firmicutes fue el filo dominante (49,06%), seguido de Actinobacteria (31,15%) Proteobacteria (12,92%), Bacteroidetes (4,93%), y Verrucomicrobia (1,9%). El grupo de niños con madres con sobrepeso mostró una dominancia de Firmicutes (53,39%), seguido de Actinobacteria (41,06%), Bacteroidetes (3,14%), Proteobacteria (2,39%), y en los niños nacidos de madres obesas, Firmicutes también fue el filo principal (53,33%), seguido de Actinobacteria (37,11%), Proteobacteria (9,35%) y Bacteroidetes (0,19%).

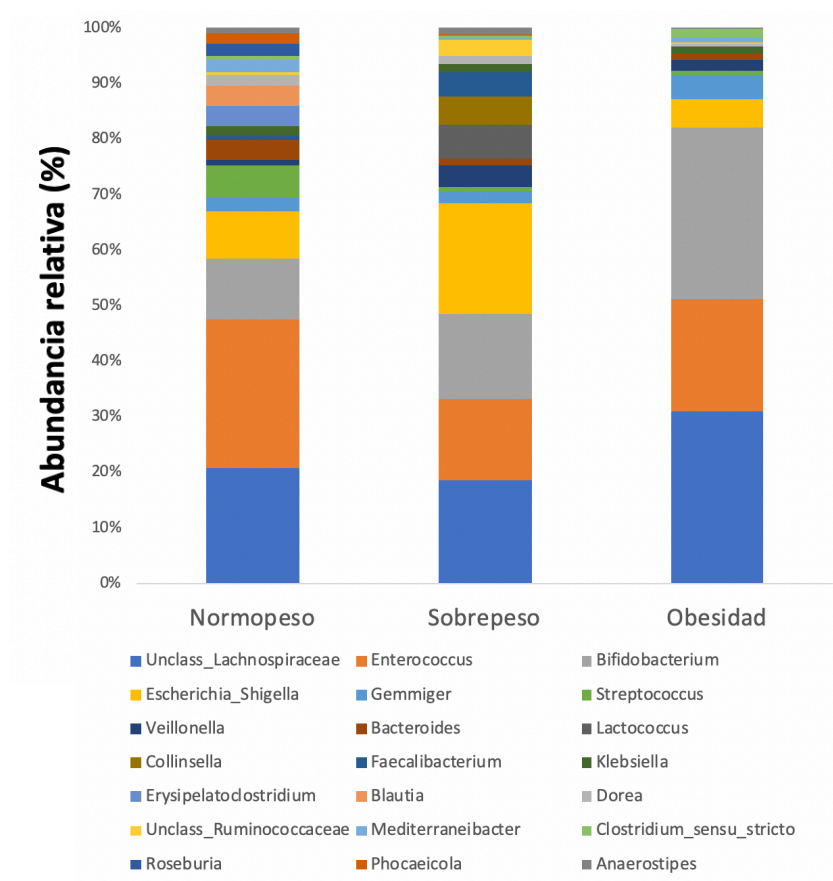


Figura 9. Abundancia relativa en porcentaje de los taxa presentes de la microbiota intestinal de los niños de 6 meses en función del BMI de sus madres

A la hora de estudiar la composición de las comunidades microbianas, se realizó un modelo lineal general multivariante, utilizando como factor fijo el BMI, e incluyendo

como covariables el tipo de parto y la lactancia materna hasta los 3 meses. A nivel de *filo* hubo una sobreabundancia de Bacteroidetes ($p=0,05$) y a nivel de familia, de Bacteroidaceae ($p=0,043$) en los grupos de normopeso. Además, se observó un aumento en las muestras de niños de madres obesas del género *Bifidobacterium* ($p=0,05$). Las muestras de niños de madres con sobrepeso estuvieron enriquecidas en *Ruthenibacterium* ($p=0,001$) y *Anaerostipes* ($p=0,05$), mientras que la microbiota de niños de madres con normopeso tuvo mayor abundancia en *Bacteroides* ($p=0,001$), *Faecalimonas* ($p=0,043$), *Romboutsia* ($p=0,048$), *Dialister* ($p=0,027$), *Parasutterella* ($p=0,019$).

Para identificar las funciones microbianas enriquecidas o disminuidas en los perfiles de los microbiomas intestinales de los niños según el BMI materno antes del embarazo, se realizó una evaluación del potencial funcional de la comunidad microbiana utilizando la metaproteómica obtenida de estudios anteriores. Nuestro análisis reveló una sobrerrepresentación de las funciones involucradas en el transporte y metabolismo de nucleótidos y en la producción de energía y el metabolismo de conversión. Observamos una mayor abundancia del factor de elongación de la traducción GTPasa (COG0480) ($p=0,002$), acetilornitina desacetilasa (COG0624) ($p=0,016$), proteína de unión al sustrato del sistema de transporte de maltooligosacárido (COG2182) ($p=0,007$), y β -glucosidasa (COG1472) ($p=0,016$), en la microbiota intestinal de niños nacidos de madres obesas (Figura 10).

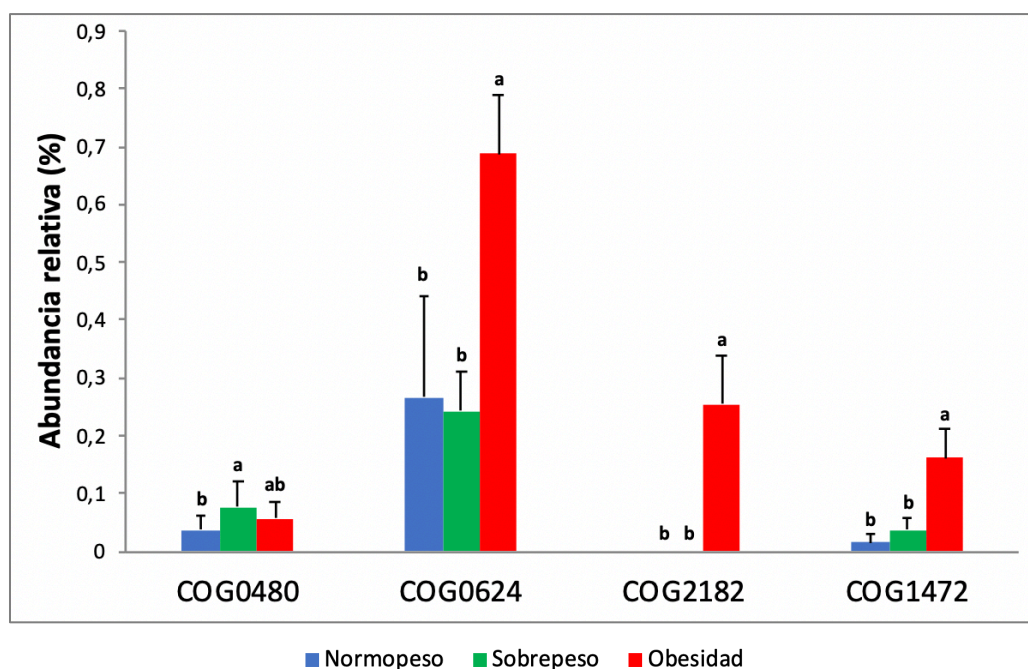


Figura 10. Capacidades metabólicas potenciales de la microbiota infantil.

Diferencias significativas en las capacidades metabólicas potenciales de los microbiomas intestinales entre los niños nacidos de madres normopeso (azul), madres con sobrepeso (verde) y madres obesas (rojo). Análisis de ANOVA con prueba post-hoc de Bonferroni. Valores medios con barras de error típico. Medias con una letra común no son significativamente diferentes.

Dado que nuestro trabajo anterior demostró un aumento de la actividad de la glicosidasa en la microbiota intestinal de sujetos que se correlacionaba con un BMI ≥ 25 kg/m², analizamos y observamos un aumento de las actividades microbianas de β -galactosidasa, α -galactosidasa, α -glucosidasa, β -glucosidasa y α -fucosidasa intestinal en niños nacidos de madres con sobrepeso y obesas (Figura 11).

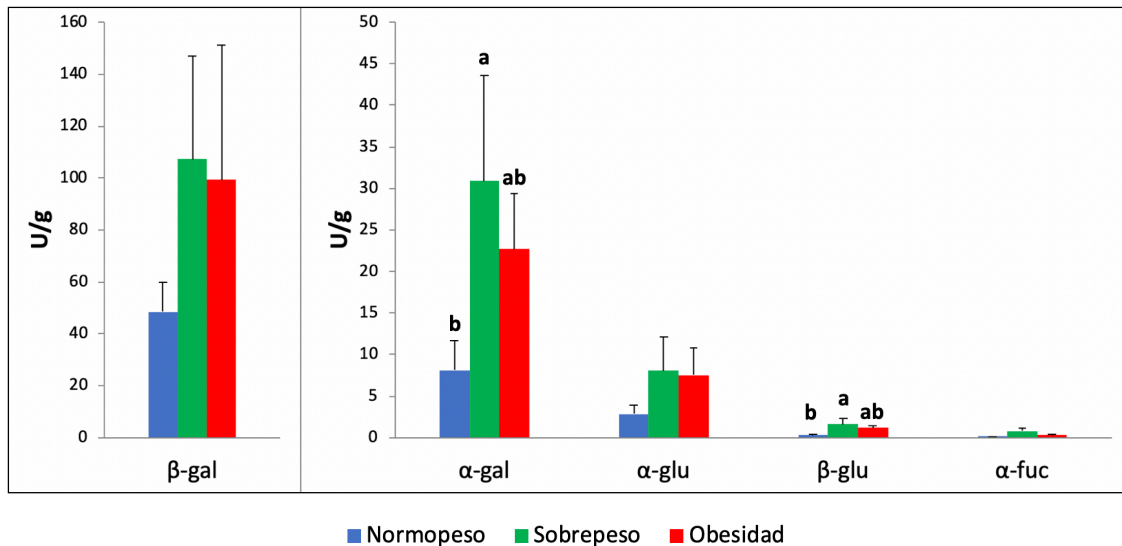


Figura 11. Distribución de las actividades glicosidasa específicas de la microbiota intestinal de niños de 6 meses en función de los grupos de BMI de sus madres (U/g).

Análisis de ANOVA con prueba post-hoc de Bonferroni. Valores medios con barras de error típico. Medias con una letra común no son significativamente diferentes. La actividad β -galactosidasa se separó, ya que el nivel de actividad fue significativamente mayor en comparación con las demás actividades y se muestran en el panel de la izquierda.

Aunque el análisis estadístico sólo mostró diferencias significativas entre los grupos de BMI en las actividades α -galactosidasa ($p=0,05$) y β -glucosidasa ($p=0,019$), existía una clara tendencia a una correlación positiva entre el metabolismo de los carbohidratos por parte de las enzimas glicosidasas, de origen exclusivamente microbiano, y el BMI.

En resumen, nuestros hallazgos indican que el exceso de peso materno antes del embarazo puede imprimir una microbiota intestinal cuyo desempeño metabólico, concretamente la capacidad de extracción de energía a partir de la dieta, altere la salud metabólica en la descendencia.

Tras una amplia investigación en la que se estudió la asociación de la obesidad con la microbiota humana, especialmente a través del metabolismo de carbohidratos, quisimos dar un paso cualitativo que demostrara la transferencia de la composición y la funcionalidad de la microbiota, y en consecuencia del fenotipo en modelos murinos GF, a los que les inoculamos de forma oral la microbiota intestinal de sujetos seleccionados en función de sus características y medidas metabólicas, para el estudio de asociación de la microbiota con la obesidad, y conocer las vías metabólicas subyacentes.

1.2. Trasplante de microbiota fecal en ratones germ-free

Inicialmente quisimos comprobar fue si la microbiota se instalaba en los ratones receptores tras el trasplante mediante *oral gavage*. Así, a las dos semanas de la inoculación, recogimos muestras fecales de los ratones y analizamos su composición microbiana.

El estudio filogenético de la microbiota de ratones, en comparación con la de humanos, resultó en dos comunidades muy diferentes (Figura 12).

A nivel de filo, fueron significativas las diferencias de Actinobacteria ($p < 0,001$) enriquecidas en humanos, y de Bacteroidetes ($p = 0,01$), Proteobacteria ($p = 0,002$) y Verrucomicrobia ($p = 0,024$) aumentadas en muestras de ratones.

A nivel de género, hubo 3 especies predominantes de forma significativa en humanos, correspondientes a *Bifidobacterium* ($p < 0,001$), *Unclass_Lactobacillales* ($p = 0,036$) y *Unclass_Peptostreptococcaceae* ($p = 0,002$). Por otro lado, las muestras de ratones estaban enriquecidas en *Akkermansia* ($p = 0,024$), *Bacteroides* ($p = 0,047$), *Citrobacter* ($p = 0,044$), *Coprobacillus* ($p = 0,036$), *Enterocloster* ($p = 0,011$), *Escherichia_Shigella* ($p = 0,003$) y *Unclass_Enterobacteriaceae* ($p = 0,015$).

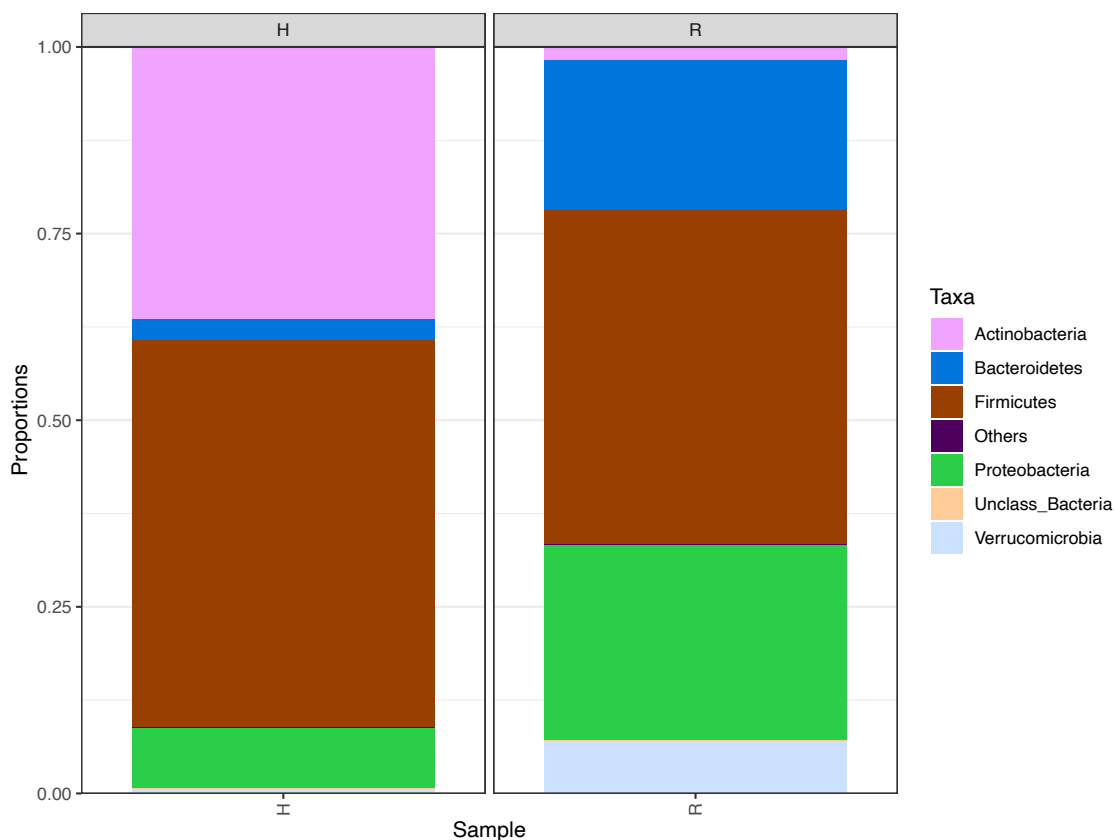


Figura 12. Distribución de las abundancias relativas de los distintos filos en los grupos de estudio (H: humano, R: ratón).

A primera vista, y con abundancias relativas medias, se puede ver que la microbiota de humanos es bastante diferente a la de ratones, a pesar de que la comunidad microbiana de los modelos murinos es exclusivamente de origen humano.

Seguidamente, examinamos la α -diversidad de las comunidades microbianas intestinales. En humanos, estuvieron incrementadas la diversidad filogenética de Faith ($p=0,006$) y el índice de Chao-1 (estima la riqueza) ($p=0,008$). El número de individuos por muestra ($p=0,707$) no fue significativo, porque, curiosamente, apenas varió entre los dos grupos. Estos datos podrían indicar que a pesar de que el trasplante traslade una comunidad microbiana completa, puede ser diferente y estar empobrecida en especies no compatibles con modelos murinos.

A continuación, se calcularon las distancias UniFrac para determinar la β -diversidad entre las comunidades microbianas de los grupos. Las cuantificaciones de varianzas se calcularon utilizando PERMANOVA con la función *adonis* en el paquete R *vegan* (Oksanen et al., 2019). Como era de esperar, se observó que, de forma significativa, la estructura de la microbiota intestinal de los humanos difería de la comunidad microbiana de los ratones ($p < 0,001$ para distancias UniFrac weighted y unweighted) (Figura 13).

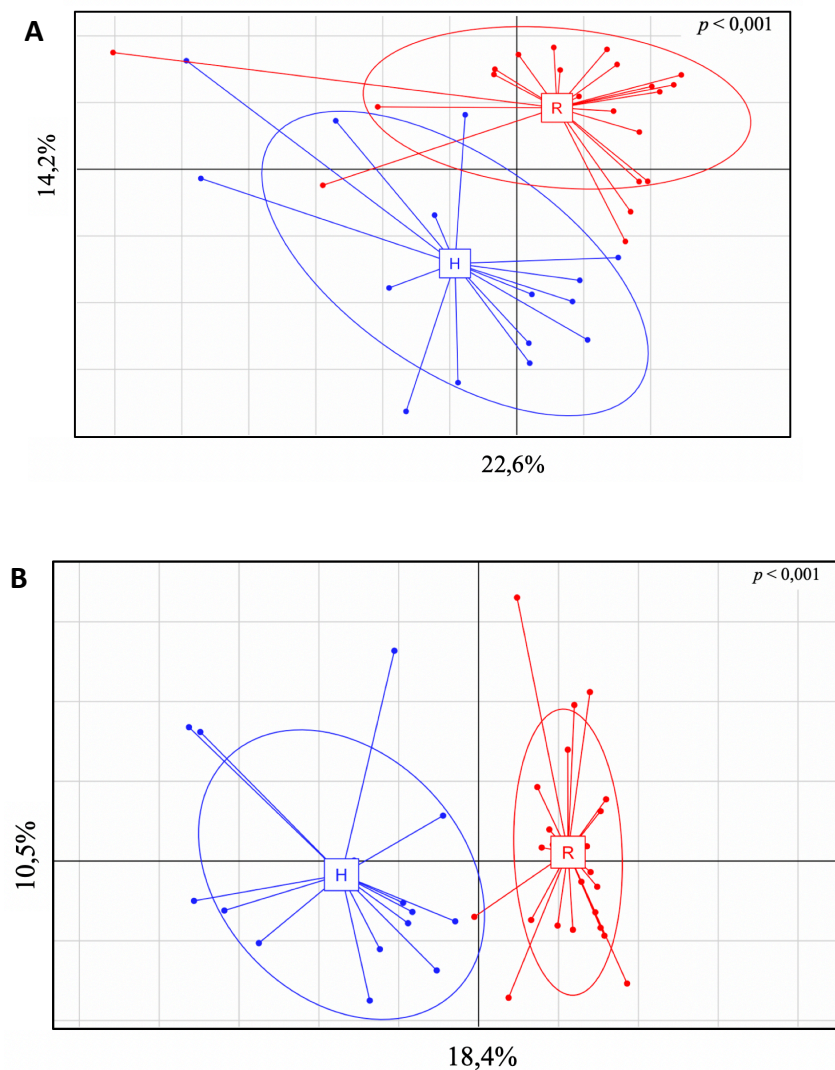


Figura 13. Análisis de coordenadas principales (PCoA) de las comunidades intestinales de microbiota de humanos y ratones GF humanizados.
A. Weighted UniFrac ($p=0,001$), B. Unweighted UniFrac ($p=0,001$)

Para comprobar si el FMT fue exitoso, llevamos a cabo un análisis por pares de donante-receptor. Realizamos un cluster jerárquico con distancias Jaccard de las muestras de ratones y de los donantes humanos, y obtuvimos una clasificación en la que preferentemente las muestras de ratones agrupan por el individuo del que habían recibido la microbiota (Figura 14).

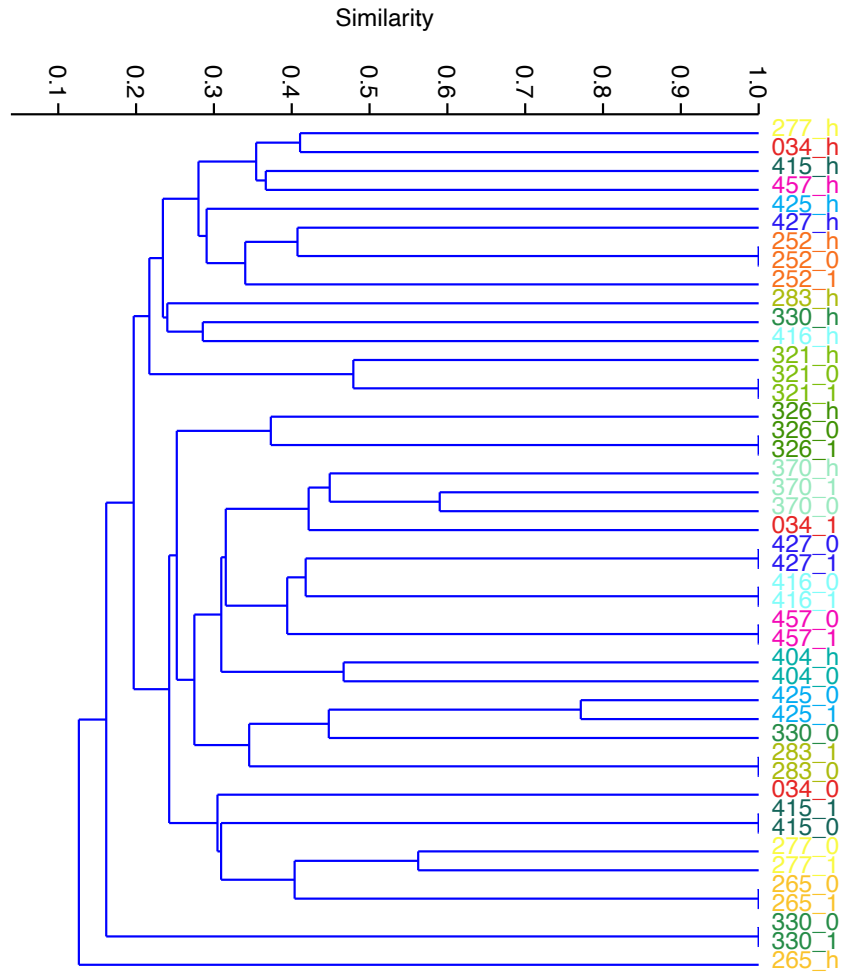


Figura 14. Cluster jerárquico de la composición de la comunidad microbiana intestinal humana y de ratón.

La agrupación se realizó mediante el índice de Jaccard. Las muestras se colorean en función de la pareja donante-receptor.

Por tanto, podemos decir que el FMT funcionó y que los resultados observados en ratones, tienen una influencia total o parcial de la microbiota humana.

1.3. La obesidad mediada por la microbiota se traslada a modelos murinos

de la microbiota intestinal de niños a ratones, así como la asociación entre la microbiota intestinal de los niños con el perfil de obesidad de sus madres, a través de las actividades glicosidasas, se comprobó si la microbiota de los niños era capaz de ejercer el mismo efecto en ratones GF humanizados.

En primer lugar, se midió el peso de los ratones en condiciones axénicas, antes de la inoculación de la microbiota, y a las dos semanas del FMT, cuando se considera que la microbiota se ha establecido correctamente (Turnbaugh et al., 2006; Yano et al., 2015). Los ratones habían consumido una dieta normal, igual para todos los grupos, y agua, ambas esterilizadas. La ganancia de peso que experimentaron los ratones fue significativamente mayor ($p=0,033$) para aquellos que habían recibido microbiota de niños de madres obesas frente a los que recibieron la microbiota de niños de madres con sobrepeso y normopeso. Los resultados se muestran en la siguiente gráfica (Figura 15).

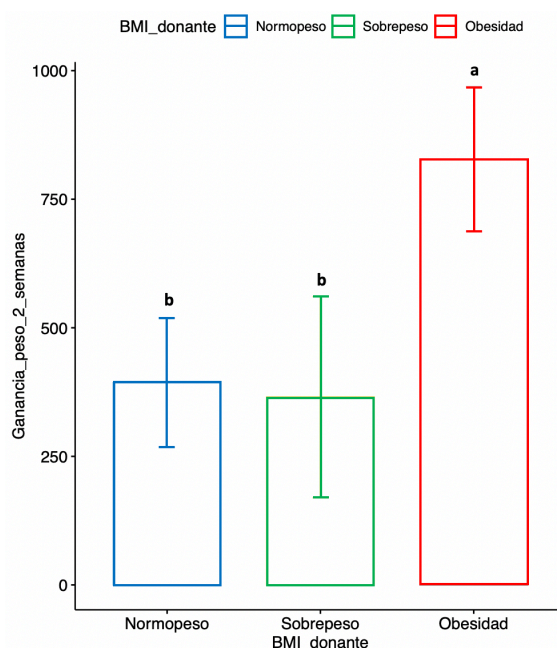


Figura 15. Ganancia de peso (mg) a las dos semanas del FMT en ratones gnotobióticos divididos en los grupos de BMI de la madre del donante.

Análisis de ANOVA ($p=0,033$) con prueba post-hoc de Bonferroni. Valores medios con barras de error típico. Medias con una letra común no son significativamente diferentes.

Seguidamente se midió la glucosa en sangre de los ratones para establecer si existía relación del peso con el perfil glucémico mediante el Oral Gavage Glucose Tolerance Test (OGTT). Se midió la glucosa en ayunas y tras la ingesta de una solución de glucosa al 20% (p/v), como viene descrito en el apartado de Material y Métodos. Se comprobó que las medidas de glucosa en sangre, establecidas como área bajo la curva (AUC, mg h/dL), tuvieron una correlación positiva con el peso del ratón, por lo que los ratones mostraron signos de síndrome metabólico asociado con la microbiota.

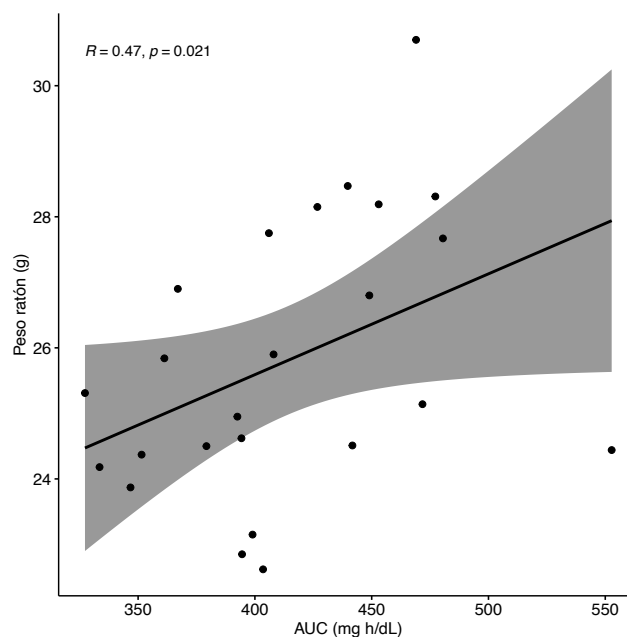


Figura 16. La glucosa en sangre determinada como AUC (mg h/dL) se correlaciona positivamente con el peso del ratón.

Se muestran el coeficiente de correlación de (R) y el valor de significancia para la prueba de correlación de Spearman ($p=0,021$).

A continuación, se analizó si la composición de la microbiota de los ratones era diferente en función del peso de la madre del donante. Se comparó la α -diversidad en función del BMI y se obtuvieron diferencias significativas en los índices de Chao-1 ($p=0,031$), Menhinick ($p=0,009$), Margalef ($p=0,026$) y Fisher-Alpha ($p=0,026$), todos disminuidos en el grupo de obesidad.

A la hora de estudiar la β -diversidad entre las comunidades, se realizó un análisis de distancias UniFrac incluyendo los confounders que fueron significativos en humanos (tipo de parto y tipo lactancia hasta 3 meses). La microbiota de los ratones se agrupó en función del BMI de las madres de los niños usando métricas de distancias UniFrac unweighted ($p=0,001$) pero no en las weighted ($p=0,792$), indicando que los grupos se distribuyen debido a una prioridad a las bacterias minoritarias.

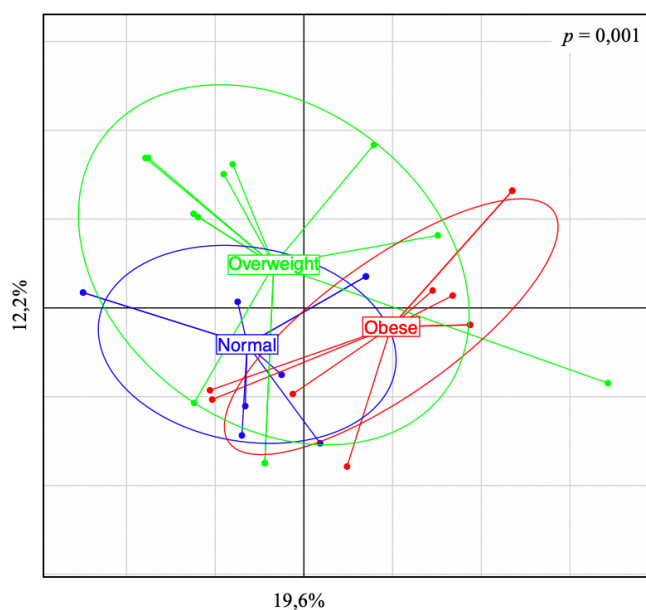


Figura 17. Análisis de coordenadas principales (PCoA) de las comunidades intestinales de microbiota de ratones GF humanizados.

Unweighted UniFrac ($p=0,001$)

Para analizar la abundancia de las especies, realizamos un modelo lineal general multivariante utilizando como factor fijo el BMI, e incluyendo como covariables el tipo de parto, la lactancia materna hasta los 3 meses y tanda de experimentación de los ratones. Ningún filo mostró diferencias significativas de abundancia entre los grupos de BMI. Sin embargo, a nivel de familia observamos un incremento de Lachnospiraceae ($p=0,029$) y un descenso en Ruminococcaceae ($p=0,005$) en el grupo de ratones que habían recibido la microbiota de niños de madres obesas. A nivel de género, *Anaerostipes* ($p=0,05$),

Erysipelatoclostridium (p=0,004), *Klebsiella* (p=0,022), *Ruthenibacterium* (p=0,05) y *Unclass_Lachnospiraceae* (p=0,046) estuvieron aumentados en el grupo obeso; mientras que *Enterocloster* (p=0,015), *Faecalibacterium* (p=0,004), *Intestinimonas* (p=0,048), *Morganella* (p=0,048), *Paeniclostridium* (p=0,045) y *Unclass_Ruminococcaceae* (p=0,001) estuvieron incrementados en el grupo normopeso. Es de destacar que las especies *Anaerostipes* y *Ruthenibacterium* también fueron significativas en los humanos, y mantuvieron esas diferencias entre grupos una vez realizado el FMT.

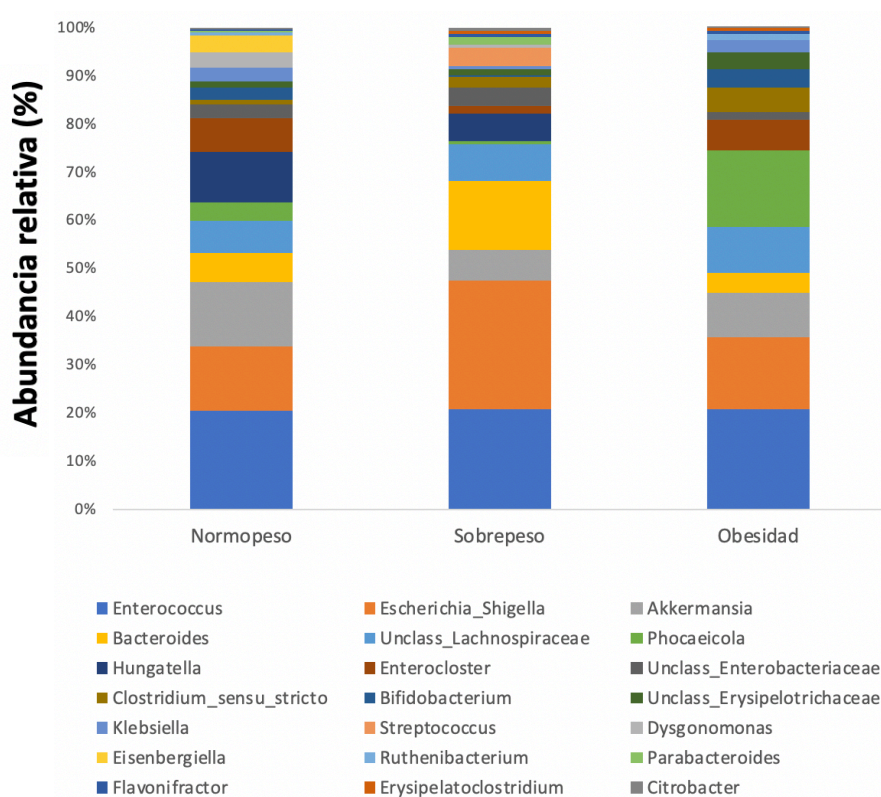


Figura 18. Abundancia relativa en porcentaje de los taxa presentes de la microbiota intestinal de los ratones que recibieron la microbiota de los niños de 6 meses en función del BMI de su madre.

Por último, quisimos conocer si la actividad glicosidasa de la microbiota los ratones tenía asociación con el BMI, igual que observamos en los niños (Figura 19). Inicialmente, estudiamos la actividad β -galactosidasa por ser la actividad que nuestro grupo había descrito como posible moduladora de la obesidad, y de la β -glucosidasa, debido a que en nuestro estudio en humanos había salido significativamente diferente entre los grupos.

Sin embargo, nuestros análisis mostraron un resultado inesperado, ya que la actividad glicosidasa de muestras de microbiota de ratones no mantenía la asociación con el BMI de la madre de los donantes.

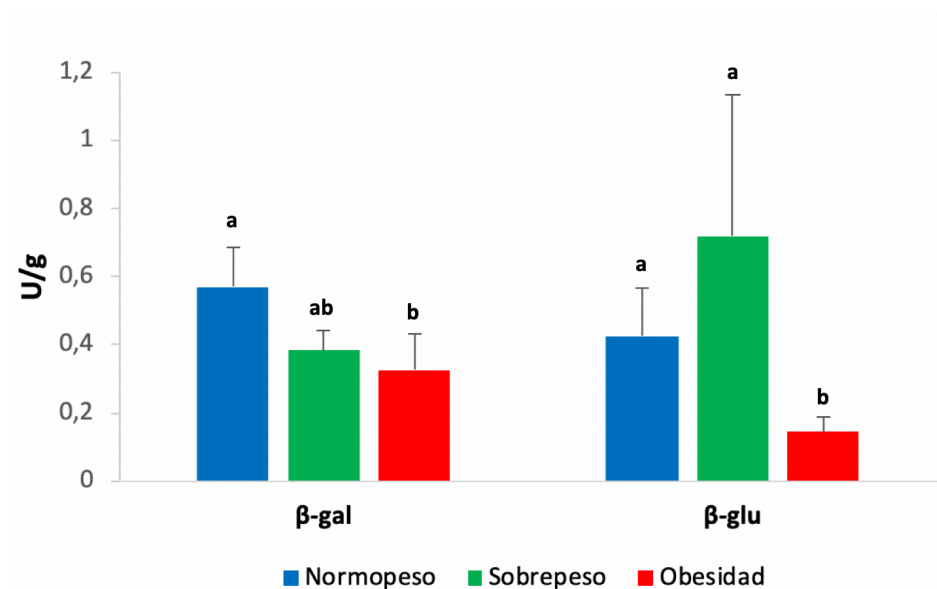


Figura 19. Distribución de las actividades glicosidasa (U/g) de la microbiota intestinal de ratones trasplantados con microbiota de niños de 6 meses en función de los grupos de BMI de sus madres. Análisis de ANOVA con prueba post-hoc de Bonferroni. Valores medios con barras de error típico. Medias con una letra común no son significativamente diferentes.

Nuestro estudio consiguió trasladar el fenotipo de las madres de los niños a los ratones a través de la microbiota infantil, dando lugar, además, a comunidades microbianas diferentes en función del BMI materno. Sin embargo, a la hora de medir la actividad glicosidasa, no obtuvimos una asociación del rendimiento enzimático con el BMI. Estos resultados podrían indicar que hay factores adicionales a la microbiota que contribuyen al metabolismo microbiano. Entre ellos, la dieta podría ser clave para modular la actividad glicosidasa.

2. Microbiota y neurodesarrollo

2.1. Asociación de la microbiota intestinal infantil con la motricidad fina.

El siguiente avance del presente estudio fue el análisis de la relación de la microbiota y el neurodesarrollo. Estudios anteriores de nuestro grupo hallaron que la microbiota de los niños asociaba con el rendimiento cognitivo (Cerdó, 2018). En esta ocasión, nuestra hipótesis fue que las comunidades microbianas subyacentes variarían entre los niños según las características de su desarrollo neurológico.

Este estudio incluyó 71 parejas de madres y niños (45 niños y 26 niñas) (Tabla 11). Los test con las escalas Bayley®-III de desarrollo infantil se registraron en estos niños sanos nacidos a término a la edad de 18 meses. Los niños incluidos en este estudio alcanzaron el umbral para el neurodesarrollo típico y se dicotomizaron en dos grupos, por encima y por debajo de la mediana (percentil 50), según sus puntuaciones en tres dominios de las escalas individuales de Bayley®-III: cognición compuesta, lenguaje (lenguaje receptivo, lenguaje expresivo lenguaje y lenguaje compuesto) y motricidad (motricidad gruesa y motricidad fina). Las medianas [rango] de las puntuaciones de Bayley®-III fueron las siguientes: cognición compuesta (125[90–140]), lenguaje receptivo (12[8–15]), lenguaje expresivo (11[6–15]), lenguaje compuesto (106[83–124]), motricidad gruesa (12[7–12]) y motricidad fina (13[8–19]).

Tabla 11. Características de la población en función de la dicotomización entre las puntuaciones de motricidad fina de la escala de Bayley®-III.

Característica	Por debajo de la mediana	Por encima de la mediana	p
Características de las madres			
Edad (años)	32,87 (5,37)	33,57 (2,97)	0,485
BMI pre-embarazo			0,034*
Normopeso	12 (38,71%)	9 (22,5%)	
Sobrepeso	9 (29,03%)	24 (60,0%)	
Obesidad	10 (32,26%)	7 (17,5%)	
Peso pre-embarazo (kg)	72,12 (14,3)	72,38 (15,17)	0,966
Ganancia de peso (kg)	8,71 (4,23)	8,35 (7,62)	0,832
Diabetes			0,515
Sí	17 (54,84%)	25 (62,5%)	
No	14 (45,16%)	15 (37,5%)	
Educación			0,154
Primaria/Secundaria	20 (64,52%)	18 (45,0%)	
Universidad	11 (35,48%)	20 (50,0%)	
Tabaco durante el embarazo			0,744
Sí	28 (90,32%)	37 (92,5%)	
No	3 (9,68%)	3 (7,5%)	
Alcohol durante el embarazo			0,855
Sí	30 (96,77%)	39 (97,5%)	
No	1 (3,23%)	1 (2,5%)	
Tipo de parto			0,644
Eutócico	20 (64,52%)	22 (55,0%)	
Distócico	4 (12,90%)	5 (12,5%)	
Cesárea	7 (22,58%)	13 (32,5%)	
Características de los niños			
Sexo			0,243
Masculino	22 (70,97%)	23 (57,5%)	
Femenino	9 (29,03%)	17 (42,5%)	
Peso al nacer (g)	3253,87 (467,99)	3287,25 (578,51)	0,794
Longitud al nacer (cm)	50,68 (1,96)	49,83 (2,02)	0,098
Perímetro cefálico (cm)	34,75 (1,29)	34,66 (1,47)	0,803
Placenta (g)	498,52 (108,69)	532,06 (127,56)	0,281
Alimentación†			0,032*
Lactancia materna	14 (45,16%)	29 (72,5%)	
Mixta	4 (12,90%)	5 (12,5%)	
Fórmula artificial	13 (41,94%)	6 (15,0%)	

Los valores enumerados son totales para la variable (porcentaje del valor total n) o medias (SD). Diferencias entre los grupos de Motricidad Fina Bayley®-III según test T-Student. Se aplicó la prueba de chi-cuadrado a las variables cualitativas. *Los valores de $p \leq 0,05$ están resaltados en negrita. † La información sobre las prácticas de alimentación de los niños se recolectó a los 3 meses de edad.

Se analizaron muestras fecales de niños sanos de 18 meses mediante la secuenciación de la región hipervariable V1-V2 del gen 16S rRNA. Después del filtrado de calidad, 3.354.210 secuencias de lectura (lecturas promedio por muestra = 47.242; SD = 29.220) generaron un perfil microbiano intestinal con 679 OTUs bacterianas a nivel de especie, agrupadas en 87 géneros distintos pertenecientes a 38 familias después de una anotación filogenética con alto nivel de confianza. La clasificación taxonómica de las OTUs se realizó usando la base de datos *RDP Classifier* (Q. Wang et al., 2007), lo que resultó en una comunidad dominada por taxones pertenecientes a *Firmicutes* (516), seguidos de *Bacteroidetes* (104), *Proteobacteria* (32), *Actinobacteria* (23) y *Fusobacteria* (4). El análisis de las especies dominantes de todos los niños reveló veintiún OTUs muy abundantes (> 1% de todas las secuencias de lectura), pero solo se detectaron seis de ellas en todas las muestras. Estas OTUs predominantes y muy abundantes pertenecían a los géneros *Lachnospiracea_incertae_sedis*, *Streptococcus*, *Fusicatenibacter*, *Anaerostipes* y *Faecalibacterium*. A nivel de género, diecinueve fueron muy abundantes (>1 % de todas las secuencias leídas) y representaron el 89,6% del total de lecturas, con predominio de *Bacteroides*, *Lachnospiracea_incertae_sedis*, *unclass_Lachnospiraceae*, *Fusicatenibacter* y *Streptococcus* (cada uno de los cuales proporciona más del 5% de todas las secuencias de lectura) (Figura 20).

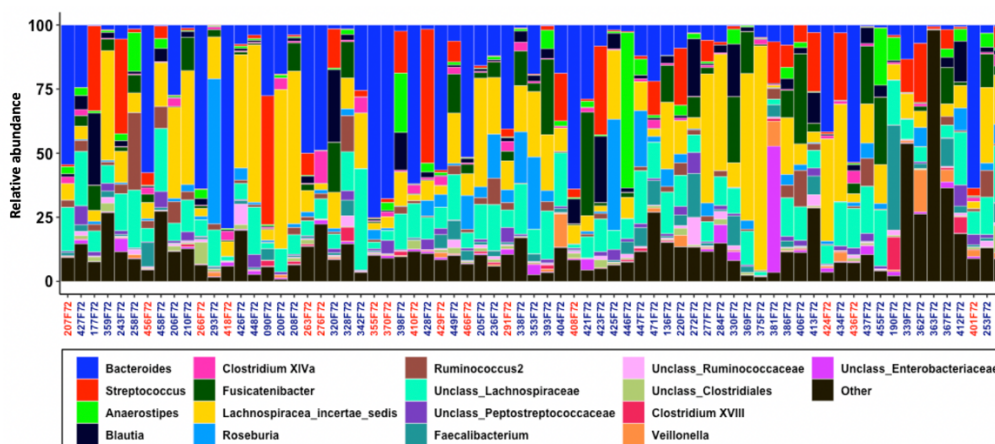


Figura 20. Composición y estructura microbiana intestinal en 71 niños sanos nacidos a término a los 18 meses de edad.

Filogenia de la microbiota intestinal de los niños de los 17 géneros principales detectados en \geq 98 % de los sujetos del estudio. Los nombres de las muestras están coloreados según el enterotipo: *Firm* en azul, *Bact* en rojo.

Inicialmente, examinamos si las medidas de la estructura y diversidad de la comunidad microbiana intestinal diferían entre los niños clasificados como por encima y por debajo de la mediana en las seis escalas individuales de Bayley®-III. La α -diversidad microbiana (diversidad intramuestra), evaluada por la riqueza (número de taxones), diversidad filogenética de Faith (medida de diversidad filogenética) y el índice de diversidad de Shannon (una medida no filogenética de abundancia y uniformidad bacterianas), no fueron significativamente diferentes entre los grupos por encima y por debajo de la mediana para cada escala Bayley®-III (Tabla 12).

Tabla 12. Asociación entre los índices de α -diversidad y cada escala Bayley®-III. Análisis de T-Student

		Richness		Faith's PD		SDI	
		Por debajo de la mediana	Por encima de la mediana	Por debajo de la mediana	Por encima de la mediana	Por debajo de la mediana	Por encima de la mediana
Lenguaje compuesto	Media	247,07	259	14,22	14,43	2,87	3,04
	(SD)	(62,39)	(54,35)	(2,42)	(2,18)	(0,74)	(0,52)
	<i>p-valor</i>	0,394		0,705		0,245	
Lenguaje expresivo	Media	244,67	262,03	14,28	14,4	2,88	3,05
	(SD)	(51,67)	(62,11)	(2,07)	(2,46)	(0,68)	(0,56)
	<i>p-valor</i>	0,209		0,814		0,242	
Lenguaje receptivo	Media	256,14	252,45	14,71	14,1	2,93	3
	(SD)	(61,27)	(55,9)	(2,41)	(2,16)	(0,51)	(0,7)
	<i>p-valor</i>	0,794		0,268		0,681	
Motricidad fina	Media	253,32	254,45	14,42	14,28	2,95	2,98
	(SD)	(56,74)	(59,25)	(2,31)	(2,27)	(0,48)	(0,72)
	<i>p-valor</i>	0,936		0,802		0,828	
Motricidad gruesa	Media	254,77	253,33	14,25	14,42	2,97	2,97
	(SD)	(60,26)	(56,51)	(2,61)	(2)	(0,66)	(0,6)
	<i>p-valor</i>	0,917		0,758		0,965	
Cognición compuesta	Media	253,5	254,26	14,39	14,32	2,97	2,97
	(SD)	(75,17)	(43,89)	(2,84)	(1,84)	(0,74)	(0,54)
	<i>p-valor</i>	0,957		0,898		0,978	

Richness: Número de OTU's (Riqueza); Faith's PD: Diversidad filogenética de Faith; SDI: Índice de diversidad de Shannon

Además, se realizaron análisis de coordenadas principales basados en métricas de distancia UniFrac para comparar la β -diversidad (diversidad entre muestras) entre grupos por encima y por debajo de la mediana para cada escala Bayley®-III. UniFrac mide la distancia entre comunidades microbianas basándose en su abundancia (weighted) y ocurrencia (unweighted) teniendo en cuenta su relación filogenética. Al analizar todas las OTUs, la única puntuación de Bayley®-III con fuerte asociación con la estructura y composición de la comunidad microbiana intestinal de niños a los 18 meses fue la motricidad fina, que explica el 4 % de la variación de la microbiota (Tabla 13 y Figura 21). Los niños con perfiles por debajo de la mediana se agruparon alejados de los niños

por encima de la mediana, usando métricas de distancias UniFrac weighted ($p=0,021$) pero no en las unweighted ($p=0,552$).

Tabla 13. Asociaciones entre la composición de la microbiota intestinal (secuencias del gen 16S rRNA) y las escalas Bayley®-III.

Análisis de las distancias UniFrac (weighted) *Valores de $p \leq 0,05$ resaltados en negra

	F model	R ²	p valor
Lenguaje compuesto	0,546	0,008	0,816
Lenguaje expresivo	0,487	0,007	0,846
Lenguaje receptivo	0,758	0,011	0,517
Motricidad fina	2,877	0,04	0,021*
Motricidad gruesa	0,632	0,009	0,699
Cognición compuesta	0,892	0,013	0,469

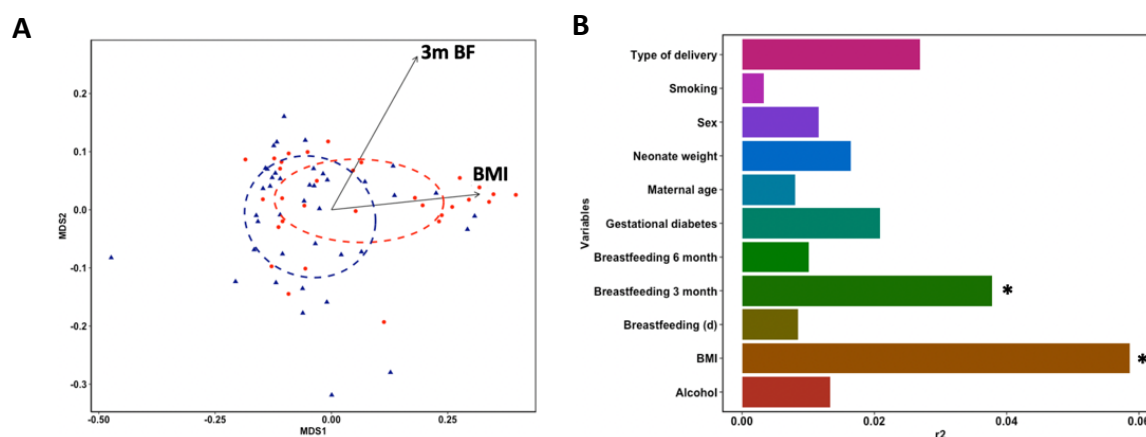


Figura 21. Composición y estructura microbiana intestinal en 71 niños sanos nacidos a término a los 18 meses de edad.

(A) Diagrama de dispersión del análisis de coordenadas principales utilizando métricas UniFrac weighted en grupos de motricidad fina por encima de la mediana (azul) y por debajo de la mediana (rojo). Las variables explicativas significativas adicionales están representadas por flechas negras en el mismo origen del sistema de coordenadas. (B) Las barras horizontales muestran la influencia de las variables antropométricas, maternas y nutricionales (r^2) en la composición de la microbiota intestinal. * $p < 0,05$ para la prueba PERMANOVA con 999 permutaciones.

También estudiamos si la β -diversidad de la microbiota intestinal estaba asociada con variables antropométricas, maternas y nutricionales (Tabla 14).

Tabla 14. Asociaciones entre la composición de la microbiota intestinal (secuencias del gen 16S rRNA) y otras variables de interés. Análisis de las distancias UniFrac (weighted)

*Valores de $p \leq 0,05$ resaltados en negrita

	F model	R²	p valor
Edad materna	0,609	0,008	0,720
BMI pre-embarazo	4,434	0,059	0,005*
Peso pre-embarazo	0,550	0,007	0,770
Diabetes materna	1,581	0,021	0,126
Tabaco durante el embarazo	0,248	0,003	0,989
Alcohol durante el embarazo	1,012	0,013	0,393
Tipo de parto	1,019	0,027	0,405
Sexo del bebé	0,880	0,012	0,446
Peso al nacimiento	1,247	0,016	0,242
Lactancia materna hasta los 3 meses	2,862	0,038	0,023*
Lactancia materna hasta los 6 meses	0,766	0,010	0,569

La prueba PERMANOVA basada en la distancia mostró un efecto explicativo significativo del BMI materno pregestacional (categorizado como normopeso, sobrepeso u obesidad) y el tipo de alimentación hasta el tercer mes (fórmula, lactancia materna exclusiva o mixta) en la β -diversidad utilizando la matriz de distancia UniFrac (weighted) (Figura 21A,B). Curiosamente, la alimentación con leche materna hasta el tercer mes (días) no mostró ningún efecto sobre las diferencias de la comunidad microbiana, lo que sugiere que cualquier consumo de leche materna afectó a los ensamblajes microbianos intestinales en nuestra cohorte en lugar de la frecuencia de alimentación con leche materna (He et al., 2019). Juntos, la motricidad final, el BMI materno pregestacional y la lactancia materna hasta el tercer mes explicaron el 13,7 % de la variación en nuestro conjunto de datos. No se encontraron asociaciones significativas con la edad materna, el tabaquismo durante el embarazo (Sí/No), el consumo de alcohol durante el embarazo (Sí/No), el peso del recién nacido, el sexo, el tipo de parto (cesárea, vaginal) o la diabetes

gestacional (Sí/No). Estas asociaciones significativas se consideraron en análisis estadísticos posteriores para evitar el efecto de las variables confusoras.

Para investigar la potencial asociación de las puntuaciones de motricidad fina con la prevalencia de perfiles de comunidades microbianas intestinales, identificamos tipos de comunidades en muestras de niños mediante el uso de modelos Dirichlet Multinomial Mixture (DMM), que fueron agrupadas en función de la contribución de los taxones a nivel de género. El ajuste del modelo generó un número óptimo de 2 tipos de comunidad DMM, denominadas enterotipos (Figura 22A). Los dos enterotipos microbianos intestinales tenían peso $P = 0,78$ y $0,22$ y variabilidad $\Theta = 15,45$ y $51,36$. Por lo tanto, el enterotipo muy abundante (78 % de las muestras) comprendía muestras con perfiles comunitarios más variables, mientras que el enterotipo menos prevalente (22 % de las muestras) comprendía muestras con ensamblajes comunitarios más similares (Figura 22B). Observamos que los enterotipos se clasificaron en treinta géneros que representaron el 85,4 % del total de lecturas en nuestro conjunto de datos, con lecturas totales medias que oscilaron entre el 0,07 % (*Flavonifractor*) y el 21,3 % (*Bacteroides*) (Figura 22C). Los géneros muy abundantes (>1 % del total de lecturas) como *unclass_Clostridiales*, *unclass_Ruminococcaceae*, *Ruminococcus*, *unclass_Peptostreptococcaceae*, *unclass_Enterobacteriaceae*, *Enterococcus*, *Faecalibacterium*, *Ruminococcus2* y *Roseburia* no impulsaron la clasificación de enterotipos. Un conjunto básico de nueve géneros fueron los impulsores más importantes en la predicción del modelo (Figura 22D). El primer enterotipo contenía muestras con composición microbiana mixta cuyos impulsores más importantes fueron un grupo de géneros dentro de *Firmicutes* como *Lachnospiraceae_incertae_sedis*, *unclass_Lachnospiraceae*, *Streptococcus* y *Blautia*, y la contribución específica de *Fusicatenibacter* y *Anaerostipes* (Figura 22D). El segundo enterotipo fue impulsado principalmente por *Bacteroides* con una contribución específica

de *Clostridium XIVa* y *Parabacteroides* a la asignación de enterotipos. Sobre la base de sus respectivos perfiles de dominancia a nivel de género, nos referimos a los enterotipos como tipo dominante *Firmicutes* (Firm) y tipo dominante *Bacteroides* (Bact). Los géneros característicos de cada clasificación de enterotipo representaron el 81,7 % (Bact; SD = 7,2) y el 68,8 % (Firm; SD = 18,5) de las abundancias totales medias en sus muestras correspondientes (Figura 22E). Estos resultados mostraron que los géneros distintivos representaron la mayoría de las lecturas en el enterotipo Bact con *Bacteroides* como el principal contribuyente al ensamblaje general del enterotipo, mientras que los géneros distintivos *Lachnospiracea_incertae_sedis* y *unclass_Lachnospiraceae* fueron los géneros más abundantes en el enterotipo Firm más variable. Finalmente, para probar las asociaciones entre enterotipos y la motricidad fina, realizamos una prueba exacta de Fisher. Cada enterotipo se asoció significativamente con un grupo motricidad fina infantil, donde las muestras por encima de la mediana pertenecían al enterotipo Firm y el grupo por debajo de la mediana pertenecía principalmente al enterotipo Bact ($p=0,04$, odds ratio = 0,27).

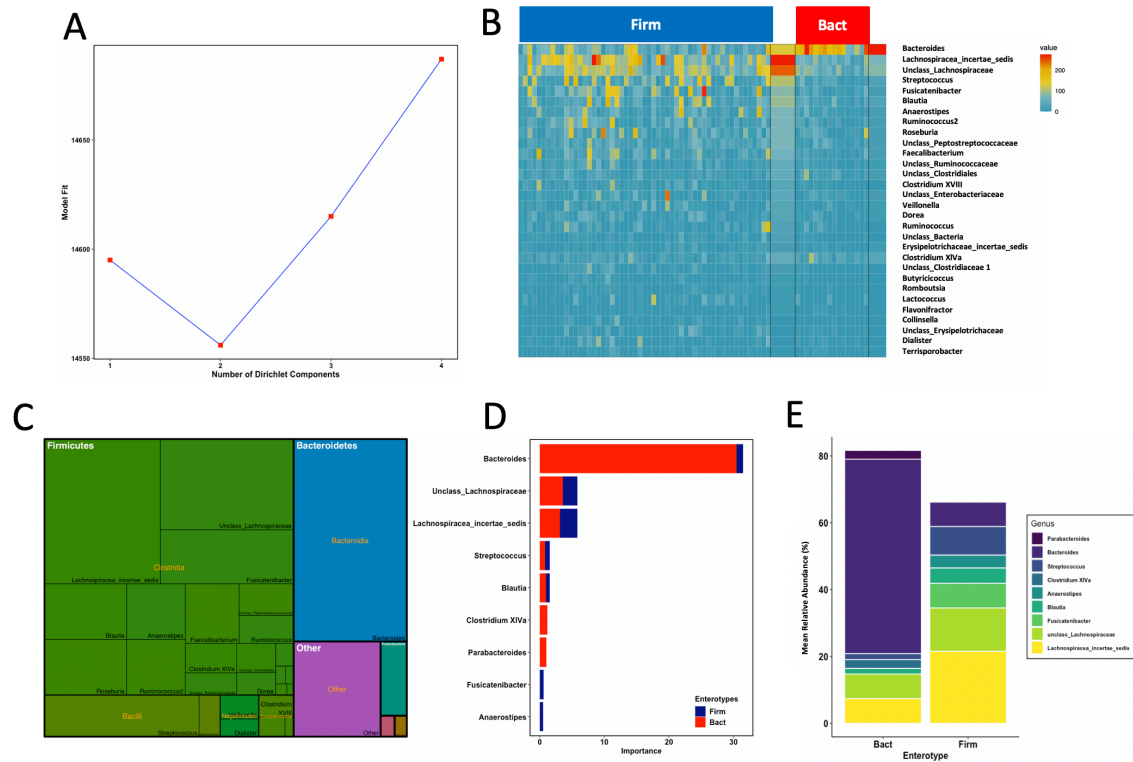


Figura 22. El modelo probabilístico con Dirichlet Multinomial Mixtures de muestras fecales reveló 2 enterotipos en 71 niños sanos nacidos a término a los 18 meses de edad.

(A) El modelo se ajustó a $k=4$ y presentó el valor de ajuste de modelo más bajo de la aproximación de Laplace para cuatro componentes, lo que se tomó como evidencia de la presencia de los dos tipos de comunidades principales. (B) Heatmap que muestra la abundancia relativa de los 30 enterotipos más dominantes generados por DMM. (C) Contribución de los 30 más dominantes generados a la composición general de la comunidad. (D) Contribución a la predicción del modelo del núcleo microbiano generado para cada enterotipo. (E) Contribución de los géneros predominantes (abundancias relativas medias) a los perfiles microbianos en cada enterotipo DMM.

Para investigar más a fondo la asociación de la motricidad fina con la composición de la microbiota, utilizamos el software estadístico DESeq2 y ajustamos el modelo con las covariables para identificar taxones a nivel de género con abundancias diferenciales entre los grupos de motricidad fina por debajo y por encima de la mediana. Identificamos 11 géneros sobreabundantes en el grupo por encima de la mediana y 2 géneros en el grupo por debajo de la mediana (Figura 23). Estos géneros sobreabundantes eran filogenéticamente diferentes. Los géneros discriminatorios pertenecían a *Actinobacteria*,

Firmicutes y *Fusobacteria* en niños con motricidad fina por encima de la mediana, y a *Bacteroidetes* y *Firmicutes* en aquellos con motricidad fina por debajo de la mediana. La microbiota intestinal de los niños con motricidad fina por encima de la mediana mostró una alta prevalencia de *Bifidobacterium*, *Collinsella*, *Coprococcus*, *Enterococcus*, *Fusobacterium*, *Holdemanella*, *Lactobacillus*, *Propionibacterium*, *Roseburia*, *Veillonella* y un género no asignado dentro de *Veillonellaceae*. Por el contrario, la microbiota intestinal de los niños con motricidad fina por debajo de la mediana estaba enriquecida en *Parabacteroides* y *Turicibacter*. Al estar los probióticos *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* enriquecidos en niños con motricidad fina por encima de la mediana, realizamos un análisis más detallado sobre la asociación de especies microbianas pertenecientes a los géneros *Bifidobacterium* (7 OTUs) y *Lactobacillus* (11 OTUs) con la motricidad fina. El análisis reveló que solo *Bifidobacterium* OTU-242 tendía a enriquecerse en niños con motricidad fina por encima de la mediana (Log_2FC 2,51; $\text{FDR} < 0,05$). Las comparaciones de secuencias de nucleótidos de BLASTN y EzTaxon mostraron que OTU-242 tenía una identidad de secuencia del 100 % con el 16S rRNA de *B. bifidum* ATCC 29521.

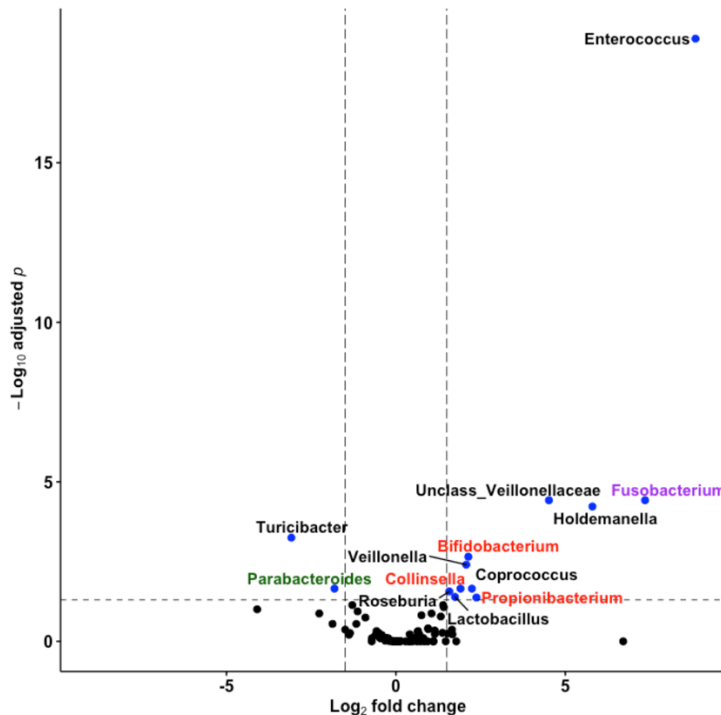


Figura 23. Abundancia diferencial de microbiota intestinal entre niños con grupos de motricidad fina por encima y por debajo de la mediana.

Volcano plot que muestra los \log_2 fold changes reducidos en la abundancia media de géneros frente a $-\log_{10}$ de FDR. Los colores azules representan significancia y los nombres de las etiquetas denotan la taxonomía de los géneros a nivel de filo. Las líneas discontinuas indican umbrales de significancia ($FDR < 0,05$).

Observamos una asociación significativa entre la microbiota intestinal y las habilidades de motricidad fina en niños sanos nacidos a término de 18 meses de edad, robusta al ajuste por variables perinatales, nutricionales, maternas y del bebé. Nuestro estudio se suma a la creciente evidencia que conecta la microbiota intestinal con el eje intestino-cerebro, donde las etapas iniciales de la colonización y el ensamblaje intestinal pueden vincularse con los resultados del desarrollo neurológico con posibles asociaciones a largo plazo. Estos resultados sugieren apuntar a especies asociadas negativamente como *Turicibacter* y *Parabacteroides* en modelos de ratones apropiados, e invitan a realizar más estudios de intervención utilizando cepas de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* para influir en los resultados de motricidad en niños.

2.2. La microbiota intestinal está asociada con el desarrollo cognitivo infantil

Estudios anteriores de nuestro grupo hallaron que la microbiota de los niños de 6 meses asocia con el rendimiento cognitivo. (Cerdó, 2018).

Por otro lado, cuando se estudió la proteómica de la microbiota, se encontraron diferencias significativas en la abundancia de varias enzimas entre los grupos de COGCOM. Un hallazgo interesante fue que la histidina amonio-liasas (HAL), una enzima que cataliza la desaminación no oxidativa de la L-histidina (His), dando lugar a urocanato (Uro) fue significativamente más abundante en la microbiota intestinal de los niños con un valor de COGCOM por encima de la mediana ($p < 0,05$).

Partiendo de estas premisas, el presente estudio abordó de forma exhaustiva el papel del metabolismo de la His, que consta principalmente de dos vías enzimáticas de catabolismo, una, mediada a través de la HAL, y otra a través de la histidina descarboxilasa (HDC) que da lugar a la histamina y a sus productos de degradación (Figura 24).

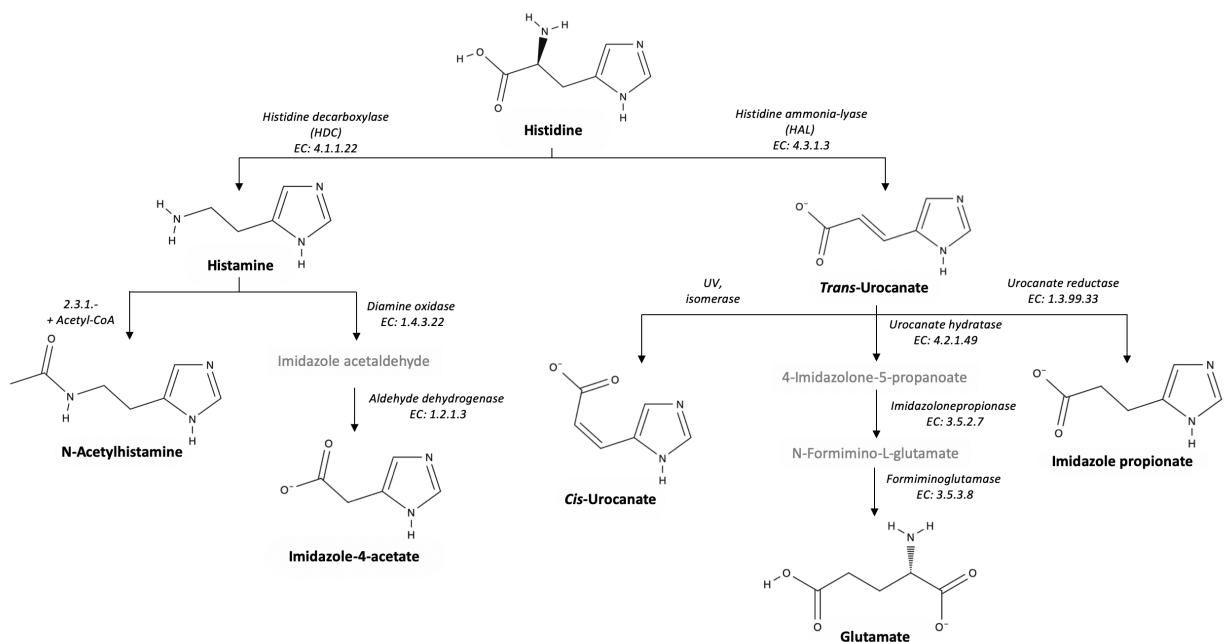


Figura 24. Rutas enzimáticas del metabolismo de la histidina (Acuña et al., 2021)

Se comprobó *in vitro* si esta asociación se replicaba, midiendo la actividad enzimática HAL en las mismas muestras (Figura 25). Se obtuvo una correlación positiva del incremento de la actividad HAL con el valor de COGCOM ($p=0,029$)

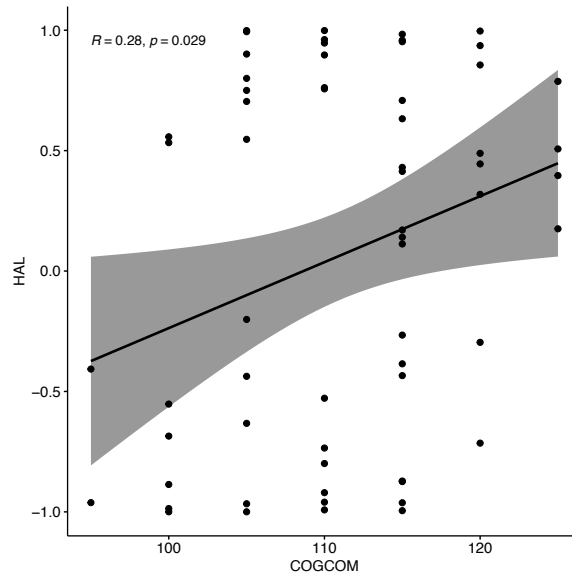


Figura 25. El incremento de la actividad HAL (U/g) se correlaciona positivamente con el valor de la escala de Cognición Compuesta (COGCOM) de la escala de Bayley®-III. Se muestran el coeficiente de correlación (R) y el valor de significancia para la prueba de correlación de Pearson ($p=0,029$).

Debido a que la HAL microbiana estaba aumentada en los niños con una cognición por encima de la mediana, se procedió a comprobar la relación entre las concentraciones de los metabolitos de la ruta de la HAL en heces y en el metabolismo intracelular microbiano. Para ello se midieron los metabolitos histidina (His), urocanato (Uro) e imidazol-propionato (ImP) de la ruta de la HAL, e histamina (Him) de la ruta de la HDC, y se utilizó UHPLC-MS/MS, como se ha descrito en el apartado de Material y métodos. El análisis de Spearman reveló que existía una correlación significativa y positiva (Figura 26) entre las concentraciones intracelulares y fecales de los metabolitos de la ruta de la HAL, confirmando el papel de la microbiota en este metabolismo.

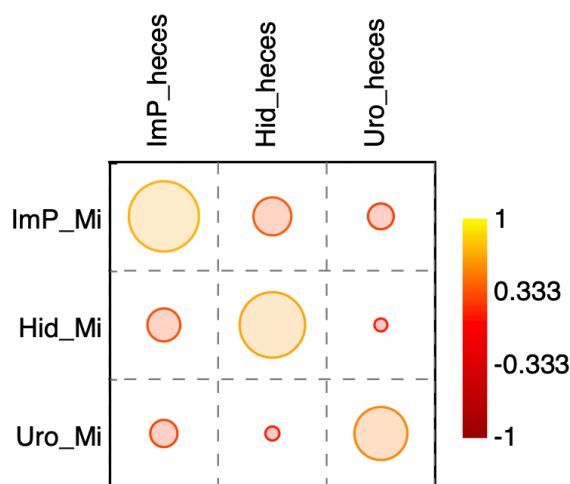


Figura 26. Los metabolitos fecales e intracelulares microbianos están en correlacionados de manera positiva.

Los círculos mostrados corresponden con las correlaciones de Spearman significativas ($p < 0,05$).

La medida de las concentraciones de los compuestos da una idea estática del metabolismo. Por eso, también es interesante calcular los ratios entre los productos generados, que dan una visión más cercana a la realidad de un metabolismo que por definición es dinámico. La microbiota genera metabolitos que pasan al intestino del huésped, y finalmente, deben excretarse en la orina. Debido a esta secuencia en el metabolismo, realizamos una correlación de los metabolitos y sus ratios en heces y en orina, y obtuvimos correlaciones positivas en el compuesto ImP ($p=0,0011$), y en los ratios ImP/His ($p=0,0068$). El ImP es un compuesto final en la degradación de la His a través de la ruta de la HAL, y es de origen microbiano, por lo que nuestros resultados coinciden con nuestra hipótesis.

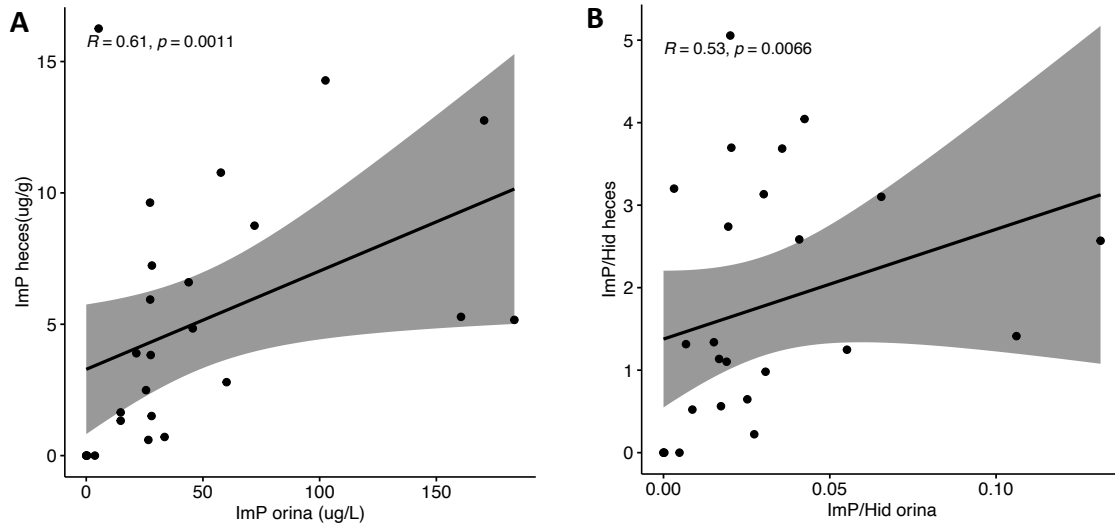


Figura 27. La concentración en orina del compuesto ImP (A) y del ratio ImP/His (B) correlacionan positivamente con su concentración en heces.

Se muestran el coeficiente de correlación (R) y el valor de significancia para la prueba de correlación de Spearman (ImP: $p=0,0011$; ImP/His: $p=0,0068$).

Seguidamente, se realizó el análisis estadístico entre grupos mediante una prueba t de Student de las concentraciones de los metabolitos en muestras fecales y de metaboloma intracelular microbiano, y obtuvimos una mayor abundancia de ImP en heces ($p=0,012$) y en metaboloma intracelular de microbiota ($p=0,016$) de niños por encima de la mediana. Además, en este grupo también encontramos aumentados los ratios ImP/His en heces ($p=0,019$) y en metaboloma intracelular ($p=0,018$) (Figura 28).

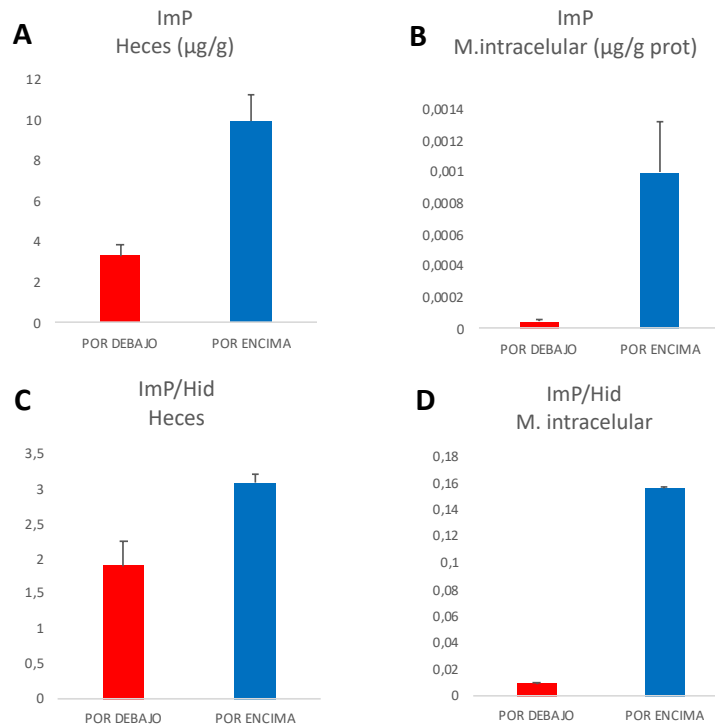


Figura 28. Medida de los metabolitos (A-B) y ratios (C-D) en heces y metaboloma intracelular de niños de 6 meses por grupos de COGCOM

(Rojo, por debajo de la mediana; Azul por encima de la mediana). Medidas incrementadas significativamente ($p < 0,05$) en el grupo con COGCOM por encima de la mediana. Análisis de t de Student. Valores medios con barras de error típico.

Por otro lado, en el grupo de niños con un COGCOM por debajo de la mediana, la medida del ratio Him/ImP ($p = 0,037$) en heces estuvo significativamente aumentada (Figura 29).

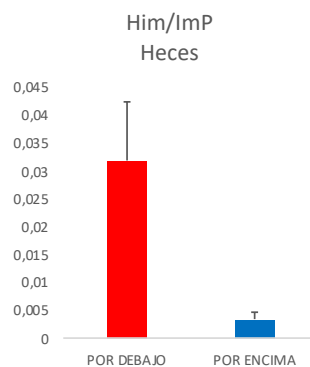


Figura 29. Medida del ratio Him/ImP en heces de niños de 6 meses por grupos de COGCOM. Análisis de t de Student ($p < 0,05$). Valores medios con barras de error típico.

Una vez se comprobó que los metabolitos de la histidina en heces y metaboloma intracelular presentaban abundancias diferenciales entre los grupos de COGCOM, viendo el papel de la microbiota en este metabolismo, se midieron las concentraciones de los compuestos y ratios de los metabolitos de la histidina en orina como matriz biológica de excreción fisiológica. Se comprobó que, efectivamente, la His en orina de niños con COGCOM por encima de la mediana estaba disminuida de forma significativa ($p=0,012$), lo que podría indicar que en esos niños, tiene un mayor catabolismo, principalmente debido a la HAL. Además, en este grupo hubo una abundancia significativa de Uro en orina ($p=0,032$), y que el ratio His/Uro en orina, estaba disminuido en los niños con COGCOM por encima de la mediana con diferencias muy cercanas a la significancia ($p=0,08$). Esto confirmó nuestros hallazgos por proteómica e *in vitro* de la medida de la HAL, pues a mayor rendimiento enzimático, menor cantidad de sustrato (His) y mayor cantidad de producto (Uro) (Figura 30).

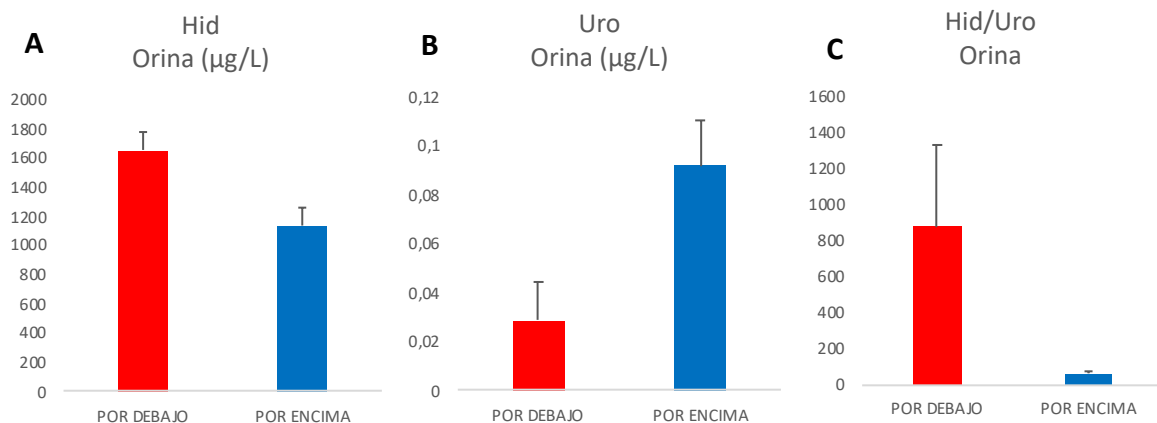


Figura 30. Medida de la concentración de His (A), concentración de Uro (B) y del ratio His/Uro (C) en orina de niños de 6 meses por grupos de COGCOM.

(Rojo, por debajo de la mediana; Azul por encima de la mediana). Análisis de t de Student. Valores medios con barras de error típico.

Partiendo de que se habían observado diferencias significativas entre las comunidades microbianas de los niños con un COGCOM por encima y por debajo de la mediana, respectivamente, y además estas diferencias estaban influidas por la semana gestacional a la que las madres daban a luz (Cerdó, 2018), se analizó si existía una correlación entre la abundancia de estas especies significativas y los metabolitos fecales e intracelulares bacterianos que se generaron, se realizó una correlación de Spearman y se obtuvieron correlaciones positivas para *Lactococcus* con el ratio Him/Uro en heces ($p=0,036$); *Lachnospiraceae_Incertae_Sedis* con la Him intracelular ($p=0,033$) y al ratio Him/His intracelular ($p=0,028$); y *Bacteroides* con la His intracelular ($p=0,029$).

Estas correlaciones indican que existe una relación entre el COGCOM, la microbiota intestinal y los metabolitos de la histidina.

2.3. El neurodesarrollo de ratones gnotobióticos se ve afectado por la microbiota y se asocia con el perfil cognitivo del donante humano

Tras demostrar que la microbiota intestinal asocia con el perfil de desarrollo cognitivo de niños de 6 meses, se estudió si esta microbiota era también capaz de transferir el fenotipo de neurodesarrollo a ratones GF.

Se les realizó a los ratones los test de Open Field (OF) y Novel Object Recognition (NORT) (Figura 31). El test de reconocimiento de objetos es una prueba de uso común para la evaluación de las funciones de memoria en roedores (Akkerman et al., 2012). Concretamente, el índice $d2$ es el valor que se usa como discriminante entre los grupos. Se calcula como $d2=(b-a)/e$, siendo b el tiempo de exploración del objeto nuevo en el segundo ensayo; a el tiempo de exploración del objeto conocido del primer ensayo, y e el tiempo de exploración total.

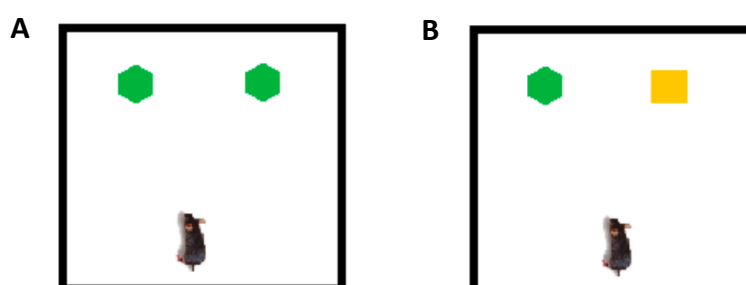


Figura 31. Esquema del test de reconocimiento de objetos. A. Familiarización. B. Reconocimiento. (S. Menchén, 2020)

Al realizar el análisis comparativo entre el perfil de cognición (medido como COGCOM) de los niños que fueron donantes de la microbiota de cada ratón, con los resultados $d2$ del test de reconocimiento de objetos, hubo una asociación significativa entre los resultados de los ratones y los de sus donantes (Figura 32).

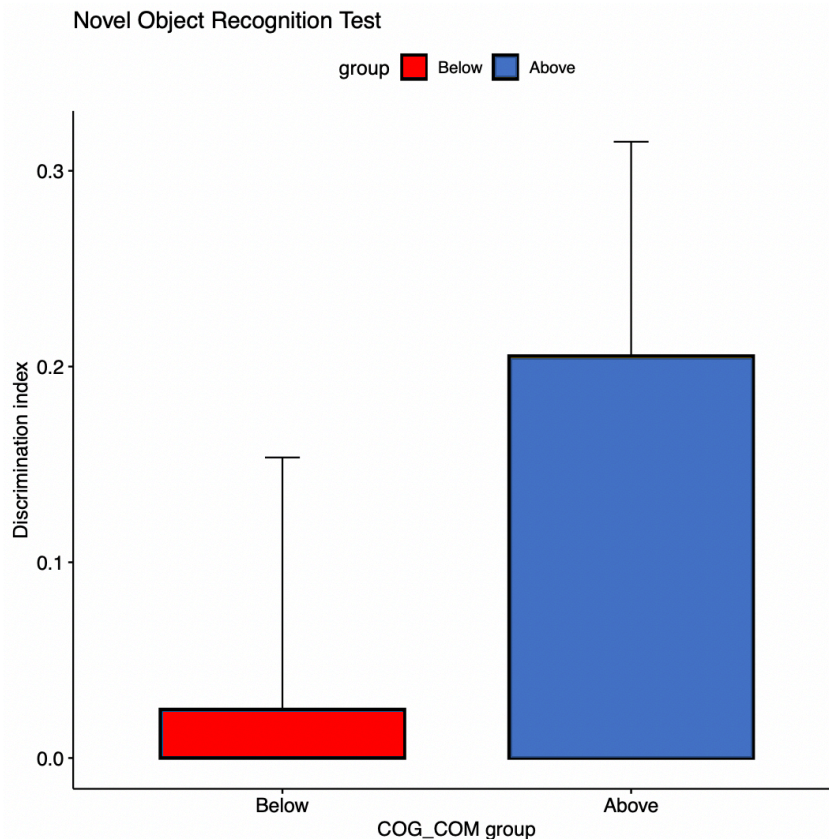


Figura 32. El rendimiento cognitivo de los ratones humanizados (Discrimination index, d_2) asocia de forma significativa ($p < 0,05$) con los grupos de COGCOM de los niños de los que recibieron la microbiota intestinal.

Below (rojo, por debajo de la mediana del valor de COGCOM); Above (azul, por encima de la mediana del valor de COGCOM). Analisis t- Student. Valores medios con barras de error típico.

A la hora de analizar las comunidades microbianas según el desarrollo cognitivo, la α -diversidad entre los grupos de ratones en función del COGCOM de su donante fue significativamente diferente. El grupo por encima de la mediana tuvo un mayor número de individuos ($p=0,038$), Dominancia ($p=0,023$) e índice de Berger-Parker ($p=0,02$).

Seguidamente, se estudió si la comunidad microbiana intestinal de la ratones asociaba con el perfil de cognición de los donantes de los que habían recibido las heces. Se realizó un análisis UniFrac (Figura 33) y tanto las distancias weighted ($p=0,044$) como las unweighted ($p=0,036$) fueron significativas, dando dos comunidades microbianas diferentes para cada grupo de COGCOM, por encima y por debajo de la mediana, controlando para las covariables de tanda de experimentación y semana de gestación en

el momento del parto, que como se vio en estudios anteriores, influía en la separación por grupos de COGCOM.

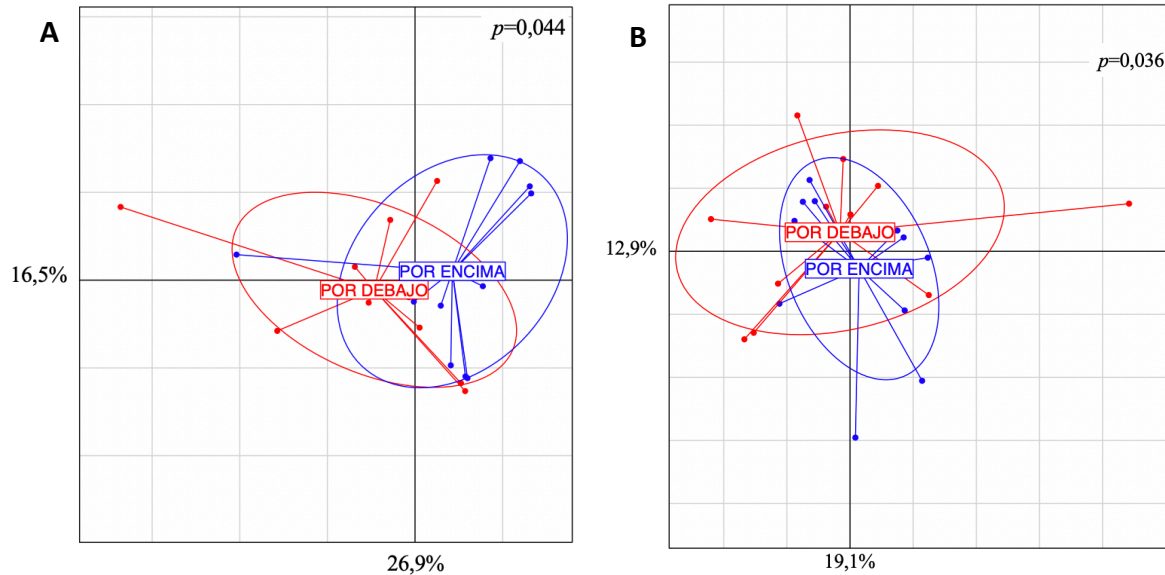


Figura 33. Análisis de coordenadas principales (PCoA) de las comunidades intestinales de microbiota de ratones GF humanizados.

A. Weighted UniFrac ($p=0,044$), B. Unweighted UniFrac ($p=0,036$)

Para analizar la abundancia diferencial de las especies en función a los grupos de COGCOM, realizamos un modelo lineal general multivariante corregido por las covariables semana gestacional y tanda de experimentación de los ratones. Observamos un incremento significativo en el grupo de ratones que habían recibido la microbiota de niños con COGCOM por encima de la mediana de los filos Actinobacteria ($p=0,018$) y Bacteroidetes ($p=0,05$), y un descenso del filo Verrucomicrobia ($p=0,029$) (Figura 34).

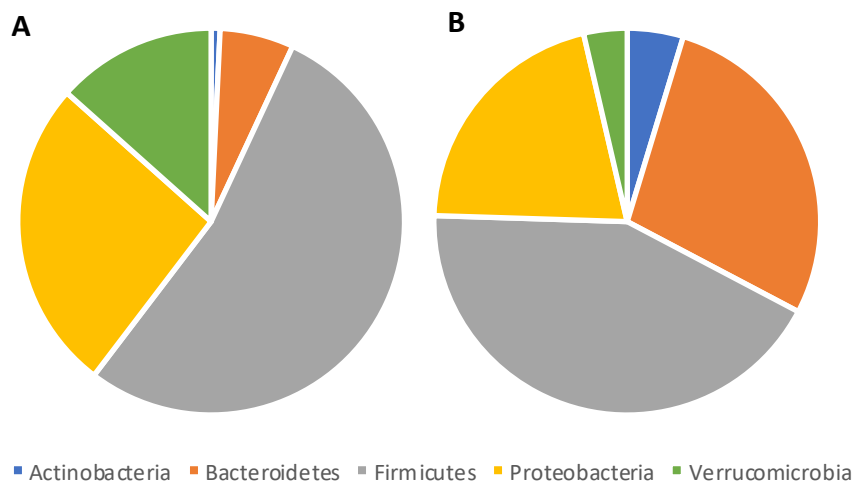


Figura 34. Abundancia relativa de la microbiota de los ratones entre grupos de COGCOM de los donantes a nivel de filo.

A. Abundancia relativa de los filos en el grupo de ratones que recibieron la microbiota de niños con COGCOM por debajo de la mediana. B. Abundancia relativa de los filos en el grupo de ratones que recibieron la microbiota de niños con COGCOM por encima de la mediana.

A nivel de familia, se mantuvo la diferencia significativa que existía entre los niños humanos de Bacteroidaceae incrementada en el grupo por encima de la mediana ($p=0,042$). Además, las muestras por encima de la mediana estuvieron enriquecidas en Bifidobacteriaceae ($p=0,02$) y Eubacteriaceae ($p=0,05$), y empobrecidas en Akkermansiaceae ($p=0,029$). De manera similar que en los humanos, los ratones matuvieron diferencias significativas en las abundancias de Bacteroides ($p=0,04$) por encima de la mediana, y Lachnospiraceae_incertae_sedis ($p=0,002$) por debajo de la mediana. Adicionalmente, el grupo por encima de la mediana estaba enriquecido en *Bifidobacterium* ($p=0,017$), *Clostridium sensu stricto* ($p=0,025$), *Eubacterium* ($p=0,05$), *Lacrimispora* ($p=0,048$), *Ruthenibacterium* ($p=0,014$), *Schaalia* ($p=0,047$), *Terrisporobacter* ($p=0,033$), *Unclass_Bacilli* ($p=0,05$), *Unclass_Firmicutes* ($p=0,04$) y *Unclass_Ruminococcaceae* ($p=0,027$). Por debajo de la mediana, los géneros

Akkermansia ($p=0,028$), *Caecibacterium* ($p=0,023$) y *Unclass_Bacteroidaceae* ($p=0,012$) estaban incrementados de manera significativa.

Por último, con el fin de confirmar nuestra hipótesis de que el neurodesarrollo está modulado por el metabolismo de la histidina, realizamos una medida de los metabolitos de la histidina en las muestras murinas de heces, metaboloma intracelular de la microbiota, orina, suero y cerebro. Obtuvimos resultados interesantes (Figura 35), como que la His ($p=0,05$) estaba aumentada en la orina de los ratones que mostraron peor rendimiento en la prueba de NORT, coincidiendo esto con los resultados anteriormente vistos en humanos. Asimismo, se encontró una mayor concentración del Uro ($p=0,018$) en el metaboloma intracelular de los ratones con mejores resultados en la prueba de NORT, indicando un paralelismo con los humanos.

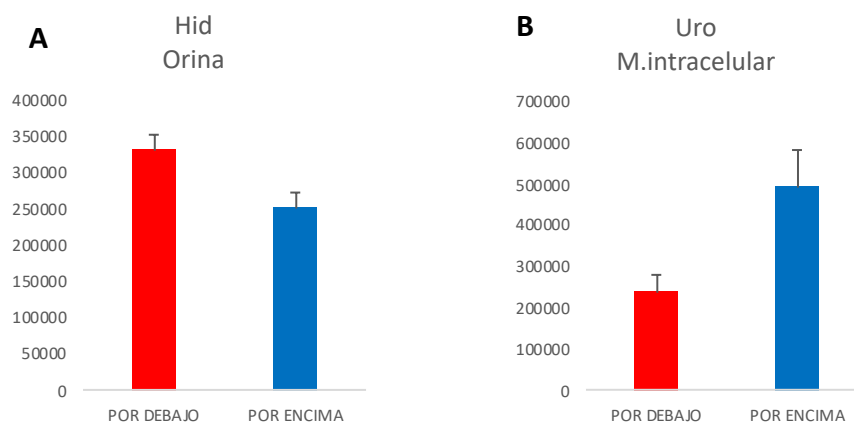


Figura 35. Medida de los metabolitos Hid en orina(A) y Uro en el metaboloma intracelular microbiano (B) de las muestras de ratones por grupos de NORT.

(Rojo, por debajo de la mediana; Azul por encima de la mediana). Análisis de t de Student. Valores medios con barras de error típico.

El conjunto de resultados muestra una clara influencia de la microbiota intestinal en el rendimiento cognitivo de los ratones, trasladando el fenotipo de sus donantes. Esta asociación parece estar mediada por el metabolismo de la histidina. Se requieren más estudios para ampliar el conocimiento sobre este campo.

3. Determinación rápida y simultánea de intermediarios del metabolismo de la histidina en microbiota y biomatrices humanas y de ratón

En capítulos anteriores, se ha visto cómo el metabolismo de la histidina estaba involucrado en el desarrollo cognitivo de niños. La histidina es el precursor del urocanato así como de la histamina, un neurotransmisor que durante mucho tiempo se ha considerado un modulador de la cognición, así como de muchos otros metabolitos que impactan en la fisiología del huésped. Igualmente, numerosos estudios recogidos en la introducción han reportado la influencia de los metabolitos de la histidina en la salud humana. A pesar de la importancia fisiológica de la histidina y sus metabolitos bioactivos, la falta de un método estandarizado y sensible para su detección y cuantificación simultáneas dificulta la evaluación correcta de la influencia de la disbiosis del ecosistema intestinal en estudios de enfermedades de grandes cohortes.

Usando UHPLC-ESI-MS/MS, se ha desarrollado un método novedoso para determinar simultáneamente histidina y siete metabolitos bioactivos extraídos fácilmente de pequeñas cantidades de orina, heces y metaboloma de microbiota humanos y de ratones en una sola ejecución rápida (6,5 min), lo que permite una evaluación integral del metabolismo de la histidina en el organismo. También se monitorizó la actividad de las principales enzimas que rigen el metabolismo de la histidina, HAL y HDC, en extractos celulares microbianos intestinales.

Optimización del método

Se empleó el método UHPLC-ESI-MS/MS debido a su precisión, selectividad, sensibilidad y reproducibilidad. Aunque se probó el modo negativo, el uso de ESI positivo resultó en una buena ionización de los compuestos y los iones $[M+H]^+$ fueron seleccionados como iones precursores. La selectividad y la sensibilidad del método se mejoraron aún más mediante la elección del ion productor de la respuesta más alta. Se

probaron diferentes opciones de fase estacionaria y fase móvil y, finalmente, obtuvimos la mejor separación, forma de pico y respuesta en una fase de agua con ácido fórmico al 0,1 % (v/v) y una fase móvil de ACN en el modo de elución en gradiente.

Se probaron diferentes columnas C18 para un análisis de fase inversa, como la columna Acquity HSS T3 (1,8 μm , 2,1 \times 150 mm) que promueve la retención de compuestos polares y la compatibilidad de la fase móvil acuosa. Al utilizar la columna HSS T3, los metabolitos de histidina se retuvieron bien, pero los isómeros de urocanato *cis* y *trans* se dividieron en dos picos demasiado amplios. Después se probó el análisis de cromatografía líquida de interacción hidrofílica (HILIC) para la separación de isómeros de urocanato. Se realizó el análisis en la columna de amida BEH (1,7 μm , 2,1 \times 100 mm) ya que se sabe que proporciona suficiente retención para compuestos muy polares. (Tolstikov & Fiehn, 2002). La separación en la columna HILIC fue probada previamente por K. M. Joo et al., y se aplicó con éxito para determinar el nivel de urocanato *cis* y *trans* en el estrato córneo de muestras de antebrazo y frente (Joo et al., 2012). Observamos una separación suficiente y buenas formas de pico de los urocanatos, pero obtuvimos un desempeño deficiente para los otros analitos. Dado que mejorar la separación de isómeros sin sacrificar una amplia cobertura era uno de los objetivos clave en el desarrollo de este método, se utilizó la columna HSS T3 para detectar y cuantificar histidina, N-acetilhistamina, glutamato, imidazol-propionato, imidazol-4-acetato e histamina, y la columna de amida BEH para *trans*- y *cis*-urocanato.

Validación del método

Evaluación del efecto matriz

Debido a su alta selectividad y sensibilidad, la espectrometría de masas junto con la cromatografía líquida es una poderosa herramienta analítica. (Silvestro et al., 2013). Sin embargo, el desarrollo de instrumentación HPLC-MS/MS y sus aplicaciones no

garantizan la eliminación efectiva de interferencias de impurezas endógenas. El análisis cuantitativo con ESI puede verse sustancialmente afectado por la aparición de supresión o aumento de iones causado por la presencia de una matriz u otras interferencias en la muestra, según lo reportado por muchos autores. (Silvestro et al., 2013; Trufelli et al., 2011). Este fenómeno se conoce comúnmente como "efecto matriz (ME)" y es responsable de datos deficientes y poco confiables en un ensayo cuantitativo, lo que induce una gran influencia en la reproducibilidad, la linealidad y la precisión del método. (Trufelli et al., 2011). El efecto matriz puede ocurrir en cualquier análisis de LC-MS, especialmente en matrices complejas como heces, metaboloma microbiano y orina. El uso de patrones internos es una estrategia eficiente destacada para superar y mejorar los efectos de matriz y, en consecuencia, mejorar la precisión del método. (Silvestro et al., 2013).

En el presente trabajo se propone el uso de dos patrones con estructuras similares y comportamiento químico análogo a los metabolitos de histidina: atenolol (Zhu et al., 2018) para *cis*- y *trans*-urocanato, y ATAA (Kammeyer et al., 1997) para los demás metabolitos. Esos compuestos nunca se han detectado en muestras humanas y de ratones y no se detectaron en nuestras muestras. Agregamos estos dos patrones en orina humana y de ratón (HU, MU), heces (HF, MF) y metaboloma microbiano (HM, MM).

Para comprobar la presencia o ausencia de efecto matriz para el atenolol o el ATAA y, en consecuencia, para los metabolitos de histidina, se realizó una comparación de pendientes entre diferentes curvas de calibración. Primero, se preparó una curva de seis niveles de concentración para atenolol y ATAA en agua destilada y ACN. De manera similar, se realizó una segunda curva de calibración agregando a cada matriz la misma cantidad de atenolol y ATAA que se usó en la calibración estándar (seis niveles de calibración). Las tablas 15 y 16 muestran los parámetros de calibración obtenidos.

Tabla 15. Efecto matriz. Comparación de las curvas de calibrado en H₂O+ACN (patrones) y cada una de las matrices medidas para el ATAA

ATAA							Comparación estadística		
	<i>a</i>	<i>s_a</i>	<i>b (mL ng⁻¹)</i>	<i>s_b (mL ng⁻¹)</i>	<i>R² (%)</i>	<i>s_{y/x}</i>	<i>F_{calc}</i>	<i>t_{calc} (b)</i>	<i>t_{calc} (a)</i>
Patrón	580,42	965,04	728,54	18,75	99,8	1455,73			
HU	14,02	1136,31	749,78	22,07	99,74	1714,08	1,39	0,73	0,38
HM	-329,44	482,88	695,09	9,38	99,94	728,4	3,99	1,59	0,84
HF	1505,33	1259,14	704,96	24,46	99,64	1899,36	1,7	0,77	0,58
MU	-264,78	432,32	667,86	8,4	99,95	652,14	4,98	1,05	0,8
MM	578,4	611,66	680,24	11,88	99,91	922,67	2,49	2,18	0,01
MF	311,92	1155,73	729,4	22,45	99,72	1743,38	1,43	0,03	0,18
HDC	-481,05	613	688,52	11,91	99,91	924,68	2,48	1,8	0,93
HAL	-484,32	812,35	685,18	15,78	99,84	1225,4	1,41	1,77	0,84

a, ordenada en el origen; *s_a*, desviación estándar de la ordenada en el origen; b, pendiente; *s_b*, desviación estándar de la pendiente; *R²*, coeficiente de determinación; *s_{y/x}*, desviación estándar de la regresión. *F_{tab}* (df: 4 . P=0,95)=6,38; *t_{tab}* (df: 10. P=0,95)=2,23. HU, Orina humana; HM, Metaboloma microbiota humana; HF, Heces humanas; MU, Orina de ratón; MM, Metaboloma de la microbiota de ratón; MF, Heces de ratón; HDC, actividad histidina descarboxilasa; HAL, actividad histidina amonio-liasa.

Tabla 16. Efecto matriz. Comparación de las curvas de calibrado en H₂O+ACN (patrones) y cada una de las matrices medidas para el atenolol

Atenolol							Comparación estadística		
	<i>a</i>	<i>s_a</i>	<i>b (mL ng⁻¹)</i>	<i>s_b (mL ng⁻¹)</i>	<i>R² (%)</i>	<i>s_{y/x}</i>	<i>F_{calc}</i>	<i>t_{calc} (b)</i>	<i>t_{calc} (a)</i>
Patrón	16224,03	9527,44	8530,31	185,08	99,86	14371,82			
HU	14208,95	8471,88	8622,77	164,57	99,89	12779,55	1,26	0,37	0,16
HM	-5217,72	7079,89	8793,32	137,53	99,93	10679,78	1,81	1,14	1,81
HF	14549,94	5085,34	8321	98,79	99,96	7671,06	3,51	1	0,16
MU	-584,73	6634,85	8862,22	128,89	99,94	10008,44	2,06	1,19	1,45
MM	-4418,15	8014,02	8754,45	155,68	99,91	12088,88	1,41	0,93	1,66
MF	11680,97	5728,56	8432,22	111,28	99,95	8641,34	2,77	0,45	0,41
HDC	2062,42	6856,23	8890,06	133,19	99,93	10342,39	1,93	1,58	1,21
HAL	-2797,81	7613,3	8829,67	147,89	99,92	11484,41	1,57	1,26	1,56

a, ordenada en el origen; *s_a*, desviación estándar de la ordenada en el origen; b, pendiente; *s_b*, desviación estándar de la pendiente; *R²*, coeficiente de determinación; *s_{y/x}*, desviación estándar de la regresión. *F_{tab}* (df: 4 . P=0,95)=6,38; *t_{tab}* (df: 10. P=0,95)=2,23. HU, Orina humana; HM, Metaboloma microbiota humana; HF, Heces humanas; MU, Orina de ratón; MM, Metaboloma de la microbiota de ratón; MF, Heces de ratón; HDC, actividad histidina descarboxilasa; HAL, actividad histidina amonio-liasa.

Se aplicó una prueba t-Student para comparar la similitud estadística entre los valores de la pendiente para cada curva de calibrado (Cantarero et al., 2011). En primer lugar, comparamos las varianzas, estimadas como $s^2_{y/x}$ mediante la distribución F de Snedecor. Los valores F calculados fueron inferiores al valor F crítico de 6,38 (nivel de significación del 5% y 4 grados de libertad) y las varianzas fueron iguales. En consecuencia, el valor t calculado se obtiene con la ecuación

$$t_{cal} = (b_1 - b_2) / \sqrt{(s_{b1}^2 + s_{b2}^2)}$$

donde b_1 , b_2 , s^2_{b1} y s^2_{b2} son las pendientes de las curvas de calibración y sus respectivas varianzas. Estos valores se compararon con el valor t teórico de 2,23 y fueron más bajos, lo que indica que no hubo diferencias significativas en las pendientes y las intersecciones. Como la respuesta para ambos estándares fue estadísticamente igual, en agua desionizada + ACN y en todas las muestras humanas y de ratón, se demostró la ausencia del efecto matriz. Por tanto, los metabolitos de histidina no deberían presentar efecto matriz en ninguna de las matrices medidas.

Características analíticas del método

Linealidad de la curva de calibrado: Una vez demostrada la ausencia del efecto matriz, se construyó una curva de calibrado de seis puntos inyectando 100 μ L de diferentes soluciones estándar. Se construyó una curva de calibrado para cada metabolito de histidina usando la relación del área del pico del analito/patrón interno frente a la concentración del analito. Los resultados para la ordenada en el origen (a), pendiente (b), coeficiente de determinación (R^2) y nivel de probabilidad de la prueba de falta de ajuste, P_{lof} (%), se resumen en la Tabla 17. Los valores de los coeficientes de correlación (R^2) oscilaron entre 99,6 y 100% y los valores de p fueron $>5\%$ en todos los casos (P_{lof} %)

(Analytical Methods Committee, 1994). Por lo tanto, los datos muestran una buena linealidad dentro de los rangos establecidos.

Tabla 17. Parámetros analíticos y estadísticos de la medida de los metabolitos de la histidina.

	a	s _a	b	s _b	R ² (%)	S (y/x)	LOD (ng mL ⁻¹)	LOQ (ng mL ⁻¹)	P _{lof} (%)
Columna HSS T3									
Histidina	-0,018	0,027	0,03	5,20 · 10 ⁻⁴	99,9	0,04	1,4	4,8	12
N-acetilhistamina	0,714	0,401	0,635	7,80 · 10 ⁻³	100	0,606	0,4	1,4	44
Glutamato	0,029	0,045	0,063	8,68 · 10 ⁻⁴	99,9	0,067	1,5	5,2	27
Imidazol-propionato	0,358	0,11	0,146	2,14 · 10 ⁻³	99,9	0,166	0,8	2,6	33
Imidazol-4-acetato	-0,012	0,003	0,006	5,81 · 10 ⁻⁵	100	0,005	2,4	8,2	35
Histamina	-0,042	0,007	0,008	1,45 · 10 ⁻⁴	99,9	0,011	2,3	7,8	16
Columna BEH Amide									
Cis-urocanato	0,273	0,517	0,304	1 · 10 ⁻²	99,7	0,78	0,5	1,7	17
Trans-urocanato	-0,674	0,727	0,396	1,41 · 10 ⁻²	99,6	1,097	0,2	0,7	20

a, ordenada en el origen; s_a, desviación estándar de la ordenada en el origen; b, pendiente; s_b, desviación estándar de la pendiente; R², coeficiente de determinación; s_{y/x}, desviación estándar de la regresión; LOD, límite de detección; LOQ, límite de cuantificación; P_{lof}(%), nivel de probabilidad de la prueba de falta de ajuste.

Sensibilidad (LOD y LOQ): Los valores obtenidos para los LOD variaron de 0,2 a 2,4 ng mL⁻¹, y los LOQ de 0,7 a 8,2 ng mL⁻¹ para *trans*-urocanato e imidazol-4-acetato respectivamente. Los resultados se resumen en la Tabla 17.

Selectividad: La comparación entre el cromatograma de una muestra dopada con una concentración conocida de los patrones internos con el correspondiente de una muestra sin dopar mostró que los patrones no estaban presentes en las muestras y que las interferencias de sustancias endógenas estaban ausentes en el tiempo de retención de todos los analitos. Por lo tanto, las condiciones instrumentales optimizadas confirmaron una alta selectividad del método propuesto. Los cromatogramas en modo MRM de una

muestra fecal de ratón se muestran en la Figura 36 (columna T3 HSS) y en la Figura 37 (columna amida BEH).

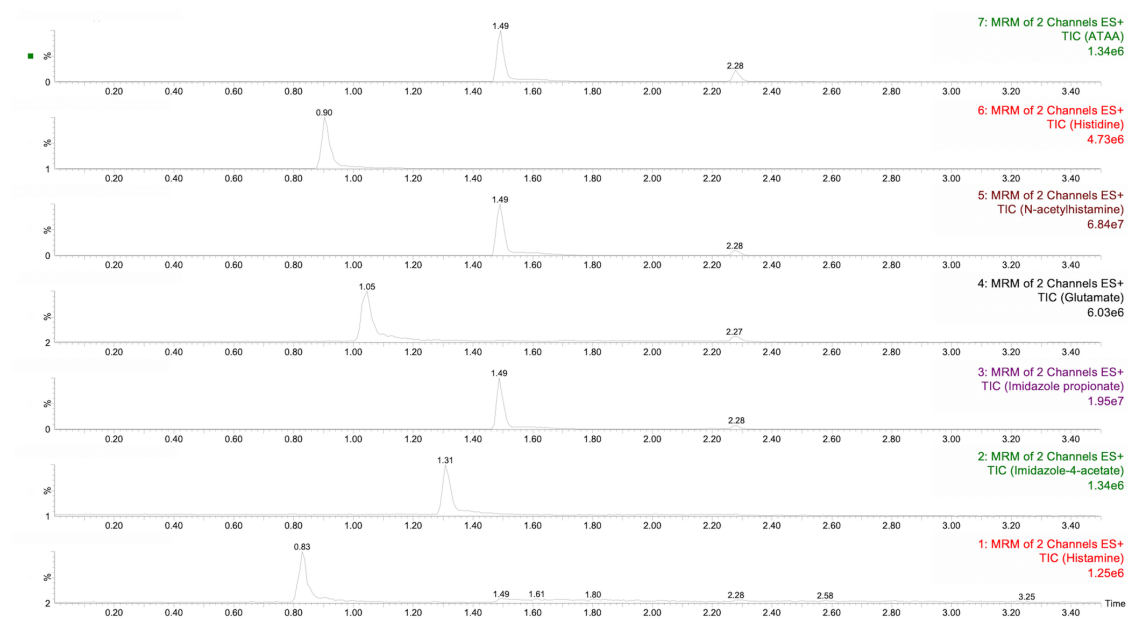


Figura 36. Cromatograma UHPLC–MS/MS de una muestra de ratón con columna HSS T3

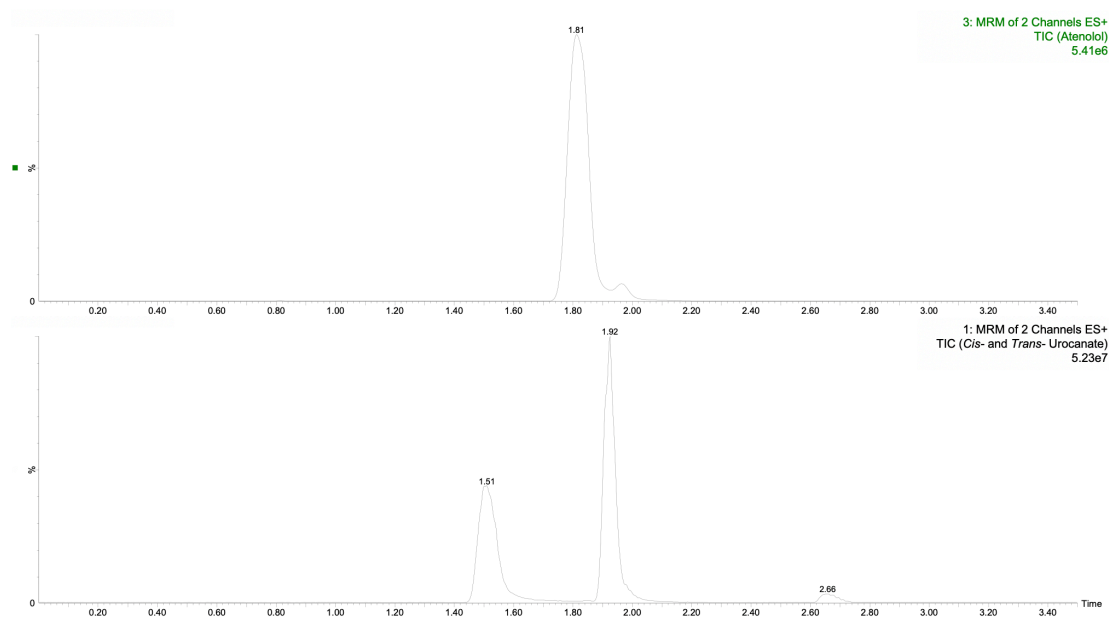


Figura 37. Cromatograma UHPLC–MS/MS de una muestra de ratón con columna BEH Amide

Exactitud (veracidad y precisión): Analizamos cada compuesto en el disolvente en tres niveles de concentración (5, 50 y 100 ng mL⁻¹) en tres réplicas durante tres días consecutivos. La precisión se calculó como desviación estándar relativa (% RSD). Las tasas de recuperación (%Rec) se calcularon para determinar la veracidad comparando la concentración estimada con la cantidad encontrada. La Tabla 18 muestra los resultados obtenidos. El %Rec varió del 87 % para el imidazol-propionato al 114% para el imidazol-4-acetato, lo que está dentro de los límites recomendados (± 15 % de las concentraciones nominales)(CDER & CVM, 2018). La precisión interdía también fue < 15% en todos los casos. Por lo tanto, todos los compuestos estuvieron dentro de los límites aceptables para la validación del método bioanalítico.

Tabla 18. Exactitud del método. Ensayo de recuperación, precisión y veracidad

	<i>Estimada (ng mL⁻¹)</i>	<i>Encontrada^a (RSD) (ng mL⁻¹)</i>	<i>Recuperación (%)</i>
Histidina	5	4,8 (3,2)	96
	50	48,2 (1,5)	96
	100	100,7 (2,8)	101
N-acetilhistamina	5	4,8 (3,8)	96
	50	48,8 (0,8)	98
	100	100,5 (3,5)	101
Glutamato	5	4,6 (3,9)	93
	50	49,2 (2,3)	98
	100	100,1 (3,1)	100
Imidazol-propionato	5	4,3 (3,7)	87
	50	49,4 (1,7)	99
	100	99,9 (3,7)	100
Imidazol-4-acetato	5	5,7 (1,8)	114
	50	49,5 (0,3)	99
	100	100,5 (2,6)	101
Histamina	5	5,6 (0,8)	113
	50	48,7 (1,1)	97
	100	100,1 (2,6)	100
<i>Cis</i> -Urocanato	5	4,4 (1,8)	88
	50	53,7 (0,5)	107
	100	98,6 (1)	99
<i>Trans</i> -Urocanato	5	5,6 (0,3)	112
	50	52,1 (1,5)	104
	100	99,8 (0,7)	100

^a Determinación media (Desviación estándar relativa, %)

Biomonitorización de metabolitos bioactivos de histidina en orina, heces y metaboloma de microbiota humana y de ratón.

La L-histidina es un aminoácido nutricionalmente esencial con propiedades bioquímicas y fisiológicas únicas usada para tratar la artritis reumatoide y la anemia en pacientes con insuficiencia renal crónica en el pasado, pero recientemente se investigó para prevenir la fatiga durante el ejercicio extenuante, como terapia en trastornos relacionados con el envejecimiento, síndrome metabólico, dermatitis atópica, úlceras, enfermedades inflamatorias intestinales, enfermedades oculares y trastornos neurológicos y como biomarcador de diabetes tipo II inducida por microorganismos (Brosnan & Brosnan, 2020; Koh et al., 2018; Moro et al., 2020). Estos efectos están mediados por la histidina y sus principales metabolitos bioactivos la histamina, N-acetilhistamina, imidazol-4-acetato, *cis*-urocanato, *trans*-urocanato, glutamato e imidazol-propionato. (Albert et al., 2010; Branco et al., 2018; Bukke et al., 2020; Canadian Institutes of Health Research, Canada Foundation for Innovation, 2019; Chu et al., 2020; Correale & Farez, 2013; DiNicolantonio et al., 2018; Fischer et al., 2021; Hart & Norval, 2020; Hodo et al., 2020; W. Hu & Chen, 2017; Ibrahim et al., 2020; Koh et al., 2018, 2020; Kopple & Swendseid, 1975; Korhonen et al., 2020; Krall et al., 2016; W. Li et al., 2020; Menezes et al., 2016; Molinaro et al., 2020; Pugin et al., 2017; Schubert & Peura, 2008; Stipanuk & A., 2006; Torii et al., 2013; Tunnicliff, 1998; Valembois et al., 2017; Zhu et al., 2018). Desarrollamos y validamos un método simple, rápido y robusto para determinar sus concentraciones en orina, heces y metaboloma de microbiota de humanos y de ratones (Figura 38 y Tabla 19).

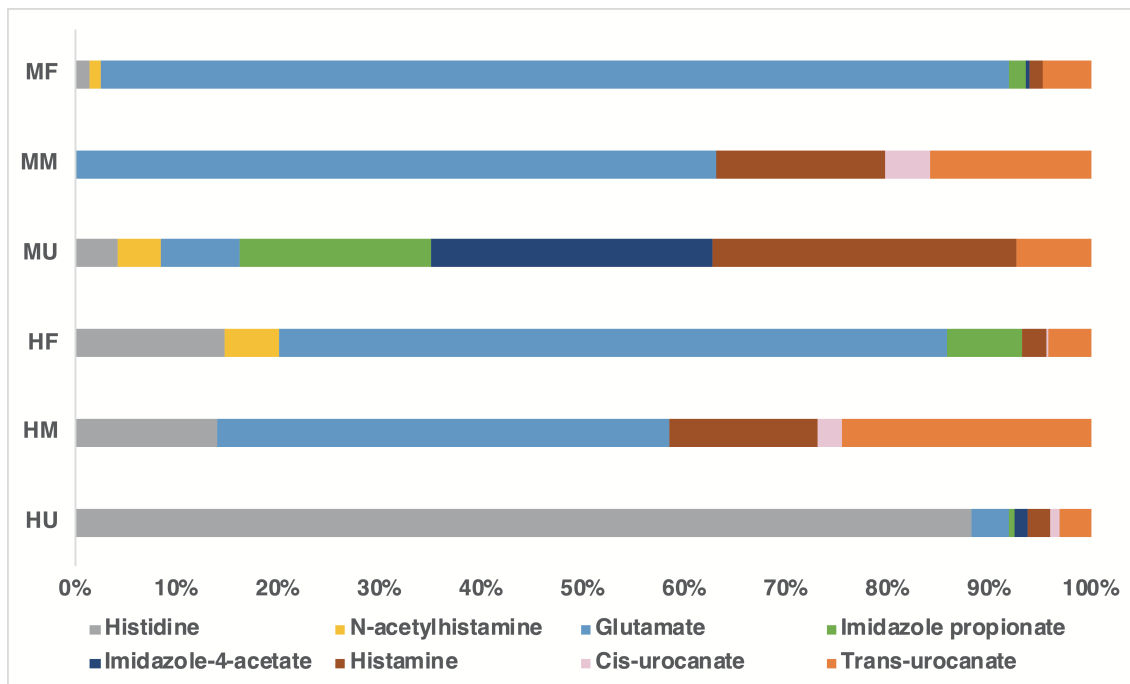


Figura 38. La histidina y sus metabolitos bioactivos en muestras biológicas

Orina humana, metaboloma microbiano humano y heces humanas (HU, HM y HF); y orina de ratón, metaboloma microbiano de ratón y heces de ratón (MU, MM y MF). Se usaron los promedios de diez repeticiones para determinar la contribución de cada metabolito de la histidina

Tabla 19. Distribución total del pool de histidina ($\mu\text{mol L}^{-1}$)

	Histidina	N-acetil-histamina	Glutamato	Imidazol-propionato	Imidazol-4-acetato	Histamina	Cis-urocanato	Trans-urocanato
HU	7,07 (6,02)	ND	0,31 (0,19)	0,04 (0,06)	0,1 (0,04)	0,18 (0,04)	0,07 (0,07)	0,25 (0,15)
HM	0,09 (0,08)	ND	0,29 (0,27)	ND	ND	0,09 (0,01)	0,01 (0,01)	0,16 (0,11)
HF	0,81 (0,34)	0,29 (0,47)	3,59 (2,86)	0,4 (0,36)	ND	0,13 (0,07)	0,01 (0,01)	0,23 (0,15)
MU	0,11 (0,02)	0,11 (0,06)	0,2 (0,05)	0,47 (0,39)	0,69 (0,32)	0,75 (0,75)	ND	0,18 (0,09)
MM	ND	ND	0,35 (0,44)	ND	ND	0,09 (0,01)	0,02 (0,04)	0,09 (0,13)
MF	0,2 (0,08)	0,13 (0,09)	11,78 (23,85)	0,22 (0,44)	0,04 (0,01)	0,16 (0,09)	0,02 (0,02)	0,62 (0,84)
HDC						0,59 (0,19)		
HAL							0,05 (0,09)	0,99 (1,37)

Determinación media (Desviación estándar). ND, no detectado (<LOD)

El método propuesto se aplicó a 10 muestras humanas y 10 de ratones. También evaluamos la producción de *trans*-urocanato e histamina como resultado de las

actividades de HAL y HDC, las enzimas clave que gobiernan el catabolismo metabólico de la histidina (Tabla 19).

Todos los metabolitos se cuantificaron en heces de ratón, lo que sugiere un amplio intercambio de metabolitos de histidina entre el intestino y el huésped. Se detectaron glutamato e histamina en todos los fluidos y muestras en concentraciones que oscilaban entre 0,20 y 11,78 μM para el glutamato y entre 0,09 y 0,75 μM para la histamina. La alta frecuencia de detección de estos metabolitos es consistente con su papel central en el metabolismo y la fisiología del huésped. Las heces de los ratones tenían el mayor contenido de glutamato, 11,78 μM , 3,3 veces más que las heces humanas, posiblemente relacionado con las diferencias en la composición de la microbiota intestinal entre especies (R. Liu et al., 2017). Los niveles de histamina en orina en ratones alcanzaron 0,75 μM , más altos que los observados en la orina humana que se encontraban dentro del rango previamente publicado (Myers et al., 1981). Las diferencias entre las matrices de especies se destacaron con una proporción de histamina a histidina en orina que fue 281 veces mayor en ratones en comparación con humanos, lo que sugiere un proceso inflamatorio o alérgico subyacente en nuestra cohorte de ratones. (Branco et al., 2018). El nivel más alto de imidazol-4-acetato, el producto de la oxidación de la histamina por la diamino oxidasa y la aldehído deshidrogenasa, también se observó en la orina del ratón, lo que indica una alta tasa catabólica de histamina. La orina de ratón también contenía la mayor cantidad de imidazol-propionato entre las matrices, 10 veces más que en la orina humana. El imidazol-propionato no mostró asociación con las variables de salud infantil, posiblemente debido al bajo número de sujetos. Por el contrario, la N-acetilhistamina solo se pudo cuantificar en heces humanas y de ratón y en orina de ratón en concentraciones de 0,11 μM a 0,29 μM . El hecho de que se detectara N-acetilhistamina en heces humanas y de ratón confirmó informes previos sobre su origen en el metabolismo microbiano

intestinal (Fujisaka et al., 2018) que eventualmente puede ser excretado en la orina (Van Der Heiden et al., 1972).

La orina humana tuvo la concentración más alta de histidina alcanzando 7,07 μM , lo que posiblemente refleja una ingesta dietética excesiva de histidina en lugar de una degradación de histidina alterada por la deficiencia de HAL, ya que su producto *trans*-urocanato se detectó en todas las muestras de orina. El *cis*-urocanato se separó eficazmente del *trans*-urocanato y se cuantificó en todas las matrices excepto en la orina de ratón, con un rango de 0,01 μM en heces humanas y metaboloma microbiano intracelular a 0,07 μM en orina humana. Este hallazgo probablemente se deba a la exposición de la piel a los rayos UV. (Korhonen et al., 2020). Finalmente, el *trans*-urocanato alcanzó la concentración más alta (0,62 μM) en las heces de ratón, igual que se observó para el glutamato, siendo ambos metabolitos los intermediarios inicial y final de la vía de degradación de la histidina, lo que indica una alta tasa catabólica en las heces de ratón.

Una cuantificación precisa de las alteraciones en el metabolismo de la histidina y su modulación por la microbiota es clave para evaluar el impacto de la disbiosis en enfermedades neurológicas, inmunitarias y metabólicas. La evaluación de los metabolitos de histidina ha sido cubierta parcialmente por varios métodos separados con alcance, sensibilidad y precisión variables, impidiendo la cuantificación simultánea y la asociación de metabolitos y sus ratios con trastornos relacionados con la histidina. Para cubrir esta necesidad, hemos desarrollado y validado un método rápido, robusto y de alto rendimiento para la cuantificación de histidina y siete metabolitos bioactivos fácilmente extraídos de orina, heces y metaboloma de microbiota humana y de ratón, mediante cromatografía líquida en tándem con espectrometría de masas. A pesar de que los compuestos tenían diferentes propiedades fisicoquímicas, logramos medir

simultáneamente los metabolitos de histidina con un tiempo de ejecución de 6,5 minutos. Nuestro enfoque novedoso captura el metabolismo de la histidina en un solo ensayo con un alto nivel de precisión y reproducibilidad, lo que lo hace especialmente interesante para el fenotipado metabólico de la microbiota profunda en grandes estudios de enfermedades y la detección rutinaria posnatal de alteraciones en la vía de la histidina.

4. Discusión global

La microbiota intestinal humana es una comunidad microbiana densa y diversa presente en el tracto gastrointestinal compuesta aproximadamente por 10^{14} - 10^{15} células bacterianas (es decir, 10 veces la cantidad de células eucariotas en el cuerpo), que contribuye en gran medida a la salud y enfermedad del organismo (Frag et al., 2020). Existe una amplia evidencia que ha revelado que las comunidades microbianas intestinales han coevolucionado con el huésped para desarrollar una relación mutualista, lo que influye en la homeostasis metabólica, el sistema endocrino, la función cerebral y la disponibilidad de macronutrientes (Frag et al., 2020). De especial interés son las etapas tempranas de la vida, donde el establecimiento y la influencia de la microbiota intestinal puede tener consecuencias a largo plazo de cara al desarrollo del metabolismo energético, la cognición, el comportamiento y sus posibles alteraciones

Microbiota y obesidad

La obesidad es un problema de salud pública de primer orden. Se trata de una enfermedad multifactorial que tiene una base genética pero requiere de factores ambientales para manifestarse (Heymsfield & Wadden, 2017). La composición microbiana del tracto GI tiene un impacto directo en la salud humana, generando efectos beneficiosos o adversos (Marchesi & Ravel, 2015) y en consecuencia, también en la obesidad.

Numerosos estudios respaldan esta hipótesis. En 2004, Backhed et al. publicaron un estudio en el que demostraron que los ratones convencionales tenían más de grasa corporal y gonadal que los ratones GF (Bäckhed et al., 2004). También demostraron que la colonización de ratones GF con microbiota procedente del ciego de ratones convencionales produjo un aumento del 60% de la grasa corporal de los GF en dos semanas. El aumento en la grasa corporal se acompañó de un aumento de marcadores

relativos al síndrome metabólico. Estos resultados les llevaron a proponer que la microbiota de los individuos obesos era más eficiente en la extracción de energía a partir de la dieta que la microbiota de los individuos delgados. Para demostrar esto y determinar si el aumento en la adiposidad era una característica que se transmitía a través de la microbiota, este mismo grupo de investigación observó un aumento en el porcentaje de grasa corporal en los ratones GF que habían recibido microbiota procedente de los ratones obesos (ob/ob) superior al aumento de grasa corporal que se produjo en los ratones que recibieron la microbiota de los ratones delgados, a pesar de que no hubo diferencias en el consumo de alimentos (Turnbaugh et al., 2006). Estos datos y otros experimentos en modelos animales (Turnbaugh et al., 2008) propusieron que la microbiota es un agente activo en la extracción de energía de la dieta y demostraron que su transmisión trasladaba los fenotipos tanto obeso como delgado en modelos animales. Posteriormente, en humanos, se transfirió la microbiota intestinal de donantes humanos delgados a pacientes con síndrome metabólico. Estos pacientes mejoraron su resistencia insulínica periférica 6 semanas después del trasplante aunque su peso corporal y adiposidad no se modificaron. Este hecho se asoció a una ganancia en diversidad bacteriana intestinal, así como a un aumento en la cantidad del productor de butirato *Roseburia intestinalis* (Vrieze et al., 2012). Recientemente, se comprobó que la dieta juega un papel central en la efectividad de la transmisión de los fenotipos obeso y delgado a través del trasplante de microbiota. Ridaura et al. (Ridaura et al., 2013) transfirieron la microbiota intestinal procedente de parejas de gemelos disparejos en el perfil de obesidad a ratones GF. Al igual que los estudios anteriores, los animales que recibieron la microbiota intestinal del gemelo obeso aumentaron su masa grasa con respecto a los que recibieron microbiota del gemelo delgado a pesar de no existir diferencias en el consumo de alimento. Después de la inoculación de los animales realizaron experimentos de cohabitación en los que incluyeron en la misma jaula ratones que habían recibido la microbiota del gemelo obeso

junto con ratones que habían recibido la microbiota del gemelo delgado. La cohabitación produjo una invasión de los microorganismos de los animales inoculados con la microbiota del gemelo delgado hacia los ratones inoculados con una microbiota del gemelo obeso y una disminución en el porcentaje de grasa corporal de los ratones que habían recibido la microbiota del gemelo obeso cuando los ratones se alimentaban con una dieta típica de ratón (baja en grasa y alta en polisacáridos vegetales). Cuando los ratones recibían una dieta alta en grasas y baja en frutas y vegetales, la microbiota de los ratones que habían recibido la microbiota del gemelo delgado fracasaban en la invasión y no protegían a sus compañeros de jaula del aumento de grasa corporal. Éstos y otros estudios indican que el microbioma juega un papel en la homeostasis energética del huésped y en establecimiento y desarrollo de obesidad. Aunque numerosos estudios han abordado la interrelación entre microbioma, dieta y obesidad, aún están por esclarecer tanto los microorganismos responsables como los mecanismos moleculares de su interacción metabólica con el huésped.

Conociendo que la microbiota del obeso tiene una mayor capacidad de extracción de energía y que nuestro estudio metaproteómico señalaba hacia las glicosidasas, enzimas exclusivas de origen microbiano e imprescindibles para la fermentación de carbohidratos y polisacáridos indigeribles de la dieta, se exploró su actividad y posible relación con la obesidad (Hernández et al., 2013). Tras analizar la actividad específica de 23 glicosidasas diferentes, se comprobó que la actividad total era 40 veces superior en el obeso y, lo más importante, que correlacionaba positivamente con BMI, la glucemia en ayunas y la resistencia a la insulina.

Esta conexión metabólica entre microbiota y huésped proporcionaba la pista para emplear la actividad glicosidasa, en concreto la actividad β -galactosidasa, para identificar las bacterias activas en la microbiota de obesos y delgados (Ruiz et al., 2017). Los datos demostraron que la composición de la microbiota activa es muy diferente a la total,

destacando los miembros de Bacteroidetes, Proteobacterias y Actinobacteria. Además, la intervención dietética a largo plazo cambió la estructura de la microbiota activa pero no su capacidad metabólica, que viene determinada por BMI. Sorprendentemente, la funcionalidad microbiana (actividades α -glucosidasa y β -galactosidasa) correlacionaban positivamente con los marcadores metabólicos, BMI y resistencia a la insulina en los obesos. La correlación entre actividad metabólica y BMI se vio confirmada también mediante análisis metabolómico (Rojo et al., 2015).

Nuestro enfoque para comprender cómo la microbiota influye y es capaz de imprimir fenotipos de obesidad de manera vertical a través de las generaciones (madre-hijo) y entre especies (madre-hijo-ratón) se ha centrado en estudios de la composición y la funcionalidad, tanto *in silico*, como *in vitro* e *in vivo* de las comunidades microbianas en función de la herencia del perfil materno de obesidad.

En nuestro primer trabajo, se emplearon técnicas de análisis de librerías del gen 16S rRNA, metaproteómica y medidas *in vitro* de actividades glicosidasas para establecer asociaciones entre los perfiles metabólicos y filogenéticos de las comunidades microbianas en muestras fecales de niños de madres con normopeso, sobrepeso y obesidad. Se observó una menor abundancia del género *Bacteroides* en sujetos obesos, pero un aumento en *Bifidobacterium*. Curiosamente, los niveles de probióticos tradicionales de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* parecen ser más altos en las enfermedades relacionadas con la obesidad y el sistema endocrino según los datos recuperados de algunos estudios (Armougom et al., 2009; Schwartz et al., 2010). Las muestras de niños de madres con sobrepeso estuvieron enriquecidas en *Ruthenibacterium* y *Anaerostipes*, mientras que la microbiota de niños de madres obesas tuvo mayor abundancia en *Faecalimonas*, *Romboutsia*, *Dialister*, *Parasutterella*. A nivel de filo hubo una sobreabundancia de Bacteroidetes en los grupos de normopeso. Aunque hay

resultados contradictorios de estudios en cuanto a los patrones de las comunidades microbianas intestinales en humanos obesos, las composiciones de nuestras muestras son consistentes con la hipótesis Bacteroidetes bajo/Firmicutes alto propuesta inicialmente por Turnbaugh et al. en 2006 (Turnbaugh et al., 2006) que asocia la obesidad con una disminución de la diversidad bacteriana y la reducción de la representación de Bacteroidetes. En nuestro análisis de la composición, sin embargo, no se observaron diferencias de la diversidad microbiana.

En nuestro estudio, proporcionamos evidencia de que la obesidad materna está relacionada con diferencias significativas en la estructura de la comunidad microbiana intestinal pues las métricas de β -diversidad mostraron tres grupos distintos agrupados según el BMI materno antes del embarazo. Mueller et al. mostró que la obesidad materna se asoció con una composición alterada de la microbiota intestinal en los recién nacidos nacidos por vía vaginal, aunque no se trasladó en los nacidos por cesárea (Mueller et al., 2016). Por otro lado, los resultados de un metanálisis sugirieron que la lactancia materna es un factor protector significativo contra la obesidad en niños (Yan et al., 2014). Nosotros también encontramos un efecto relacionado con el modo de parto y de la lactancia materna sobre la microbiota intestinal.

Nuestras predicciones por análisis metagenómicos mostraron un enriquecimiento general en los genes implicados en las vías metabólicas de la microbiota intestinal de los niños nacidos de madres obesas. Es de destacar que encontramos un enriquecimiento en los módulos de la degradación de polisacáridos, como la proteína de unión al sustrato del sistema de transporte de maltooligosacárido (COG2182) y la β -glucosidasa (COG1472).

Cabe destacar que la microbiota hidroliza los carbohidratos no digeribles en oligosacáridos y monosacáridos que alimentan el metabolismo central del carbono (Flint, Scott, Duncan, et al., 2012). Las principales rutas metabólicas bacterianas son la ruta de

Embden-Meyerhof-Parnas (glucólisis, para azúcares de seis carbonos) y la ruta de las pentosas-fosfato (para azúcares de cinco carbonos) que conducen al fosfoenolpiruvato que se convierte en productos de fermentación como butirato y propionato (Miller & Wolin, 1996). En nuestro estudio, el microbioma de los niños nacidos de madres obesas tiene una proporción significativamente mayor de genes involucrados en el metabolismo de la β -glucosidasa, una enzima de origen exclusivamente bacteriano que actúa sobre los enlaces $\beta 1 \rightarrow 4$, que unen dos glucosas o moléculas con sustituciones de glucosa (como el disacárido celobiosa). Teniendo en cuenta que las rutas de degradación de carbohidratos estaban presentes en la microbiota intestinal, nuestros resultados sugieren una mayor capacidad para procesar la mayor variedad de polisacáridos en la dieta por parte de la microbiota intestinal de los niños nacidos de madres obesas.

La determinación de las actividades microbianas intestinales de α -galactosidasa, β -galactosidasa, α -glucosidasa, β -glucosidasa y α -fucosidasa en niños de 6 meses confirmó el enriquecimiento del metabolismo de carbohidratos de los metaproteomas en los niños de madres obesas y con sobrepeso. Estos resultados concuerdan con los publicados previamente por Hernández et al. (Hernández et al., 2013), donde, tras analizar la actividad específica de 23 glicosidasas diferentes, se comprobó que la actividad enzimática glicosidasa de 23 enzimas era 40 veces superior en el obeso y correlacionaba positivamente con el BMI, con un salto notable en el valor de las actividades glicosidasas en sujetos con un BMI $>25\text{kg}/\text{m}^2$ (sobrepeso y obesidad), con la glucemia en ayunas y la resistencia a la insulina.

Finalmente, este estudio muestra diferencias en la composición taxonómica y la funcionalidad de la microbiota intestinal entre los grupos de niños que se mantuvieron tras una corrección estricta para las covariables confusoras tipo de parto y lactancia materna, donde la obesidad materna antes del embarazo puede imprimir una composición microbiana intestinal selectiva con mayor capacidad metabólica durante la infancia. Estos

resultados confirman nuevamente que la capacidad de extracción de energía por parte de la microbiota está asociada al perfil de obesidad de los sujetos, siendo en este caso aún más interesante, pues la microbiota de la descendencia es la que hereda la funcionalidad de la microbiota materna.

Teniendo en cuenta que la microbiota es un agente asociado a la obesidad y que traslada el fenotipo de su huésped, nos planteamos continuar con un enfoque *in vivo* y procedimos a analizar la composición y funcionalidad de la microbiota intestinal de ratones GF humanizados con microbiota de niños de nuestro estudio, y su asociación con el fenotipo del donante humano (madre-hijo) y del receptor murino (madre-hijo-ratón).

Inicialmente realizamos un análisis de la composición microbiana de los ratones para comprobar que el FMT funcionaba. Las diferencias significativas en las abundancias a nivel de filo y género, así como la α y β diversidad, mostraron que el establecimiento de la microbiota era diferente en los receptores murinos respecto de sus donantes. Sin embargo, estas diferencias se mantuvieron de manera similar en cada pareja donante-receptor, mostrando una clusterización en la que preferentemente las muestras de ratones agrupaban por el individuo del que procedía su microbiota. Por tanto, a pesar de las diferencias comunes en la composición microbiana entre distintas especies, podemos asumir que los resultados observados en ratones, tienen una influencia total o parcial de la microbiota humana, como han descrito los resultados de otros autores con la humanización de ratones mediante el FMT en estudios de microbiota y obesidad (Ridaura et al., 2013) así como de microbiota y alteraciones en el neurodesarrollo (Sharon et al., 2019).

En relación a la obesidad, tras recibir todos los grupos una dieta chow, definida como normal, es decir, alta en fibra y baja en grasas, la ganancia de peso que experimentaron

los ratones que habían recibido microbiota de niños de madres obesas fue significativamente mayor frente a los que recibieron la microbiota de niños de madres con sobrepeso y normopeso. Estos resultados coinciden con los descritos por Ridaura (Ridaura et al., 2013), demostrando que la microbiota de gemelos dispare (uno delgado y otro obeso) inducía adiposidad y fenotipos metabólicos similares en ratones. Además, la microbiota del gemelo delgado podía prevenir el aumento de adiposidad en ratones receptores de microbiota de obesos, si los ratones se alimentan con una dieta adecuada. Por otro lado, Soderborg et al. (Soderborg et al., 2018), inocularon microbiota de niños de madres obesas y delgadas en ratones GF y no hallaron diferencias en la ganancia de peso siguiendo una dieta chow, pero sí lo hicieron al someter a los ratones a una dieta occidental, es decir, alta en grasas y carbohidratos. Además, nuestros resultados mostraron que las medidas de glucosa en sangre de los ratones, establecidas como área bajo la curva (AUC, mg h/dL), tuvieron una correlación positiva con el peso del ratón, por lo que la microbiota generó en los ratones signos de síndrome metabólico. El análisis de composición de la microbiota de los ratones reveló una β -diversidad diferente, en función del BMI de las madres de los niños (análisis de UniFrac unweighted), así como una α -diversidad empobrecida significativamente en el grupo de los ratones que habían recibido la microbiota de niños de madres obesas. Estos resultados se corresponden con lo descrito por Turnbaugh (Turnbaugh et al., 2006), sumando evidencia a que la microbiota de los obesos suele estar empobrecida en la diversidad de especies, y las comunidades microbianas son diferentes según el perfil de obesidad del huésped. En cuanto al perfil taxonómico, hubo dos especies que se mantuvieron significativas igual que en el estudio de los humanos, *Anaerostipes* y *Ruthenibacterium*, incrementadas en los sujetos con exceso de peso. Por otro lado, *Faecalibacterium* estuvo empobrecida en estas muestras. Esto concuerda con los resultados revelados por un estudio donde se sometió a sujetos obesos y con sobrepeso a la ingesta de dieta mediterránea, mejorando

el perfil metabólico y disminuyendo la abundancia de *Ruthenibacterium lactatiformans* y aumentando la abundancia de *Faecalibacterium prausnitzii* (Horvath et al., 2020; Meslier et al., 2020). Las especies de NGP que son reconocidas y probadas clínicamente parecen ser menos abundantes en pacientes relacionados con la obesidad. Por lo tanto, las especies probadas de los géneros *Akkermansia*, *Faecalibacterium*, *Eubacterium*, *Bacteroides*, *Parabacteroides* y *Christensenella* podrían contribuir a restaurar los desequilibrios microbianos observados. En este sentido, los nuevos microbios beneficiosos o los enfoques de búsqueda de NGP podrían basarse con éxito en el cultivo y aislamiento de nuevos géneros y especies que presentan una abundancia diferencial entre pacientes y sujetos sanos y pueden vincularse con resultados clínicos relevantes. (López-Moreno et al., 2021)

Finalmente, y basándonos en estudios anteriores, aunque habíamos propuesto la actividad glicosidasa como criterio racional para identificar y clasificar las comunidades microbianas en el desarrollo de obesidad, nuestra hipótesis quedó parada debido a los resultados obtenidos tras la medida de las actividades glicosidasas de la microbiota de ratones, que puede deberse a efectos de la variabilidad de la microbiota y metabolismo interespecie (R. Liu et al., 2017). En este caso, no hubo una asociación con el BMI materno de los niños, al contrario, la actividad glicosidasa se vio aumentada en los grupos de los ratones que habían recibido la microbiota de niños de madre con normopeso y sobrepeso, siendo siempre superiores a las de madres obesas. Además, estos resultados nos hicieron plantearnos que posiblemente el impacto de la dieta, que no habíamos considerado en nuestro experimento, tenía una gran importancia a la hora de trasladar el metabolismo microbiano y su asociación con el BMI. Futuros estudios que integren el conjunto completo de factores que influyen en la obesidad esclarecerán los mecanismos subyacentes del traslado de la funcionalidad de la microbiota entre especies y su potencial uso terapéutico.

Microbiota y motricidad fina

A la vista de los resultados obtenidos, nos planteamos comenzar a explorar otra vía de comunicación microbiota-huésped, en este caso el neurodesarrollo y su relación con el metabolismo microbiano. Cada vez hay mayor acuerdo en estudios en humanos y animales de que la microbiota intestinal afecta el desarrollo del cerebro, las consecuencias y los trastornos neurológicos, lo que da como resultado cambios a largo plazo en el comportamiento. Los estudios iniciales en ratones GF enfatizaron que la colonización temprana con una microbiota completamente libre de patógenos específicos (SPF) mejoró el desarrollo cerebral y las anomalías del comportamiento (Clarke et al., 2013; Lu, 2018; Sudo et al., 2004). Los estudios clínicos transversales asociaron la composición microbiana alterada con la fisiopatología de la enfermedad de Alzheimer, el trastorno del espectro autista, la esclerosis múltiple, la enfermedad de Parkinson y accidentes cerebrovasculares (Cryan et al., 2020). Es de vital importancia comprender los efectos conductuales de la colonización microbiana intestinal durante los primeros años de vida, la fase más rápida y dinámica del desarrollo cerebral posnatal (Cerdó et al., 2016). La composición bacteriana comienza a confluir hacia una microbiota similar a la de un adulto al final del primer año de vida y se parece completamente a la microbiota adulta a los 2,5 años de edad. Para comprender la asociación de la microbiota con el desarrollo cognitivo lo ideal sería observar las diferencias entre los niños en un punto intermedio en el que la microbiota y el neurodesarrollo todavía están concurrendo. Nosotros estudiamos la asociación de la estructura de la microbiota intestinal evaluada por métricas de α -diversidad (intrasujeto) y β -diversidad (entre sujetos) con el neurodesarrollo a nivel cognitivo, del lenguaje y motor en una cohorte de niños sanos de 18 meses de edad. Además, buscamos identificar taxones característicos específicos dentro de perfiles microbianos o enterotipos. Encontramos asociaciones entre los enterotipos de la

microbiota intestinal con la motricidad fina en niños e identificamos taxones significativamente diferentes. Es importante destacar que las asociaciones entre los enterotipos y las puntuaciones de motricidad fina se mantuvieron al controlar las covariables como la lactancia materna y el BMI pregestacional materno.

Considerado prácticamente como el *gold standard* en su campo, Bayley®-III es actualmente la prueba más extendida para la evaluación del comportamiento de niños pequeños de 0 a 42 meses, utilizada tanto en entornos clínicos como de investigación (Bayley, 2006). Realizado por un examinador experto, la estructura del Bayley®-III, que se divide en distintas puntuaciones compuestas (cognitivo, lenguaje y motor), permite una evaluación más precisa de dominios específicos del desarrollo, identificando a los niños con retrasos en el desarrollo y brindando información para el plan de intervención. En nuestro estudio, los niños con valores por encima o por debajo de la mediana para cada subescala de Bayley®-III no diferían sustancialmente en la α -diversidad, como indicaron la riqueza de la comunidad, la uniformidad, la similitud filogenética y la abundancia de especies. Nuestros resultados contrastan con lo encontrado por Carlson et al. (Carlson et al., 2018), donde una mayor α -diversidad se asoció con puntuaciones más bajas en la puntuación compuesta general, la escala de recepción visual y la escala de lenguaje expresivo a los 2 años de edad utilizando las escalas Müllen de aprendizaje temprano. Sin embargo, nuestros hallazgos concuerdan con el estudio de Sordillo et al. en niños de 3 años (Sordillo et al., 2020). Los autores utilizaron la tercera edición del Cuestionario de Edades y Etapas, y no reportaron asociaciones entre la diversidad de la microbiota intestinal y los resultados del desarrollo. En nuestro estudio, se observaron asociaciones consistentes de la β -diversidad de la microbiota intestinal infantil para la subescala de motricidad fina. Las habilidades de motricidad fina se refieren al control de pequeños músculos que está altamente relacionado con las funciones cognitivas que procesan la

información visual (Zuccarini et al., 2020). A pesar de esta conexión, la evaluación de las escalas Bayley®-III no mostró asociaciones significativas de las demás subescalas cognitivas y de lenguaje con la microbiota intestinal en nuestra cohorte. La asociación significativa entre la β -diversidad de la microbiota y los grupos de motricidad fina se observó utilizando distancias UniFrac weighted y no fue significativa con distancias UniFrac unweighted. Este resultado indicó que son las diferencias en la abundancia de OTUs más que la presencia y ausencia de OTUs las se asociaron con la estructura general de la comunidad en los grupos de motricidad fina. Las diferencias en la β -diversidad en niños sanos solo han sido reportadas por Christian et al. (Christian et al., 2015) quienes observaron asociaciones significativas entre la microbiota intestinal y el temperamento en niños. En nuestro estudio, el sexo infantil no tuvo impacto en la estructura de la microbiota intestinal.

Con el fin de revelar posibles ensamblajes microbianos subyacentes en grupos de motricidad fina, enterotipamos nuestra cohorte de estudio utilizando Dirichlet Multinomial Mixtures. En base a las abundancias proporcionales a nivel de género, se identificaron dos enterotipos distintos y se denominaron Bact y Firm debido a la contribución dominante de *Bacteroides* y *Firmicutes* en cada enterotipo. Nuestro análisis de enterotipo se alineó con informes previos de variación de microbiota centrados en *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Prevotella* y *Ruminococcaceae* (Bokulich et al., 2016; Planer et al., 2016). Los dos primeros años de vida se caracterizan por una sucesión de taxones bacterianos en los que una comunidad aeróbica facultativa rica en *Enterobacteriaceae* evoluciona a una comunidad rica en anaerobios estrictos que contiene *Bacteroides* que se enriquece progresivamente en una mezcla diversa de *Ruminococcaceae*, *Faecalibacterium* y *Lachnospira* dentro del filo *Firmicutes*. (Ruiz et al., 2017). Es de destacar que se observó una asociación estadísticamente significativa entre la prevalencia de enterotipos Bact y Firm con habilidades de motricidad fina. Este

es el primer estudio infantil prospectivo que vincula los enterotipos y el neurodesarrollo infantil, y muestra un desempeño de la motricidad fina de los niños más pobre con una comunidad predominantemente *Bacteroides*. Nuestros resultados confirmaron las observaciones de Sordillo et al. sobre la asociación del agrupamiento de coabundancia dominado por *Bacteroides* con puntajes de motricidad fina más bajos (Sordillo et al., 2020). Además, identificamos taxones cuya abundancia fue significativamente diferente entre los grupos de motricidad fina. La motricidad del grupo por debajo de la mediana se asoció con una mayor abundancia de *Turicibacter* y *Parabacteroides*. Finegold et al. estableció una lista de géneros significativos entre muestras de control con autismo severo versus muestras de control de no hermanos, donde *Turicibacter* y *Parabacteroides* aumentaron significativamente en niños autistas (Finegold et al., 2010). El deterioro de la coordinación motora es una condición común en niños con trastornos del neurodesarrollo como el autismo (Macdonald et al., 2014). En nuestra cohorte, las habilidades motoras finas por encima de la mediana se asociaron con una mayor abundancia de once géneros, incluidos *Coprococcus* y un género no asignado dentro de *Veillonellaceae*. Kang et al. (Kang et al., 2013) informaron que *Coprococcus* y *unclass_Veillonellaceae* eran menos abundantes en individuos autistas en comparación con controles neurotípicos entre las edades de 3 y 16 años. Un hallazgo interesante en el grupo motricidad fina por encima de la mediana fue la sobreabundancia de *Lactobacillus Bifidobacterium*, los géneros probióticos más importantes y ampliamente utilizados. Varios estudios han explorado el papel de estos probióticos en el eje intestino-cerebro. Bravo et al. observó que la ingestión de *L. rhamnosus* (JB-1) regulaba el comportamiento emocional y la expresión del receptor central GABA en ratones a través del nervio vago (Bravo et al., 2011). En otro estudio, Davari et al. informó que una suplementación de *L. acidophilus*, *B. lactis* y *L. fermentum* mejoró el deterioro inducido por la diabetes de la actividad sináptica y la función cognitiva en ratas (Davari et al., 2013). Aún así, se

requieren más estudios sobre la traducción roedor-humano. Un conocido estudio de Messaoudi et al. reveló una reducción de la ansiedad autoinformada en humanos tratados con *L. helveticus* R0052 y *B. longum* R0175 (Messaoudi et al., 2011). Se han observado efectos similares en otras investigaciones sobre el estado de ánimo. Por ejemplo, en un ensayo controlado aleatorizado reciente (Steenbergen et al., 2015), hombres y mujeres sanos consumieron un producto placebo o una mezcla de varios probióticos (*B. bifidum* W23, *B. lactis* W52, *L. acidophilus* W37, *L. brevis* W63, *L. casei* W56, *L. salivarius* W24 y *L. lactis* W19 y W58). En relación con el placebo, los participantes tratados con probióticos exhibieron una reactividad sustancialmente reducida al estado de ánimo triste (evaluado por el Índice de Leiden de la Escala de Sensibilidad a la Depresión). Por tanto, la administración de probióticos de forma independiente o en combinación puede tener implicaciones neurológicas beneficiosas y en concreto, puede afectar positivamente la motricidad en la infancia temprana (Cerdó et al., 2017).

Microbiota y cognición

Continuamos analizando la posible relación entre la microbiota y el neurodesarrollo estudiando su conexión con la cognición en niños. Partiendo de los datos iniciales de Cerdó et al. (Cerdó, 2018), nuestro grupo había observado que la microbiota era diferente en relación a la cognición. Concretamente, el análisis de β -diversidad determinada mediante el análisis UniFrac mostró dos comunidades diferentes, una asociando con el grupo por encima y otra con el grupo por debajo de la mediana de los valores de la subescala de cognición compuesta (COGCOM) del test de Bayley®-III. Estas muestras también presentaron diferencias en su α -diversidad en los índices de Simpson, Shannon y Evenness, que fueron superiores en la microbiota de los niños con COGCOM por encima de la mediana, mientras que hubo una Dominancia reducida en este grupo. Por otro lado, cuando se estudió la metaproteómica de la microbiota, se encontraron

diferencias significativas en la abundancia de varias enzimas entre los grupos de COGCOM. Un hallazgo interesante fue que la HAL, una enzima que cataliza la desaminación no oxidativa de la His dando lugar a Uro, fue significativamente más abundante en la microbiota intestinal de los niños con un valor de COGCOM por encima de la mediana ($p < 0,05$).

Siguiendo esta pista, realizamos un análisis *in vitro* de esta actividad HAL en la microbiota intestinal de niños de 6 meses, y obtuvimos una correlación positiva entre los valores de COGCOM y los de HAL. La His también es el aminoácido precursor, a través de la ruta de la HDC, de la Him, un neurotransmisor que se ha asociado históricamente con la función cognitiva (Alvarez, 2009). El siguiente paso fue medir de los metabolitos His, Him, Uro e ImP en orina, heces y metaboloma intracelular de la microbiota fecal de los niños mediante UHPLC-MS/MS. Debido a que es la HAL de la microbiota la que fue medida y demostrada estar aumentada en los niños por encima de la mediana, se quiso comprobar si existía alguna relación entre las concentraciones de los metabolitos de la ruta de la HAL en heces y en metabolismo intracelular microbiano. El análisis de Spearman reveló que había una correlación significativa y positiva entre las concentraciones microbianas intracelulares y las fecales del mismo metabolito, confirmando el papel de la microbiota en este metabolismo. A continuación, quisimos conocer si las concentraciones entre el metaboloma fecal del huésped, asociado con la microbiota, tenían relación con el metaboloma en orina, donde finalmente se excretan los productos de degradación de la histidina. Comprobamos que, en este caso, el ImP y el ratio ImP/His en orina correlacionaban positivamente con su concentración en heces. El ImP es un producto microbiano y final en el metabolismo de la histidina por la ruta de la HAL, por lo que es un buen indicador de los hallazgos obtenidos en relación al papel de la microbiota en el metabolismo. Por último, quisimos estudiar la presencia de los metabolitos en la orina de los niños. Observamos que, de forma significativa, la orina de

los niños con COGCOM por encima de la mediana tenían menor concentración His, pero mayor concentración de Uro, lo que podría indicar que en esos niños tiene un mayor catabolismo, principalmente debido a la HAL. Esto se confirmó con las medidas en el ratio de la His/Uro en orina, que estaba disminuido en los niños con COGCOM por encima de la mediana. Los resultados confirmaron nuestros hallazgos por proteómica e *in vitro* de la medida de la HAL, pues a mayor rendimiento enzimático, menor cantidad de sustrato (His) y mayor cantidad de producto (Uro). Estos valores pueden indicar la presencia de histidinemia en muestras de niños con COGCOM por debajo de la mediana, que se caracteriza por un aumento de las concentraciones de histidina en sangre y orina, un descenso en el urocanato y resulta de una disminución de la actividad de la proteína HAL. La histidinemia es un trastorno metabólico caracterizado por niveles elevados de histidina en los fluidos corporales que se asocia con retraso mental y defectos del habla (Kawai et al., 2005). Mejorar los métodos para la detección de enfermedades pediátricas debe ser importante para garantizar un rápido diagnóstico y tratamiento a los niños.

En relación a la composición de la microbiota, anteriormente nuestro grupo había observado que existían diferencias significativas entre las comunidades microbianas de los niños con un COGCOM por encima y por debajo de la mediana, respectivamente, y además estas diferencias estaban influidas por la semana gestacional a la que las madres daban a luz. Concretamente, los taxones dentro de *Lactococcus* y *Lachnospiraceae_Incertae_Sedis* estaban aumentados significativamente en niños con COGCOM por debajo de la mediana. Por el contrario, los taxones dentro de *Bacteroides* mostraron una mayor abundancia en niños con COGCOM por encima de la mediana. Se quiso conocer si existía una correlación entre la abundancia de estas especies significativas y los metabolitos fecales e intracelulares bacterianos que se generaron. Al realizar la correlación de Spearman, se obtuvieron correlaciones positivas para *Lactococcus* con el ratio Him/Uro en heces; *Lachnospiraceae_Incertae_Sedis* con la

Him intracelular y al ratio Him/His intracelular; y *Bacteroides* con la His intracelular. Esto concuerda con lo descrito por Liang et al. (Liang et al., 2021), donde describieron que las especies productoras de Him, entre las que se encuentra *Lactococcus* son más abundantes en las heces de los pacientes con enfermedad de Parkinson. Estas correlaciones indican que existe una relación entre el COGCOM, la microbiota intestinal y los metabolitos de la histidina.

A continuación, quisimos comprobar si la microbiota era capaz de trasladar el rendimiento cognitivo de su huésped. Así, nos planteamos continuar con un enfoque *in vivo* y procedimos a analizar la composición y funcionalidad de la microbiota intestinal de ratones GF humanizados con microbiota de niños de nuestro estudio, y su asociación con el fenotipo de neurodesarrollo del donante humano en el receptor murino.

Se realizó a los ratones un test de Open Field (OF) y otro de Novel Object Recognition (NORT). El test de reconocimiento de objetos es una prueba de uso común para la evaluación de las funciones de memoria en roedores (Akkerman et al., 2012). Al realizar el análisis comparativo entre el perfil de cognición (COGCOM) de los niños que fueron donantes de la microbiota de cada ratón con los resultados del test de reconocimiento de objetos, hubo una asociación significativa entre los resultados de los ratones y los de sus donantes, siendo superior el neurodesarrollo de los ratones que habían recibido una microbiota de niños con un rendimiento cognitivo por encima de la mediana. Estos resultados concuerdan con los de Lee et al. (Lee et al., 2020), donde vieron cómo el fenotipo cognitivo del donante se transfería a los ratones a través del FMT, donde una microbiota envejecida por sí misma es suficiente para producir un descenso en la cognición, comparados con microbiotas más jóvenes. Otro estudio reveló que los ratones GF que recibieron muestras fecales de niños con autismo desarrollaron comportamientos similares al autismo, en comparación con el grupo control (Sharon et al., 2019). Debido

a estas diferencias en el fenotipo, analizamos la composición microbiana de las muestras fecales de los ratones. Obtuvimos diferencias significativas en la α -diversidad, donde el grupo que había recibido microbiota de niños con COGCOM por encima de la mediana tuvo un mayor número de individuos, Dominancia e índice de Berger-Parker. La β -diversidad se estudió con un análisis UniFrac y tanto las distancias weighted como las unweighted fueron significativas, dando dos comunidades microbianas diferentes para cada grupo de COGCOM, por encima y por debajo de la mediana, controlando para las covariables de tanda de experimentación y semana de gestación en el momento del parto, que como se vio en estudios anteriores, influía en la separación por grupos de COGCOM. Para analizar la abundancia diferencial de las especies en función a los grupos de COGCOM, realizamos un modelo lineal general multivariante corregido por las covariables semana gestacional y tanda de experimentación de los ratones. Observamos un incremento en el grupo de ratones que habían recibido la microbiota de niños con COGCOM por encima de la mediana de los filos Actinobacteria y Bacteroidetes, y un descenso del filo Verrucomicrobia. A nivel de familia, se mantuvo la diferencia significativa que existía entre los niños humanos de Bacteroidaceae incrementada en el grupo por encima de la mediana. Además, las muestras por encima de la mediana estuvieron enriquecidas en Bifidobacteriaceae y Eubacteriaceae, y empobrecidas en Akkermansiaceae. De manera similar que en los humanos, los ratones matuvieron diferencias significativas en las abundancias de *Bacteroides* por encima de la mediana, y *Lachnospiracea_incertae_sedis* por debajo de la mediana. En un estudio de asociación de la microbiota con el rendimiento cognitivo (Carlson et al., 2018), los investigadores encontraron que el cluster con niveles altos de *Bacteroides* mostraron el nivel más alto de rendimiento (percentil 90). Adicionalmente, el grupo por encima de la mediana estaba enriquecido en *Bifidobacterium*, *Clostridium sensu stricto*, *Eubacterium*, entre otros géneros. En humanos, la ausencia de *Bifidobacterium* a los 30 días de vida en recién

nacidos prematuros se ha asociado con deterioro del neurodesarrollo en la infancia, que podría ser revertido por la administración de determinadas cepas de *Bifidobacterium* (Beghetti et al., 2021). Por debajo de la mediana, los géneros *Akkermansia*, *Caecibacterium* y *Unclass_Bacteroidaceae* estaban incrementados de manera significativa. La especie *Akkermansia muciniphila* se ha descrito como un NGP con efectos beneficiosos para el control de la obesidad, diabetes y enfermedades metabólicas. Recientemente, un grupo de investigadores (Higarza et al., 2021) encontraron que *Akkermansia muciniphila* CIP107961 conseguía revertir la disfunción cognitiva inducida por el exceso de grasas y colesterol en ratas con esteatohepatitis no alcohólica. Estos datos contrastan con nuestros resultados, por lo que se requieren de más estudios para comprobar los resultados.

Por último, con el fin de confirmar nuestra hipótesis de que el neurodesarrollo está modulado por el metabolismo de la histidina, realizamos una medida de los metabolitos de la histidina en las muestras murinas de heces, metaboloma intracelular de la microbiota, orina, suero y cerebro. Obtuvimos resultados interesantes, como que la His estaba aumentada de manera significativa en la orina de los ratones que mostraron peor rendimiento en la prueba de NORT, coincidiendo esto con los resultados anteriormente vistos en humanos. Asimismo, se encontró una mayor concentración del Uro en el metaboloma intracelular de los ratones con mejores resultados en la prueba de NORT, indicando un paralelismo con los humanos, donde las distintas microbiotas de los donantes también producen perfiles diferentes de metabolomas en los ratones.

Medida del metaboloma

A pesar de la evidencia que vincula la disbiosis del microbioma intestinal con manifestaciones de la enfermedad en sitios distantes del intestino, la mayoría de los estudios no han considerado el efecto del microbioma y su variedad de productos en la

multitud de vías moleculares en las que están potencialmente involucrados. El último capítulo de este trabajo expone un método rápido y simultáneo para la medida de los metabolitos de la His mediante UHPLC-MS/MS. Una cuantificación precisa de las alteraciones en el metabolismo de la His y su modulación por la microbiota es clave para evaluar el impacto de la disbiosis en enfermedades neurológicas, inmunitarias y metabólicas. La evaluación de los metabolitos de His ha sido cubierta parcialmente por varios métodos separados (Joo et al., 2012; Kammeyer et al., 1997; Zhu et al., 2018), con alcance, sensibilidad y precisión variables, impidiendo la cuantificación simultánea y la asociación de metabolitos y sus ratios con trastornos relacionados con la His. Para cubrir esta necesidad, hemos desarrollado y validado un método rápido, robusto y de alto rendimiento para la cuantificación de His y siete metabolitos bioactivos fácilmente extraídos de orina, heces y metaboloma de microbiota humana y de ratón, mediante cromatografía líquida en tándem con espectrometría de masas. A pesar de que los compuestos tenían diferentes propiedades fisicoquímicas, logramos medir simultáneamente los metabolitos de histidina con un tiempo de ejecución de 6,5 minutos. Nuestro enfoque novedoso captura el metabolismo de la His en un solo ensayo con un alto nivel de precisión y reproducibilidad, lo que lo hace especialmente interesante para el fenotipado metabólico de la microbiota profunda en grandes estudios de enfermedades y la detección rutinaria posnatal de alteraciones en la vía de la His.

No existe un “*gold standard*” de referencia de una microbiota intestinal humana con capacidad de promover la salud metabólica del huésped. Sin embargo, a partir del estudio de la composición a través de estudios bioinformáticos e *in vivo*, y del análisis del metaboloma generado por parte de la microbiota, se puede avanzar en el conocimiento para entender la influencia de la microbiota en el huésped. Conocer qué mecanismos moleculares pueden estimular la actividad microbiana en el lumen intestinal será el objetivo de futuros experimentos.

Conclusiones

1. La composición taxonómica de la microbiota intestinal de los niños del estudio es distinta en función del BMI de la madre previo al embarazo, y además está influida por el tipo de parto y la lactancia materna.
2. El exceso de peso materno antes del embarazo imprime una microbiota intestinal cuyo desempeño metabólico puede transferirse como componente hereditario. Concretamente, las actividades enzimáticas glicosidasas microbianas están aumentadas en niños de madres con sobrepeso y obesidad, pudiendo influir en el metabolismo de carbohidratos y en el fenotipo obesogénico.
3. La microbiota fecal de niños de 6 meses transferida a ratones gnotobióticos les imprime también el fenotipo de obesidad. No obstante, este fenotipo no es dependiente exclusivamente de las actividades glicosidasa, sino, además, de la ingesta energética.
4. La microbiota está asociada a la motricidad fina, parámetro medible de neurodesarrollo, en niños de 18 meses. Las comunidades microbianas son diferentes y están influidas por el BMI de la madre y la lactancia materna.
5. Las especies predominantes en niños con mejor rendimiento motriz son, entre otras, *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*, especies que pueden ser utilizadas de forma preventiva y terapéutica debido a su amplio uso como probióticos clásicos.

6. Existe una asociación entre la microbiota intestinal y el rendimiento cognitivo en las primeras etapas de la vida, donde la regulación del metabolismo de la histidina por parte de la microbiota intestinal es clave y significativamente diferente, pues se ha encontrado que la actividad enzimática histidina amonio-liasa está aumentada en niños con mejor cognición, así como los productos de esta ruta metabólica.

7. El perfil de desarrollo cognitivo de niños de 6 meses se traslada de forma eficiente a través de la transferencia de microbiota en ratones gnotobióticos. Este hallazgo puede estar mediado por el metabolismo de la microbiota sobre la histidina.

8. La determinación simultánea, rápida y no invasiva de los compuestos bioactivos del metabolismo de la histidina, puede constituir un biomarcador medible clave para entender la funcionalidad de la microbiota en la fisiología del huésped.

Conclusions

1. The taxonomic composition of the infant gut microbiota from our study is different depending on the BMI of the mother prior to pregnancy, and it is also influenced by the type of delivery and breastfeeding.
2. Maternal excess weight before pregnancy imprints an intestinal microbiota whose metabolic performance can be transferred as a hereditary component. Specifically, microbial glycosidase enzyme activities are increased in children from overweight and obese mothers, and they may influence carbohydrate metabolism and the obesogenic phenotype.
3. The fecal microbiota of 6-month-old children transferred to gnotobiotic mice also gives them the obesity phenotype. However, this phenotype is not exclusively dependent on glycosidase activities, but also on energy intake.
4. The microbiota is associated with fine motor skills, a measurable parameter of neurodevelopment, in 18-month-old children. The microbial communities are different and are influenced by the mother's BMI and breastfeeding.
5. The predominant species in children with better motor performance are, among others, *Bifidobacterium* and *Lactobacillus*, species that can be used preventively and therapeutically due to their wide use as classic probiotics.

6. There is an association between the gut microbiota and cognitive performance in early life, where regulation of histidine metabolism by the gut microbiota is key and significantly different, since it has been found that the enzymatic activity histidine ammonia-lyase is increased in children with better cognition, as well as the products of this metabolic pathway.
7. The cognitive development profile of 6-month-old children is efficiently translated through microbiota transfer in gnotobiotic mice. This finding may be mediated by the metabolism of the microbiota on histidine.
8. Simultaneous, rapid and non-invasive determination of the bioactive compounds of histidine metabolism may constitute a key measurable biomarker to understand the functionality of the microbiota in the physiology of the host.

Referencias

- Acuña, I., Ruiz, A., Cerdó, T., Cantarero, S., López-Moreno, A., Aguilera, M., Campoy, C., & Suárez, A. (2021). Rapid and simultaneous determination of histidine metabolism intermediates in human and mouse microbiota and biotrices. *BioFactors*, biof.1766. <https://doi.org/10.1002/biof.1766>
- AESAN. (2019). *Prevalencia de sobrepeso y obesidad en España en el informe “The heavy burden of obesity” (OCDE 2019) y en otras fuentes de datos. Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición. Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social. Gobierno de España.*
- Agus, A., Planchais, J., & Sokol, H. (2018). Gut Microbiota Regulation of Tryptophan Metabolism in Health and Disease. *Cell Host & Microbe*, 23(6), 716–724. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.05.003>
- Akkerman, S., Prickaerts, J., Steinbusch, H. W. M., & Blokland, A. (2012). Object recognition testing: Statistical considerations. *Behavioural Brain Research*, 232(2), 317–322. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2012.03.024>
- Albert, E., Walker, J., Thiesen, A., Churchill, T., & Madsen, K. (2010). Cis-Urocanic Acid Attenuates Acute Dextran Sodium Sulphate-Induced Intestinal Inflammation. *PLoS ONE*, 5(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013676>
- Alvarez, E. O. (2009). The role of histamine on cognition. *Behavioural Brain Research*, 199(2), 183–189. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2008.12.010>
- Analytical Methods Committee. (1994). Is my calibration linear? *Analyst*, 119, 2363–2366.
- Anders, S., & Huber, W. (2010). Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biology*, 11(10), R106. <https://doi.org/10.1186/gb-2010-11-10-r106>
- Armougom, F., Henry, M., Vialettes, B., Raccach, D., & Raoult, D. (2009). Monitoring Bacterial Community of Human Gut Microbiota Reveals an Increase in Lactobacillus in Obese Patients and Methanogens in Anorexic Patients. *PLOS ONE*, 4(9), e7125. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007125>
- Arumugam, M., Raes, J., Pelletier, E., Le Paslier, D., Yamada, T., Mende, D. R., Fernandes, G. R., Tap, J., Bruls, T., Batto, J.-M., Bertalan, M., Borruel, N., Casellas, F., Fernandez, L., Gautier, L., Hansen, T., Hattori, M., Hayashi, T., Kleerebezem, M., ... Bork, P. (2011). Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*, 473(7346), 174–180. <https://doi.org/10.1038/nature09944>
- Azaïs-Braesco, V., Bresson, J. L., Guarner, F., & Corthier, G. (2010). Not all lactic acid bacteria are probiotics, ...but some are. *British Journal of Nutrition*, 103(7), 1079–1081. <https://doi.org/10.1017/S0007114510000723>
- Bäckhed, F., Ding, H., Wang, T., Hooper, L. V., Koh, G. Y., Nagy, A., Semenkovich, C. F., & Gordon, J. I. (2004). The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(44), 15718–15723. <https://doi.org/10.1073/pnas.0407076101>
- Bayley, N. (2006). *Bayley scales of infant and toddler development* (3rd ed.).
- Beghetti, I., Barone, M., Turrone, S., Biagi, E., Sansavini, A., Brigidi, P., Corvaglia, L., & Aceti, A. (2021). Early-life gut microbiota and neurodevelopment in preterm infants: Any role for Bifidobacterium? *European Journal of Pediatrics*. <https://doi.org/10.1007/s00431-021-04327-1>
- Beltrán-Barrientos, L. M., Garcia, H. S., Reyes-Díaz, R., Estrada-Montoya, M. C., Torres-Llanez, M. J.,

- Hernández-Mendoza, A., González-Córdova, A. F., & Vallejo-Cordoba, B. (2019). Cooperation between *Lactococcus lactis* NRRL B-50571 and NRRL B-50572 for Aroma Formation in Fermented Milk. *Foods*, *8*(12), 645. <https://doi.org/10.3390/foods8120645>
- Bercik, P., Denou, E., Collins, J., Jackson, W., Lu, J., Jury, J., Deng, Y., Blennerhassett, P., Macri, J., McCoy, K. D., Verdu, E. F., & Collins, S. M. (2011). The Intestinal Microbiota Affect Central Levels of Brain-Derived Neurotropic Factor and Behavior in Mice. *Gastroenterology*, *141*, 599–609. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.04.052>
- Bervoets, L., Van Hoorenbeeck, K., Kortleven, I., Van Noten, C., Hens, N., Vael, C., Goossens, H., Desager, K. N., & Vankerckhoven, V. (2013). Differences in gut microbiota composition between obese and lean children: A cross-sectional study. *Gut Pathogens*, *5*(1), 10. <https://doi.org/10.1186/1757-4749-5-10>
- Bokulich, N. A., Chung, J., Battaglia, T., Henderson, N., Jay, M., Li, H., D. Lieber, A., Wu, F., Perez-Perez, G. I., Chen, Y., Schweizer, W., Zheng, X., Contreras, M., Dominguez-Bello, M. G., & Blaser, M. J. (2016). Antibiotics, birth mode, and diet shape microbiome maturation during early life. *Science Translational Medicine*, *8*(343), 1–13. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aad7121>
- Branco, A. C. C. C., Yoshikawa, F. S. Y., Pietrobon, A. J., & Sato, M. N. (2018). Role of Histamine in Modulating the Immune Response and Inflammation. *Mediators of Inflammation*, *2018*. <https://doi.org/10.1155/2018/9524075>
- Bravo, J. A., Forsythe, P., Chew, M. V., Escaravage, E., Savignac, H. M., Dinan, T. G., Bienenstock, J., & Cryan, J. F. (2011). Ingestion of *Lactobacillus* strain regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse via the vagus nerve. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(38), 16050–16055. <https://doi.org/10.1073/pnas.1102999108>
- Brosnan, M. E., & Brosnan, J. T. (2020). Histidine metabolism and function. *Journal of Nutrition*, *150*, 2570S–2575S. <https://doi.org/10.1093/jn/nxaa079>
- Bruch, J. D. (2016). Intestinal infection associated with future onset of an anxiety disorder: Results of a nationally representative study. *Brain, Behavior, and Immunity*, *57*, 222–226. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2016.05.014>
- Bukke, V. N., Archana, M., Villani, R., Romano, A. D., Wawrzyniak, A., Balawender, K., Orkisz, S., Beggiano, S., Serviddio, G., & Cassano, T. (2020). The dual role of glutamatergic neurotransmission in Alzheimer's disease: From pathophysiology to pharmacotherapy. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(20), 1–29. <https://doi.org/10.3390/ijms21207452>
- Camarinha-Silva, A., Jáuregui, R., Chaves-Moreno, D., Oxley, A. P. A., Schaumburg, F., Becker, K., Wos-Oxley, M. L., & Pieper, D. H. (2014). Comparing the anterior nares bacterial community of two discrete human populations using Illumina amplicon sequencing. *Environmental Microbiology*, *16*(9), 2939–2952. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12362>
- Camilleri, M. (2015). Peripheral mechanisms in appetite regulation. *Gastroenterology*, *148*(6), 1219–1233. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2014.09.016>
- Canadian Institutes of Health Research, Canada Foundation for Innovation, and by T. M. I. C. (TMIC). (2019). *The Human Metabolome Database*. N-Acetylhistamine.

<http://www.hmdb.ca/metabolites/HMDB0013253>

- Cani, P. D., & de Vos, W. M. (2017). Next-generation beneficial microbes: The case of *Akkermansia muciniphila*. *Frontiers in Microbiology*, 8(SEP). Scopus. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01765>
- Cano, P. G., Santacruz, A., Moya, Á., & Sanz, Y. (2012). *Bacteroides uniformis* CECT 7771 Ameliorates Metabolic and Immunological Dysfunction in Mice with High-Fat-Diet Induced Obesity. *PLOS ONE*, 7(7), e41079. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041079>
- Cantarel, B. L., Coutinho, P. M., Rancurel, C., Bernard, T., Lombard, V., & Henrissat, B. (2009). The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): An expert resource for Glycogenomics. *Nucleic Acids Research*, 37(Database issue), D233-238. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn663>
- Cantarero, S., Zafra-Gomez, A., Ballesteros, O., Navalon, A., Vilchez, J. L., Verge, C., & De Ferrer, J. A. (2011). Matrix effect study in the determination of linear alkylbenzene sulfonates in sewage sludge samples. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 30(4), 813–818. <https://doi.org/10.1002/etc.447>
- Carlson, A. L., Xia, K., Azcarate-Peril, M. A., Goldman, B. D., Ahn, M., Styner, M. A., Thompson, A. L., Geng, X., Gilmore, J. H., & Knickmeyer, R. C. (2018). Infant Gut Microbiome Associated With Cognitive Development. *Biological Psychiatry*, 83(2), 148–159. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2017.06.021>
- Castro-Nallar, E., Bendall, M. L., Pérez-Losada, M., Sabuncyan, S., Severance, E. G., Dickerson, F. B., Schroeder, J. R., Yolken, R. H., & Crandall, K. A. (2015). Composition, taxonomy and functional diversity of the oropharynx microbiome in individuals with schizophrenia and controls. *PeerJ*, 3, e1140. <https://doi.org/10.7717/peerj.1140>
- CDER, & CVM. (2018). *Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research (CDER) Center for Veterinary Medicine (CVM)*.
- Cerdó, T. (2018). *Estructura y funcionalidad de la microbiota intestinal en niños nacidos de madres obesas y su efecto sobre el neurodesarrollo durante los primeros meses de vida*. Universidad de Granada. <https://digibug.ugr.es/handle/10481/52515>
- Cerdó, T., García-Valdés, L., Altmäe, S., Ruíz, A., Suárez, A., & Campoy, C. (2016). Role of microbiota function during early life on child's neurodevelopment. *Trends in Food Science and Technology*, 57, 273–288. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.08.007>
- Cerdó, T., Ruíz, A., Suárez, A., & Campoy, C. (2017). Probiotic, Prebiotic, and Brain Development. *Nutrients*, 9(11). <https://doi.org/10.3390/nu9111247>
- Chang, C.-J., Lin, T.-L., Tsai, Y.-L., Wu, T.-R., Lai, W.-F., Lu, C.-C., & Lai, H.-C. (2019). Next generation probiotics in disease amelioration. *Journal of Food and Drug Analysis*, 27(3), 615–622. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2018.12.011>
- Chen, H., Nwe, P.-K., Yang, Y., Rosen, C. E., Bielecka, A. A., Kuchroo, M., Cline, G. W., Kruse, A. C., Ring, A. M., Crawford, J. M., & Palm, N. W. (2019). A Forward Chemical Genetic Screen Reveals Gut Microbiota Metabolites That Modulate Host Physiology. *Cell*, 177(5), 1217-1231.e18. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.03.036>
- Chen, J. (2012). *Package 'GUniFrac'*. Available online at: <https://cran.r->

[project.org/web/packages/GUniFrac/GUniFrac.pdf](https://cran.r-project.org/web/packages/GUniFrac/GUniFrac.pdf) (accessed on: December 2018).

- Chen, Y., Yang, F., Lu, H., Wang, B., Chen, Y., Lei, D., Wang, Y., Zhu, B., & Li, L. (2011). Characterization of fecal microbial communities in patients with liver cirrhosis. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, *54*(2), 562–572. <https://doi.org/10.1002/hep.24423>
- Chessel, D., Dufour, A., & Thioulouse, J. (2004). *The ade4 Package – I: One-Table Methods*. Available online at: <https://cran.r-project.org/doc/Rnews/>. (Accessed on: December 2018).
- Christian, L. M., Galley, J. D., Hade, E. M., Schoppe-Sullivan, S., Kamp Dush, C., & Bailey, M. T. (2015). Gut microbiome composition is associated with temperament during early childhood. *Brain, Behavior, and Immunity*, *45*, 118–127. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2014.10.018>
- Chu, Z., Liu, P., Li, X., Liu, Y., Liu, F., Lei, G., Yang, L., Deng, L., & Dang, Y. (2020). Microinjection of valproic acid into the ventrolateral orbital cortex exerts an antinociceptive effect in a rat of neuropathic pain. *Psychopharmacology*, *237*(8), 2509–2516. <https://doi.org/10.1007/s00213-020-05551-7>
- Clarke, G., Grenham, S., Scully, P., Fitzgerald, P., Moloney, R. D., Shanahan, F., Dinan, T. G., & Cryan, J. F. (2013). The microbiome-gut-brain axis during early life regulates the hippocampal serotonergic system in a sex-dependent manner. *Molecular Psychiatry*, *18*, 666–673. <https://doi.org/10.1038/mp.2012.77>
- ClinicalTrials.gov. (NCT02670811). *Antihypertensive Effect of Fermented Milk With Lactococcus Lactis on Prehypertensive Subjects*. Available online: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02670811> (accessed on 27 April 2021).
- ClinicalTrials.gov. (NCT02637115). *Evaluation of the Effects Associated With the Administration of Akkermansia Muciniphila on Parameters of Metabolic Syndrome (Microbes4U)*. Available online at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02637115> (accessed on 27 April 2021).
- ClinicalTrials.gov. (NCT03657186). *Study to Evaluate Benefit of ProbioSatys™ on Weight Reduction in Overweight Subjects*. Available online: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03657186> (accessed on 27 April 2021).
- Cole, J. R., Chai, B., Marsh, T. L., Farris, R. J., Wang, Q., Kulam, S. A., Chandra, S., McGarrell, D. M., Schmidt, T. M., Garrity, G. M., Tiedje, J. M., & Ribosomal Database Project. (2003). The Ribosomal Database Project (RDP-II): Previewing a new autoaligner that allows regular updates and the new prokaryotic taxonomy. *Nucleic Acids Research*, *31*(1), 442–443. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg039>
- Collado, M. C., Isolauri, E., Laitinen, K., & Salminen, S. (2008). Distinct composition of gut microbiota during pregnancy in overweight and normal-weight women. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *88*(4), 894–899. <https://doi.org/10.1093/ajcn/88.4.894>
- Correale, J., & Farez, M. F. (2013). Modulation of multiple sclerosis by sunlight exposure: Role of cis-urocanic acid. *Journal of Neuroimmunology*, *261*(1–2), 134–140. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2013.05.014>
- Cryan, J. F., O’Riordan, K. J., Cowan, C. S. M., Sandhu, K. V., Bastiaanssen, T. F. S., Boehme, M., Codagnone, M. G., Cussotto, S., Fulling, C., Golubeva, A. V., Guzzetta, K. E., Jaggar, M., Long-Smith, C. M., Lyte, J. M., Martin, J. A., Molinero-Perez, A., Moloney, G., Morelli, E., Morillas, E., ... Dinan, T. G. (2019). The Microbiota-Gut-Brain Axis. *Physiological Reviews*, *99*(4), 1877–2013.

<https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2018>

- Cryan, J. F., O’Riordan, K. J., Sandhu, K., Peterson, V., & Dinan, T. G. (2020). The gut microbiome in neurological disorders. In *The Lancet Neurology* (Vol. 19, Issue 2, pp. 179–194). Lancet Publishing Group. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(19\)30356-4](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(19)30356-4)
- Currie, L. A. (1999). Detection and quantification limits: Origins and historical overview. *Analytica Chimica Acta*, 391, 127–134.
- Davari, S., Talaei, S. A., Alaei, H., & Salami, M. (2013). Probiotics treatment improves diabetes-induced impairment of synaptic activity and cognitive function: Behavioral and electrophysiological proofs for microbiome-gut-brain axis. *Neuroscience*, 240, 287–296. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.02.055>
- David, L. A., Maurice, C. F., Carmody, R. N., Gootenberg, D. B., Button, J. E., Wolfe, B. E., Ling, A. V., Devlin, A. S., Varma, Y., Fischbach, M. A., Biddinger, S. B., Dutton, R. J., & Turnbaugh, P. J. (2014). Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature*, 505(7484), 559–563. <https://doi.org/10.1038/nature12820>
- de Groot, P. F., Frissen, M. N., de Clercq, N. C., & Nieuwdorp, M. (2017). Fecal microbiota transplantation in metabolic syndrome: History, present and future. *Gut Microbes*, 8(3), 253–267. <https://doi.org/10.1080/19490976.2017.1293224>
- De Palma, G., Blennerhassett, P., J.Lu, Deng, Y., Park, A. J., Green, W., Denou, E., Silva, M. A., Santacruz, A., Sanz, Y., Surette, M. G., Verdu, E. F., Collins, S. M., & Bercik, P. (2015). Microbiota and host determinants of behavioural phenotype in maternally separated mice. *Nature Communications*, 6:7735. <https://doi.org/10.1038/ncomms8735>
- de Vos, W. M., & Nieuwdorp, M. (2013). Genomics: A gut prediction. *Nature*, 498(7452), 48–49. <https://doi.org/10.1038/nature12251>
- Déchelotte, P., Breton, J., Trotin-Piccolo, C., Grube, B., Erlenbeck, C., Bothe, G., Fetissov, S. O., & Lambert, G. (2021). The Probiotic Strain H. alvei HA4597® Improves Weight Loss in Overweight Subjects under Moderate Hypocaloric Diet: A Proof-of-Concept, Multicenter Randomized, Double-Blind Placebo-Controlled Study. *Nutrients*, 13(6), 1902. <https://doi.org/10.3390/nu13061902>
- Delzenne, N. M., & Cani, P. D. (2008). [Gut microflora is a key player in host energy homeostasis]. *Medicine Sciences: M/S*, 24(5), 505–510. <https://doi.org/10.1051/medsci/2008245505>
- Depommier, C., Everard, A., Druart, C., Plovier, H., Van Hul, M., Vieira-Silva, S., Falony, G., Raes, J., Maiter, D., Delzenne, N. M., de Barsey, M., Loumaye, A., Hermans, M. P., Thissen, J.-P., de Vos, W. M., & Cani, P. D. (2019). Supplementation with *Akkermansia muciniphila* in overweight and obese human volunteers: A proof-of-concept exploratory study. *Nature Medicine*, 25(7), 1096–1103. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0495-2>
- Desbonnet, L., Garrett, L., Clarke, G., Bienenstock, J., & Dinan, T. G. (2009). The probiotic *Bifidobacteria infantis*: An assessment of potential antidepressant properties in the rat. *Journal of Psychiatric Research*, 43(2), 164–174. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2008.03.009>
- Dewulf, E. M., Cani, P. D., Claus, S. P., Fuentes, S., Puylaert, P. G. B., Neyrinck, A. M., Bindels, L. B., de Vos, W. M., Gibson, G. R., Thissen, J.-P., & Delzenne, N. M. (2013). Insight into the prebiotic

- concept: Lessons from an exploratory, double blind intervention study with inulin-type fructans in obese women. *Gut*, 62(8), 1112–1121. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2012-303304>
- Diaz Heijtz, R., Wang, S., Anuar, F., Qian, Y., Björkholm, B., Samuelsson, A., Hibberd, M. L., Forssberg, H., & Pettersson, S. (2011). Normal gut microbiota modulates brain development and behavior. *PNAS*, 108(7), 3047–3052. <https://doi.org/10.1073/pnas.1010529108>
- DiNicolantonio, J. J., McCarty, M. F., & O'Keefe, J. H. (2018). Role of dietary histidine in the prevention of obesity and metabolic syndrome. *Open Heart*, 5(2), e000676. <https://doi.org/10.1136/openhrt-2017-000676>
- Engels, C., Ruscheweyh, H.-J., Beerenwinkel, N., Lacroix, C., & Schwab, C. (2016). The Common Gut Microbe *Eubacterium hallii* also Contributes to Intestinal Propionate Formation. *Frontiers in Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00713>
- Everard, A., Belzer, C., Geurts, L., Ouwerkerk, J. P., Druart, C., Bindels, L. B., Guiot, Y., Derrien, M., Muccioli, G. G., Delzenne, N. M., de Vos, W. M., & Cani, P. D. (2013). Cross-talk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(22), 9066–9071. <https://doi.org/10.1073/pnas.1219451110>
- Everard, A., Lazarevic, V., Derrien, M., Girard, M., Muccioli, G. G., Muccioli, G. M., Neyrinck, A. M., Possemiers, S., Van Holle, A., François, P., de Vos, W. M., Delzenne, N. M., Schrenzel, J., & Cani, P. D. (2011). Responses of gut microbiota and glucose and lipid metabolism to prebiotics in genetic obese and diet-induced leptin-resistant mice. *Diabetes*, 60(11), 2775–2786. <https://doi.org/10.2337/db11-0227>
- Fan, Y., & Pedersen, O. (2021). Gut microbiota in human metabolic health and disease. *Nature Reviews Microbiology*, 19(1), 55–71. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0433-9>
- FAO, & WHO. (2001). *Food and Agriculture Organization; World Health Organization Expert Consultation. Evaluation of Health and Nutritional Properties of Powder Milk and Live Lactic Acid Bacteria. Córdoba, Argentina. Available online: Ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/probio_report_en.pdf (accessed on 8 February 2021).*
- Farag, M. A., Abdelwareth, A., Sallam, I. E., el Shorbaji, M., Jehmlich, N., Fritz-Wallace, K., Serena Schäpe, S., Rolle-Kampczyk, U., Ehrlich, A., Wessjohann, L. A., & von Bergen, M. (2020). Metabolomics reveals impact of seven functional foods on metabolic pathways in a gut microbiota model. *Journal of Advanced Research*, 23, 47–59. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2020.01.001>
- Feng, Q., Liang, S., Jia, H., Stadlmayr, A., Tang, L., Lan, Z., Zhang, D., Xia, H., Xu, X., Jie, Z., Su, L., Li, X., Li, X., Li, J., Xiao, L., Huber-Schönauer, U., Niederseer, D., Xu, X., Al-Aama, J. Y., ... Wang, J. (2015). Gut microbiome development along the colorectal adenoma–carcinoma sequence. *Nature Communications*, 6(1), 6528. <https://doi.org/10.1038/ncomms7528>
- Filippis, F. D., Pellegrini, N., Vannini, L., Jeffery, I. B., Stora, A. L., Laghi, L., Serrazanetti, D. I., Cagno, R. D., Ferrocino, I., Lazzi, C., Turrone, S., Cocolin, L., Brigidi, P., Neviani, E., Gobbetti, M., O'Toole, P. W., & Ercolini, D. (2016). High-level adherence to a Mediterranean diet beneficially impacts the gut microbiota and associated metabolome. *Gut*, 65(11), 1812–1821. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-309957>

- Finegold, S. M., Dowd, S. E., Gontcharova, V., Liu, C., Henley, K. E., Wolcott, R. D., Youn, E., Summanen, P. H., Granpeesheh, D., Dixon, D., Liu, M., Molitoris, D. R., & Green, J. A. (2010). Pyrosequencing study of fecal microflora of autistic and control children. *Anaerobe*, *16*(4), 444–453. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2010.06.008>
- Finegold, S. M., Molitoris, D., Song, Y., Liu, C., Vaisanen, M.-L., Bolte, E., McTeague, M., Sandler, R., Wexler, H., Marlowe, E. M., Collins, M. D., Lawson, P. A., Summanen, P., Baysallar, M., Tomzynski, T. J., Read, E., Johnson, E., Rolfé, R., Nasir, P., ... Kaul, A. (2002). Gastrointestinal Microflora Studies in Late-Onset Autism. *Clinical Infectious Diseases*, *35*(Supplement_1), S6–S16. <https://doi.org/10.1086/341914>
- Fischer, K. D., Knackstedt, L. A., & Rosenberg, P. A. (2021). Glutamate homeostasis and dopamine signaling: Implications for psychostimulant addiction behavior. *Neurochemistry International*, *144*(April 2020), 104896. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2020.104896>
- Flint, H. J., Scott, K. P., Duncan, S. H., Louis, P., & Forano, E. (2012). Microbial degradation of complex carbohydrates in the gut. *Gut Microbes*, *3*(4), 289–306. <https://doi.org/10.4161/gmic.19897>
- Flint, H. J., Scott, K. P., Louis, P., & Duncan, S. H. (2012). The role of the gut microbiota in nutrition and health. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, *9*(10), 577–589. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2012.156>
- Fröhlich, E. E., Farzi, A., Mayerhofer, R., Reichmann, F., Jac, A., Wagner, B., Zinser, E., Bordag, N., Magnes, C., Fröhlich, E., Kashofer, K., Gorkiewicz, G., & Holzer, P. (2016). Cognitive impairment by antibiotic-induced gut dysbiosis: Analysis of gut microbiota-brain communication. *Brain, Behavior, and Immunity*, *56*, 140–155. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2016.02.020>
- Fujisaka, S., Avila-pacheco, J., Soto, M., Kostic, A., Dreyfuss, J. M., Pan, H., Ussar, S., Altindis, E., Li, N., Bry, L., Clish, C. B., & Kahn, C. R. (2018). Diet, Genetics, and the Gut Microbiome Drive Dynamic Changes in Plasma Metabolites. *Cell Reports*, *22*(11), 3072–3086. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.02.060>
- Gao, R., Zhu, C., Li, H., Yin, M., Pan, C., Huang, L., Kong, C., Wang, X., Zhang, Y., Qu, S., & Qin, H. (2018). Dysbiosis Signatures of Gut Microbiota Along the Sequence from Healthy, Young Patients to Those with Overweight and Obesity. *Obesity*, *26*(2), 351–361. <https://doi.org/10.1002/oby.22088>
- Goh, Y. J., & Klaenhammer, T. R. (2015). Genetic mechanisms of prebiotic oligosaccharide metabolism in probiotic microbes. *Annual Review of Food Science and Technology*, *6*, 137–156. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-022814-015706>
- Goodrich, J. K., Waters, J. L., Poole, A. C., Sutter, J. L., Koren, O., Blekhman, R., Beaumont, M., Van Treuren, W., Knight, R., Bell, J. T., Spector, T. D., Clark, A. G., & Ley, R. E. (2014). Human Genetics Shape the Gut Microbiome. *Cell*, *159*(4), 789–799. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.09.053>
- Gu, S., Chen, Y., Zhang, X., Lu, H., Lv, T., Shen, P., Lv, L., Zheng, B., Jiang, X., & Li, L. (2016). Identification of key taxa that favor intestinal colonization of *Clostridium difficile* in an adult Chinese population. *Microbes and Infection*, *18*(1), 30–38. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2015.09.008>
- Hammer, Ø., Harper, D. A. T., & Ryan, P. (2001). *PAST-Palaeontological statistics*. Available at: https://www.uv.es/pardomv/pe/2001_1/past/pastprog/past.pdf Accessed on: May 2019.

- Han, S., Shannahan, S., & Pellish, R. (2016). Fecal Microbiota Transplant: Treatment Options for *Clostridium difficile* Infection in the Intensive Care Unit. *Journal of Intensive Care Medicine*, *31*(9), 577–586. <https://doi.org/10.1177/0885066615594344>
- Hart, P. H., & Norval, M. (2020). The Multiple Roles of Urocanic Acid in Health and Disease. *Journal of Investigative Dermatology*. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2020.07.017>
- Hasebe, K., Kendig, M. D., & Morris, M. J. (2021). Mechanisms Underlying the Cognitive and Behavioural Effects of Maternal Obesity. *Nutrients*, *13*(1), 240. <https://doi.org/10.3390/nu13010240>
- He, X., Parenti, M., Grip, T., Lönnerdal, B., Timby, N., Domellöf, M., Hernell, O., & Slupsky, C. M. (2019). Fecal microbiome and metabolome of infants fed bovine MFGM supplemented formula or standard formula with breast-fed infants as reference: A randomized controlled trial. *Scientific Reports*, *9*(1), 11589. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47953-4>
- Hernández, E., Bargiela, R., Diez, M. S., Friedrichs, A., Pérez-Cobas, A. E., Gosalbes, M. J., Knecht, H., Martínez-Martínez, M., Seifert, J., von Bergen, M., Artacho, A., Ruiz, A., Campoy, C., Latorre, A., Ott, S. J., Moya, A., Suárez, A., Martins dos Santos, V. A. P., & Ferrer, M. (2013). Functional consequences of microbial shifts in the human gastrointestinal tract linked to antibiotic treatment and obesity. *Gut Microbes*, *4*(4), 306–315. <https://doi.org/10.4161/gmic.25321>
- Heymsfield, S. B., & Wadden, T. A. (2017). Mechanisms, Pathophysiology, and Management of Obesity. *The New England Journal of Medicine*, *376*(3), 254–266. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1514009>
- Higarza, S. G., Arboleya, S., Arias, J. L., Gueimonde Fernández, M., & Arias, N. (2021). *Akkermansia muciniphila* and environmental enrichment reverse cognitive impairment associated with high-fat high-cholesterol consumption in rats. <https://doi.org/10.13039/501100011033>
- Hodo, T. W., de Aquino, M. T. P., Shimamoto, A., & Shanker, A. (2020). Critical Neurotransmitters in the Neuroimmune Network. *Frontiers in Immunology*, *11*(August), 1–26. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01869>
- Holmes, I., Harris, K., & Quince, C. (2012). Dirichlet multinomial mixtures: Generative models for microbial metagenomics. *PLoS ONE*, *7*(2), 30126. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030126>
- Horvath, A., Durdevic, M., Leber, B., di Vora, K., Rainer, F., Kronen, E., Douschan, P., Spindelboeck, W., Durchschein, F., Zollner, G., Stauber, R. E., Fickert, P., Stiegler, P., & Stadlbauer, V. (2020). Changes in the Intestinal Microbiome during a Multispecies Probiotic Intervention in Compensated Cirrhosis. *Nutrients*, *12*(6), 1874. <https://doi.org/10.3390/nu12061874>
- Hu, W., & Chen, Z. (2017). The roles of histamine and its receptor ligands in central nervous system disorders: An update. *Pharmacology and Therapeutics*, *175*, 116–132. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.02.039>
- Hu, Z., Zhang, Y., Li, Z., Yu, Y., Kang, W., Han, Y., Geng, X., Ge, S., & Sun, Y. (2016). Effect of *Helicobacter pylori* infection on chronic periodontitis by the change of microecology and inflammation. *Oncotarget*, *7*(41), 66700–66712. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.11449>
- Ibrahim, K. S., Abd-Elrahman, K. S., El Mestikawy, S., & Ferguson, S. S. G. (2020). Targeting vesicular glutamate transporter machinery: Implications on metabotropic glutamate receptor 5 signaling and behavior. *Molecular Pharmacology*, *98*(4), 314–327. <https://doi.org/10.1124/molpharm.120.000089>

- Jaacks, L. M., Vandevijvere, S., Pan, A., McGowan, C. J., Wallace, C., Imamura, F., Mozaffarian, D., Swinburn, B., & Ezzati, M. (2019). The obesity transition: Stages of the global epidemic. *The Lancet Diabetes & Endocrinology*, *7*(3), 231–240. [https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(19\)30026-9](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(19)30026-9)
- Jakobsson, H. E., Abrahamsson, T. R., Jenmalm, M. C., Harris, K., Quince, C., Jernberg, C., Björkstén, B., Engstrand, L., & Andersson, A. F. (2014). Decreased gut microbiota diversity, delayed Bacteroidetes colonisation and reduced Th1 responses in infants delivered by caesarean section. *Gut*, *63*(4), 559–566. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2012-303249>
- Jiang, H., Ling, Z., Zhang, Y., Mao, H., Ma, Z., Yin, Y., Wang, W., Tang, W., Tan, Z., Shi, J., Li, L., & Ruan, B. (2015). Altered fecal microbiota composition in patients with major depressive disorder. *Brain, Behavior, and Immunity*, *48*, 186–194. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2015.03.016>
- Jonduo, M. E., Wawae, L., Masiria, G., Suda, W., Hattori, M., Takayasu, L., Abdad, M. Y., Greenhill, A. R., Horwood, P. F., Pomat, W., & Umezaki, M. (2020). Gut microbiota composition in obese and non-obese adult relatives from the highlands of Papua New Guinea. *FEMS Microbiology Letters*, *367*(19), fnaa161. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnaa161>
- Joo, K. M., Han, J. Y., Son, E. D., Nam, G. W., Chung, H. Y., Jeong, H. J., Cho, J. C., & Lim, K. M. (2012). Rapid, simultaneous and nanomolar determination of pyroglutamic acid and cis-/trans-urocanic acid in human stratum corneum by hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, *897*, 55–63. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.04.008>
- Kammeyer, A., Pavel, S., Asghar, S. S., Bos, J. D., & Teunissen, M. B. M. (1997). Prolonged increase of cis-urocanic acid levels in human skin and urine after single total-body ultraviolet exposures. *Photochemistry and Photobiology*, *65*(3), 593–598. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1997.tb08611.x>
- Kang, D.-W., Park, J. G., Ilhan, Z. E., Wallstrom, G., LaBaer, J., Adams, J. B., & Krajmalnik-Brown, R. (2013). Reduced Incidence of Prevotella and Other Fermenters in Intestinal Microflora of Autistic Children. *PLoS ONE*, *8*(7), e68322. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068322>
- Kawai, Y., Moriyama, A., Asai, K., Coleman-Campbell, C. M., Sumi, S., Morishita, H., & Suchi, M. (2005). Molecular characterization of histidinemia: Identification of four missense mutations in the histidase gene. *Human Genetics*, *116*(5), 340–346. <https://doi.org/10.1007/s00439-004-1232-5>
- Keku, T. O., McCoy, A. N., & Azcarate-Peril, A. M. (2013). Fusobacterium spp. and colorectal cancer: Cause or consequence? *Trends in Microbiology*, *21*(10), 506–508. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2013.08.004>
- Koeth, R. A., Wang, Z., Levison, B. S., Buffa, J. A., Org, E., Sheehy, B. T., Britt, E. B., Fu, X., Wu, Y., Li, L., Smith, J. D., DiDonato, J. A., Chen, J., Li, H., Wu, G. D., Lewis, J. D., Warrier, M., Brown, J. M., Krauss, R. M., ... Hazen, S. L. (2013). Intestinal microbiota metabolism of L-carnitine, a nutrient in red meat, promotes atherosclerosis. *Nature Medicine*, *19*(5), 576–585. <https://doi.org/10.1038/nm.3145>
- Koh, A., Mannerås-Holm, L., Yunn, N. O., Nilsson, P. M., Ryu, S. H., Molinaro, A., Perkins, R., Smith, J. G., & Bäckhed, F. (2020). Microbial Imidazole Propionate Affects Responses to Metformin through p38γ-Dependent Inhibitory AMPK Phosphorylation. *Cell Metabolism*, *32*(4), 643–653.e4.

<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2020.07.012>

- Koh, A., Molinaro, A., Ståhlman, M., Khan, M. T., Schmidt, C., Mannerås-Holm, L., Wu, H., Carreras, A., Jeong, H., Olofsson, L. E., Bergh, P. O., Gerdes, V., Hartstra, A., de Brauw, M., Perkins, R., Nieuwdorp, M., Bergström, G., & Bäckhed, F. (2018). Microbially Produced Imidazole Propionate Impairs Insulin Signaling through mTORC1. *Cell*, *175*(4), 947-961.e17. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.09.055>
- Kopple, J. D., & Swendseid, M. E. (1975). Evidence that histidine is an essential amino acid in normal and chronically uremic man. *Journal of Clinical Investigation*, *55*(5), 881-891. <https://doi.org/10.1172/JCI108016>
- Korhonen, E., Bisevac, J., Hyttinen, J. M. T., Piippo, N., Hytti, M., Kaarniranta, K., Petrovski, G., & Kauppinen, A. (2020). UV-B-induced inflammasome activation can be prevented by cis-urocanic acid in human corneal epithelial cells. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, *61*(4). <https://doi.org/10.1167/iovs.61.4.7>
- Krall, J., Brygger, B. M., Sigurðardóttir, S. B., Ng, C. K. L., Bundgaard, C., Kehler, J., Nielsen, B., Bek, T., Jensen, A. A., & Frølund, B. (2016). Discovery of α -Substituted Imidazole-4-acetic Acid Analogues as a Novel Class of $\rho 1\gamma$ -Aminobutyric Acid Type A Receptor Antagonists with Effect on Retinal Vascular Tone. *ChemMedChem*, *11*(20), 2299-2310. <https://doi.org/10.1002/cmde.201600356>
- Lakka, H.-M., Laaksonen, D. E., Lakka, T. A., Niskanen, L. K., Kumpusalo, E., Tuomilehto, J., & Salonen, J. T. (2002). The metabolic syndrome and total and cardiovascular disease mortality in middle-aged men. *JAMA*, *288*(21), 2709-2716. <https://doi.org/10.1001/jama.288.21.2709>
- Larsbrink, J., Rogers, T. E., Hemsworth, G. R., McKee, L. S., Tauzin, A. S., Spadiut, O., Klintner, S., Pudlo, N. A., Urs, K., Koropatkin, N. M., Creagh, A. L., Haynes, C. A., Kelly, A. G., Cederholm, S. N., Davies, G. J., Martens, E. C., & Brumer, H. (2014). A discrete genetic locus confers xyloglucan metabolism in select human gut Bacteroidetes. *Nature*, *506*(7489), 498-502. <https://doi.org/10.1038/nature12907>
- Lee, J., Venna, V. R., Durgan, D. J., Shi, H., Hudobenko, J., Putluri, N., Petrosino, J., McCullough, L. D., & Bryan, R. M. (2020). Young versus aged microbiota transplants to germ-free mice: Increased short-chain fatty acids and improved cognitive performance. *Gut Microbes*, *12*(1), 1814107. <https://doi.org/10.1080/19490976.2020.1814107>
- Ley, R. E., Turnbaugh, P. J., Klein, S., & Gordon, J. I. (2006). Microbial ecology: Human gut microbes associated with obesity. *Nature*, *444*(7122), 1022-1023. <https://doi.org/10.1038/4441022a>
- Li, L., Su, Q., Xie, B., Duan, L., Zhao, W., Hu, D., Wu, R., & Liu, H. (2016). Gut microbes in correlation with mood: Case study in a closed experimental human life support system. *Neurogastroenterology and Motility: The Official Journal of the European Gastrointestinal Motility Society*, *28*(8), 1233-1240. <https://doi.org/10.1111/nmo.12822>
- Li, W., Kutas, M., Gray, J. A., Hagerman, R. H., & Olichney, J. M. (2020). The Role of Glutamate in Language and Language Disorders—Evidence from ERP and Pharmacologic Studies. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *119*(August), 217-241. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2020.09.023>
- Liang, Y., Cui, L., Gao, J., Zhu, M., Zhang, Y., & Zhang, H.-L. (2021). Gut Microbial Metabolites in Parkinson's Disease: Implications of Mitochondrial Dysfunction in the Pathogenesis and Treatment.

Molecular Neurobiology. <https://doi.org/10.1007/s12035-021-02375-0>

- Lim, M. Y., You, H. J., Yoon, H. S., Kwon, B., Lee, J. Y., Lee, S., Song, Y.-M., Lee, K., Sung, J., & Ko, G. (2017). The effect of heritability and host genetics on the gut microbiota and metabolic syndrome. *Gut*, *66*(6), 1031–1038. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-311326>
- Lin, H. V., Frassetto, A., Kowalik, E. J., Nawrocki, A. R., Lu, M. M., Kosinski, J. R., Hubert, J. A., Szeto, D., Yao, X., Forrest, G., & Marsh, D. J. (2012). Butyrate and propionate protect against diet-induced obesity and regulate gut hormones via free fatty acid receptor 3-independent mechanisms. *PloS One*, *7*(4), e35240. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035240>
- Ling, Z., Kong, J., Liu, F., Zhu, H., Chen, X., Wang, Y., Li, L., Nelson, K. E., Xia, Y., & Xiang, C. (2010). Molecular analysis of the diversity of vaginal microbiota associated with bacterial vaginosis. *BMC Genomics*, *11*(1), 488. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-488>
- Ling, Z., Li, Z., Liu, X., Cheng, Y., Luo, Y., Tong, X., Yuan, L., Wang, Y., Sun, J., Li, L., & Xiang, C. (2014). Altered Fecal Microbiota Composition Associated with Food Allergy in Infants. *Applied and Environmental Microbiology*, *80*(8), 2546–2554. <https://doi.org/10.1128/AEM.00003-14>
- Liu, Q., Duan, Z. P., Ha, D. K., Bengmark, S., Kurtovic, J., & Riordan, S. M. (2004). Synbiotic modulation of gut flora: Effect on minimal hepatic encephalopathy in patients with cirrhosis. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, *39*(5), 1441–1449. <https://doi.org/10.1002/hep.20194>
- Liu, R., Hong, J., Xu, X., Feng, Q., Zhang, D., Gu, Y., Shi, J., Zhao, S., Liu, W., Wang, X., Xia, H., Liu, Z., Cui, B., Liang, P., Xi, L., Jin, J., Ying, X., Wang, X., Zhao, X., ... Wang, W. (2017). Gut microbiome and serum metabolome alterations in obesity and after weight-loss intervention. *Nature Medicine*, *23*(7), 859–868. <https://doi.org/10.1038/nm.4358>
- Liu, X., Li, X., Xia, B., Jin, X., Zou, Q., Zeng, Z., Zhao, W., Yan, S., Li, L., Yuan, S., Zhao, S., Dai, X., Yin, F., Cadenas, E., Liu, R. H., Zhao, B., Hou, M., Liu, Z., & Liu, X. (2021). High-fiber diet mitigates maternal obesity-induced cognitive and social dysfunction in the offspring via gut-brain axis. *Cell Metabolism*, *33*(5), 923-938.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2021.02.002>
- López-Moreno, A., Acuña, I., Torres-Sánchez, A., Ruiz-Moreno, Á., Cerk, K., Rivas, A., Suárez, A., Monteoliva-Sánchez, M., & Aguilera, M. (2021). Next Generation Probiotics for Neutralizing Obesogenic Effects: Taxa Culturing Searching Strategies. *Nutrients*, *13*(5), 1617. <https://doi.org/10.3390/nu13051617>
- Lozupone, C. A., Hamady, M., Kelley, S. T., & Knight, R. (2007). Quantitative and qualitative beta diversity measures lead to different insights into factors that structure microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, *73*(5), 1576–1585. <https://doi.org/10.1128/AEM.01996-06>
- Lu, J. (2018). Effects of Intestinal Microbiota on Brain Development in Humanized Gnotobiotic Mice. *SCIENTIFIC Reports*, *16*. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23692-w>.
- Lucas, N., Legrand, R., Deroissart, C., Dominique, M., Azhar, S., Le Sollicec, M.-A., Léon, F., do Rego, J.-C., Déchelotte, P., Fetissov, S. O., & Lambert, G. (2019). *Hafnia alvei* HA4597 Strain Reduces Food Intake and Body Weight Gain and Improves Body Composition, Glucose, and Lipid Metabolism in a Mouse Model of Hyperphagic Obesity. *Microorganisms*, *8*(1). <https://doi.org/10.3390/microorganisms8010035>

- Luczynski, P., McVey Neufeld, K.-A., Oriach, C. S., Clarke, G., Dinan, T. G., & Cryan, J. F. (2016). Growing up in a Bubble: Using Germ-Free Animals to Assess the Influence of the Gut Microbiota on Brain and Behavior. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, *19*(8), pyw020. <https://doi.org/10.1093/ijnp/pyw020>
- Luczynski, P., Whelan, S. O., O'Sullivan, C., Clarke, G., Shanahan, F., Dinan, T. G., & Cryan, J. F. (2016). Adult microbiota-deficient mice have distinct dendritic morphological changes: Differential effects in the amygdala and hippocampus. *European Journal of Neuroscience*, *44*, 2654–2666. <https://doi.org/10.1111/ejn.13291>
- Lynch, S. V., & Pedersen, O. (2016). The Human Intestinal Microbiome in Health and Disease. *The New England Journal of Medicine*. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1600266>
- Ma, J., Li, C., Wang, J., & Gu, J. (2020). Genetically Engineered Escherichia coli Nissle 1917 Secreting GLP-1 Analog Exhibits Potential Antiobesity Effect in High-Fat Diet-Induced Obesity Mice. *Obesity*, *28*(2), 315–322. <https://doi.org/10.1002/oby.22700>
- Ma, Y., Liu, J., Hou, J., Dong, Y., Lu, Y., Jin, L., Cao, R., Li, T., & Wu, J. (2014). Oral Administration of Recombinant Lactococcus lactis Expressing HSP65 and Tandemly Repeated P277 Reduces the Incidence of Type I Diabetes in Non-Obese Diabetic Mice. *PLOS ONE*, *9*(8), e105701. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105701>
- Macdonald, M., Lord, C., & Ulrich, D. A. (2014). *Motor Skills and Calibrated Autism Severity in Young Children With Autism Spectrum Disorder*. 95–105.
- Maes, M., Kubera, M., Leunis, J.-C., Berk, M., Geffard, M., & Bosmans, E. (2013). In depression, bacterial translocation may drive inflammatory responses, oxidative and nitrosative stress (O&NS), and autoimmune responses directed against O&NS-damaged neoepitopes. *Acta Psychiatrica Scandinavica*, *127*(5), 344–354. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0447.2012.01908.x>
- Marchesi, J. R., & Ravel, J. (2015). The vocabulary of microbiome research: A proposal. *Microbiome*, *3*(1), 31. <https://doi.org/10.1186/s40168-015-0094-5>
- Menezes, A. C., Raposo, S., Simões, S., Ribeiro, H., Oliveira, H., & Ascenso, A. (2016). Prevention of Photocarcinogenesis by Agonists of 5-HT1A and Antagonists of 5-HT2A Receptors. *Molecular Neurobiology*, *53*(2), 1145–1164. <https://doi.org/10.1007/s12035-014-9068-z>
- Meslier, V., Laiola, M., Roager, H. M., Filippis, F. D., Roume, H., Quinquis, B., Giacco, R., Mennella, I., Ferracane, R., Pons, N., Pasolli, E., Rivellesse, A., Dragsted, L. O., Vitaglione, P., Ehrlich, S. D., & Ercolini, D. (2020). Mediterranean diet intervention in overweight and obese subjects lowers plasma cholesterol and causes changes in the gut microbiome and metabolome independently of energy intake. *Gut*, *69*(7), 1258–1268. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2019-320438>
- Messaoudi, M., Violle, N., Bisson, J. F., Desor, D., Javelot, H., & Rougeot, C. (2011). Beneficial psychological effects of a probiotic formulation (Lactobacillus helveticus R0052 and Bifidobacterium longum R0175) in healthy human volunteers. *Gut Microbes*, *2*(4). <https://doi.org/10.4161/gmic.2.4.16108>
- Miller, T. L., & Wolin, M. J. (1996). Pathways of acetate, propionate, and butyrate formation by the human fecal microbial flora. *Applied and Environmental Microbiology*, *62*(5), 1589–1592. <https://doi.org/10.1128/aem.62.5.1589-1592.1996>

- Molinaro, A., Bel Lassen, P., Henricsson, M., Wu, H., Adriouch, S., Belda, E., Chakaroun, R., Nielsen, T., Bergh, P. O., Rouault, C., André, S., Marquet, F., Andreelli, F., Salem, J. E., Assmann, K., Bastard, J. P., Forslund, S., Le Chatelier, E., Falony, G., ... Bäckhed, F. (2020). Imidazole propionate is increased in diabetes and associated with dietary patterns and altered microbial ecology. *Nature Communications*, *11*(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19589-w>
- Moro, J., Tome, D., Schmidely, P., Demersay, T., & Azzout-Marniche, D. (2020). Histidine: A Systematic Review on Metabolism and Physiological Effects in Human and Different Animal Species. *Nutrients*, *12*(1414), 1–20. <https://doi.org/10.3390/nu12051414>
- Mueller, N. T., Shin, H., Pizoni, A., Werlang, I. C., Matte, U., Goldani, M. Z., Goldani, H. A. S., & Dominguez-Bello, M. G. (2016). Birth mode-dependent association between pre-pregnancy maternal weight status and the neonatal intestinal microbiome. *Scientific Reports*, *6*, 23133. <https://doi.org/10.1038/srep23133>
- Munukka, E., Rintala, A., Toivonen, R., Nylund, M., Yang, B., Takanen, A., Hänninen, A., Vuopio, J., Huovinen, P., Jalkanen, S., & Pekkala, S. (2017). Faecalibacterium prausnitzii treatment improves hepatic health and reduces adipose tissue inflammation in high-fat fed mice. *The ISME Journal*, *11*(7), 1667–1679. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.24>
- Munukka, E., Wiklund, P., Pekkala, S., Völgyi, E., Xu, L., Cheng, S., Lyytikäinen, A., Marjomäki, V., Alen, M., Vaahtovuori, J., Keinänen-Kiukaanniemi, S., & Cheng, S. (2012). Women With and Without Metabolic Disorder Differ in Their Gut Microbiota Composition. *Obesity*, *20*(5), 1082–1087. <https://doi.org/10.1038/oby.2012.8>
- Myers, G., Donlon, M., & Kaliner, M. (1981). Measurement of urinary histamine: Development of methodology and normal values. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *67*(4), 305–311. [https://doi.org/10.1016/0091-6749\(81\)90026-9](https://doi.org/10.1016/0091-6749(81)90026-9)
- Naseribafrouei, A., Hestad, K., Avershina, E., Sekelja, M., Linløkken, A., Wilson, R., & Rudi, K. (2014). Correlation between the human fecal microbiota and depression. *Neurogastroenterology and Motility: The Official Journal of the European Gastrointestinal Motility Society*, *26*(8), 1155–1162. <https://doi.org/10.1111/nmo.12378>
- Neufeld, K. M., Kang, N., Bienenstock, J., & Foster, J. A. (2011). Reduced anxiety-like behavior and central neurochemical change in germ-free mice. *Neurogastroenterology and Motility*, *23*, 255–e119. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2982.2010.01620.x>
- Nicolas, G. R., & Chang, P. V. (2019). Deciphering the Chemical Lexicon of Host–Gut Microbiota Interactions. *Trends in Pharmacological Sciences*, *40*(6), 430–445. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2019.04.006>
- Nicolucci, A. C., Hume, M. P., Martínez, I., Mayengbam, S., Walter, J., & Reimer, R. A. (2017). Prebiotics Reduce Body Fat and Alter Intestinal Microbiota in Children Who Are Overweight or With Obesity. *Gastroenterology*, *153*(3), 711–722. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2017.05.055>
- Oksanen, J., Blanchet, F. G., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P. R., O’hara, R. B., Solymos, P., Stevens, M. H. H., & Wagner, H. (2019). *Vegan: Community Ecology Package*. R Package Version 2.5-6. Available online at <http://CRAN.Rproject.org/package=vegan>.

- OMS. (2022). *Obesidad. Organización Mundial de la Salud. Available online: https://www.who.int/es/health-topics/obesity#tab=tab_1 (accessed on 24 February 2022).*
- Pasteur, L. (1885). *Observations relatives à la note précédente de M. Duclaux. CR Acad Sci 100: 1885.*
- Payne, A. N., Chassard, C., & Lacroix, C. (2012). Gut microbial adaptation to dietary consumption of fructose, artificial sweeteners and sugar alcohols: Implications for host-microbe interactions contributing to obesity. *Obesity Reviews: An Official Journal of the International Association for the Study of Obesity*, 13(9), 799–809. <https://doi.org/10.1111/j.1467-789X.2012.01009.x>
- Pedersen, H. K., Gudmundsdottir, V., Nielsen, H. B., Hyotylainen, T., Nielsen, T., Jensen, B. A. H., Forslund, K., Hildebrand, F., Prifti, E., Falony, G., Le Chatelier, E., Levenez, F., Doré, J., Mattila, I., Plichta, D. R., Pöhö, P., Hellgren, L. I., Arumugam, M., Sunagawa, S., ... Pedersen, O. (2016). Human gut microbes impact host serum metabolome and insulin sensitivity. *Nature*, 535(7612), 376–381. <https://doi.org/10.1038/nature18646>
- Pei, Z., Bini, E. J., Yang, L., Zhou, M., Francois, F., & Blaser, M. J. (2004). Bacterial biota in the human distal esophagus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(12), 4250–4255. <https://doi.org/10.1073/pnas.0306398101>
- Perry, R. J., Peng, L., Barry, N. A., Cline, G. W., Zhang, D., Cardone, R. L., Petersen, K. F., Kibbey, R. G., Goodman, A. L., & Shulman, G. I. (2016). Acetate mediates a microbiome-brain- β -cell axis to promote metabolic syndrome. *Nature*, 534(7606), 213–217. <https://doi.org/10.1038/nature18309>
- Planer, J. D., Peng, Y., Kau, A. L., Blanton, L. V., Ndao, I. M., Tarr, P. I., Warner, B. B., & Gordon, J. I. (2016). Development of the gut microbiota and mucosal IgA responses in twins and gnotobiotic mice. *Nature*, 534(7606), 263–266. <https://doi.org/10.1038/nature17940>
- Pugin, B., Barcik, W., Westermann, P., Heider, A., Wawrzyniak, M., Hellings, P., Akdis, C. A., & O'Mahony, L. (2017). A wide diversity of bacteria from the human gut produces and degrades biogenic amines. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 28(1), 1353881. <https://doi.org/10.1080/16512235.2017.1353881>
- Qin, N., Yang, F., Li, A., Prifti, E., Chen, Y., Shao, L., Guo, J., Le Chatelier, E., Yao, J., Wu, L., Zhou, J., Ni, S., Liu, L., Pons, N., Batto, J. M., Kennedy, S. P., Leonard, P., Yuan, C., Ding, W., ... Li, L. (2014). Alterations of the human gut microbiome in liver cirrhosis. *Nature*, 513(7516), 59–64. <https://doi.org/10.1038/nature13568>
- R Core Team. (2018). *R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Available online at <https://www.R-project.org/>.*
- Rampelli, S., Schnorr, S. L., Consolandi, C., Turrone, S., Severgnini, M., Peano, C., Brigidi, P., Crittenden, A. N., Henry, A. G., & Candela, M. (2015). Metagenome Sequencing of the Hadza Hunter-Gatherer Gut Microbiota. *Current Biology*, 25(13), 1682–1693. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.04.055>
- Rao, A. V., Basted, A. C., Beaulne, T. M., Katzman, M. A., Iorio, C., Berardi, J. M., & Logan, A. C. (2009). A randomized, double-blind, placebo-controlled pilot study of a probiotic in emotional symptoms of chronic fatigue syndrome. *Gut Pathogens*, 1(1), 6. <https://doi.org/10.1186/1757-4749-1-6>
- Reddy, K. S., & Yusuf, S. (1998). Emerging Epidemic of Cardiovascular Disease in Developing Countries. *Circulation*, 97(6), 596–601. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.97.6.596>

- Rhead, J. L., Letley, D. P., Mohammadi, M., Hussein, N., Mohagheghi, M. A., Eshagh Hosseini, M., & Atherton, J. C. (2007). A new *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin determinant, the intermediate region, is associated with gastric cancer. *Gastroenterology*, *133*(3), 926–936. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.06.056>
- Ridaura, V. K., Faith, J. J., Rey, F. E., Cheng, J., Duncan, A. E., Kau, A. L., Griffin, N. W., Lombard, V., Henrissat, B., Bain, J. R., Muehlbauer, M. J., Ilkayeva, O., Semenkovich, C. F., Funai, K., Hayashi, D. K., Lyle, B. J., Martini, M. C., Ursell, L. K., Clemente, J. C., ... Gordon, J. I. (2013). Gut microbiota from twins discordant for obesity modulate metabolism in mice. *Science (New York, N.Y.)*, *341*(6150), 1241214. <https://doi.org/10.1126/science.1241214>
- Rijkers, G. T., Vos, W. M. de, Brummer, R.-J., Morelli, L., Corthier, G., & Marteau, P. (2011). Health benefits and health claims of probiotics: Bridging science and marketing. *British Journal of Nutrition*, *106*(9), 1291–1296. <https://doi.org/10.1017/S000711451100287X>
- Riva, A., Borgo, F., Lassandro, C., Verduci, E., Morace, G., Borghi, E., & Berry, D. (2017). Pediatric obesity is associated with an altered gut microbiota and discordant shifts in Firmicutes populations. *Environmental Microbiology*, *19*(1), 95–105. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13463>
- Rodríguez, J. M., Murphy, K., Stanton, C., Ross, R. P., Kober, O. I., Juge, N., Avershina, E., Rudi, K., Narbad, A., Jenmalm, M. C., Marchesi, J. R., & Collado, M. C. (2015). The composition of the gut microbiota throughout life, with an emphasis on early life. *Microbial Ecology in Health and Disease*, *26*, 26050. <https://doi.org/10.3402/mehd.v26.26050>
- Rojo, D., Hevia, A., Bargiela, R., López, P., Cuervo, A., González, S., Suárez, A., Sánchez, B., Martínez-Martínez, M., Milani, C., Ventura, M., Barbas, C., Moya, A., Suárez, A., Margolles, A., & Ferrer, M. (2015). Ranking the impact of human health disorders on gut metabolism: Systemic lupus erythematosus and obesity as study cases. *Scientific Reports*, *5*(1), 8310. <https://doi.org/10.1038/srep08310>
- Round, J. L., & Mazmanian, S. K. (2009). The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nature Reviews. Immunology*, *9*(5), 313–323. <https://doi.org/10.1038/nri2515>
- Ruiz, A., Cerdó, T., Jáuregui, R., Pieper, D. H., Marcos, A., Clemente, A., García, F., Margolles, A., Ferrer, M., Campoy, C., & Suárez, A. (2017). One-year calorie restriction impacts gut microbial composition but not its metabolic performance in obese adolescents. *Environmental Microbiology*, *19*(4), 1536–1551. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13713>
- Russell, S. L., Gold, M. J., Hartmann, M., Willing, B. P., Thorson, L., Wlodarska, M., Gill, N., Blanchet, M.-R., Mohn, W. W., McNagny, K. M., & Finlay, B. B. (2012). Early life antibiotic-driven changes in microbiota enhance susceptibility to allergic asthma. *EMBO Reports*, *13*(5), 440–447. <https://doi.org/10.1038/embor.2012.32>
- Sanapareddy, N., Legge, R. M., Jovov, B., McCoy, A., Burcal, L., Araujo-Perez, F., Randall, T. A., Galanko, J., Benson, A., Sandler, R. S., Rawls, J. F., Abdo, Z., Fodor, A. A., & Keku, T. O. (2012). Increased rectal microbial richness is associated with the presence of colorectal adenomas in humans. *The ISME Journal*, *6*(10), 1858–1868. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.43>
- Santacruz, A., Collado, M. C., García-Valdés, L., Segura, M. T., Martín-Lagos, J. A., Anjos, T., Martí-Romero,

- M., Lopez, R. M., Florido, J., Campoy, C., & Sanz, Y. (2010). Gut microbiota composition is associated with body weight, weight gain and biochemical parameters in pregnant women. *British Journal of Nutrition*, *104*(1), 83–92. <https://doi.org/10.1017/S0007114510000176>
- Sartor, R. B. (2008). Microbial influences in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*, *134*(2), 577–594. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.11.059>
- Savage, D. C. (1977). Microbial ecology of the gastrointestinal tract. *Annual Review of Microbiology*, *31*, 107–133. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.31.100177.000543>
- Savignac, H. M., Tramullas, M., Kiely, B., Dinan, T. G., & Cryan, J. F. (2015). Bifidobacteria modulate cognitive processes in an anxious mouse strain. *Behavioural Brain Research*, *287*, 59–72. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2015.02.044>
- Scanlan, P. D., Shanahan, F., Clune, Y., Collins, J. K., O’Sullivan, G. C., O’Riordan, M., Holmes, E., Wang, Y., & Marchesi, J. R. (2008). Culture-independent analysis of the gut microbiota in colorectal cancer and polyposis. *Environmental Microbiology*, *10*(3), 789–798. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01503.x>
- Schloss, P. D., Westcott, S. L., Ryabin, T., Hall, J. R., Hartmann, M., Hollister, E. B., Lesniewski, R. A., Oakley, B. B., Parks, D. H., Robinson, C. J., Sahl, J. W., Stres, B., Thallinger, G. G., Van Horn, D. J., & Weber, C. F. (2009). Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, *75*(23), 7537–7541. <https://doi.org/10.1128/AEM.01541-09>
- Schubert, M. L., & Peura, D. A. (2008). Control of Gastric Acid Secretion in Health and Disease. *Gastroenterology*, *134*(7), 1842–1860. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.05.021>
- Schwartz, A., Taras, D., Schäfer, K., Beijer, S., Bos, N. A., Donus, C., & Hardt, P. D. (2010). Microbiota and SCFA in Lean and Overweight Healthy Subjects. *Obesity*, *18*(1), 190–195. <https://doi.org/10.1038/oby.2009.167>
- Shang, H., Sun, J., & Chen, Y. Q. (2016). Clostridium Butyricum CGMCC0313.1 Modulates Lipid Profile, Insulin Resistance and Colon Homeostasis in Obese Mice. *PLOS ONE*, *11*(4), e0154373. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0154373>
- Sharon, G., Cruz, N. J., Kang, D.-W., Gandal, M. J., Wang, B., Kim, Y.-M., Zink, E. M., Casey, C. P., Taylor, B. C., Lane, C. J., Bramer, L. M., Isern, N. G., Hoyt, D. W., Noecker, C., Sweredoski, M. J., Moradian, A., Borenstein, E., Jansson, J. K., Knight, R., ... Mazmanian, S. K. (2019). Human Gut Microbiota from Autism Spectrum Disorder Promote Behavioral Symptoms in Mice. *Cell*, *177*(6), 1600–1618.e17. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.05.004>
- Silvestro, L., Tarcomnicu, I., & Rizea, S. (2013). Matrix Effects in Mass Spectrometry Combined with Separation Methods—Comparison HPLC, GC and Discussion on Methods to Control these Effects. *Tandem Mass Spectrometry - Molecular Characterization*, 3–38. <https://doi.org/10.5772/55982>
- Singh, R. K., Chang, H.-W., Yan, D., Lee, K. M., Ucmak, D., Wong, K., Abrouk, M., Farahnik, B., Nakamura, M., Zhu, T. H., Bhutani, T., & Liao, W. (2017). Influence of diet on the gut microbiome and implications for human health. *Journal of Translational Medicine*, *15*(1), 73. <https://doi.org/10.1186/s12967-017-1175-y>

- Smits, S. A., Leach, J., Sonnenburg, E. D., Gonzalez, C. G., Lichtman, J. S., Reid, G., Knight, R., Manjurano, A., Chagalucha, J., Elias, J. E., Dominguez-Bello, M. G., & Sonnenburg, J. L. (2017). Seasonal Cycling in the Gut Microbiome of the Hadza Hunter-Gatherers of Tanzania. *Science (New York, N.Y.)*, 357(6353), 802–806. <https://doi.org/10.1126/science.aan4834>
- Soderborg, T. K., Clark, S. E., Mulligan, C. E., Janssen, R. C., Babcock, L., Ir, D., Young, B., Krebs, N., Lemas, D. J., Johnson, L. K., Weir, T., Lenz, L. L., Frank, D. N., Hernandez, T. L., Kuhn, K. A., D'Alessandro, A., Barbour, L. A., El Kasmi, K. C., & Friedman, J. E. (2018). The gut microbiota in infants of obese mothers increases inflammation and susceptibility to NAFLD. *Nature Communications*, 9(1), 4462. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06929-0>
- Sonnenburg, J. L., & Bäckhed, F. (2016). Diet-microbiota interactions as moderators of human metabolism. *Nature*, 535(7610), 56–64. <https://doi.org/10.1038/nature18846>
- Sordillo, J. E., Korrick, S., Laranjo, N., Carey, V., Weinstock, G. M., Gold, D. R., & Connor, G. O. (2020). Association of the Infant Gut Microbiome With Early Childhood Neurodevelopmental Outcomes An Ancillary Study to the VDAART Randomized Clinical Trial. 2(3), 1–13. <https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2019.0905>
- Steenbergen, L., Sellaro, R., van Hemert, S., Bosch, J. A., & Colzato, L. S. (2015). A randomized controlled trial to test the effect of multispecies probiotics on cognitive reactivity to sad mood. *Brain, Behavior, and Immunity*, 48, 258–264. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2015.04.003>
- Stipanuk, M. H. ; C., & A., M. (2006). *Biochemical, Physiological, & Molecular Aspects of Human Nutrition* (Fourth). Elsevier.
- Sudo, N., Chida, Y., Aiba, Y., Sonoda, J., Oyama, N., Yu, X., Kubo, C., & Koga, Y. (2004). Postnatal microbial colonization programs the hypothalamic – pituitary – adrenal system for stress response in mice. *J Physiol*, 558.1, 263–275. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2004.063388>
- Tai, N., Wong, F. S., & Wen, L. (2015). The role of gut microbiota in the development of type 1, type 2 diabetes mellitus and obesity. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 16(1), 55–65. <https://doi.org/10.1007/s11154-015-9309-0>
- Tan, H., Zhai, Q., & Chen, W. (2019). Investigations of Bacteroides spp. Towards next-generation probiotics. *Food Research International*, 116, 637–644. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.08.088>
- Tasse, L., Bercovici, J., Pizzut-Serin, S., Robe, P., Tap, J., Klopp, C., Cantarel, B. L., Coutinho, P. M., Henrissat, B., Leclerc, M., Doré, J., Monsan, P., Remaud-Simeon, M., & Potocki-Veronese, G. (2010). Functional metagenomics to mine the human gut microbiome for dietary fiber catabolic enzymes. *Genome Research*, 20(11), 1605–1612. <https://doi.org/10.1101/gr.108332.110>
- Thingholm, L. B., Rühlemann, M. C., Koch, M., Fuqua, B., Laucke, G., Boehm, R., Bang, C., Franzosa, E. A., Hübenthal, M., Rahnavard, A., Frost, F., Lloyd-Price, J., Schirmer, M., Lusi, A. J., Vulpe, C. D., Lerch, M. M., Homuth, G., Kacprowski, T., Schmidt, C. O., ... Huttenhower, C. (2019). Obese Individuals with and without Type 2 Diabetes Show Different Gut Microbial Functional Capacity and Composition. *Cell Host & Microbe*, 26(2), 252-264.e10. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.07.004>
- Tolstikov, V. V., & Fiehn, O. (2002). Analysis of highly polar compounds of plant origin: Combination of hydrophilic interaction chromatography and electrospray ion trap mass spectrometry. *Analytical*

Biochemistry, 301(2), 298–307. <https://doi.org/10.1006/abio.2001.5513>

- Tomova, A., Husarova, V., Lakatosova, S., Bakos, J., Vlkova, B., Babinska, K., & Ostatnikova, D. (2015). Gastrointestinal microbiota in children with autism in Slovakia. *Physiology & Behavior*, 138, 179–187. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2014.10.033>
- Torii, K., Uneyama, H., & Nakamura, E. (2013). Physiological roles of dietary glutamate signaling via gut-brain axis due to efficient digestion and absorption. *Journal of Gastroenterology*, 48(4), 442–451. <https://doi.org/10.1007/s00535-013-0778-1>
- Trufelli, H., Palma, P., Famiglini, G., & Cappiello, A. (2011). An overview of matrix effects in liquid chromatography–mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*, 30, 491–509. <https://doi.org/10.1002/mas.20298>
- Tsilingiri, K., Barbosa, T., Penna, G., Caprioli, F., Sonzogni, A., Viale, G., & Rescigno, M. (2012). Probiotic and postbiotic activity in health and disease: Comparison on a novel polarised ex-vivo organ culture model. *Gut*, 61(7), 1007–1015. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2011-300971>
- Tunncliff, G. (1998). Pharmacology and function of imidazole 4-acetic acid in brain. *General Pharmacology*, 31, 503–509.
- Turnbaugh, P. J., Bäckhed, F., Fulton, L., & Gordon, J. I. (2008). Diet-induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the mouse distal gut microbiome. *Cell Host & Microbe*, 3(4), 213–223. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2008.02.015>
- Turnbaugh, P. J., Ley, R. E., Mahowald, M. A., Magrini, V., Mardis, E. R., & Gordon, J. I. (2006). An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*, 444(7122), 1027–1031. <https://doi.org/10.1038/nature05414>
- Valembois, S., Krall, J., Frølund, B., & Steffansen, B. (2017). Imidazole-4-acetic acid, a new lead structure for interaction with the taurine transporter in outer blood-retinal barrier cells. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 103, 77–84. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2017.02.041>
- Van Der Heiden, C., Wadman, S. K., De Bree, P. K., & Wauters, E. A. K. (1972). Increased urinary imidazolepropionic acid, n-acetylhistamine and other imidazole compounds in patients with intestinal disorders. *Clinica Chimica Acta*, 39(1), 201–214. [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(72\)90317-8](https://doi.org/10.1016/0009-8981(72)90317-8)
- Verhulst, S. L., Vael, C., Beunckens, C., Nelen, V., Goossens, H., & Desager, K. (2008). A Longitudinal Analysis on the Association Between Antibiotic Use, Intestinal Microflora, and Wheezing During the First Year of Life. *Journal of Asthma*, 45(9), 828–832. <https://doi.org/10.1080/02770900802339734>
- Vrieze, A., Van Nood, E., Holleman, F., Salojärvi, J., Kootte, R. S., Bartelsman, J. F. W. M., Dallinga-Thie, G. M., Ackermans, M. T., Serlie, M. J., Oozeer, R., Derrien, M., Druesne, A., Van Hylckama Vlieg, J. E. T., Bloks, V. W., Groen, A. K., Heilig, H. G. H. J., Zoetendal, E. G., Stroes, E. S., de Vos, W. M., ... Nieuwdorp, M. (2012). Transfer of intestinal microbiota from lean donors increases insulin sensitivity in individuals with metabolic syndrome. *Gastroenterology*, 143(4), 913–916.e7. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2012.06.031>
- Wahlström, A., Sayin, S. I., Marschall, H.-U., & Bäckhed, F. (2016). Intestinal Crosstalk between Bile Acids and Microbiota and Its Impact on Host Metabolism. *Cell Metabolism*, 24(1), 41–50. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.05.005>

- Wang, B., Jiang, X., Cao, M., Ge, J., Bao, Q., Tang, L., Chen, Y., & Li, L. (2016). Altered Fecal Microbiota Correlates with Liver Biochemistry in Nonobese Patients with Non-alcoholic Fatty Liver Disease. *Scientific Reports*, *6*(1), 32002. <https://doi.org/10.1038/srep32002>
- Wang, L., Christophersen, C. T., Sorich, M. J., Gerber, J. P., Angley, M. T., & Conlon, M. A. (2011). Low relative abundances of the mucolytic bacterium *Akkermansia muciniphila* and *Bifidobacterium* spp. In feces of children with autism. *Applied and Environmental Microbiology*, *77*(18), 6718–6721. <https://doi.org/10.1128/AEM.05212-11>
- Wang, M., Zhou, J., He, F., Cai, C., Wang, H., Wang, Y., Lin, Y., Rong, H., Cheng, G., Xu, R., & Zhou, W. (2019). Alteration of gut microbiota-associated epitopes in children with autism spectrum disorders. *Brain, Behavior, and Immunity*, *75*(October 2018), 192–199. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2018.10.006>
- Wang, Q., Garrity, G. M., Tiedje, J. M., & Cole, J. R. (2007). Naïve Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Applied and Environmental Microbiology*, *73*(16), 5261–5267. <https://doi.org/10.1128/AEM.00062-07>
- Wolters, M., Ahrens, J., Romani-Pérez, M., Watkins, C., Sanz, Y., Benítez-Páez, A., Stanton, C., & Günther, K. (2019). Dietary fat, the gut microbiota, and metabolic health—A systematic review conducted within the MyNewGut project. *Clinical Nutrition (Edinburgh, Scotland)*, *38*(6), 2504–2520. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2018.12.024>
- Wu, T.-R., Lin, C.-S., Chang, C.-J., Lin, T.-L., Martel, J., Ko, Y.-F., Ojcius, D. M., Lu, C.-C., Young, J. D., & Lai, H.-C. (2019). Gut commensal *Parabacteroides goldsteinii* plays a predominant role in the anti-obesity effects of polysaccharides isolated from *Hirsutella sinensis*. *Gut*, *68*(2), 248–262. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2017-315458>
- Yan, J., Liu, L., Zhu, Y., Huang, G., & Wang, P. P. (2014). The association between breastfeeding and childhood obesity: A meta-analysis. *BMC Public Health*, *14*, 1267. <https://doi.org/10.1186/1471-2458-14-1267>
- Yano, J. M., Yu, K., Donaldson, G. P., Shastri, G. G., Ann, P., Ma, L., Nagler, C. R., Ismagilov, R. F., Mazmanian, S. K., & Hsiao, E. Y. (2015). Indigenous Bacteria from the Gut Microbiota Regulate Host Serotonin Biosynthesis. *Cell*, *161*(2), 264–276. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.02.047>
- Younossi, Z. M., Koenig, A. B., Abdelatif, D., Fazel, Y., Henry, L., & Wymer, M. (2016). Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease—Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, *64*(1), 73–84. <https://doi.org/10.1002/hep.28431>
- Zheng, P., Zeng, B., Zhou, C., Liu, M., Fang, Z., Xu, X., Zeng, L., Chen, J., Fan, S., Du, X., Zhang, X., Yang, D., Yang, Y., Meng, H., Li, W., Melgiri, N. D., Licinio, J., Wei, H., & Xie, P. (2016). Gut microbiome remodeling induces depressive-like behaviors through a pathway mediated by the host's metabolism. *Molecular Psychiatry*, *21*(6), 786–796. <https://doi.org/10.1038/mp.2016.44>
- Zheng, X., Xie, G., Zhao, A., Zhao, L., Yao, C., Chiu, N. H. L., Zhou, Z., Jia, W., Nicholson, J. K., & Jia, W. (2011). The Footprints of Gut Microbial Mammalian Co-Metabolism. *Journal of Proteome Research*, *11*.
- Zheng, Y., Ley, S. H., & Hu, F. B. (2018). Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and

its complications. *Nature Reviews. Endocrinology*, 14(2), 88–98.
<https://doi.org/10.1038/nrendo.2017.151>

Zhong, X., Harrington, J. M., Millar, S. R., Perry, I. J., O’Toole, P. W., & Phillips, C. M. (2020). Gut Microbiota Associations with Metabolic Health and Obesity Status in Older Adults. *Nutrients*, 12(8), 2364. <https://doi.org/10.3390/nu12082364>

Zhu, H., Wang, N., Yao, L., Chen, Q., Zhang, R., Qian, J., Hou, Y., Guo, W., Fan, S., Liu, S., Zhao, Q., Du, F., Zuo, X., Guo, Y., Xu, Y., Li, J., Xue, T., Zhong, K., Song, X., ... Xiong, W. (2018). Moderate UV Exposure Enhances Learning and Memory by Promoting a Novel Glutamate Biosynthetic Pathway in the Brain. *Cell*, 173(7), 1716-1727.e17. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.04.014>

Zijlmans, M. A. C., Korpela, K., Riksen-Walraven, J. M., de Vos, W. M., & de Weerth, C. (2015). Maternal prenatal stress is associated with the infant intestinal microbiota. *Psychoneuroendocrinology*, 53, 233–245. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2015.01.006>

Zoetendal, E. G., Akkermans, A. D. L., & De Vos, W. M. (1998). Temperature Gradient Gel Electrophoresis Analysis of 16S rRNA from Human Fecal Samples Reveals Stable and Host-Specific Communities of Active Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(10), 3854–3859.

Zuccarini, M., Guarini, A., Savini, S., Faldella, G., & Sansavini, A. (2020). Do 6-Month Motor Skills Have Cascading Effects on 12-Month Motor and Cognitive Development in Extremely Preterm and Full-Term Infants? *Frontiers in Psychology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2020.01297>

Anexos

Proyectos y contratos que han financiado la Tesis Doctoral

1: Reference FP7-KBBE-2013-7

Title: MyNewGut: Microbiome Influence on Energy balance and Brain Development-Function Put into Action to Tackle Diet-related Diseases and Behavior

IP at UGR: Dra.Cristina Campoy

Colaborator at UGR: Dr.Antonio Suárez

Funding Organism: FP7 Cooperation Theme 2 Food, Agriculture, Fisheries and Biotechnologies Time: 01/01/2014-31/12-2019

Funding (€) 8.973.268

2: Reference BFU2012-40254-C03-01 Title: PREOBE-2nd Follow-up:

IP: Dra.Cristina Campoy

Colaborator at UGR: Dr.Antonio Suárez

Funding Organism: MINECO Time: 01/01-2013-31/12-16 Funding (€): 197.468

3: Reference: 2921

Title: Search for novel functional ingredients for infant formulas to improve human neurodevelopment

IPs: Dr.Antonio Suárez and Dra.Cristina Campoy

Funding Organism: Fondo Tecnológico. C.D.T.I. Ministerio de Ciencia e Innovación. Fundación Empresa – UGR

Company: Laboratorios ORDESA S.L.

Time: 01/01/09-31/12/18

Funding (€): 45.000, 30.000, extended for 2019.

4: Proyecto Internacional EFSA. Agencia Europea De Seguridad Alimentaria: OBEMIRISK Consortium-Partnering Grant - Project EFSA -Coordinadora: Margarita Aguilera Gómez. (Universidad de Granada).31/10/2018-31/05/2021. 200.484 €

5: Proyecto Internacional – Programa Eufora- Hosting Sites - Coordinadora EFSA: Margarita Aguilera Gómez. (Universidad de Granada). 01/09/2021-31/08/2022. 28.000 € Klara Cerk-Bioinformatica-Metagenómica-Microbiota-Obesidad-EDC

6: Proyecto Europa Investiga-MICIN: Identificación del rol patofisiológico de la microbiota alterada por xenobióticos de la dieta en pacientes con desórdenes hormonales-Laboratorio de referencia (INYTA-Departamento de Microbiología). 01/06/2019-31/05/2021. 8.500 € EUROS

7: Proyecto Infraestructura: Laboratorio de referencia de microbiota humana: Estación de manipulación de microorganismos en anaerobiosis y accesorios para la optimización y armonización del análisis fenotípico y genotípico de la microbiota y su impacto en nutrición y salud". 190.407 € (29-12-2020-29-12-2022)

8: Proyecto FIS ISCIII: Influence of endocrine disrupters chemicals on gut microbiota: a missed link in childhood obesity (ENDOMICROMICS) 111.320 € (01-01-2021-31-12-2023)

Contratos y becas competitivas disfrutadas por la Doctoranda durante la realización de la Tesis Doctoral

Contrato: Formación de Profesorado Universitario (FPU16/04587)

Entidad financiadora: Ministerio de Educación, Cultura y Deporte

Duración: 04/10/2017 – 28/02/2022

Beca: Estancias breves en centros extranjeros

Entidad financiadora: Ministerio de Educación, Cultura y Deporte

Duración: 06/05/2019-04/08/2019

Lugar: Università di Bologna, Italia

Parte de los resultados de esta Tesis Doctoral han sido publicados

- Acuña, I., Ruiz, A., Cerdó, T., Cantarero, S., López-Moreno, A., Aguilera, M., Campoy, C., & Suárez, A. (2021). Rapid and simultaneous determination of histidine metabolism intermediates in human and mouse microbiota and biomatrices. *BioFactors*, biof.1766. <https://doi.org/10.1002/biof.1766>

ÍNDICE DE IMPACTO: 6.113

CATEGORÍA: ENDOCRINOLOGY & METABOLISM

POSICIÓN RELATIVA: 26/145 Q1

CATEGORÍA: BIOCHEMISTRY & MOLECULAR BIOLOGY

POSICIÓN RELATIVA: 64/297 Q1

- Acuña, I., Cerdó, T., Ruiz, A., Torres-Espínola, F. J., López-Moreno, A., Aguilera, M., Suárez, A., & Campoy, C. (2021). Infant Gut Microbiota Associated with Fine Motor Skills. *Nutrients*, 13(5), 1673. <https://doi.org/10.3390/nu13051673>

ÍNDICE DE IMPACTO: 5.717

CATEGORÍA: NUTRITION & DIETETICS

POSICIÓN RELATIVA: 17/88 Q1

- López-Moreno, A., Acuña, I., Torres-Sánchez, A., Ruiz-Moreno, Á., Cerk, K., Rivas, A., Suárez, A., Monteoliva-Sánchez, M., & Aguilera, M. (2021). Next Generation Probiotics for Neutralizing Obesogenic Effects: Taxa Culturing Searching Strategies. *Nutrients*, 13(5), 1617. <https://doi.org/10.3390/nu13051617>

ÍNDICE DE IMPACTO: 5.717

CATEGORÍA: NUTRITION & DIETETICS

POSICIÓN RELATIVA: 17/88 Q1

Comunicaciones científicas en orden cronológico

1: Título: Asociación de la microbiota intestinal infantil con la motricidad fina

Nombre del congreso: II Congreso Investigación PTS

Tipo de aportación: Comunicación oral

Año: 2022

Lugar: Granada, España

Autores: Inmaculada Acuña, Tomás Cerdó, Alicia Ruiz, Francisco José Torres-Espínola, Ana López-Moreno, Margarita Aguilera, Antonio Suárez y Cristina Campoy

2: Título: Infant gut microbiota associated with fine motor skills

Nombre del congreso: Curso “Neurociencia del Comportamiento: del laboratorio a la vida real (2a Edición)”

Tipo de aportación: Comunicación oral

Año: 2021

Lugar: Online

Autores: Inmaculada Acuña, Tomás Cerdó, Alicia Ruiz, Francisco José Torres-Espínola, Ana López-Moreno, Margarita Aguilera, Antonio Suárez y Cristina Campoy

3: Título: Asociación funcional de la microbiota intestinal en niños con el perfil materno de obesidad

Nombre del congreso: I Congreso Anual de Estudiantes de Doctorado. Universidad Miguel Hernández.

Tipo de aportación: Comunicación oral

Año: 2021

Lugar: Online

Autores: Inmaculada Acuña, Tomás Cerdó, Alicia Ruiz, Ana López-Moreno, Margarita Aguilera, Cristina Campoy y Antonio Suárez

4: Título: Nuevos microorganismos con acción probiótica en alteraciones metabólicas causadas por la exposición a xenobióticos obesógenos: modulación e intervención en disbiosis de la microbiota.

Nombre del congreso: I Congreso Anual de Estudiantes de Doctorado. Universidad Miguel Hernández

Tipo de aportación: Comunicación tipo póster

Año: 2021

Lugar: Online

Autores: Ana López-Moreno, Inmaculada Acuña, Antonio Suárez y Margarita Aguilera.

5: Título: Gut microbial functional maturation and succession during human early life

Nombre del congreso: I Congreso Nacional de Investigadores del PTS

Tipo de aportación: Comunicación tipo póster

Año: 2019

Lugar: Granada, España

Autores: Tomás Cerdó, Alicia Ruiz, Inmaculada Acuña, Ruy Jáuregui, Nico Jehmlich, Sven-Bastian Haange, Martin von Bergen, Antonio Suárez y Cristina Campoy

6: Título: Risk assessment of dietary hazardous substances and impact on human gut microbiota: possible role in several dysbiotic phenotypes

Nombre del congreso: XXVII Congreso Nacional de Microbiología (SEM 2019)

Tipo de aportación: Comunicación tipo póster

Año: 2019

Lugar: Málaga, España

Autores: Soumi de Montijo, Inmaculada Acuña, Ana López-Moreno, Nerea Villa, Ana Rivas y Margarita Aguilera

7: Título: Gut microbial community composition and functionality associated with maternal pre-pregnancy body mass index

Nombre del congreso: Gut Microbiota for Health World Summit

Tipo de aportación: Comunicación tipo póster

Año: 2018

Lugar: Roma, Italia

Autores: Tomas Cerdó, Alicia Ruiz, Inmaculada Acuña, Ruy Jáuregui, Nico Jehmlich, Sven-Bastian Haange, Martin von Bergen, Antonio Suárez y Cristina Campoy