UNIVERSITAT DE BARCELONA

Impacte d'una sobrecàrrega bacteriana i vírica sobre el sistema immunitari de rates lactants i paper preventiu d'un postbiòtic en la diarrea induïda per rotavirus

Carla Morales Ferré

Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència ***Reconeixement- NoComercial – SenseObraDerivada 4.0. Espanya de Creative Commons***.

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia ***Reconocimiento - NoComercial – SinObraDerivada 4.0. España de Creative* Commons**.

This doctoral thesis is licensed under the ***Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 4.0. Spain License***.

UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE FARMÀCIA I CIÈNCIES DE L'ALIMENTACIÓ

Impacte d'una sobrecàrrega bacteriana i vírica sobre el sistema immunitari de rates lactants i paper preventiu d'un postbiòtic en la diarrea induïda per rotavirus

Carla Morales Ferré

Barcelona, 2022

FACULTAT DE FARMÀCIA I CIÈNCIES DE L'ALIMENTACIÓ

Departament de Bioquímica i Fisiologia

Programa de doctorat

ALIMENTACIÓ I NUTRICIÓ

Impacte d'una sobrecàrrega bacteriana i vírica sobre el sistema immunitari de rates lactants i paper preventiu d'un postbiòtic en la diarrea induïda per rotavirus

Memòria presentada per **Carla Morales Ferré** per optar al Títol de Doctor per la Universitat de Barcelona.

Aquesta tesi ha estat realitzada al grup d'Autoimmunitat, Immunonutrició i Tolerància amb la supervisió dels Drs. **Francisco J. Pérez Cano** i **M. José Rodríguez Lagunas**.

Dr. Francisco J. Pérez (director i tutor)

Dra. M. José Rodríguez Lagunas (directora)

Carla Morales Ferré (doctoranda)

Carla Morales Ferré

Barcelona, 2022

Aquesta tesi ha estat finançada per:

Danone Nutricia Research

Projecte FBG309956

Biosearch Life

Projecte FBG308056

La doctoranda ha gaudit dels ajuts següents:

Beca de col·laboració en els projectes de recerca FBG309956 i FBG308056

Fundació Bosch i Gimpera

Durant el període de novembre 2018 - juny 2021

UNIVERSITAT DE BARCELONA

Secció de Fisiologia
Departament de Bioquímica i Fisiologia
Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació

Av. Joan XXIII, 27-31
08028 Barcelona

Tel. +34 934 024 505
franciscoperez@ub.edu
mjrodriguez@ub.edu

Francisco J. Pérez Cano, professor titular, i **M. José Rodríguez Lagunas**, professora lectora, de la Secció de Fisiologia del Departament de Bioquímica i Fisiologia de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de Barcelona,

INFORMEN

Que la memòria titulada ***Impacte d'una sobrecàrrega bacteriana i vírica sobre el sistema immunitari de rates lactants i paper preventiu d'un postbiòtic en la diarrea induïda per rotavirus*** presentada per **CARLA MORALES FERRÉ** per optar al Títol de Doctor per la Universitat de Barcelona, ha estat realitzada sota la nostra direcció a la Secció de Fisiologia del Departament de Bioquímica i Fisiologia i, considerant-la conclosa, autoritzem la seva presentació per ser jutjada pel tribunal corresponent.

I perquè així consti, signem el present a Barcelona, 27 de febrer de 2022

Dr. Francisco J. Pérez Cano
Secció de Fisiologia
Departament de Bioquímica i Fisiologia
Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació
Universitat de Barcelona

Dra. M. José Rodríguez Lagunas
Secció de Fisiologia
Departament de Bioquímica i Fisiologia
Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació
Universitat de Barcelona

Índex

RESUM 1

INTRODUCCIÓ **3**

1. Desenvolupament del sistema immunitari **5**

1.1 El sistema immunitari innat 5

1.2 El sistema immunitari adaptatiu 6

1.3 Desenvolupament del sistema immunitari mucosal 9

2. Desenvolupament de la microbiota intestinal **11**

2.1 Colonització i composició de la microbiota intestinal 11

2.2 Funcions de la microbiota intestinal 13

3. El sistema immunitari i la microbiota en funció del sexe **15**

4. Infeccions durant el període de lactància **17**

4.1 Infeccions en el lactant: rotavirus 17

4.1.1 Patogènesi 19

4.1.2 Clínica 21

4.1.3 Resposta immunitària 22

4.1.4 Tractaments i prevenció 22

4.1.5 Models animals de rotavirus 24

4.2 Infeccions maternes durant la lactància: mastitis 25

4.2.1 Classificació i clínica 27

4.2.2 Staphylococcus Epidermidis 27

4.2.3 Patogènesis 29

4.2.4 Resposta immunitària 29

4.2.5 Tractaments 30

4.2.6 Models animals de mastitis 30

5. Moduladors microbians: Prebiòtics, probiòtics i postbiòtics **31**

5.1 Prebiòtics 31

5.1.1 Tipus 31

5.1.2 Mecanismes d'acció i efectes beneficiosos 32

5.2 Probiòtics 34

5.2.1 Mecanismes d'acció 34
5.2.2 Efectes beneficiosos en infants 36
5.3 Postbiòtics 37
5.3.1 Tipus de postbiòtics 37
5.3.2 Mecanismes d'acció i efectes beneficiosos 38
OBJECTIUS 42
RESULTATS 47
Article 1. *Staphylococcus epidermidis*' overload during suckling impacts the immune development in rats 49
Article 2. Sexual Dimorphism Has Low Impact on the Response against Rotavirus Infection in Suckling Rats 81
Article 3. Effects of a postbiotic and prebiotic mixture on suckling rats' microbiota and immunity 103
Article 4. Preventive effect of a postbiotic and prebiotic mixture in a rat model of early life rotavirus induced-diarrhea 133
DISCUSSIÓ 169
CONCLUSIONS 207
BIBLIOGRAFIA 211

Índex de taules i figures

Taula 1. Diferències del sistema immunitari innat i adaptatiu segons el sexe en les diferents etapes de vida. 16

Figura 1. Representació de l'evolució dels nivells d'immunoglobulines des de l'embaràs fins el primer any de vida del nounat. 8
Figura 2. Representació esquemàtica del teixit limfoide associat a l'intestí 10
Figura 3. Factors que influeixen en el desenvolupament de la microbiota intestinal. 12
Figura 4. Funcions de la microbiota intestinal classificades segons els seus efectes sobre l'hoste a nivell d'estructura de l'intestí, metabolisme i capacitat defensiva. 14
Figura 5. Representació del Rotavirus on es mostren les diferents proteïnes víriques estructurals 18
Figura 6. Distribució geogràfica de les taxes de mortalitat associades al rotavirus entre els nens menors de 5 anys durant l'any 2016 19
Figura 7. Esquema dels mecanismes patogènics del RV 21
Figura 8. Esquema de l'epiteli i els conductes mamaris en condicions fisiològiques (a) i en situació de mastitis (b) 26
Figura 9. Efectes duals del Staphylococcus epidermidis a la barrera cutània 28
Figura 10. Mecanismes d'acció dels prebiòtics 32
Figura 11. Mecanismes d'acció pels quals dels probiòtics poden actuar dins de l'intestí 35

Abreviatures

2-FL	2'-fucosil·lactosa
A1AT	Antitripsina alfa-1
Ac	Anticossos
Ag	Antigen
AGCC	Àcids grassos de cadena curta
APCs	Cèl·lules presentadores d'antígens
Cldn	Claudina
DLP	Partícula vírica de doble capa
DP	Grau de polimerització
EDIM	*Epizootic diarrhea of infant mouse virus*
Ec_{wt}	*wild-type murine rotavirus EDIM-Cambridge*
FcRn	Receptor del fragment constant (Fc) de les immunoglobulines
FOS	Fructooligosacàrids
GALT	Teixit limfoide associat a l'intestí
GLM	Ganglis limfàtics mesentèrics
GOS	Galactooligosacàrids
HMOs	Oligosacàrids de la llet materna
IELs	Limfòcits intraepitelials
IFIH1	Domini C que conté la proteïna 1 de l'helicasa induïda per interferó
IFN	Interferó
Ig	Immunoglobulines
IL	Interleucines
IRF	Factor regulador de l'interferó
lcFOS	Fructooligosacàrids de cadena llarga
LPL	Limfòcits de la lamina pròpia

MSP	Modulines solubles en fenol
MUC	Mucines
Ocln	Ocludina
OMS	Organització Mundial de la Salut
PRRs	Receptors de reconeixement de patrons
RV	Rotavirus
RRV	Rotavirus rhesus
SA-11	Rotavirus de simi A
scGOS	Galactoooligosacàrids de cadena curta
SI	Sistema immunitari
Tc	Limfòcits T citotòxics
Th	Limfòcits T col·laboradors
TLR	Receptors de tipus Toll
TNF-α	Factor de necrosi tumoral alfa
Treg	Limfòcits T reguladors
UFC	Unitats formadores de colònies
VP	proteïnes virals
WHO	World Health Organization

RESUM

El sistema immunitari del nounat és immadur i, per tant, predisposa al nadó a patir infeccions, que en el cas de nounats del gènere masculí semblen presentar una incidència i una gravetat majors que el femení. La llet materna conté diferents components bioactius que promouen el desenvolupament immunitari o protegeixen al nounat durant els primers mesos de vida. Les fórmules infantils són una alternativa per aquells nounats que no reben lactància materna. Tenen una composició que busca reproduir la de la llet de la mare, pel que és freqüent l'addició de diversos compostos bioactius com els prebiòtics, probiòtics i postbiòtics, entre d'altres.

L' objectiu d'aquesta tesi consisteix en establir els efectes sobre el desenvolupament del sistema immunitari neonatal de dues infeccions comunes durant el període de lactància (mastitis infecciosa materna i gastroenteritis vírica de l'infant) i avaluar el paper del dimorfisme sexual i dels prebiòtics galactooligosacàrids de cadena curta (scGOS), fructoologoscàrids de cadena llarga (lcFOS) i del postbiòtic Lactofidus® sobre el desenvolupament del sistema immunitari i la infecció per RV durant la lactància.

En primer lloc, per determinar l'efecte de la sobrecàrrega bacteriana que pot rebre un nounat a través de la llet materna en un context de mastitis, es van suplementar diàriament durant tota la lactància (3 setmanes) rates nounades amb dues dosis (alta i baixa) d'un dels principals agents etiològics, el Staphylococcus epidermidis. Es va avaluar el seu impacte tot just després de la lactància i 3 setmanes després, per a estudiar la persistència dels efectes. Ambdues dosis van induir petits canvis en les subpoblacions de limfòcits, van reduir la concentració d'immunoglobulines (Ig) plasmàtiques i van retardar l'assoliment de l'equilibri Th1/Th2, mantenint en etapes posteriors el biaix cap a la resposta Th2 de les primeres etapes de vida. Únicament la dosi alta va tenir un impacte en les variables hematològiques causant leucocitosi i limfocitosi i influint en la maduració de la barrera intestinal.

En segon lloc, respecte a la infecció per RV, es va establir el paper del dimorfisme sexual en el procés. Per això, es van utilitzar rates que es van infectar oralment amb el RV durant la primera setmana de vida i es va fer el seguiment de la clínica i dels mecanismes alterats o involucrats en la seva resposta defensiva. Globalment, tot i que el sexe dels animals no va influir en la incidència de diarrea, sí que es van trobar algunes diferències en alguns elements de la resposta humoral sexe-dependents, que probablement estan implicades en el fet que els mascles presentin una major gravetat de la diarrea.

En tercer lloc, i per determinar els efectes del postbiòtic Lactofidus® i la seva combinació amb els prebiòtics scGOS-lcFOS, es van utilitzar rates lactants sanes que van rebre oralment el Lactofidus® i/o scGOS-lcFOS des del segon dia de vida fins al final de l'estudi. En la segona aproximació, a dia 5 de vida, la meitat de les rates de cada grup es van infectar oralment amb el RV i es va fer el seguiment del procés. En ambdós dissenys es va avaluar la microbiota i múltiples variables immunitàries.

En el cas de les rates sanes, totes les suplementacions van modificar el perfil d'Ig. El scGOS-lcFOS va modular la composició de la microbiota i el perfil d'àcids grassos de cadena curta (AGCC). El Lactofidus® va augmentar l'expressió gènica d'alguns dels receptors de tipus Toll (TLR). La combinació de tots dos productes va mostrar els efectes observats amb la barreja de prebiòtics.

Enfront la diarrea causada per RV, totes les intervencions van resultar ser efectives en reduir la incidència i la gravetat d'aquesta. Aquest efecte positiu es va relacionar amb la seva activitat de bloqueig del virus, els canvis en el perfil d'Ig i la microbiota intestinal, així com en l'expressió gènica intestinal. La suplementació amb scGOS-lcFOS va enfortir la funció de barrera intestinal i va modificar el perfil d'AGCC mentre que el postbiòtic va potenciar l'expressió dels TLR i va reduir el pH fecal. La combinació dels dos tipus de components va preservar molts dels efectes observats individualment i va provocar-ne de nous com un major reclutament leucocític durant la infecció.

En resum, el contacte amb patògens durant la lactància, ja tinguin en origen una infecció materna com la mastitis o una del nounat com la gastroenteritis vírica, afecta el desenvolupament del sistema immunitari. A més, el dimorfisme sexual de la resposta defensiva enfront infeccions sembla ja estar present en aquestes primeres etapes de vida. Les intervencions experimentals de prebiòtics i postbiòtics, sols o en combinació, semblen una bona estratègia per millorar el desenvolupament microbià i immunitari dels lactants i la seva capacitat defensiva enfront infeccions i per tant, contrarestar els processos infecciosos, suggerint la utilitat de la seva addició a fórmules infantils.

INTRODUCCIÓ

1. Desenvolupament del sistema immunitari

El desenvolupament del sistema immunitari (SI) dels humans, rates i altres mamífers comença en les primeres etapes embrionàries [1]. Durant la gestació, el SI del fetus humà està regulat negativament per sobreviure a l'interior de l'úter matern i que no s'esdevingui cap rebuig [2,3]. Després de néixer, el SI del nounat fa una transició de l'ambient controlat de dins de l'úter cap a un ambient més hostil a l'exterior d'aquest. Això, afegit al fet que el SI del nadó encara no és madur, dona lloc a un increment en la susceptibilitat a patir infeccions [4,5].

1.1 El sistema immunitari innat

Existeixen diferents mecanismes de defensa innats per fer front als patògens. En general es parla de barreres que poden ser físiques (que aïllen de l'exterior com la pell, els epitelis i el moc secretat a les mucoses), químiques (com els pèptids antimicrobians i el baix pH de l'estómac) i microbiològiques (bacteris comensals que recobreixen les mucoses i la pell i eviten el creixement de patògens). En el nounat, aquestes barreres no estan totalment desenvolupades. Per exemple, l'epiteli gastrointestinal i respiratori mostren una permeabilitat elevada permetent el pas de certes substàncies. El pH de l'estómac és relativament bàsic en comparació amb el d'un adult i la secreció dels components propis de la barrera química no està completament desenvolupada [2].

El SI innat és la primera línia de defensa de l'hoste per evitar la invasió de microorganismes, i actua de manera ràpida mentre altres mecanismes inclosos en la resposta immunitària adaptativa es posen en marxa [2,4]. El SI innat està format per cèl·lules i factors solubles que reconeixen estructures comunes a molts microorganismes invasors. Els factors solubles poden estar presents de forma constitutiva, com per exemple les defensines o les proteïnes del complement. També existeixen mediadors que s'alliberen quan els microorganismes interaccionen amb les cèl·lules de l'hoste com per exemple, les citocines i quimioquines [2]. Les proteïnes del sistema del complement es comencen a expressar en el fetus i durant els primers 12-18 mesos de vida assoleixen els nivells que es troben en l'adult [6].

A més, el SI innat inclou diferents cèl·lules com els neutròfils, monòcits, macròfags, cèl·lules dendrítiques i cèl·lules *Natural killer* (NK) [2,6]. Les cèl·lules del SI, entre d'altres om les cèl·lules epitelials utilitzen receptors de superfície anomenats receptors de reconeixement de patrons (PRRs) com els receptors toll-like (TLR), els quals reconeixen estructures moleculars conservades que es troben presents en molts tipus de microorganismes. Quan aquests receptors reconeixen un patogen, s'activen vies de senyalització que preparen el SI innat i adaptatiu per eliminar-lo. Una de les respostes quan s'activen aquests TLR és la producció de citocines que permeten la comunicació

entre les cèl·lules epitelials i immunitàries per coordinar la resposta contra l'agent invasor [2,3].

Els neutròfils són els leucòcits més abundants i tenen un paper rellevant en la destrucció de patògens extracel·lulars durant una infecció. En aquest sentit, el nounat té una resposta cel·lular innata immadura ja que presenta uns nivells baixos de neutròfils i l'activitat de les cèl·lules presentadores d'antígens (APCs) com les cèl·lules dendrítiques i macròfags, també es troba reduïda. Així, durant els primers anys de vida el procés de fagocitosi és més deficient [7]. A més, la transmigració dels neutròfils des de la sang cap al lloc d'infecció es veu reduïda degut a que els nivells de L-selectina i d'antigen de macròfag (Mac)-1 són menors [6]. Aquests, entre altres factors, influeixen en el fet que els nounats siguin susceptibles a patir septicèmies mentre aquestes cèl·lules acaben de madurar [6].

Les cèl·lules NK s'activen ràpidament al contactar amb les APCs o citocines i tenen habilitat citolítica i secreten interferó (IFN) γ. Tenen un paper molt important en la resolució d'infeccions víriques [5]. Els nadons presenten una activitat baixa al néixer però al poc temps incrementen molt la seva proporció [2] assolint nivells més elevats que en adults [5,6]. Durant les primeres etapes de vida, aquestes cèl·lules tenen una menor adhesió degut a que l'expressió de la selectina CD62L es troba reduïda. En canvi, els nivells d'integrina β2 són similars als dels adults [7]. Les cèl·lules NK madures es classifiquen en dos grups segons l'expressió del CD56 (uns amb baixa expressió o NK^{dim} i altres amb alta expressió o NK^{bright}). Els mecanismes d'acció dels dos subtipus de NK són diferents, mentre les NK^{dim} indueixen citotoxicitat, les NK^{bright} secreten citocines [5]. Els nounats presenten subgrups similars i tenen un percentatge més elevat de la població NK^{brigh} que no pas els adults [8]. En el cas de rates lactants, la proporció de cèl·lules NK de la melsa és similar a la dels adults, on es poden diferenciar subtipus que co-expressen la molècula CD8 i d'altres que no [1]. D'altra banda, la proporció de limfòcits NK en el compartiment intraepitelial és més elevada en rates lactants que en adultes, i el seu fenotip depèn de l'edat de l'animal. Durant les dues primeres setmanes de vida, les NK majoritàriament expressen CD8 i passat aquest temps, les NK $CD8^-$ augmenten la seva proporció [9].

1.2 El sistema immunitari adaptatiu

El SI adaptatiu actua de manera específica i està format per la resposta cel·lular a través de limfòcits B i T i la resposta humoral a través d'anticossos (Ac) [2,3]. Els nivells dels limfòcits B i T són alts al naixement i augmenten durant el primer any de vida del nadó, després disminueixen fins arribar als valors que es troben en l'adult. En néixer, la funcionalitat dels limfòcits del nadó és pobre degut a la falta d'estimulació antigènica durant la vida fetal, ja que, inicialment, la majoria de limfòcits són immadurs o *naïve*

[3,6]. Tot i així, durant el primer any de vida incrementa i no és fins després de la primera dècada de vida que la resposta adaptativa és completa.

Pel que fa als limfòcits T, el seu desenvolupament comença a les 12-14 setmanes de gestació [10]. Els limfòcits T αβ, migren al timus per madurar donant lloc als limfòcits T citotòxics (Tc) o col·laboradors (Th) [6]. Els limfòcits Tc ($CD8^+$) s'encarreguen d'eliminar les cèl·lules infectades. D'altra banda, els limfòcits Th ($CD4^+$) orquestren la resposta d'altres cèl·lules immunitàries a través de la secreció de diferents citocines. Es poden dividir entre limfòcits efectors (Th1, Th2 i Th17, entre d'altres) i limfòcits T reguladors (Treg). Els darrers s'encarreguen de suprimir la resposta excessiva dels limfòcits T efectors i de generar tolerància [6,11]. La capacitat per eliminar un patogen, depèn del tipus de limfòcit Th efector que predomini. La diferenciació dels limfòcits Th depèn de les citocines presents al lloc on s'activen. Els Th1 col·laboren en la resposta immunitària cel·lular contra virus i bacteris intracel·lulars mentre que els Th2 ajuden a les respostes humorals per combatre microorganismes extracel·lulars com paràsits i es troben incrementats en els processos al·lèrgics [10]. Els limfòcits Th17 responen contra bacteris extracel·lulars i també participen en les respostes inflamatòries de malalties autoimmunitàries [2].

Pel que fa als limfòcits B, quan s'activen, es diferencien en cèl·lules plasmàtiques que són capaces de generar Ac [2]. Tant els limfòcits B com els T, després d'eliminar un patogen, es poden transformar en cèl·lules de memòria i així, en entrar en contacte de nou amb aquest microorganisme, els limfòcits proliferaran ràpidament donant lloc a una resposta immunitària més ràpida i efectiva sense necessitat de la participació de les APC [2,3].

Els efectors de la resposta humoral són els Ac o immunoglobulines (Ig) produïts per cèl·lules plasmàtiques derivades dels limfòcits B i poden ser de 5 tipus: IgG, IgM, IgA, IgD i IgE. La seva funció és neutralitzar els patògens unint-se a la seva superfície i inhibint que interaccionin amb les cèl·lules de l'hoste. A més, opsonitzen el patogen facilitant la fagocitosi i l'eliminació d'aquest [2,3]. Les IgG i IgM dominen a nivell sistèmic mentre que la IgA predomina a nivell de les mucoses [2]. La IgE participa en la defensa contra paràsits, però també té un paper important en reaccions al·lèrgiques [2]. La producció d'IgM comença en l'úter i augmenta en el període post-natal. En canvi, la producció d'IgA i IgG és escassa fins als 6 mesos d'edat [10]. Les IgM són els primers Ac que es secreten quan un limfòcit reconeix un antigen (Ag) i després les IgG o IgA [3]. En els humans, durant el primer any de vida, com el nadó ha de fer front a molts Ag, el repertori d'IgG creix i assoleix el 70% del que tenen els adults, mentre que els nivells d'IgA només arriben al 30%. L'infant assoleix els nivells d'Ig propis d'un adult entre l'any i els 12 anys de vida (**Figura 1**) [3,12].

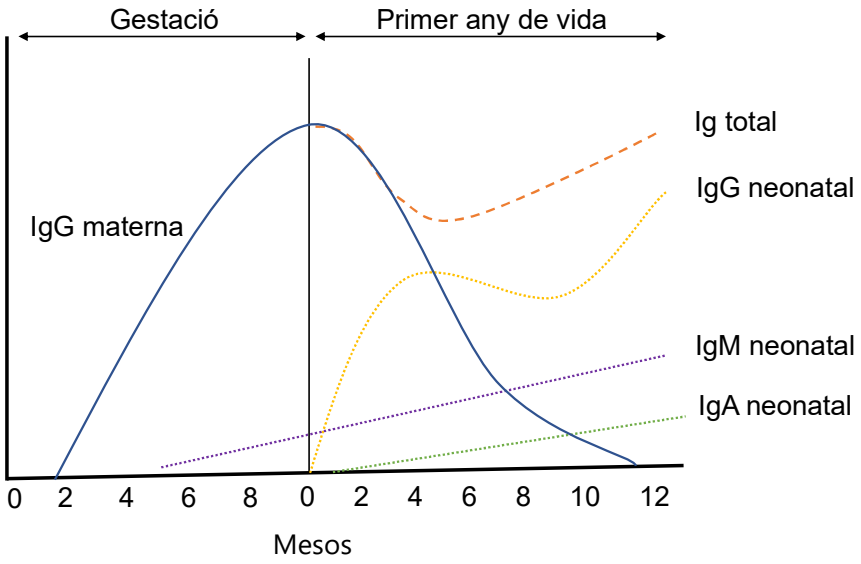


Figura 1. Representació de l'evolució dels nivells d'immunoglobulines des de l'embaràs fins el primer any de vida del nounat. Modificada de [12]

A més, la llet humana, especialment durant els primers dies de vida del nounat conté una elevada quantitat d'Ac per protegir-lo enfront infeccions. Els principals Ac presents en la llet materna són IgA (90-95%), IgM (2-5%) i IgG (menys de l'1%). Les IgG de la mare arriben per via transplacentària al nadó durant els últims mesos de gestació a través del receptor neonatal que reconeix el fragment constant (Fc) de les Ig o FcRn per protegir al nounat durant els primers mesos de vida. En canvi, la IgM i la IgA no poden creuar la placenta i el nounat les rep a través de la llet materna per facilitar la protecció enfront infeccions [13,14].

En rates, al igual que en humans, el seu SI comença a formar-se durant la gestació. El període de gestació és molt curt i quan neixen, el seu SI encara és immadur, la seva ontogènia es troba endarrerida en comparació amb els humans, ja que en aquests últims, les estructures limfoides es formen en el període prenatal mentre que en els rosegadors és en el post natal [1]. Pel que fa a la llet dels rosegadors, hi ha més proporció d'IgG en comparació amb la llet humana [15], ja que, a part de rebre-les de forma transplacentària, les cries d'aquest mamífers expressen el receptor FcRn al duodè que permet transportar les IgG que els hi arriba a través de la llet [14].

1.3 Desenvolupament del sistema immunitari mucosal

El tracte gastrointestinal conté l'òrgan immunològic més gran del cos [16]. L'intestí té funció nutritiva però també defensiva [4]. El SI intestinal s'ha d'adaptar i funcionar tenint en compte el canvi constant del seu ambient (aliments, Ag propis, microorganismes, toxines, patògens...) [16,17].

A l'epiteli intestinal, els enteròcits es troben connectats entre sí mitjançant els complexes d'unió estreta, els tres complexes més importants són les T*ight Junction*, unions adherents i desmosomes, les quals tenen la funció de regular el pas de substàncies [16]. Les *Tigh junction* són complexos que es troben a la part més apical, estan formats per proteïnes transmembrana (com per exemple claudines i ocludina), proteïnes de membrana perifèrica (com per exemple zona occludens 1 i zona occludens 2) i proteïnes reguladores [18]. Les unions adherents es troben sota les unions estretes i són necessàries per al seu muntatge. Juntament amb els desmosomes, les unions adherents proporcionen enllaços adhesius forts per mantenir la integritat de l'epiteli intestinal [18]. Tant les Tight Junction com les unions adherents estan connectades al citoesquelet d'actina i miosina que permet la regulació de les unions a través del citoesquelet [18]. A més, també s'hi troben les cèl·lules de Paneth, les quals secreten substàncies antimicrobianes [19] i les cèl·lules Goblet, encarregades de secretar mucines que protegeixen la superfície de l'epiteli [16]. En conjunt s'encarreguen d'evitar l'entrada de patògens cap a l'interior de l'intestí.

El teixit limfoide associat a l'intestí (GALT) és una barrera de defensa de l'organisme enfront de patògens presents a la llum intestinal alhora que permet induir tolerància a antígens innocus procedents de la dieta i de la pròpia microbiota intestinal (**Figura 2**) [20]. Es divideix en dos compartiments: el GALT organitzat i el GALT difús. El GALT organitzat és l'inductor de la resposta immunitària intestinal i està constituït per fol·licles limfoides aïllats, fol·licles limfoides associats (plaques de Peyer) i ganglis limfàtics mesentèrics (GLM) [21]. El GALT difús és l'efector de la resposta immunitària i està constituït per les poblacions de limfòcits disperses en l'epiteli (limfòcits intraepitelials; IELs) o en la làmina pròpia (limfòcits de la lamina pròpia; LPL) [21].

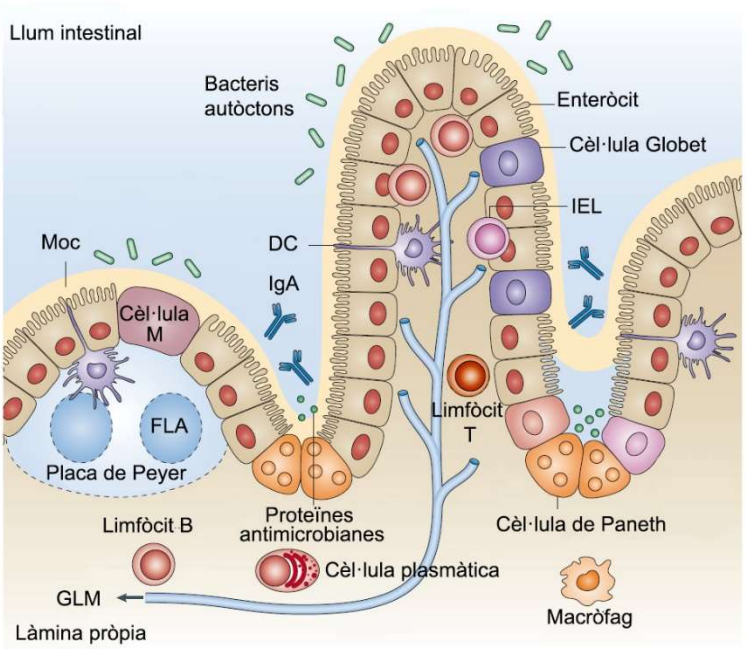


Figura 2. Representació esquemàtica del teixit limfoide associat a l'intestí. DC: cèl·lula dendrítica; IEL: limfòcit intraepitelial; IgA: immunoglobulina A; FLA: fol·licles limfoides aïllats; GLM: ganglis limfàtics mesentèrics. Modificada de [22].

Al fetus s'observen limfòcits B en el teixit intestinal, però no es diferencien cap a cèl·lules plasmàtiques productores d'IgA fins al període post natal [23] i, per tant, durant els primers mesos de vida, la secreció d'IgA intestinal és pràcticament nul·la i la protecció de la mucosa intestinal dependrà de la IgA procedent de la llet materna. Respecte al GALT, els GLM i les PP encara que es formen abans del naixement, no maduren fins després del naixement. La seva mida i el desenvolupament dels centres germinals depèn de la colonització de la microbiota [23].

L'epiteli intestinal del nounat és immadur a nivell anatòmic, metabòlic i immunològic. La colonització microbiana i la nutrició del nounat condicionen aquest procés de maduració [24]. Els nounats responen als Ag microbians generant una resposta Th2 en comptes de generar una resposta antibacteriana i antivírica (Th1) permetent la colonització i l'establiment d'una microbiota apropiada, la qual influeix en la correcta estimulació i educació del SI del nounat [25]. Un cop la barrera intestinal va madurant, la permeabilitat intestinal es redueix i el pas de macromolècules es torna més restrictiu [25].

La llet materna conté compostos bioactius com la IgA, lactoferrina, lisozim, hormones, citocines, oligosacàrids de la llet materna (HMO) i altres factors antimicrobians que intervenen en la colonització, l'establiment adequat de la microbiota intestinal i el correcte desenvolupament del SI intestinal del nounat [16,25–27]. Els HMOs són un

grup heterogeni de carbohidrats que es sintetitzen a la glàndula mamària i es troben en abundància a la llet materna [28,29]. Els HMO són resistents al pH i a la digestió enzimàtica, de manera que la majoria arriben intactes al tracte gastrointestinal [28]. S'ha descrit que els HMOs modulen la microbiota del nounat afavorint el creixement selectiu de bacteris beneficiosos per a la salut i a més, es poden unir als antígens virals i bacterians bloquejant la seva interacció amb les cèl·lules de l'hoste, prevenint així infeccions [25,26].

Les rates tenen l'anatomia del GALT similar a la humana mentre que el desenvolupament de les PP és més lent. Els limfòcits B de les rates lactants secreten poca IgA en l'intestí en comparació amb la rata adulta. Els IELs de les rates adultes ja es troben en les lactants, tot i que la seva proporció és diferent. La proporció de limfòcits T αβ augmenta progressivament durant el període de lactància dels rosegadors [1,9,30]. Les cèl·lules NK també es troben elevades en comparació amb les rates adultes [1]. A la làmina pròpia de les rates lactants predomina la proporció dels limfòcits T $CD8^+$ mentre que en les rates adultes ho fan els T $CD4^+$. Les cèl·lules plasmàtiques de la làmina pròpia no apareixen fins dotze dies després del naixement. Primer es produeix IgM i als 1-3 mesos predomina la IgA [1,9,30].

2. Desenvolupament de la microbiota intestinal

La microbiota autòctona intestinal és el conjunt de microorganismes que colonitzen la mucosa intestinal generant un benefici mutu entre l'hoste i els microorganismes [31]. La microbiota intestinal està formada per bacteris, fongs, virus i paràsits [16].

2.1 Colonització i composició de la microbiota intestinal

La colonització microbiana de l'intestí del nounat té un paper important per al SI i per al metabolisme. Si durant aquest procés hi ha alguna alteració de la colonització microbiana, pot augmentar la susceptibilitat a patir malalties al llarg de la vida adulta [32]. Des del naixement la microbiota s'instaura i es va desenvolupant i canviant, i no és fins als 2-5 anys de vida que la seva composició i diversitat és similar a la d'un adult [32]. La diversitat microbiana present en un adult sa es manté estable i contribueix al manteniment de l'homeòstasi immunitària. S'ha informat que a la microbiota de la gent gran (>65 anys) hi ha una disminució en la diversitat en comparació amb la de l'adult i aquests canvis podrien estar relacionats amb la davallada de la salut associada a l'edat (**Figura 3**) [32].

La colonització de la microbiota intestinal depèn de diferents factors ambientals com el tipus de naixement, la genètica, l'edat gestacional de la mare, el tipus d'alimentació del nadó i els tractaments amb antibiòtics (**Figura 3**) [2,16]. La primera exposició als microorganismes materns succeeix en l'úter [4]. El tipus de part condiciona la

microbiota que s'instaura en els nadons, ja que els nadons que han nascut per part vaginal, tenen una microbiota més similar a la microbiota vaginal de la mare, mentre que els que neixen per cesària, tenen una microbiota influenciada per la de la pell materna [26].

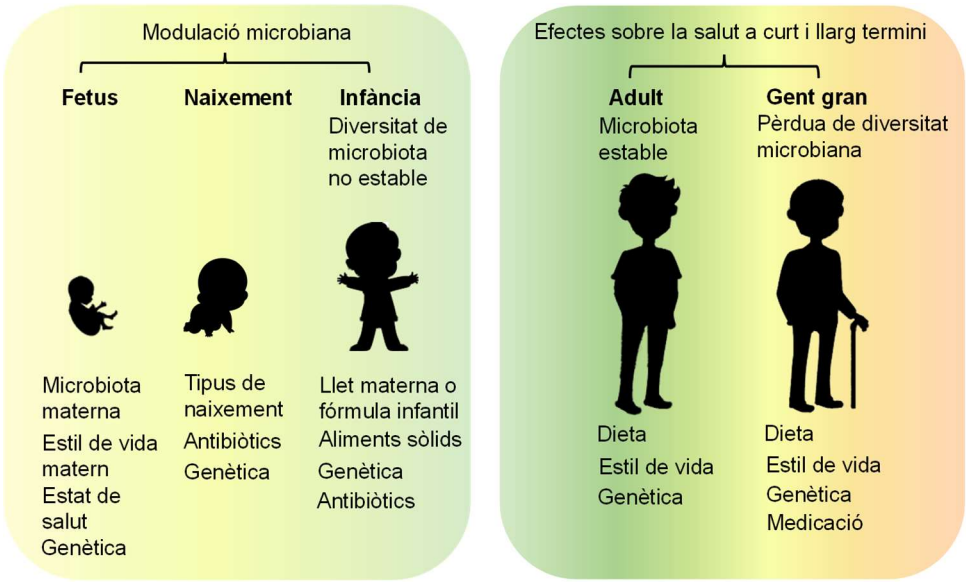


Figura 3. Factors que influeixen en el desenvolupament de la microbiota intestinal. Elaboració pròpia a partir de [16,32].

Els primers microorganismes que colonitzen l'intestí són anaerobis facultatius com *Lactobacillus*, enterobacteria i coliforms seguit de *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Bacteroides* i *Eubacterium* [2]. Aquest procés està influenciat segons els factors ambientals que s'han comentat al paràgraf anterior. Els nens que han nascut per part vaginal tenen un predomini d'espècies de *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Prevotella* o *Sneathia* mentre que els que han nascut per cesària predominen espècies de *Staphylococcus*, *Corynebacterium* i *Propionibacterium* [16,32].

La dieta del nounat, ja sigui llet materna o una fórmula infantil, també impacta notablement en el desenvolupament de la microbiota intestinal [4]. Mentre dura la lactància materna, la composició de la microbiota del nounat és veu influenciada per la de la llet materna [33]. Aquesta llet és una font de bacteris comensals que afavoreix el predomini de bacteris *Bifidobacterium*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* i *Lactobacillus* als intestins del nounat [32,33]. A més, la llet materna conté HMOs, els quals es digereixen parcialment a l'intestí prim i els bacteris els fermenten en el colon produint àcids grassos de cadena curta (AGCC) que tenen un paper molt important en el desenvolupament de la microbiota intestinal [4,33,34].

La introducció dels aliments sòlids al voltant dels 4-6 mesos d'edat provoca una disminució dels nivells de *Bifidobacterium* i activa la colonització dels bacteris

productors de butirat com per exemple, espècies de *Bacteroides* i *Clostridium* [32,35]. Durant la introducció del menjar sòlid, la microbiota pateix una diversificació gradual on cada cop s'assembla més a la microbiota adulta. Els nadons que reben la fórmula infantil en comptes de llet materna tenen una diversificació de la microbiota més primerenca [35].

La utilització d'antibiòtics durant les primeres etapes de vida afecta negativament a la microbiota ja que provoca una reducció de la seva diversitat, afavorint que s'hi adhereixin bacteris patogènics. A més, una sobreexposició d'antibiòtics està associada amb un augment del risc a patir malalties auto inflamatòries en el futur i pot predisposar al nounat a patir malalties al·lèrgiques [16,36].

2.2 Funcions de la microbiota intestinal

La microbiota intestinal juga un paper essencial en manteniment de l'homeòstasi de l'individu. És important pel metabolisme dels nutrients, defensa de l'hoste, desenvolupament del SI de l'hoste i desenvolupament l'intestí així com del manteniment de l'estructura i funció del tracte gastrointestinal (**Figura 4**) [16,37].

La microbiota intestinal és molt important pel metabolisme dels nutrients i la detoxificació de productes tòxics. Permet que l'hoste obtingui nutrients essencials com algunes vitamines i aminoàcids. A més, la microbiota intestinal és capaç de sintetitzar la vitamina K i diferents components de vitamina B [38]. També és capaç d'aprofitar nutrients no digeribles per l'hoste i generar AGCC, els quals són una font d'energia important pels enteròcits, s'integren al cicle de Krebs i en les rutes de síntesis de lípids i catabolisme glucídic permetent l'obtenció d'energia i també l'estimulació del peristaltisme intestinal [31,37,39].

La microbiota intestinal contribueix a la immunomodulació del SI innat i adaptatiu. Interacciona amb el SI contribuint a la seva maduració i promou la immunitat de la barrera intestinal [37]. A nivell del SI innat, la microbiota intestinal regula l'homeòstasi dels neutròfils i la granulocitosi [40]. A més, indueix la síntesi de proteïnes antimicrobianes en les cèl·lules de Paneth [38]. A nivell del SI adaptatiu, la microbiota influeix en la formació i activació dels limfòcits Tc, Treg, Th17 i B [38,39]. Com s'ha mencionat anteriorment, els Tc s'encarreguen d'eliminar les cèl·lules infectades i els Treg s'encarreguen de suprimir la resposta excessiva dels limfòcits T efectores i de generar tolerància [6,11]. En quant als limfòcits Th17, abans s'ha mencionat que responen contra bacteris extracel·lulars. Aquests limfòcits són abundants en la mucosa intestinal i secreten citocines (IL-17A, IL-17F, IL-21 i IL-22) que milloren la funció de la barrera del tracte gastrointestinal protegint a l'organisme enfront els patògens [5,39].

D'altra banda, la microbiota produeix metabòlits que també influeixen en el SI. Per exemple, els AGCC tenen efectes anti-inflamatoris en la mucosa intestinal. Els metabòlits derivats de l'indol i poliamines estimulen la producció de mucina i pèptids

antimicrobians [37]. La microbiota afavoreix la formació de la capa de moc, evitant l'adhesió de bacteris patogènics a l'epiteli, afavorint el transport del contingut luminal i l'ús dels pèptids i carbohidrats com a font de nutrició dels bacteris comensals [41,42]. Finalment, la microbiota té un paper de protecció en front els patògens, ja que els bacteris comensals habiten l'intestí i competeixen pels nutrients, els llocs d'adhesió i alguns són capaços de secretar pèptids antimicrobians que eviten la formació de nínxols per part dels microorganismes patogènics [16,26].

La importància de la microbiota intestinal en el desenvolupament del SI s'ha demostrat en ratolins lliures de gèrmens, els quals tenen més susceptibilitat a patir infeccions i tant el SI innat com l'adquirit no es desenvolupen correctament [37,43]. En aquest sentit, la formació de la melsa i els ganglis limfàtics mesentèrics no és correcta. Tanmateix, la producció d'IgA i el nombre de limfòcits Th es troben reduïts i a més, tenen incrementada la proporció de limfòcits Th1/Th2 [37].

La disbiosi és una alteració en la composició i funcionalitat de la microbiota intestinal [44]. Està associada a malalties autoimmunitàries, obesitat, al·lèrgies i trastorns inflamatoris com la malaltia inflamatòria intestinal i la síndrome de l'intestí irritable [37,39]. Per tant, la relació entre el SI i la microbiota intestinal és molt important per mantenir el balanç entre la tolerància a la microbiota i la resposta immunitària contra els patògens [37].

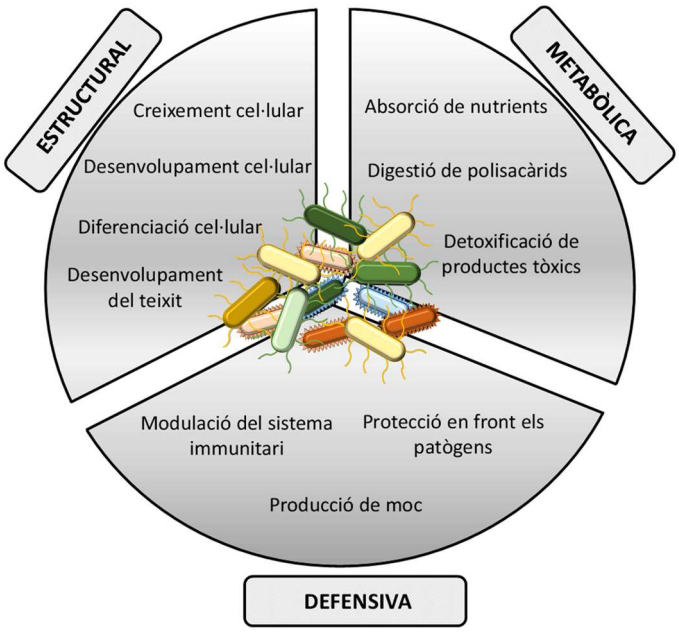


Figura 4. Funcions de la microbiota intestinal classificades segons els seus efectes sobre l'hoste a nivell d'estructura de l'intestí, metabolisme i capacitat defensiva. Elaboració pròpia.

3. El sistema immunitari i la microbiota en funció del sexe

S'han descrit factors genètics, hormonals, epigenètics i ambientals que fan que existeixin diferències entre els mecanismes de la resposta immunitària d'homes i dones [45–47]. Aquesta diferència està relacionada amb el cromosoma X, ja que aquest cromosoma conté molts gens relacionats amb el SI, factors de transcripció involucrats en el SI i microRNAs reguladors de la resposta immunitària [47]. A més, les hormones sexuals com la progesterona, estrògens, i testosterona modulen la resposta de les cèl·lules immunitàries [45,48,49]. La remodelació de la cromatina i la metilació del DNA són mecanismes epigenètics que també modulen la resposta immunitària [49].

D'altra banda, s'ha vist que la composició de la microbiota intestinal dels homes i de les dones és diferent [50–52], això també podria influir en el funcionament del SI. Estudis en bessons bivitel·lins de diferents sexes mostren durant la infància una microbiota similar, però després de la pubertat, no mantenen la similitud com succeeix en el cas de germans bivitel·lins del mateix sexe. Aquests canvis suggereixen que l'estatus hormonal modula la composició de la microbiota [46]. En el cas de ratolins, hi ha estudis que mostren que les femelles tenen una major diversitat i riquesa microbiana que els mascles [50,53]. Tot i que és difícil establir de forma global quins microorganismes són majoritaris en cada sexe ja que depèn de la soca o animal d'estudi, alimentació i edat [53].

Els nadons nens són més propensos a patir infeccions i morir en primeres etapes de vida en comparació amb les nenes. Per exemple, durant els primers anys de vida, els nens són mes susceptibles a la infecció causada per rotavirus (RV) [54] i pateixen més infeccions causades per protozous com, per exemple, el *Plasmodium falciparum*, causant de la malària [45].

Les dones tenen una resposta immunitària humoral i cel·lular més potent que els homes, cosa que les protegeix contra els patògens, però les predisposa cap a una resposta inflamatòria aberrant fent que tinguin més risc de patir malalties autoimmunitàries [46,55–57]. En aquest sentit, les malalties autoimmunitàries com el lupus eritematós sistèmic, l'artritis reumatoide o la diabetis de tipus I tenen una major incidència en dones que en homes. Malgrat que en els homes és menys comú patir malalties autoimmunitàries, n'hi ha d'algunes com la fibrosis pulmonar idiopàtica o la miocarditis que té una incidència major en homes [45]. Per altra banda, els homes tendeixen a ser més susceptibles de patir diferents infeccions causades per bacteris, virus i paràsits en comparació amb les dones i presenten certes infeccions virals amb major gravetat [46,47,49]. Existeix alguna excepció, per exemple, els homes es solen infectar més del virus influenza A, però la fatalitat és major en dones [47].

Estudis en humans, rosegadors i cultius primaris mostren les diferències associades al sexe en el SI durant les diferents etapes de vida (**Taula 1**). Abans de néixer, els fetus de sexe masculí presenten una resposta inflamatòria superior als de sexe femení que es manté més elevada fins a la pubertat [45]. En canvi, durant l'edat adulta, el SI innat de les femelles presenten una resposta inflamatòria major, l'expressió gènica de la via dels TLR és més elevada i les APC són més eficients en presentar Ag en comparació amb els mascles [45,49]. En canvi, *in vitro*, s'ha descrit que els mascles tenen més limfòcits NK que les femelles [58]. Durant la vellesa els homes tenen una resposta inflamatòria superior a les dones, mentre que aquestes presenten més limfòcits NK i expressen més IL-10 [45].

Taula 1. Diferències del sistema immunitari innat i adaptatiu segons el sexe en les diferents etapes de vida.

	Període pre-natal	Infantesa-pubertat	Post-pubertat /Adultesa	Gent gran
Immunitat innata				
Resposta inflamatòria				
Cèl·lules NK				
IL-10				
Vies TLR				
APCs				
Cèl·lules dendrítiques				
Macròfags				
Immunitat adaptativa				
Limfòcits B				
Immunoglobulines				
IgA				
IgG				
IgM				
IgE				
Activació/proliferació				
T				
Th				
Tc				
Treg				

APC, cèl·lules presentadores d'antigen; IL, interleucina; NK, cèl·lula natural killer; Th, T col·laboradors; Tc, T citotòxics; TLR, receptor de tipus Toll; Treg, T regulador. Modificat de [45]. Blau: major resposta immunitària en el sexe masculí; Rosa: major resposta immunitària en el sexe femení.

En quant al SI adaptatiu, els fetus de sexe masculí mostren nivells d'IgE superiors als de sexe femení [59]. Durant la infantesa, malgrat que els nivells de IgM i IgG són iguals en tots dos sexes, els nens presenten uns nivells d'IgA majors [60]. Les dones en edat adulta i durant la vellesa tenen més limfòcits B i Ig [45] tot i que també s'ha descrit que les dones en edat adulta tenen menys nivells d'IgA que els homes adults [60]. D'altra banda, els limfòcits T proliferen i s'activen més en dones que en homes amb l'excepció dels limfòcits Tc, els quals, durant la vida adulta són superiors en dones mentre que durant la vellesa ho són en homes [45]. D'altra banda, els Treg es troben en nivells més elevant en homes des de la infantesa fins la vellesa [45].

4. Infeccions durant el període de lactància

Durant el període post natal, tant la microbiota materna com la del nounat pateixen canvis biològics i ambientals que poden afectar la salut de la mare i la del nadó [61]. A més, en el cas del nounat, el seu SI es troba immadur i té una major susceptibilitat a patir infeccions gastrointestinals i respiratòries [4,5,62,63]. Els bacteris comensals com *Streptococcus* del grup B*, E. Coli, Listeria monocytogenes* i el virus respiratori sincitial poden causar infeccions greus al nounat mentre que en edats més avançades són poc virulents [63]. D'altra banda, la mare també pot patir malalties que solen aparèixer durant el període de lactància com seria el cas de les infeccions a la mama causada per fongs o bacteris. Totes dues poden donar lloc a complicacions com provocar el cessament de la lactància materna i, en situacions greus, generar un abscés a la glàndula mamària que requereixi drenatge quirúrgic o aspiració amb agulla [64,65].

4.1 Infeccions en el lactant: rotavirus

El RV és un virus que pertany a la família Reoviridae. És un virus no embolcallat d'uns 70 nm amb RNA de doble cadena segmentat. El seu genoma és d'unes 18.5 quilobases i codifica per sis proteïnes virals estructurals (VP1, VP2, VP3, VP4, VP6 i VP7) i sis proteïnes no estructurals (NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5 i NSP6) [66,67].

Les proteïnes no estructurals actuen a la replicació viral o interactuen amb les proteïnes de l'hoste influint en la resposta immunitària de l'hoste [67]. Les proteïnes NSP1, NSP2 i NSP4 es creu que estan involucrades en la virulència del virus [68], on NSP1 és un antagonista de l'interferó i la NSP4 és una enterotoxina [67,69].

La càpsida està formada per tres capes proteiques (la interna, la mitjana i l'externa) que contenen el genoma al seu interior. La capa interna està formada majoritàriament per la VP2 i en menor quantitat per les proteïnes VP1 i VP3 [66,70]. A la capa mitjana, s'hi troba la VP6, la seva reactivitat serològica i la variabilitat genètica determina el grup (espècie) de RV (d'A a J) [54]. Finalment, a l'externa es troben la VP4 (antigen de tipus

P) i la VP7 (antigen de tipus G), les qual indueixen la resposta immunitària fent que l'hoste produeixi Ac específics contra RV (**Figura 5**) [66]. Segons la seqüència de nucleòtids de les VP7 i VP4, les espècies de RV classifiquen com a serotips G i P, respectivament [69].

Segons les propietats antigèniques, el RV es classifica en 10 serogrups (A-J) [54], d'aquests, només 3 infecten a humans (A-C) i el predominant és el RV del grup A. Alhora, aquest grup es classifica en serotips G i P segons els Ag que presenta a la capa externa de la càpsida [68].

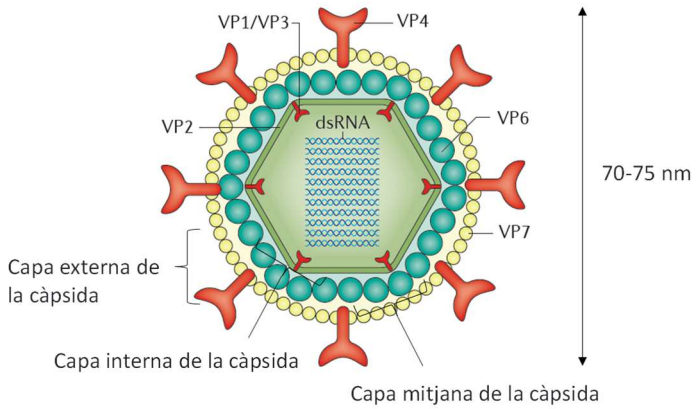


Figura 5. Representació del Rotavirus on es mostren les diferents proteïnes víriques estructurals. Modificada de [66].

El RV és el principal virus que causa diarrea aguda en nens i representa un 20-30% de tots el casos de gastroenteritis greu que requereixen tractament en hospital [54,66,68]. Aquest virus és el causant d'1.3 milions de morts en nens menors de cinc anys a tot el món [54]. Hi ha una mortalitat molt elevada en països d'Àfrica i Àsia (**Figura 6)** [54].

La distribució geogràfica del RV és variable, en regions tropicals, es troben infeccions per RV durant tot l'any, mentre que en zones més temperades, el virus sol aparèixer els mesos més freds (Europa, Àsia, Estats Units) i secs (Àfrica), per tant, segons el territori el virus es comporta com un virus estacional [54,67].

La gastroenteritis causada per RV afecta als nens de tot el món, especialment als que viuen en àrees remotes on hi ha una atenció sanitària deficient i unes condicions higièniques pobres [54]. Els adults, no s'acostumen a infectar amb el RV [54].

La susceptibilitat a patir la infecció causada per RV es modula amb factors no immunològics com la presència d'àcid gàstric i factors immunològics com l'expressió diferencial dels receptors de RV [66].

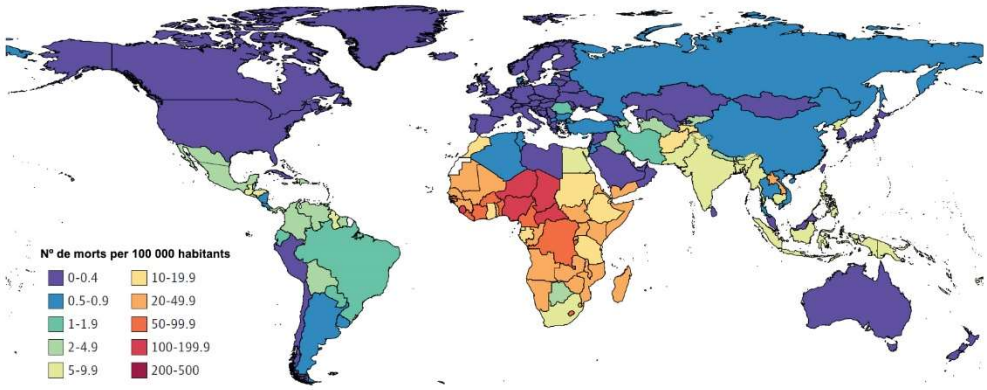


Figura 6. Distribució geogràfica de les taxes de mortalitat associades al rotavirus entre els nens menors de 5 anys durant l'any 2016. Modificada de [71].

Els RV són resistents a les condicions ambientals i es transmeten fàcilment, ja que només amb 10 partícules infectives o inclús menys poden causar la malaltia [54]. La càpsida de tres capes del RV és molt estable i facilita la transmissió fecal-oral [67], la qual és la principal ruta de transmissió [54]. El virus s'excreta en les femtes a una quantitat molt elevada [54,66]. Tot i així, la transmissió també pot tenir lloc a partir d'aigua, mans, menjar o superfícies contaminats [54]. D'altra banda, als hospitals, la infecció nosocomial per RV actua com a reservori. Les espècies A de RV són les més comunes entre les infeccions en nens i tenen una homologia elevada amb les soques animals, fet que propicia la transmissió directa d'animals a humans (especialment en països en vies de desenvolupament) [66].

4.1.1 Patogènesi

El RV infecta els enteròcits diferenciats i les cèl·lules enteroendocrines de l'intestí prim [66,67]. La unió del RV a la cèl·lula és un procés complex on intervenen el receptor d'àcid siàlic, coreceptors específics de l'hoste i la VP4 [54], la qual es trenca proteolíticament per proteases de l'hoste donant lloc a les subunitats VP5 i VP8. La primera augmenta la infectivitat de les partícules víriques mentre que la segona permet la unió del virus a la cèl·lula de l'hoste [54].

Un cop el RV s'ha unit a la cèl·lula, travessa la membrana plasmàtica per endocitosi [54]. La disminució de calci a l'endosoma provoca la solubilització de la capa externa de la càpsida, donant lloc a la partícula vírica de doble capa (DLP) [66], i a la formació dels cossos d'inclusió citoplasmàtics anomenats viroplasmes [54]. La DLP queda

alliberada de l'endosoma al citoplasma, on és transcripcionalment activa [66]. Allà, el RNA missatger del RV es transcriu i es tradueix donant lloc a les proteïnes víriques [66,69]. Un cop s'han generat les proteïnes víriques, el genoma de RNA del virus es replica i s'empaqueta en un nou DLP a l'interior del viroplasma [66]. La DLP surt del viroplasma cap al reticle endoplasmàtic gràcies a la NSP4, la qual actua com a receptor intracel·lular [66]. A l'interior del reticle endoplasmàtic es forma la capa externa de la càpsida donant lloc a la partícula vírica infecciosa [54], la qual s'allibera mitjançant la lisi cel·lular o enviant les partícules a la membrana plasmàtica apical de cèl·lules polaritzades [67]. La replicació del RV trenca l'homeòstasi cel·lular provocant dany als enteròcits i mort cel·lular [66–68]. A més, hi ha una pèrdua dels microvil·li i s'atrofien les vellositats intestinals [66].

L'enterotoxina NSP4 del RV augmenta els nivells de calci citoplasmàtic afectant al citoesquelet i a les proteïnes d'unió estreta i contribuint a la malabsorció i provocant la lisi dels enteròcits. A més, activa els canals de clor, provocant una secreció excessiva d'ions clorur cap al lumen intestinal que facilita el transport d'aigua, que juntament amb la reducció de la funció absortiva de la barrera epitelial, provoca la diarrea secretora. L'enterotoxina NSP4 també indueix la secreció de serotonina en les cèl·lules enteroendocrines provocant un augment de la motilitat intestinal (degut a l'augment de l'activitat de les terminacions nervioses dels nervis entèrics) juntament amb nàusees i vòmits (per l'activació dels nervis vagals) (**Figura 7**) [66].

En alguns casos, el RV pot entrar a la circulació sanguínia i provocar una infecció sistèmica. Aquests infants solen patir una infecció més greu, però no solen presentar una major simptomatologia extra-intestinal [66]. Tot i així, el RV s'associa a diferents alteracions no-gastrointestinals. S'ha descrit que el RV es pot detectar en líquid cefaloraquidi i pot provocar malalties neurològiques com meningitis o encefalitis i en models de ratolins s'ha observat que el RV podria provocar atrèsia biliar i augmentar el risc de patir diabetis mellitus, però aquestes dues associacions encara són controvertides i s'han d'estudiar amb més profunditat [66].

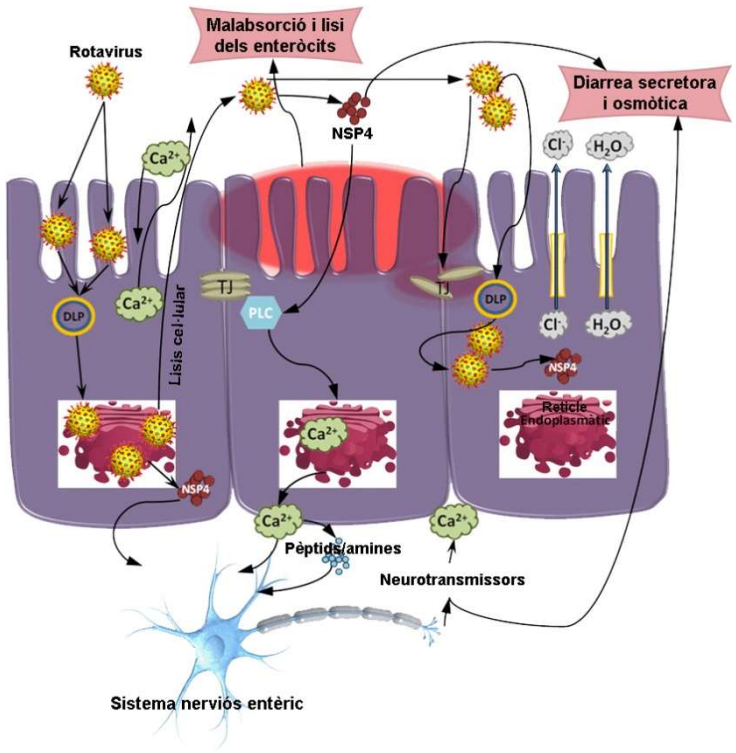


Figura 7. Esquema dels mecanismes patogènics del RV. El RV es replica a l'interior dels enteròcits i augmenta la concentració de calci intracel·lular, afectant al citoesquelet i a les proteïnes d'unió estreta i contribuint a la malabsorció i provocant la lisi dels enteròcits. La proteïna no estructural 4 (NSP4) contribueix al desequilibri d'electròlits i a la diarrea secretora. El RV pot estimular els sistema nerviós entèric augmentant la motilitat intestinal i contribuint a la diarrea. DLP: partícula vírica de doble capa; TJ: proteïnes d'unió estreta; PLC: fosfolipasa C. Adaptada de [72].

4.1.2 Clínica

La diarrea causada per RV pot anar des d'una diarrea aquosa lleu fins a una gastroenteritis aguda associada a una deshidratació que pot acabar provocant la mort de l'infant si no rep tractament [54]. La gastroenteritis causada per RV sol ser més greu que la causada per altres patògens [66,67]. Els infants de menys d'un mes, solen patir una infecció per RV asimptomàtica o lleu degut als Ac que han rebut de la mare *in utero* o que reben a través de la llet materna, mentre que a partir dels 3 mesos la infecció sol ser simptomàtica [66]. La gravetat de la diarrea causada per RV està associada a la dosis infectiva, al grau de deshidratació, a l'estat nutricional, a la immunitat natural i a tenir una edat menor de dos anys [54,66,73,74].

Les manifestacions associades a la infecció apareixen ràpid, ja que el període d'incubació és de només 1-3 dies [54,67]. Durant 2-3 dies, les manifestacions són febre

i malestar, que van acompanyats per anorèxia i somnolència. A més, també provoca vòmits, marejos, sensació de boca i gola seques, dolor abdominal i oligúria [54,66]. Després, comença la diarrea aquosa, la qual dura uns 3-8 dies. A vegades poden aparèixer manifestacions respiratòries durant la infecció per RV [54].

4.1.3 Resposta immunitària

Els enteròcits i les cèl·lules del SI reconeixen el RV mitjançant PRRs. Els receptors TLR3, TLR7 i TLR9 juguen un paper clau en la senyalització dels IFNs per fer front a la infecció causada per RV [54].

L'activació dels PRRs provoca la producció de citocines i quimiocines, per exemple IFN, factor de necrosi tumoral α (TNF-α), IL-6, IL-8, IL-15 i la quimiocina CXCL10 donant lloc al reclutament i a l'activació dels limfòcits NK i macròfags, els quals a la seva vegada estimulen la resposta dels limfòcits B i T [75].

Els limfòcits NK eliminen les cèl·lules infectades mentre que algunes citocines com l'IFN-γ i el TNF-α poden eliminar el virus sense destruir les cèl·lules infectades [76]. Els IFNs i els gens que els regulen juguen un paper clau per aturar la propagació del virus i eliminar-lo. *In vitro*, s'ha descrit que els nivells d'IFNs de tipus I, II i III augmenten i són capaços d'aturar la infecció [67,75]. El factor regulador d'IFN (IRF) 3 (IRF3) activa l'IFN de tipus I, el qual indueix la secreció de citocines pro-inflamatòries i activa les APCs [75].

Malgrat l'activació del SI innat per fer front al virus, la NSP1 del RV actua com un antagonista de l'IFN i inhibeix la senyalització dels PRRs reduint la resposta innata contra el virus [66,67]. S'ha observat que aquesta proteïna degrada el IRF3 i el IRF7 i, a més, inhibeix l'activació del factor nuclear κβ [67]. Aquesta evasió del SI innat, fa que sigui essencial el SI adaptatiu per acabar d'eliminar el virus [66].

La infecció causada per RV genera una resposta immunitària adaptativa on els limfòcits B produeixen IgG i IgA anti-RV [66,68] i els limfòcits Tc s'encarreguen d'eliminar les cèl·lules infectades i proveeixen una immunitat que pot protegir a l'organisme d'aquesta infecció [76].

L'evasió del SI que genera el RV facilita les infeccions recurrents, que es solen acompanyar amb simptomatologia més lleu, gràcies a la memòria immunològica [66].

4.1.4 Tractaments i prevenció

No hi ha cap fàrmac específic contra el RV, el tractament és simptomàtic. Es recomana el manteniment de la ingesta de calories proteiques i les solucions de rehidratació per reposar la pèrdua d'electròlits i fluids degut als vòmits i diarrea greu i per prevenir la

mortalitat o l'empitjorament de la malnutrició en els països en vies de desenvolupament [54,66]. A més, la morbiditat i mortalitat es pot reduir millorant les condicions de sanitat i d'higiene.

A més, en cas necessari es poden utilitzar fàrmacs antisecretors, antiemètics i antivirals. Els suplements que contenen bacteris beneficiosos també s'utilitzen per millorar la funció intestinal durant la infecció i, per tant reduir la durada i el nombre d'episodis, així com la gravetat de la diarrea [66]. Els fàrmacs antisecretors com el racecadotril i similars poden tenir un efecte positiu en el tractament de la diarrea causada per RV. El racecadotril redueix la secreció d'aigua i electròlits de l'intestí i pot disminuir la diarrea i la durada, però la seva eficàcia és variable. Els fàrmacs antiemètics com el dimenhidrinat, ondansetró i metoclopramida es poden utilitzar per reduir la freqüència dels vòmits i la necessitat de rehidratació intravenosa tot i que poden augmentar la diarrea [66].

La forma més eficient de prevenir les infeccions causades per RV és mitjançant la vacunació. Hi ha diferents vacunes a tot el món [54,66,77]:

- **RotaShield®:** va ser la primera vacuna que es va generar contra el RV (1998). És una vacuna tetravalent que conté una barreja de les quatre soques G més comuns. És molt efectiva en prevenir la diarrea greu causada per RV (80-100%), però es va deixar d'utilitzar per l'augment del risc d'intussuscepció, la qual té lloc quan el segment proximal de l'intestí es superposa amb el segment distal causant una obstrucció intestinal que requereix un diagnòstic ràpid i un tractament quirúrgic.
- **RV5 (RotaTeq®):** és una vacuna pentavalent formada per cinc soques (G1, G2, G3, G4 i P1A) atenuades de RV bovins modificats que expressen la VP4 o VP7 humana (2006). La vacuna s'administra en tres dosis als 2, 4 i 6 mesos d'edat. Protegeix en un 74% contra la infecció causada per RV i en un 98% evitant que aquesta esdevingui greu.
- **RV1 (Rotarix®):** és una vacuna monovalent que conté la soca 89-12 de RV humà atenuat (2006). La vacuna s'administra en dues dosis, als 2 i 4 mesos d'edat. El nombre d'hospitalitzacions es redueix entre un 80-90% en Europa i Sud-Amèrica, però en països en vies de desenvolupament a l'Àfrica és només d'un 59%.

Tant la RotaTeq com la Rotarix són segures i efectives en prevenir la gastroenteritis greu als països devenvolupats, però en els països en vies de desenvolupament no són tant eficaces. A més, ambdues vacunes tenen l'inconvenient que augmenten el risc d'intussuscepció [54,66].

A part de les dues vacunes recomanades per l'Organització Mundial de la Salut (OMS) (RotaTeq® i Rotarix®), n'hi ha d'altres que s'utilitzen exclusivament en el país on s'han desenvolupat [54,66].

- **ROTAVAC®:** vacuna que utilitza la soca de RV 116E atenuada. Està aprovada a la Índia. En els assajos clínics va mostrar una eficàcia del 56%.
- **Lanzhou Lamb RV® (LLR-85):** vacuna atenuada generada a la Xina. S'utilitza des del 2012.
- **RV3BB®:** es va desenvolupar a Austràlia utilitzant la soca G3P, la qual circula per Àsia i Àfrica. Aquesta vacuna pot provocar protecció creuada contra altres soques de RV humanes.
- **Rotavin-M1®:** vacuna generada a Vietnam.
- **BRV-PV®:** és una vacuna pentavalent amb un preu molt assequible. S'administren 3 dosis i ha reduït un 66.7% la incidència de gastroenteritis greu en infants de Nigèria.

Les vacunes actuals protegeixen enfront una gran varietat de genotips de RV. Tot i que el motiu no està clarament establert, les vacunes de RV protegeixen molt més als infants dels països desenvolupats (72-98%) que als de països en vies de desenvolupament (42-63%), i per tant hi ha menys protecció als països on hi ha més afectació d'aquesta infecció [54].

4.1.5 Models animals de rotavirus

La utilització dels models animals en la infecció causada per RV ha permès entendre la seva patogènesi tant en humans com en animals, la resposta immunitària que té lloc i poder testar l'eficàcia de les vacunes [66,68,77]. S'han utilitzat animals grans com porcs, vaques i ovelles, així com animals de mida petita com ratolins, rates i conills [78–82].

D'entre els animals de mida gran, destaquen els porcs, ja que tenen una fisiologia del tracte gastrointestinal i un desenvolupament de la immunitat mucosal similar als de l'humà [83]. Malgrat això, tant els porcs com les vaques i les ovelles requereixen d'instal·lacions grans i d'un equip especialitzat. Per tant, aquests models presenten un alt cost i el seu ús està limitat.

El model que s'ha utilitzat més àmpliament per estudiar la infecció causada per RV és en conills i sobretot en rosegadors, degut a que tenen gestacions curtes i naixements multípars, els quals permeten incorporar un gran nombre d'animals en un període curt de temps [82,84]. Tot i així, tots dos models tenen limitacions com, per exemple, que les soques de RV humà no es repliquen bé en aquests models animals i que la clínica només s'observa en animals de com a màxim 15 dies de vida [82].

La majoria dels models de diarrea associada a RV en ratolí utilitzen animals d'entre 4 i 8 dies de vida tot i que n'hi ha alguns que han utilitzat animals majors de 4 setmanes i d'entre 8 i 16 setmanes, quan es vol estudiar el procés infecciós sense clínica associada [85–88]. S'utilitzen diferents soques de RV per infectar els animals com *epizootic diarrhea of infant mouse virus* (EDIM), rotavirus rhesus (RRV), *wild-type murine rotavirus EDIM-Cambridge* (Ec_{wt}) i el rotavirus de simi A (SA-11) [85–89]. En el cas de les rates es solen utilitzar animals amb una edat compresa entre 2 i 8 dies de vida, encara que també s'han utilitzat rates de més de 21 dies d'edat, de nou com a model d'infecció no associat a clínica diarreica [82,90,91]. S'han utilitzat diferents soques de RV com, per exemple, la SA-11, RRV o EDIM [84,91,92]. Les manifestacions clíniques que es solen avaluar són la incidència i la gravetat de la diarrea. Alguns autors avaluen la gravetat mitjançant la puntuació de les femtes (índex de diarrea) amb valors entre l'u i el quatre tenint en compte la seva consistència, color i volum. També es mira el grau d'infectivitat del virus en l'hoste determinant la presència del virus en teixits i la seva eliminació mitjançant la seva detecció en femtes. D'altra banda, a nivell immunitari es quantifiquen els nivells dels Ac específics contra RV en sèrum, femtes i intestí [84,87,93].

4.2 Infeccions maternes durant la lactància: mastitis

La mastitis és una inflamació de la glàndula mamària que pot anar acompanyada o no d'infecció, la qual, si no es tracta adequadament, pot arribar a ser mortal [94]. La majoria dels casos de mastitis són d'etiologia infecciosa [95,96].

Els principals agents etiològics de les mastitis infeccioses són del gènere *Staphylococcus* i *Streptococcus*. De tots dos gèneres, els *Staphylococcus* són el majoritaris (>75%), on destaquen les espècies *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis)* i *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) [97]. També ho poden causar, de forma menys comú, espècies de *Actinomyces*, *Bacillus*, *Citrobacter*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Klebsiella*, *Mannheimia*, *Mycobacterium*, *Mycoplasma*, *Pasteurella*, *Proteus* i *Serratia*. D'altra banda, les mastitis degudes a altres microorganismes com llevats són poc freqüents [98].

Com s'ha mencionat anteriorment (apartat 3.1), la lactància materna és una font de bacteris clau per al correcte desenvolupament de la microbiota intestinal del nounat. És una font de *Stahpylococcus* i *Streptococcus* i en menor mesura de bifidobacteris, enterobacteris i bacteris de l'àcid làctic [98]. La mastitis provoca una disbiosi de la microbiota de la llet augmentant la concentració de l'agent causal i pràcticament fent desaparèixer la resta de bacteris [99]. La llet d'una mare sana conté una concentració de bacteris menor de 10^3 unitats formadores de colònies (UFC)/mL, mentre que una mare amb mastitis sofreix un augment de la quantitat de bacteris assolint nivells més

elevats de 10^4 UFC/mL [99]. La majoria dels bacteris que causen aquesta malaltia són capaços de retenir el flux de la llet mitjançant la formació de biofilms, generant un medi de cultiu que afavoreix el seu creixement [95,96]. Quan la concentració bacteriana és molt elevada, la llum dels conductes es redueix i s'acumula la llet, la qual fa pressió sobre l'epiteli i provoca dolor (**Figura 8**) [99].

La mastitis, altera la composició bacteriana de la llet, és a dir una disbiosi, que arribarà al nadó. També augmenten els nivells de clorur i sodi mentre que els nivells de lactosa i potassi baixen. En referència als macronutrients de la llet, disminueixen els nivells de carbohidrats, greixos i energia [95].

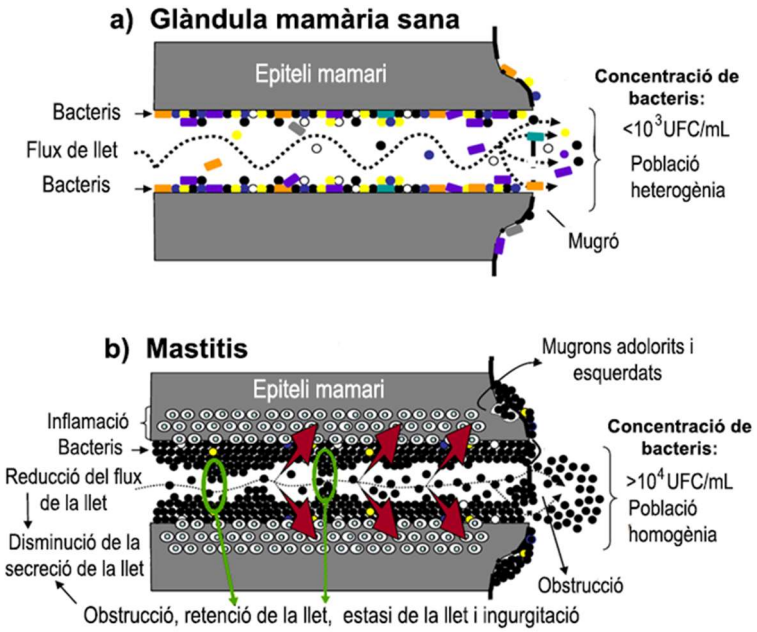


Figura 8. Esquema de l'epiteli i els conductes mamaris en condicions fisiològiques (a) i en situació de mastitis (b). Les fletxes vermelles indiquen l'augment de la pressió de la llet degut a la disminució de la llum del conducte, aquest augment provoca el dolor en forma de punxada característic de la mastitis. Modificada de [97].

La incidència de mastitis pot variar des del 3% fins el 33% de les mares lactants [61]. Malgrat que aquesta inflamació pot aparèixer en qualsevol moment de la lactància, entre el 74-95% dels casos succeeix durant les primeres dotze setmanes de lactància [94].

Els factors de risc de patir mastitis inclouen l'ús d'antibiòtics durant l'embaràs, part o l'alletament, haver tingut mastitis prèviament, tenir els mugrons esquerdats o adolorits, l'ús d'ungüents, l'estrès, les situacions d'immunodeficiència o autoimmunitat,

l'alletament incorrecte, el tabaquisme i l'edat de les mares [94,96,100,101]. En aquest sentit, s'ha observat que hi ha una major incidència en mares de 21 a 35 anys [94].

4.2.1 Classificació i clínica

La mastitis es pot classificar depenent de l'estadi de lactància i de les manifestacions clíniques [98]. Segons l'estadi, es classifiquen les mastitis pròpies de la lactància i les que apareixen en períodes fora de l'alletament.

La mastitis de la lactància és una inflamació aguda del teixit conjuntiu interlobular que es troba dins la glàndula mamària. Mentre que la mastitis que no té lloc durant la lactància, és una inflamació localitzada de les estructures secretores o no secretores de la glàndula mamària [98].

La mastitis pot provocar el cessament de l'alletament degut al dolor, malestar general i febre [61]. Segons les manifestacions clíniques, la mastitis es pot classificar en subaguda, aguda, granulomatosa i abscés mamari [96]:

- La **mastitis subaguda** és la més freqüent. Sol estar provocada per *S. epidermidis* i acostuma a provocar una sensació de cremor i dolor fort en forma de punxada. Generalment se sol infradiagnosticar i pot provocar deslletaments no desitjats [95,96].
- La **mastitis aguda** sol ser deguda a *S. aureus*. La clínica que s'observa és hiperèmia, dolor, augment de la mida de la glàndula mamària i de la seva densitat, enduriment de la zona afectada i presència d'edema. Pot provocar nàusees, vòmits, malestar, febre i limfangitis mamària (infecció als vasos limfàtics). Si no es tracta pot donar lloc a un abscés de la glàndula mamaria [95,96,98].
- La **mastitis granulomatosa** es creu que és deguda al bacteri *Corynebacterium kroppenstedtii*. És infreqüent i provoca dolor, formació d'abscessos i la retracció del mugró. La formació dels granulomes és lenta, per aquest motiu poden aparèixer mesos o inclús anys després d'haver aturat l'alletament [95,96].
- L'**abscés mamari** se sol produir per *S. epidermidis, S. aureus*, altres estafilococs coagulasa negatius i difteroides [96,102]. En l'11% dels casos de mastitis aguda es formen els abscessos mamaris. Segons las seva localització es classifiquen en superficials, intramamaris i retromamaris [96].

4.2.2 Staphylococcus Epidermidis

El *S. epidermidis* és un bacteri gram positiu, anaerobi facultatiu i catalasa positiu [103]. El seu genoma està format per 2.5 megabases, el 80% és comú en tot el gènere, però hi ha un 20% que és variable, cosa que li permet adaptar-se i créixer en diferents

microambients de la pell. A més, poden experimentar transferència horitzontal de gens a través de plasmidis i fags per adaptar-se i poder persistir al seu nínxol, ja que la pell és un lloc on hi ha una alta pressió selectiva [104].

Durant les primeres etapes de vida, la colonització del *S. epidermidis* és molt important per al desenvolupament de les cèl·lules immunitàries [104].

El *S. epidermidis* a part de ser un bacteri comensal que produeix modulines solubles en fenol (MSP) i lantibiòtics, és a dir, pèptids antimicrobians que produeixen els bacteris gram-positius [105], també és un patogen oportunista (**Figura 9**) [106] i conté factors de virulència com lipases, proteases i MSP [104]. A més, és capaç de formar biofilms, cosa que li permet evadir el SI [106,107].

Aquest bacteri pot créixer en conductes, ja siguin naturals o artificials. De fet, el *S. epidermidis* representa la primera causa d'infeccions hospitalàries, generalment associades a catèters i dispositius similars [108–110]. Per tant, la glàndula mamària i els seus conductes són perfectes per al seu creixement i per a la formació de biofilms.

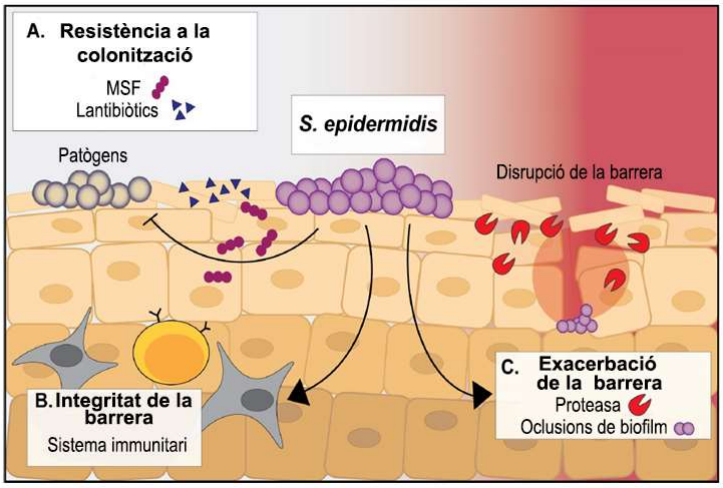


Figura 9. Efectes duals del *Staphylococcus epidermidis* a la barrera cutània. Ajuda a mantenir una bona homeòstasi de la barrera cutània evitant la colonització de patògens (A.) i ajudant a mantenir la seva integritat (B). Tot i que quan hi ha una disrupció de la barrera, el seu comportament canvia i es torna un patogen oportunista que pot exacerbar les lesions de la pell en persones predisposades com, per exemple, persones amb dermatitis atòpica (C). MSP: modulines solubles en fenol. Modificada de [104].

4.2.3 Patogènesis

La principal via d'entrada es creu que és a través de les esquerdes o fissures que es produeixen en l'arèola o mugró. L'estancament de la llet facilita l'arribada dels microorganismes per via canalicular i aquests afecten al parènquima glandular mamari i al teixit intersticial [94,96].

A la primera fase de la infecció, el *Stahpylococcus* genera els factors de virulència que faciliten l'adhesió i l'evasió del SI per tal de créixer i formar biofilm. Després, a la fase més tardana secreta els factors de virulència que li permeten millorar el biofilm i disseminar-se dins la glàndula mamària [111].

La infecció provoca coàguls de llet degut a l'agregació de leucòcits i l'activació de la coagulació que poden obstruir els conductes i evitar l'excreció completa de la llet [112]. D'altra banda, si el SI de la glàndula mamària no elimina el patogen, aquest pot arribar al torrent sanguini i donar lloc a una infecció sistèmica.

La simptomatologia i l'evolució d'una infecció causada per soques de *Staphylococcus* depèn dels seus factors de virulència i de l'habilitat defensiva de l'hoste, la qual depèn de la integritat de la pell i les membranes mucoses que eviten l'entrada del bacteri i del nombre i funcionalitat dels leucòcits que s'encarreguen d'eliminar el bacteri [111].

4.2.4 Resposta immunitària

Un cop el bacteri envaeix el teixit mamari, la permeabilitat de la barrera hemato-làctica augmenta ja que es modulen les proteïnes d'unió estreta fent que arribin més components sanguinis al teixit com per exemple les IL, les quals juguen un paper important en regular el flux de leucòcits, cap a la glàndula mamària [111]. D'altra banda, el bacteri allibera toxines que activen a les cèl·lules epitelials i el SI fent que s'alliberin citocines que atreuen més leucòcits polimorfonuclears a la zona infectada, especialment neutròfils [113].

La resposta immunitària per fer front la mastitis no és específica, sinó que és la resposta que fa el SI enfront qualsevol bacteri. Tant els neutròfils com els macròfags tenen un paper molt important en l'eliminació de bacteris extracel·lulars. Ambdós eliminen els bacteris mitjançant la fagocitosi. Durant la fase primerenca de la mastitis, els neutròfils constitueixen més del 90% dels leucòcits totals del teixit mamari i secrecions mamàries [112]. Tant els neutròfils com els macròfags, quan troben el bacteri, el fagociten i alliberen espècies reactives d'oxigen, proteïnes antibacterianes i mediadors inflamatoris [113].

4.2.5 Tractaments

Els antibiòtics són els tractaments de primera línia contra la mastitis infecciosa humana [61]. La dicloxacil·lina i flucloxacil·lina són els antibiòtics més adequats per tractar la mastitis. En casos on hi ha una intolerància o al·lèrgia a la penicil·lina, el tractament es fa amb cefalexina o clindamicina, respectivament. No hi ha un consens sobre la durada del tractament, tot i que sol ser entre 7 i 14 dies [95].

Malauradament hi ha bacteris resistents a diferents antibiòtics i per aquest motiu s'estan buscant teràpies alternatives com, per exemple, les intervencions dietètiques [61,95,114], ja que el fet que hi hagi bacteris causants de mastitis resistents a antibiòtics i amb habilitat per formar biofilms fa que aquesta malaltia tendeixi a ser una infecció recurrent o crònica [95]. D'altra banda, els antibiòtics eliminen tant els bacteris patògens com els comensals, per tant també alteren la microbiota de la llet materna [61].

Per tractar les manifestacions s'utilitzen antitèrmics, analgèsics i anti-inflamatoris locals [96]. Quan hi ha un abscés mamari, és necessària la cirurgia i després es continuarà amb el tractament d'antibiòtics i cures locals diàries [96].

4.2.6 Models animals de mastitis

Els models *in vitro* de mastitis no permeten estudiar les interaccions que hi ha entre el patogen i les cèl·lules de l'hoste en un context complex similar al real. Per aquest motiu és necessari estudiar la malaltia mitjançant models animals. L'estudi de la mastitis en remugants suposa una despesa econòmica molt gran, ja que es necessiten instal·lacions i laboratoris especialitzats [82,115]. Per això, com a alternativa, s'utilitzen models murins. Com s'ha comentat anteriorment, tant les rates com els ratolins tenen una manipulació senzilla, el seu cost és menor i permeten utilitzar un elevat nombre d'animals que permet realitzar una estadística vàlida [1,115].

Per induir la mastitis en ratolins, s'ha d'anestesiar l'animal i seguidament s'ha d'inocular el patogen, generalment bacteris, via intramamària. Se sol fer durant les dues primeres setmanes de lactància. Hi ha diferents mètodes per fer-ho, per exemple, es pot posar una gota amb molta concentració del patogen a la punta del mugró. La incidència de mastitis generada és molt variable i depèn del tipus d'agent inoculat o de si el mugró està lesionat [115]. Un altre mètode és introduir el patogen amb una micropipeta [116] o amb una xeringa després de fer un petit tall al mugró. Tant en rates com ratolins també es pot induir una mastitis mitjançant la inoculació de lipopolisacàrid al conducte mamari [117–119].

L'ús de rosegadors ha permès estudiar els canvis a nivell immunitari [119], i l'efecte protector de diferents compostos com, per exemple, el butirat i l'àcid retinoic [117,118].

En general, els estudis en models animals s'han centrat en els efectes de la mastitis en la mare, però no en els efectes que pot provocar en les cries nounades. La rata lactant és un bon model animal per estudiar el desenvolupament del SI durant les primeres etapes de vida, ja que quan neixen el seu SI és immadur però durant la lactància i el deslletament es desenvolupa ràpidament i permet estudiar la seva evolució en poques setmanes [1].

5. Moduladors microbians: Prebiòtics, probiòtics i postbiòtics

5.1 Prebiòtics

Els prebiòtics es defineixen com compostos no digeribles que són metabolitzats selectivament pels microorganismes de l'intestí modulant la composició o activitat de la microbiota intestinal, conferint un benefici per a la salut de l'hoste [31].

Es poden trobar de forma natural en aliments com les verdures, hortalisses, llegums, llet, cereals, mel, fruites i fruits secs o es poden obtenir per mètodes enzimàtics i químics [120]. Un compost només es considera un prebiòtic quan no s'absorbeix ni s'hidrolitza al tracte gastrointestinal, es fermenta de forma selectiva per bacteris beneficiosos de la microbiota intestinal i indueix efectes fisiològics beneficiosos per a la salut [120].

5.1.1 Tipus

Hi ha molts tipus de prebiòtics, la majoria són carbohidrats tot i que n'hi ha que no ho són com, per exemple, els polifenols i els àcids grassos poliinsaturats [121]. Els prebiòtics més estudiats en humans són els oligosacàrids fructans i galactans com la inulina, els fructooligosacàrids (FOS), els galactooligosacàrids (GOS) i la lactulosa.

La inulina es troba present en productes vegetals i està formada per oligosacàrids i polisacàrids de fructosa amb grau de polimerització (DP) entre 2 i 60 unitats [122]. Els FOS són oligosacàrids de fructosa amb un DP de 2 a 10 que s'obtenen de l'hidròlisi de la inulina o de la transfructosilació enzimàtica, a partir de la sacarosa [120].

Els GOS es troben a la llet humana i animal i també es poden obtenir industrialment a partir de la lactosa del sèrum de formatgeria. Estan formats per 2-10 molècules de galactosa unides a una glucosa terminal [120].

La lactulosa és un disacàrid sintètic format d'una molècula de fructosa i d'una de galactosa i que s'obté per mètodes químics o enzimàtics [123].

A la llet materna hi ha almenys 1000 oligosacàrids diferents, coneguts com a oligosacàrids de llet materna (HMOs), dels quals s'han identificat més de 200 [120]. Estan constituïts principalment per una molècula de lactosa en el seu extrem reductor a la qual se li uneixen diferents carbohidrats [120]. En llet es troben a una concentració de 5-20 g/L, amb excepció del calostre on hi ha uns nivells superiors d'uns 20-25 g/L [29].

5.1.2 Mecanismes d'acció i efectes beneficiosos

Els prebiòtics confereixen beneficis a l'hoste mitjançant diferents mecanismes (**Figura 10**), aquests poden ser microbiota dependents o microbiota independents. Els mecanismes microbiota dependents estimulen la composició o l'activitat de la microbiota intestinal, mentre que en els mecanismes microbiota independents, els prebiòtics interaccionen directament amb les cèl·lules de l'hoste o amb els patògens [124].

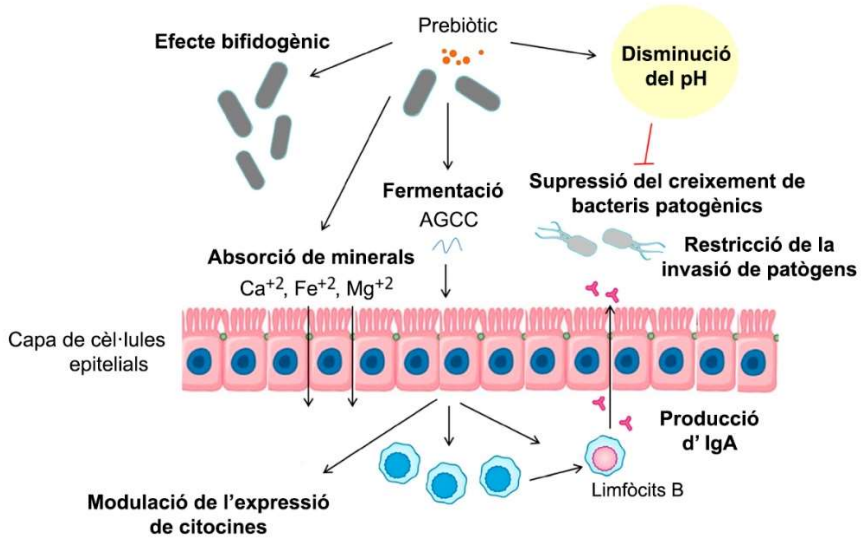


Figura 10. Mecanismes d'acció dels prebiòtics. Aquests mecanismes inclouen promoure l'absorció d'ions i oligoelements, la producció de productes metabòlics microbians, una disminució del pH i la regulació del sistema immunitari. AGCC: àcids grassos de cadena curta; IgA: immunoglobulina A .

D'entre els diferents mecanismes d'acció dels prebiòtics cal destacar:

- **Millora de l'absorció d'ions i oligoelements:** com per exemple el calci o el magnesi [125].

- **Bloqueig de la invasió dels patògens:** els prebiòtics poden mimetitzar els glicoconjugats de les microvellositats intestinals i interactuar amb receptors bacterians i evitar així que els patògens s'uneixin a les cèl·lules epitelials i inhibir la seva colonització [126].

- **Regulació del SI:** els prebiòtics poden modular la resposta de citocines i augmentar la producció d'IgA, entre altres [125].

- **Efecte bifidogènic;** els prebiòtics estimulen de forma selectiva el creixement o activitat de bacteris beneficiosos, com per exemple, els *Lactobacilli* i *Bifidobacteria,* proporcionant-los una font d'aliment [125]. S'ha descrit que els nadons alimentats amb llet materna o amb fórmules infantils suplementades amb GOS i FOS presenten un increment en l'abundància de bifidobactèries en comparació amb aquells que reben fórmules infantils sense prebiòtics [125].

- **Generació de productes metabòlics de la microbiota;** on destaquen els AGCC [125]. Els AGCC són capaços de reduir els nivells d'amoníac del sèrum, promouen la reducció del pH donant lloc a una acció bactericida i augmenten l'absorció de minerals [127]. Els més abundants són el butirat, el propionat i l'acetat [125]. El butirat és la principal font d'energia pels colonòcits i és considerat un dels metabòlits més importants del colon degut a les seves propietats anti-inflamatòries [125,126], el propionat es metabolitza al fetge i al múscul per a la gluconeogènesi i l'acetat s'utilitza per generar energia a l'hoste [126]. Respecte al propionat, s'ha descrit que participa en la regulació del metabolisme lipídic disminuint la síntesi de colesterol del fetge i també regula el metabolisme de la glucosa [127].

Els prebiòtics estan clínicament acceptats i recomanats com a suplement dietètic per a la constipació, ja que incrementen el volum del contingut intestinal i estimulen la motilitat intestinal [128]. A més semblen tenir un paper en la reducció del risc de patir malalties cardiovasculars ja que són capaços de disminuir els nivells de colesterol, de les lipoproteïnes de baixa densitat i dels triacilglicèrids [128]. També milloren la concentració i la memòria i redueixen la gravetat de malalties al·lèrgiques com la dermatitis atòpica [128].

A les fórmules infantils es solen afegir oligosacàrids prebiòtics relativament semblants als que es troben a la llet materna [129]. Els més utilitzats són els fructoologoscàrids de cadena llarga (lcFOS) i els galactooligosacàrids de cadena curta (scGOS) [129]. La combinació de scGOS i lcFOS canvia la consistència de les femtes i la composició de la microbiota intestinal dels infants que prenen fórmules infantils, fent-la més similar

als nadons que s'alimenten amb llet materna [129–131]. A més, tant estudis preclínics com clínics han mostrat que la suplementació amb scFOS i lcFOS en fórmules infantils redueix la incidència d'al·lèrgia, dermatitis atòpica i infeccions del tracte respiratori i gastrointestinal [132–136].

Malgrat la quantitat d'estudis en humans, en animals i *in vitro* per entendre els mecanismes dels prebiòtics, els seus efectes a curt i llarg termini encara no estan clars, i per tant calen més estudis per aclarir els seus mecanismes i els seus efectes sobre la salut de l'hoste [125].

5.2 Probiòtics

Els probiòtics es descriuen com microorganismes vius, que quan s'administren en quantitats adequades, confereixen beneficis per a la salut de l'hoste [121]. Els efectes beneficiosos dels probiòtics depenen de l'estat de salut de l'hoste i de la soca del bacteri [137,138]. Per tant, les propietats demostrades en una certa soca, no poden ser extrapolades a una altra, ni tan sols de la mateixa espècie.

Els probiòtics més utilitzats són soques del gènere *Bifidobacterium* i *Lactobacillus*, encara que també s'utilitzen llevats com els del gènere *Saccharomyces* [34].

La seguretat dels probiòtics està relacionada amb la vulnerabilitat dels pacients, la dosi i durada de de l'administració, la via i la freqüència d'administració. La seguretat també està lligada a la soca del microorganisme i l'absència d'infectivitat o toxicitat d'aquesta, entre d'altres [139].

5.2.1 Mecanismes d'acció

Els probiòtics exerceixen els seus efectes beneficiosos mitjançant diferents mecanismes (**Figura 11**):

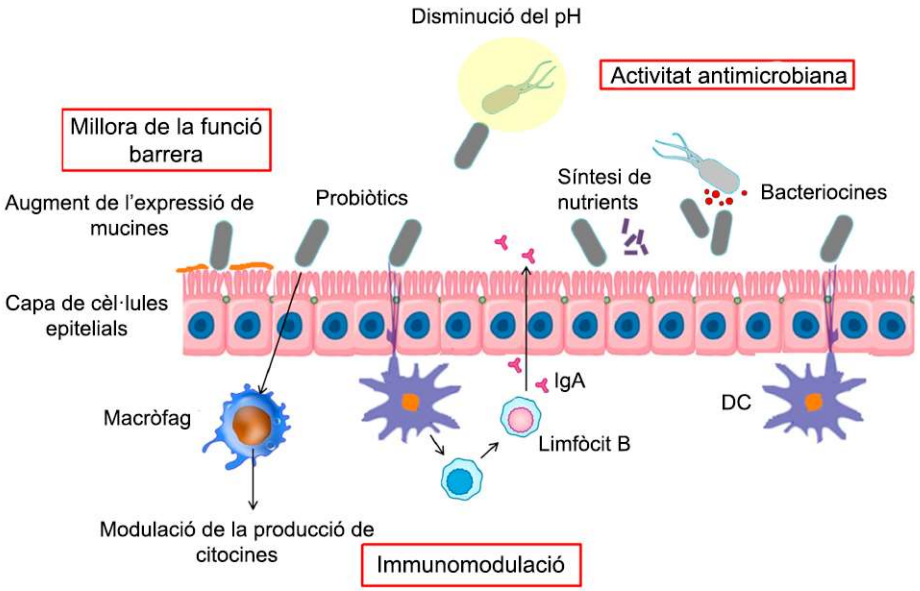


Figura 11. Mecanismes d'acció pels quals dels probiòtics poden actuar dins de l'intestí. Aquests mecanismes inclouen la millora de la funció de barrera (augment de la producció de moc i millora de la integritat de la barrera), activitat antimicrobiana (efectes antagònics sobre diversos microorganismes, adherència competitiva a la mucosa i a l'epiteli), i immunomodulació (modulació del sistema immunitari de l'hoste). IgA: immunoglobulina A; DC: cèl·lules dendrítiques.

- **Generació de compostos antimicrobians** i competència pel lloc d'adhesió a la cèl·lula intestinal i pels nutrients que es troben a l'intestí en quantitats limitades evitant la colonització de patògens [140].

- **Manteniment de la integritat de la mucosa intestinal** i millora de la funció de barrera intestinal. Els probiòtics promouen la secreció de moc i modulen les proteïnes del citoesquelet i les proteïnes d'unió estreta [125].

- **Regulació de la motilitat intestinal**. Els probiòtics poden reduir el temps de trànsit intestinal i augmentar la freqüència de les deposicions [141].

- **Síntesi de nutrients** que les cèl·lules epitelials o els bacteris utilitzen com a font d'energia [140].

- **Acció hipocolesterolèmica**. S'han proposat diferents mecanismes com per exemple la desconjugació d'àcids biliars, assimilació de colesterol endogen o

exogen, unió de colesterol i àcids biliars lliures a la cèl·lula microbiana i co-precipitació dels àcids biliars lliures [140].

- **Activitats anti-carcinogèniques** i antimutagèniques. L'activitat anti-cancerígena d'algunes soques s'associa a la capacitat de la soca probiòtica per reduir o inhibir la destrucció de l'ADN en les primeres etapes de la carcinogènesi [140].

- **Modulació del pH**. Els probiòtics mantenen un pH àcid en l'epiteli intestinal evitant la colonització de patògens sensibles al pH [125].

- **Modulació del SI intestinal i sistèmic**. Són moltes i diverses les accions i interaccions que els probiòtics fan sobre les cèl·lules immunitàries. Alguns probiòtics indueixen l'activació dels limfòcits T CD4+, dels T CD8+ i indueixen la secreció d'IgA mentre que d'altres suprimeixen la producció de citocines inflamatòries com la IL-12 i el TNF-α i estimulen la producció dels limfòcits Treg [140].

5.2.2 Efectes beneficiosos en infants

Els probiòtics tenen efectes beneficiosos en la prevenció i/o tractament de diverses afeccions en adults i en infants. Concretament, i sense profunditzar en els efectes en edat adulta, en primeres etapes de vida, existeixen soques probiòtiques com per exemple *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730, *Saccharomyces boulardii* i *Saccharomyces cerevisiae* i*Bifidobacterium breve* M-16V, entre d'altres que redueixen la gravetat, incidència o durada de la gastroenteritis infecciosa [142] [143].

Alguns probiòtics en nadons i nens petits han mostrat resultats prometedors per al maneig i tractament d'al·lèrgies, infeccions respiratòries, còlic del lactant i colitis ulcerativa [137]. En quant al còlic del lactant, és un trastorn gastrointestinal comú que afecta a nadons d'entre 1- 4 mesos que implica plors inconsolables prolongats i estats d'agitació amb etiologia multifactorial [144]. S'ha descrit que el probiòtic *Lactobacillus reuteri DSM 17938* és capaç de millorar els símptomes del còlic infantil [145]. A més, els probiòtics *Bifidobacterium longum* CECT7894 i *Pediococcus pentosaceus* redueixen el temps de plor i milloren la consistència fecal [146]. En nadons prematurs s'ha descrit que la suplementació amb certes soques de *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* disminueixen la incidència d'enterocolitis necrotitzant [142].

Malgrat els efectes beneficiosos dels probiòtics, una part de la comunitat científica no dona suport als suplements probiòtics en nens petits degut a alguns casos estranys d'infeccions relacionades amb probiòtics [147].

5.3 Postbiòtics

Els postbiòtics es defineixen com una preparació de microorganismes inanimats o els seus components que confereixen un benefici per a la salut de l'hoste [148]. Són una estratègia segura i nova per obtenir els efectes beneficiosos dels probiòtics sense utilitzar bacteris vius, fet que, com s'ha mencionat anteriorment, pot generar desconfiança en algun consumidor.

Els microorganismes es poden inactivar mitjançant diferents mètodes com per exemple la sonicació, calor, pressió elevada, radiació ionitzant, raigs ultraviolats, deshidratació o alteració del pH [149]. Segons la via d'inactivació que s'utilitza, la composició del postbiòtic i el seu efecte sobre l'hoste por ser diferent [137].

5.3.1 Tipus de postbiòtics

Els postbiòtics, com s'ha mencionat anteriorment, són una barreja heterogènia de components de bacteris d'entre els quals destaquen els lisats bacterians, fragments de la paret cel·lular, sobrenedants lliures de cèl·lules, AGCC, exopolisacàrids, enzims, vitamines i llets fermentades inactivades.

- **Lisats bacterians:** s'obtenen mitjançant la degradació mecànica o química del bacteri. Els lisats bacterians mimetitzen la presència del bacteri i estimulen el SI de l'hoste [150].

- **Fragments de la paret cel·lular:** molts components de la paret cel·lular bacteriana estimulen la resposta del SI de l'hoste [150] com per exemple els peptoglicans, els quals són els elements estructurals de la paret bacteriana més abundants entre els bacteris Gram positius [151] o els àcids teïcoics i lipoteïcoics, els quals poden representar fins el 60% de la massa de la paret cel·lular en bacteris Gram positius [152].

- **Sobrenedants lliures de cèl·lules:** contenen metabòlits biològicament actius secretats per bacteris i llevats [150]. La seva activitat depèn dels microorganismes que s'utilitzen per obtenir el sobrenedant [150]. Per exemple, s'ha descrit que els sobrenedants obtinguts de cultius bacterians de diferents soques dels gèneres *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* mostren activitat antibacteriana enfront *Escherichia coli* [153], mentre que en el cas dels sobrenedants obtinguts de diferents soques de *Lactobacillus* i de *Saccharomyces boulardii* mostren activitats anti-inflamatòries i antioxidants [154].

- **AGCC:** són els principals metabòlits que produeixen els bacteris intestinals [152]. Com s'ha mencionat anteriorment, els AGCC més abundants són el butirat, el propionat i l'acetat [125]. Del butirat destaca la seva propietat anti-inflamatòria, del propionat la seva participació en el metabolisme dels lípids i de la glucosa i de l'acetat la seva utilització per generar energia a l'hoste [125–127].

- **Exopolisacàrids:** són biopolímers amb diferents propietats químiques que produeixen els microorganismes durant el seu creixement i que són alliberats fora de la paret cel·lular bacteriana [151]. El exopolisacàrids poden modular el SI interaccionant amb macròfags i cèl·lules dendrítiques i millorant la proliferació de limfòcits T i NK [150].

- **Enzims:** els enzims microbians tenen una varietat de funcions fisiològiques, químiques i reguladores [152]. Els bacteris que més s'utilitzen per obtenir enzims són soques de *Bacillus*, ja que d'entre altres característiques, tenen un temps de fermentació curt i són bacteris reconeguts com a segurs [152].

- **Vitamines:** els microorganismes poden sintetitzar vitamines que pels humans són necessàries alhora que limitants com per exemple la riboflavina (vitamina B2), l'àcid fòlic (vitamina B9) i la cobalamina (vitamina B12) [151].

- **Llets fermentades inactivades:** les fórmules infantils es poden fermentar amb cultius bacterians durant el procés de producció i després eliminar els bacteris viables mitjançant diferents tractaments (pasteurització, esterilització i/o assecat per aerosol) deixant només components bacterians [155]. Aquests components poden estimular el SI de l'hoste, tenir una activitat antimicrobiana o influenciar en la funció de la barrera intestinal [156].

5.3.2 Mecanismes d'acció i efectes beneficiosos

En els últims anys han augmentat els estudis, tant preclínics com clínics, que utilitzen els postbiòtics com a estratègia nutricional [137]. Tot i així, encara no es coneixen bé els mecanismes d'acció dels postbiòtics [157], ja que són una barreja heterogènia de components que poden actuar de manera independent o en combinació i l'efecte que genera en l'hoste podria estar generat per molts mecanismes diferents [148]. Tot i així, recentment, s'han postulat cinc possibles mecanismes d'acció principals: la modulació de la resposta immunitària, modulació de la microbiota resident, millora de la funció de la barrera epitelial, modulació de les respostes metabòliques i senyalització sistèmica a través del sistema nerviós [148].

Els lisats bacterians presents en un postbiòtic mimetitzen la presència del bacteri i estimulen el SI [150]. Per exemple, s'ha descrit en estudis clínics experimentals que Del-Immune V®, un suplement postbiòtic que conté lisat cel·lular i fragments d'ADN del probiòtic *Lactobacillus rhamnosus V*, estimula el SI innat, mitjançant la inducció de citocines com el TNF-α o l'IFN-γ [158]. Un altre exemple són els exopolisacàrids, biopolímers que produeixen els microorganismes i alliberen fora de la paret cel·lular bacteriana, els quals poden modular la resposta immunitària interaccionant amb els macròfags i amb les cèl·lules dendrítiques i augmentar la proliferació de les cèl·lules NK i dels limfòcits T [150]. Els AGCC presents en un postbiòtic poden modificar la funció de la barrera intestinal i protegir-la contra la disrupció induïda per lipopolisacàrids i, si es troben presents en una quantitat suficient, poden estimular les cèl·lules enterocromafins per produir serotonina [148].

In vitro, s'ha descrit que els sobrenedants lliures de cèl·lules de determinats bacteris de l'àcid làctic i espècies de llevat obtinguts d'aliments fermentats tenen una activitat antimicrobiana contra *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* i contra espècies de *Salmonella* [159]. A més, després del processament, els postbiòtics poden tenir les adhesines intactes i competir pels llocs d'adhesió amb els microorganismes residents [148].

Els postbiòtics poden prevenir o tractar diferents malalties. Els seus efectes són específics de cada postbiòtic i depenen de l'individu i dels canvis temporals en la composició de la microbiota [137].

L'ús de postbiòtics en nens podria protegir-los enfront d'infeccions. Per exemple, hi ha soques d' *Escherichia coli* que causen diarrees moderades-greus en nens en països en vies de desenvolupament. *In vitro*, s'ha descrit que postbiòtics de *Bifidobacterium bifidum ATCC 29521* són capaços de reduir l'adhesió d'*Escherichia coli* O157:H7 a les cèl·lules intestinals [160]. En ratolins, un postbiòtic derivat de *Lactobacillus rhamnosus GG* ATCC 53103 pot prevenir la infecció causada per *Escherichia coli* K1 i promoure un efecte protector sobre la funció de barrera intestinal [161]. En el cas de les infeccions causades per *Salmonella*, s'ha descrit *in vitro* que el postbiòtic obtingut de *Bifidobacterium bifidum ATCC 29521* redueix la capacitat de la *Salmonella entèrica* per sobreviure i replicar-se dins dels macròfags [160]. *In vivo*, el postbiòtic obtingut d'una soca de *Lactobacillus* protegeix els ratolins de la infecció causada per *Salmonella typhimurium* [162].

Els nadons prematurs, tal i com s'ha mencionat anteriorment, són més susceptibles a patir enterocolitis necrotitzant, la qual pot arribar a ser mortal [163]. S'ha descrit que el postbiòtic obtingut de la soca *Lactobacillus rhamnosus* HN001 és capaç de reduir la gravetat de la infecció en un model de garrins prematurs i de ratolins nounats [164].

En el cas d'infeccions causades per virus en nens, tal com s'ha mencionat anteriorment, la gastroenteritis causada per RV és la responsable de més d'un milió de morts en nens menors de cinc anys a tot el món [54]. En rates, una llet fermentada i tractada tèrmicament, ja sigui enriquida amb prebiòtics o no, redueix la incidència i la gravetat de la diarrea causada per RV [165]. A més, en nens, s'ha descrit que el postbiòtic obtingut de la soca *Lactobacillus acidophilus* LB redueix la durada de la diarrea causada per RV [166].

Els postbiòtics també tenen efectes beneficiosos en al·lèrgies com per exemple en l'asma persistent i moderat. Un postbiòtic obtingut de *Mycobacterium phlei* ha mostrat millora en els símptomes i va reduir l'exacerbació aguda [167].

A nivell neurològic, estudis *in vivo* en ratolins mostren que el postbiòtic obtingut de *Enterococcus fecalis* (EC-12) modifica l'expressió de gens de receptors de neurotransmissors, alleuja l'ansietat i una tendència antidepressiva [168]. En humans s'ha descrit que el postbiòtic obtingut de la soca *Lactobacillus gasseri* CP2305 redueix l'ansietat i millora la qualitat del son [169].

Els postbiòtics també mostren beneficis metabòlics. Per exemple, els postbiòtics basats en dipèptids de muramil redueixen la resistència a la insulina en ratolins obesos [170]. Un altre exemple seria el propionat, el qual pot millorar la sensibilitat a la insulina, la tolerància a la glucosa i modificar el metabolisme lipídic [148].

Finalment, els postbiòtics tenen propietats anti-cancerígenes. Per exemple, *in vitro*, el postbiòtic derivat de *Lactobacillus plantarum* té efectes citotòxics en cèl·lules canceroses [171] i el postbiòtic obtingut del sobrenedant lliure de cèl·lules dels probiòtics *Lactobacillus casei* i *Lactobacillus rhamnosis* GG disminueix la invasió de cèl·lules canceroses del còlon [172].

OBJECTIUS

En néixer, el sistema immunitari encara es troba en desenvolupament i la resposta immunitària enfront els elements externs és diferent a la de l'adult. Per aquesta raó, hi ha una major susceptibilitat a patir infeccions durant les primeres etapes de vida. Aquests patògens poden provenir directament de la mare, a través de la llet materna -com en el cas de les mastitis infeccioses- o de l'ambient -com en el cas dels rotavirus-. A més, els processos infecciosos en els infants semblen aparèixer amb més freqüència i de forma més greu en el sexe masculí que en el femení. Aquest dimorfisme sexual en la resposta immunitària, sembla ser degut a diferents factors com els genètics, hormonals, epigenètics i ambientals.

La llet materna és el millor aliment pel nounat, ja que aporta tots els nutrients essencials i compostos bioactius per promoure el seu correcte desenvolupament i protegir-lo enfront d'infeccions. Entre aquests elements destaquen diversos tipus de moduladors microbians, com per exemple oligosacàrids (prebiòtics), bacteris (probiòtics) i els seus metabòlits (postbiòtics). No obstant això, hi ha casos en què la mare no pot alletar al seu nadó i per tant les fórmules infantils substitueixen la llet materna. Les fórmules infantils mimetitzen la composició de la llet materna afegint-hi compostos bioactius com els prebiòtics i probiòtics i, recentment, s'han començat a introduir postbiòtics.

En base a aquests precedents, la **hipòtesi** de partida d'aquesta tesi ha estat que el contacte amb un agent infecciós en primeres etapes de vida pot afectar al desenvolupament del sistema immunitari i, que components amb activitat moduladora microbiana, com prebiòtics i postbiòtics, poden promoure el desenvolupament del sistema immunitari i prevenir la infecció per rotavirus en primeres etapes de vida.

Per tant, **l'objectiu principal** d'aquesta tesi consisteix en establir, mitjançant una aproximació preclínica, els efectes sobre el desenvolupament del sistema immunitari neonatal de dues infeccions comunes durant el període de lactància (mastitis infecciosa materna i gastroenteritis vírica de l'infant), i avaluar el paper del dimorfisme sexual, així com el de diversos moduladors microbians (el prebiòtic scGOS-lcFOS i el postbiòtic Lactofidus®) sobre el desenvolupament del sistema immunitari i la infecció per rotavirus durant la lactància.

Per assolir aquest objectiu principal, s'han desenvolupat els següents objectius específics:

1. **Establir l'efecte d'una sobrecàrrega bacteriana amb *Staphylococcus epidermidis*, típic agent causal de les mastitis infeccioses, sobre la composició i funcionalitat del sistema immunitari en un model de rata lactant.**

Els resultats obtinguts d'aquest objectiu constitueixen la següent publicació:

- **Article 1:** *Staphylococcus epidermidis'* overload during suckling impacts the immune development in rats (manuscrit en preparació per ser enviat a *Frontiers in Nutrition*).

2. Aprofundir en la influència del dimorfisme sexual en la resposta neonatal enfront la infecció per RV en un model de rata lactant.

Els resultats obtinguts d'aquest objectiu constitueixen la següent publicació:

- **Article 2:** Sexual Dimorphism Has Low Impact on the Response against Rotavirus Infection in Suckling Rats. *Vaccines* 2020, 8 (3): 345; doi:10.3390/vaccines8030345.

3. Establir l'efecte i els mecanismes implicats d'un component postbiòtic (Lactofidus®), sol o en combinació amb una barreja de prebiòtics (scGOS-lcFOS), en el desenvolupament immunitari en un model de rata lactant sana i en un model d'infecció per rotavirus.

Els resultats obtinguts d'aquest objectiu constitueixen les següents publicacions:

- **Article 3:** Effects of a Postbiotic and Prebiotic Mixture on Suckling Rats' Microbiota and Immunity. *Nutrients* 2021, 13 (9): 2975; doi:10.3390/nu13092975.

- **Article 4:** Preventive effect of a postbiotic and prebiotic mixture in a rat model of early life rotavirus induced-diarrhea. *Nutrients* (enviat, pendent d'acceptació).

RESULTATS

Article 1

"*Staphylococcus epidermidis*' overload during suckling impacts the immune development in rats"

Carla Morales-Ferré, Àngels Franch, Margarida Castell, Monica Olivares, María J. Rodríguez-Lagunas, Francisco J. Pérez-Cano

Manuscrit en preparació *(Frontiers in Nutrition)*

Índex d'impacte (2020): 6.576

Categoria: 12/88 (Q1)

Els resultats d'aquest article han estat presentats en les següents comunicacions a congressos:

- *Staphylococcus epidermidis' overload during suckling impacts the immune development in rats.* Morales-Ferré, C., Massot-Cladera, M., Franch, A. Castell, M., Rodríguez-Lagunas, M.J., Pérez-Cano, F.J. al XV Congrés de la Societat Catalana d'Immunologia (Barcelona), novembre 2021.

Resum

Objectiu: Analitzar en rates nounades l'impacte sobre el creixement i la maduració del sistema immunitari d'una sobrecarrega de S*taphylococcus epidermidis* durant la lactància a dosi baixa (com succeeix a la mastitis subclínica) i a dosi alta (com succeeix a la mastitis clínica).

Material i mètodes: Es van utilitzar rates Wistar que van rebre per via oral el vehicle (grup REF) o la sobrecàrrega de S*taphylococcus epidermidis* a dosi baixa (grup Ls) o a dosi alta (grup Hs) des del dia 2 de vida fins al dia 21. Al llarg de l'estudi, es va mesurar el pes corporal i la humitat de les femtes. A dia 21 i dia 42 de vida es van estudiar la morfometria, l'expressió gènica a nivell intestinal (mitjançant la tècnica PCR a temps real), els nivells d'IgA intestinal (mitjançant la tècnica ELISA) el perfil d'Ig i citocines (mitjançant la tècnica ProcartaPlex™ Multiplex Immunoassays) i el fenotip dels limfòcits de la melsa (mitjançant citometria de flux).

Resultats: Tot i que no es van trobar diferències en el pes corporal, els grups Ls i Hs van mostrar una major longitud naso-anal i una menor humitat fecal. Ambdues dosis van reduir les immunoglobulines plasmàtiques i van retardar l'equilibri Th1/Th2 provocant un biaix cap a la resposta Th2. En canvi, la sobrecàrrega bacteriana no va influir en la concentració de citocines. Ambdues dosis van induir petits canvis a les subpoblacions de limfòcits, la dosi baixa va afectar el patró de migració intestinal dels limfòcits Tc, mentre que la dosi alta va tenir un impacte a les variables hematològiques causant leucocitosi i limfocitosi i influint en la maduració de la barrera intestinal.

Conclusions: La sobrecàrrega de S*taphylococcus epidermidis* a dosi baixa i a dosi alta durant la lactància afecta al desenvolupament del sistema immunitari a curt i llarg termini.

frontiers

Staphylococcus epidermidis' overload during suckling impacts the immune development in rats.

Carla Morales-Ferré[1,2], Àngels Franch[1,2], Margarida Castell[1,2], Mónica Olivares[3], María J. Rodríguez-Lagunas[1,2*], Francisco J. Pérez-Cano[1,2]

[1] Physiology Section, Department of Biochemistry and Physiology, Faculty of Pharmacy and Food Science, University of Barcelona (UB), 08028 Barcelona, Spain; carla.moralesferre@ub.edu (C.M.-F.); angelsfranch@ub.edu (À.F.); margaridacastell@ub.edu (M.C.); mjrodriguez@ub.edu (M.J. R.-L.); franciscoperez@ub.edu (F.J.P.-C.)

[2]Nutrition and Food Safety Research Institute (INSA-UB), 08921 Santa Coloma de Gramenet, Spain

[3]Biosearch Life SA, Camino de Purchil 66, 18004 Granada, Spain; molivares@biosearchlife.com (M.O)

*** Correspondence:**
María J. Rodríguez-Lagunas
mjrodriguez@ub.edu

Keywords: mastitis, *Staphylococcus epidermidis*, suckling rat, immune system, intestinal gene expression, immunoglobulins.

Abstract

Mastitis is an inflammation of the mammary gland occurring in 3 - 33% of the breastfeeding mothers. The majority of mastitis cases have an infectious etiology. More than 75% of infectious mastitis are caused by *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* and involves breast milk' microbiota dysbiosis, which, may have an impact in lactating infant.

The aim of this study was to analyze in rats during the suckling period and later in life the impact of a high and a low overload of *Staphylococcus epidermidis,* similarly as it occurs during the clinical and the subclinical mastitis, respectively.

From day 2 to day 21 of life, suckling rats were daily supplemented with low (Ls group) or high (Hs group) dose of *S. epidermidis*. Body weight and fecal humidity were periodically recorded. On day 21 and 42 of life, morphometry, hematological variables, intestinal gene expression, immunoglobulin (Ig) and cytokine profile and spleen cells' phenotype were measured.

Although no differences were found in body weight, Ls and Hs groups showed higher body length and lower fecal humidity. Both doses induced small changes in lymphocytes subpopulations, reduced the plasma levels of Ig and delayed the Th1/Th2 balance causing a bias towards the Th2 response. No changes were found in cytokine concentration. The low dose affected the Tc cells intestinal homing pattern whereas the high dose had an impact on the hematological variables causing leukocytosis and lymphocytosis and also influenced the intestinal barrier maturation.

In conclusion, both interventions with *Staphylococcus epidermidis* overload during suckling, affects the immune system development in short and long term.

1 Introduction

Mastitis is an inflammation of the mammary gland that can be accompanied or not by infection, which, can be fatal unless properly treated (1).

The incidence of mastitis occurs in 3% up to 33% of the breastfeeding mothers (2). Although this disease can appear in any moment of the breastfeeding, the 74-95% of the cases are reported to occur during the first 12 weeks of breastfeeding (1). The risk factors that predispose women to suffer from mastitis are the use of antibiotics during pregnancy, delivery or breastfeeding, previous mastitis, cracked or sore nipples, stress, incorrect breastfeeding, autoimmune diseases, immune deficit, smoking and age of the mother (younger than 21 years and older than 35 years have less incidence) (1,3–5).

The majority of mastitis cases have an infectious etiology (5,6). Infectious mastitis cause a dysbiosis in breast milk microbiota increasing the abundance and proportion of the causal bacteria and reducing drastically the rest of the bacterial groups (7). Although *Staphylococcus* and *Streptococcus* genera are normally present in mammary gland microbiota (7), they are the main cause of these infectious mastitis, specifically species of the *Staphylococcus* genus. Thus, more than 75% of mastitis are caused by *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*) and *Staphylococcus aureus* (8). *S. epidermidis* is a catalase-positive, coagulase-negative, gram positive and facultative anaerobe bacterium (9) that causes subacute mastitis, which is characterized by sharp, needling pain and a burning sensation in the breast (5,6).

The antibiotic therapy during 7-14 days is the first-line treatment against infectious mastitis (2,6). However, there are bacteria resistant to antibiotics and with the ability to form *biofilms*, facilitating the recurrency or the chronicity of mastitis (6). Moreover, to treat the symptomatology, antipyretics, analgesics and local anti-inflammatories are widely used (5).

In vitro models of mastitis are used for studying the interaction between the pathogen and particular host cells but do not allow the study of the complexity of the mammary gland, the impact on the breast milk and even less, the consequences of the process on the descendance. Therefore, the use of animal models is necessary. Rodents such as mice and rats are good alternative (10) due to their easier manipulation, lower cost and the higher number of animals per litter that allow the obtention of valid statistics in a short period of time (11,12). There are many procedures to induce mastitis in mice or rats such as the use of pathogens and lipopolysaccharide (11,13–16). However, the studies of mastitis are focused on the mother's health, rather than on the consequences of the intake of the disbiotic milk by the pups in the short and in the long term. Moreover, the suckling rat is a good animal model to study the development of the immune system during early life because newborn rats have and immature immune system, that develops during breastfeeding and weaning and allows the study of their progress in few weeks (12).

Our hypothesis is that during both clinical and subclinical mastitis -induced by an overgrowth of *S. epidermidis-,* an overload of this bacteria is transferred via breast milk to the lactating babies which may have an impact in their growth and immune system development.

Hence, the aim of this study is to analyze the impact of a high and low overload of *S. epidermidis* in suckling rats during the suckling period, similarly as it occurs during the clinical and the subclinical mastitis, respectively. For assessing the influence of this particular bacteria overload during suckling two timepoints will be studied, the first one at the end of suckling period, and the second one three weeks after weaning. Growth and immunity variables will be evaluated in both periods of time to establish the influence of the overload in the immune development.

2 Material and methods

2.1 Animals

Pregnant Wistar rats (G14) provided by Janvier (Le Genest St Isle, France) were individually housed in cages (2184L Eurostandard Type II L, Tecniplast, West Chester, PA, USA), monitored daily and allowed to deliver at term. The cages contained tissue papers (Gomà-Camps S.A.U., La Riba, Spain) and bedding of large fibrous particles (Souralit 1035, Bobadeb S.L., Santo Domingo de la Calzada, Spain) as cage enrichment. The day of birth was registered as day 1 of life. The following day, litters were randomly assigned to three experimental groups and were unified to 8 pups per lactating dam with a similar proportion (40-60%) of each sex in each litter. Pups had free access to maternal milk and rat diet. Dams were fed with a commercial diet corresponding to the American Institute of Nutrition 93 G formulation (17) (Teklad Global Diet 2014, Envigo, Indianapolis, IN, USA) and water ad libitum. Animal handling was performed during the first hours of the light phase on a scheduled basis, to limit the disturbance and biological rhythms' influence. After separating all the mothers and keeping the pups in the home-cage, handling and oral administration was performed once a day. Afterwards, the dam was reunited with her litter. Animals were housed under controlled conditions of temperature (20-24 °C) and humidity (40-60%) in a 12 h light−12 h dark cycle (lights on at 8:00 a.m and lights off at 8:00 p.m), at the Faculty of Pharmacy and Food Science animal facility (University of Barcelona, Spain). Cage cleaning was performed weekly. All experimental procedures were conducted in accordance with the institutional guidelines for the care and use of laboratory animals and were approved by the Ethical Committee for Animal Experimentation of the University of Barcelona and the Catalonia Government (CEEA/Ref. 308/19 and PAMN/Ref.10542, respectively), in full compliance with national legislation following the EU-Directive 2010/63/EU for the protection of animals used for scientific purposes. Sample size estimation was calculated by the Appraising Project Office's program from the Universidad Miguel Hernández de Elche (Alicante, Spain). The minimal number of animals to provide statistically significant differences among groups, using plasma immunoglobulin (Ig) G as a variable and assuming that there was no dropout rate and type I error of 0.05 (two-sided), was three litters per group, as in previous studies (18,19).

2.2 Experimental design and sample collection

Upon natural delivery, pups were distributed into three groups of 24 animals each (3 litters of 8 animals/group): the reference (REF) group and two groups supplemented with an overload of *S. epidermidis* CECT 9816, one group received a low dose (Ls) and the other a high dose (Hs) which may reflect the bacterial load received by the pups during a subclinical and a clinical infectious mastitis, respectively. *S. epidermidis* strain was provided by Biosearch Life (Granada, Spain). Suckling rats were orally administered once daily during the whole suckling period (21 days), as previously described (20), the REF group was supplemented with the vehicle (50 µL of glycerol 15%) and the groups supplemented with *S. epidermidis* received each week the same volume of 50 µL with an increasing dose of the bacterium in glycerol 15%. The Ls group was supplemented with 4.0×10^8 the first week of life, 9.0×10^8 the second and 1.4×10^9 colony forming units (CFU)/mL the

119 third whereas the Hs group received 10 times the previous doses (4.0 x 10^9 the first, 9.0 x 10^9 the
120 second and 1.4 x 10^{10} CFU/mL the third week of life).

121 The doses were proposed considering the relative abundance of the *Staphylococcus* in the breast milk
122 of healthy mothers and from those suffering from mastitis (21) in relation to the proportion of these
123bacteria present in rat breast milk (22,23) and the amount of milk received in each week of lactation
124 (24).

125 Pup body weight was recorded daily. Moreover, the naso-anal and tail lengths were measured to
126 determine the body/tail ratio. In addition, body mass index (BMI) was calculated as body
127 *weight/lenght*^{2} (g/cm^2), and the Lee Index was calculated as *(weight*$^{0.33}$*/length) x 1,000* (g$^{0.33}$/cm).

128 During the study, fecal samples were obtained after gentle abdominal massage, to determine changes
129 in the humidity. The sampling was always performed at the same time period, after the pups were
130 separated from their mothers and weighted, and prior to the oral administration.

131 Animals were euthanized at two different time points by selecting 4 pups from each dam maintaining
132 sex equality on each day of sacrifice: half of the litter on day 21 (the last day of *S. epidermidis*
133 intervention) and the other half on day 42 (three weeks after the intervention; the end of the study).
134 Rats were intramuscularly anesthetized with ketamine (90 mg/kg) (Merial Laboratories S.A.,
135 Barcelona, Spain) and xylazine (10 mg/kg) (Bayer A.G., Leverkusen, Germany) and exsanguinated
136 by cardiac puncture in heparin-treated tubes. First, blood was immediately used to count platelets and
137 white and red blood cells and related variables (Spincell3 automated hematology analyzer, MonLab,
138 Barcelona), following the manufacturer's instructions. Plasma was obtained to determine the Ig and
139 cytokine concentrations. The weights of the liver, stomach, spleen, thymus, small intestine and large
140 intestine were also recorded. Moreover, the lengths of the small and large intestines were also
141 measured. The spleen and the small intestine were collected for further analysis. A portion of 1 cm of
142 the central part of the small intestine was immediately conserved in RNAlater® (Ambion, Applied
143 Biosystems, Austin, TX, USA), incubated at 4 °C overnight and stored at -20 °C until PCR analysis
144 whereas spleen was used for lymphocytes immunofluorescence staining.

145 2.3 Fecal humidity and pH of the cecal content

146 Once a week, fecal samples were obtained, weighted, and dried in a stove at 60 ºC during 24 h. Then,
147 feces were weighted again to calculate the percentage of humidity. For pH determination, cecal
148 samples from days 21 and 42 were used. The measurement was performed with a micropH 2001 pH
149 meter (Crison Instruments, Barcelona, Spain) using a 5207 pH electrode for surfaces.

150 2.4 Quantification of immunoglobulins and cytokines

151 At the end of the *S. epidermidis* intervention (day 21) and three weeks later (day 42), the
152 concentration of IgA in the gut wash was measured by a sandwich ELISA technique with the Rat IgA
153 ELISA quantification test from Bethyl Laboratories (Montgomery, TX, USA), as previously
154 described (25). Briefly, a 96-well plate (Nunc MaxiSorp, Wiesbaden, Germany) was coated with 2
155 µg/mL of the capture antibody. After blocking, the standard and the samples were incubated. Then,
156 detection antibody was added and, after washing, an o-phenylenediamine dihydrochloride-H_2O_2
125 (Sigma-Aldrich) solution was added. Absorbance was measured in a microplate photometer
126 (LabSystems Multiskan) and data were interpolated by Multiskan Ascent v2.6 software (Thermo
127 Fisher Scientific SLU, Barcelona, Spain) according to the concentrations of the standard.

Plasma concentration of the Ig (IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG2c, IgM and IgA) and the cytokines (interleukin (IL) IL-1α, IL-1β IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12 P70, IL-13, IL-17α, interferon (IFN)-γ, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), granulocyte colony stimulating factor 3 (G-CSF3) and tumor necrosis factor (TNF)-α) were quantified using ProcartaPlex™ Multiplex immunoassays (Thermo Fisher Scientific, Barcelona, Spain) as described in previous studies (26), in which specific color-coded capture beads were bound to the Ig/cytokine of interest. Then, different detection antibodies conjugated to phycoerythrin were added. The specific concentration of each analyte was obtained by MAGPIX® analyzer (Luminex Corporation, Austin, TX, USA) at the Scientific and Technological Centers of the University of Barcelona (CCiT-UB). The lower limits of detection of the assay were as follows: 0.15 ng/mL for IgM; 1.15 ng/mL for IgG1; 2.08 ng/mL for IgG2a; 2.67 ng/mL for IgG2b; 4.21 pg/mL for IgG2c; 0.46 pg/mL for IgA; 10.49 pg/mL for IL-1α; 12.96 pg/mL for IL-1β; 1.81 pg/mL for IL-2, 0.62 pg/mL for IL-4; 1.41 pg/mL for IL-5; 2.18 pg/mL for IL-6; 6.00 pg/mL for IL-10; 4.22 pg/mL for IL-12p70; 3.00 pg/mL for IL-13; 3.34 pg/mL for IFN-γ; 4.81 pg/mL for GM-CSF; 4.90 pg/mL for G-CSF3 and 2.88 pg/mL for TNF- α.

2.5 Immunofluorescence staining and flow cytometry analysis

The spleen cells were isolated as previously described (27). Then, cell number and viability were determined using an automated cell counter (Countess TM, Invitrogen, Madrid, Spain) by staining dead cells with trypan blue.

Spleen cells ($5x10^5$ cells) were stained using immunofluorescence techniques. The mouse anti-rat monoclonal antibody conjugated to fluorescein isothiocyanate, phycoerythrin, peridinin chlorophyll protein, allophycocyanin or brilliant violet 421 used here were anti-TCRαβ (R73), anti-TCRγδ (V65), anti-CD4 (OX-35), anti-CD8α (OX-8), and anti-NKR-P1A (10/78), all from BD Biosciences (San Diego, CA, USA); anti-CD45RA (OX-33) from Caltag (Burlingame, CA, USA); anti-CD8β (3·41) from Serotec (Kidlington, Oxford, UK); anti-CD25 (OX-39), anti-αE integrin (OX-62) and anti-CD62L (OX-85) from BioLegend (San Diego, CA, USA).

For cell subset differentiation four different antibody panels were used. Panel 1: CD25/CD45RA/CD8α/CD4; panel 2: αE integrin/CD62L/CD8α/CD4/CD45RA; panel 3: TCRαβ/NK/CD8α/CD4 and panel 4: CD8α/CD8β/TCRγδ. The first panel allowed to identify the activated B and T cells. B cells (CR45RA+ cells, which is a B cell marker in rats) were identified in the second panel. In the panel 3 NK cells (TCRαβ-NK+) could be differentiated from NKT cells (TCRαβ+NK+) and T cells (TCRαβ+NK- cells from panel 3 in combination with the TCRγδ+ cells from panel 4). From the panel 3, the proportion of Th cells (CD4+CD8-TCRαβ+NK- cells) was obtained. Moreover, the CD8+TCRαβ+NK- cells (panel 3) plus the TCRγδ+ cells (panel 4) could be considered as Tc cells. The αE integrin/CD62L pattern in B, Th and Tc cells were studied in the panel 2. Results are expressed as the proportion of positive cells for a certain marker in each particular subset determined by the combination of other markers with respect to the total lymphocytes gated. Staining was developed following procedures described in previous studies (28), and samples were analyzed using a Gallios™ flow cytometer (Beckman Coulter Inc., Madrid, Spain) at the cytometry service of the Scientific and Technological Centres of the University of Barcelona (CCiT-UB). The obtained data were analyzed with FlowJo software (Tree Star Inc., Ashland, OR, USA).

2.6 Gene expression analysis

On day 21 and 42, a 1 cm of a central portion of the small intestine was homogenized for 30 s in lysing matrix tubes (MP Biomedicals, Illkirch, France) using a FastPrep-24 instrument (MP Biomedicals), as previously described (29). After RNA isolation with the RNeasy® Mini Kit (Qiagen, Madrid, Spain) its purity and concentration were determined with a NanoPhotometer (BioNova Scientific S.L., Fremont, CA, USA). Later, the corresponding cDNA was obtained using the thermal cycler PTC-100 Programmable Thermal Controller and TaqMan® Reverse Transcription Reagents (Applied Biosystems, AB, Weiterstadt, Germany).

The specific PCR TaqMan® primers (AB) used to assess gene expression with real-time PCR (ABI Prism 7900 HT, AB) were directed to the detection of free fatty acid receptor 2 (Ffar2) (Rn02345824_s1, inventoried [I], encoding for G-protein-coupled receptor 43 (Gpr43), barrier function molecules such as mucin (Muc)2 (Rn01498206_m1, I), Muc3 (Rn01481134_m1, I), ocludin (Ocln, Rn00580064_m1, I), claudin (Cldn)2 (Rn02063575_s1, I) and Cldn4 (Rn01196224_s1, I) as well as to Toll-like Receptors (TLR), such as TLR2 (Rn02133647_s1, I), TLR4 (Rn00569848_m1, I), TLR5 (Rn04219239_s1, I), and TLR9 (Rn01640054_m1, I), and maturation markers such as Fc fragment of IgG receptor and transporter (Fcgrt) (Rn00583712_m1, I, encoding for neonatal Fc receptor (FcRn). The relative gene expression was normalized to the housekeeping gene glucuronidase beta (Gusb) (Rn00566655_m1, I) using the 2-ΔΔCt method (30). Results are expressed as the percentage of expression in each experimental group normalized to the mean value obtained for the REF group, which was set at 100%, as in previous studies (18).

2.7 Statistical analysis

Results are expressed as mean ± SEM. The Statistical Package for Social Sciences (SPSS v22.0) (IBM, Chicago, IL, USA) was used for statistical analysis. Data was tested for homogeneity of variance and normality distribution by Levene's and Shapiro-Wilk tests, respectively. When data was homogeneous and had a normal behavior, conventional one-way ANOVA test was carried out followed by the post-hoc Bonferroni. Otherwise, the nonparametric Kruskal-Wallis test followed by the post hoc Mann-Whitney U test was performed. To study the effect of the overload of *S. epidermidis* in time-dependent variables, two-way ANOVA followed by the post-hoc Bonferroni was assessed. Significant differences were established when $p < 0.05$.

3 Results

3.1 Growth and morphometry

The body weight of pups was measured daily from day 2 to day 21 and weekly from day 22 to 42 of life (Figure 1). The supplementation with the low and high doses of *S. epidermidis* did not have an influence on the normal growth observed in the REF group.

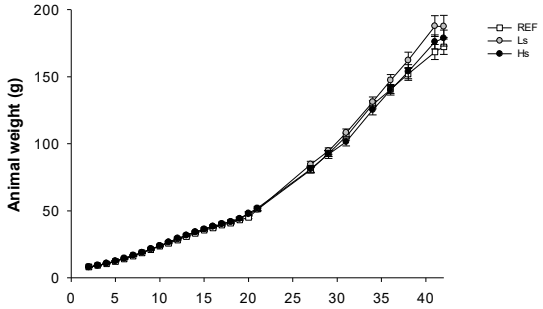


Figure 1. Body weight of suckling rats (g) during the study (from day 2 to day 42 of life). Results are expressed as mean ± SEM (n = 24 animals/group). REF: reference group; Ls: group supplemented with low dose of *S. epidermidis* and Hs: group supplemented with high dose of *S. epidermidis*.

Moreover, data from male and female were also studied separately to analyze if the intervention influenced differently in both sexes (Supplementary Figure 1). No differences between sexes were observed in the first study period (d2-d21) in the same group or between males and females from different groups. Only, in the Ls group, the body weight of males was higher than that of females in the last week of the study ($p<0.05$).

With regard to morphometry (Supplementary Table 1), the bacterial overload during suckling did not affect any of the variables analysed at day 21, however, the Ls and Hs groups showed higher naso-anal length than REF animals at day 42. Moreover, no differences were observed in the organs' weights between groups either at day 21 or at day 42. Morphometry and organs' weight variables were influenced by the age ($p<0.05$), regardless the type of intervention, with the exception of the small intestine body weight ratio, which was not affected.

Moreover, as it can be observed in the Table 1, some alterations in the hematological variables due to the bacterial overload were induced. On day 21, Hs group showed higher counts of white blood cells (WBC) and lymphocytes compared to REF and Ls animals. Moreover, the counts of monocytes (MID) in Hs group were higher than those in Ls. On day 42, hemoglobin (HBG) concentration and mean corpuscular hemoglobin (MCH) in Ls supplemented animals were lower than in the REF group. Surprisingly these changes were not observed in Hs animals, which showed higher levels of WBC compared to REF animals due to an increase in lymphocytes, MID and granulocytes (GRAN). In addition, the mean platelet volume (MPV) in Hs group was lower than in REF group.

263 **Table 1.** Hematological variables at the end of the supplementation (day 21 of life) and three weeks after (day
264 42 of life; the end of the study).

	REF	Ls	Hs
Day 21			
WBC (10^9 cells/L)	5.3 ± 0.7	4.8 ± 0.5	7.5 ± 1.0 $^{*\#}$
LYM (%)	69.1 ± 6.7	68.9 ± 2.6	69.8 ± 1.1
MID (%)	8.0 ± 0.8	13.5 ± 5.3	7.9 ± 0.4
GRAN (%)	22.9 ± 2.4	23.0 ± 2.2	22.3 ± 1.0
LYM (10^9 cells/L)	3.6 ± 0.5	3.3 ± 0.4	5.2 ± 0.7 $^{*\#}$
MID (10^9 cells/L)	0.4 ± 0.1	0.3 ± 0.0	0.5 ± 0.1 $^{\#}$
GRAN (10^9 cells/L)	1.5 ± 0.2	1.2 ± 0.2	1.8 ± 0.3
HGB (g/L)	85.1 ± 8.2	84.9 ± 1.2	83.4 ± 2.2
HCT (%)	23.9 ± 2.3	24.1 ± 0.6	24.8 ± 1.0
MCV (fL)	61.6 ± 5.9	61.1 ± 0.5	62.0 ± 2.0
MCH (pg)	21.9 ± 2.1	21.6 ± 0.6	20.8 ± 0.3
PLT (10^9 cells/L)	486.4 ± 52.1	521.6 ± 34.5	522.4 ± 51.4
MPV (fL)	8.5 ± 0.8	8.5 ± 0.2	8.9 ± 0.2
Day 42			
WBC (10^9 cells/L)	6.6 ± 0.8	6.6 ± 0.6 $^{\delta}$	8.0 ± 0.5 *
LYM (%)	76.2 ± 1.4 $^{\delta}$	74.8 ± 2.3	75.5 ± 1.2 $^{\delta}$
MID (%)	7.2 ± 0.4	7.6 ± 0.4	7.1 ± 0.3
GRAN (%)	16.6 ± 1.0 $^{\delta}$	17.6 ± 2.0	17.4 ± 1.1 $^{\delta}$
LYM (10^9 cells/L)	4.9 ± 0.4 $^{\delta}$	4.9 ± 0.5 $^{\delta}$	6.0 ± 0.4 *
MID (10^9 cells/L)	0.4 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.5 ± 0.0 *
GRAN (10^9 cells/L)	1.2 ± 0.2	1.2 ± 0.2	1.5 ± 0.1 *
HGB (g/L)	125.2 ± 1.4 $^{\delta}$	118.0 ± 1.9 $^{*\delta}$	121.5 ± 1.4 $^{\delta}$
HCT (%)	34.8 ± 0.7 $^{\delta}$	34.6 ± 0.7 $^{\delta}$	34.1 ± 0.6 $^{\delta}$
MCV (fL)	60.0 ± 0.5	60.4 ± 0.8	60.5 ± 0.5
MCH (pg)	21.6 ± 0.4	20.6 ± 0.2 *	21.5 ± 0.4 $^{\#}$
PLT (10^9 cells/L)	470.6 ± 40.1	469.9 ± 37.6	526.0 ± 44.5
MPV (fL)	9.5 ± 0.7	9.4 ± 0.7	8.3 ± 0.2 *

265 White Blood Cells (WBC), lymphocyte (LYM), monocytes, eosinophils, basophils, blasts and other precursor
266 white cells (MID), neutrophils, monocytes, eosinophils, and basophils (GRAN), hemoglobin (HGB),
267 hematocrit (HCT), Mean Cell Volume (MCV), Mean Cell Hemoglobin (MCH), platelets (PLT) and Mean
268 Platelet Volume (MPV). Results are expressed ad mean ± SEM (n = 10). Statistical significance: * $p<0.05$ *vs.*
269 REF and $^{\#}$ $p<0.05$ Hs *vs.* Ls. REF: reference group; Ls: group supplemented with low dose of *S. epidermidis*
270 and Hs: group supplemented with high dose of *S. epidermidis*.

271 Comparing 21-day-old and 42-day-old animals it can be observed that the number of LYM, HGB
272 concentration, and HCT increase with age. These age-associated changes were also present in Ls and
273 Hs animals with the exception of LYM on day 42 which were similar to those observed on day 21.

274 **3.2 Fecal and cecal content variables**

275 Fecal humidity was analyzed weekly and cecal pH was determined on days 21 and 42 in order to
276 evaluate whether the continuous administration of *S. epidermidis* during suckling influenced the
277 intestinal environment (Figure 2). During the administration period a small increase in fecal humidity
278 in the Ls group was observed on day 7 with respect to Hs group, afterwards no changes were
279 observed on days 14 and 21 (Figure 2a). One week after weaning (d28) and without the bacterial
280 overload supplementation, the humidity of Ls group's feces was higher than that of the REF group.

Then, on day 35 both Ls and Hs groups had lower fecal humidity than REF one. Finally, on day 42 no differences between groups were observed. With regard to cecal content pH, similar values were observed between groups on day 21 and 42 of life suggesting no effect of the *S. epidermidis* overload on this variable (Figure 2b).

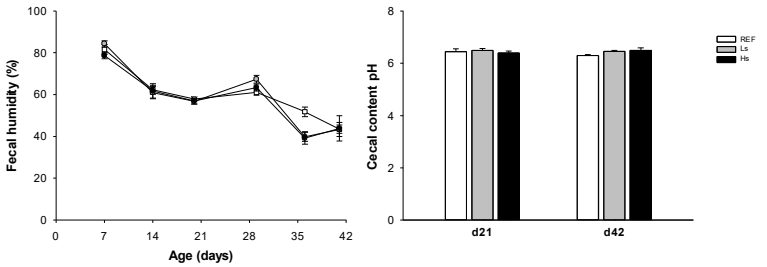
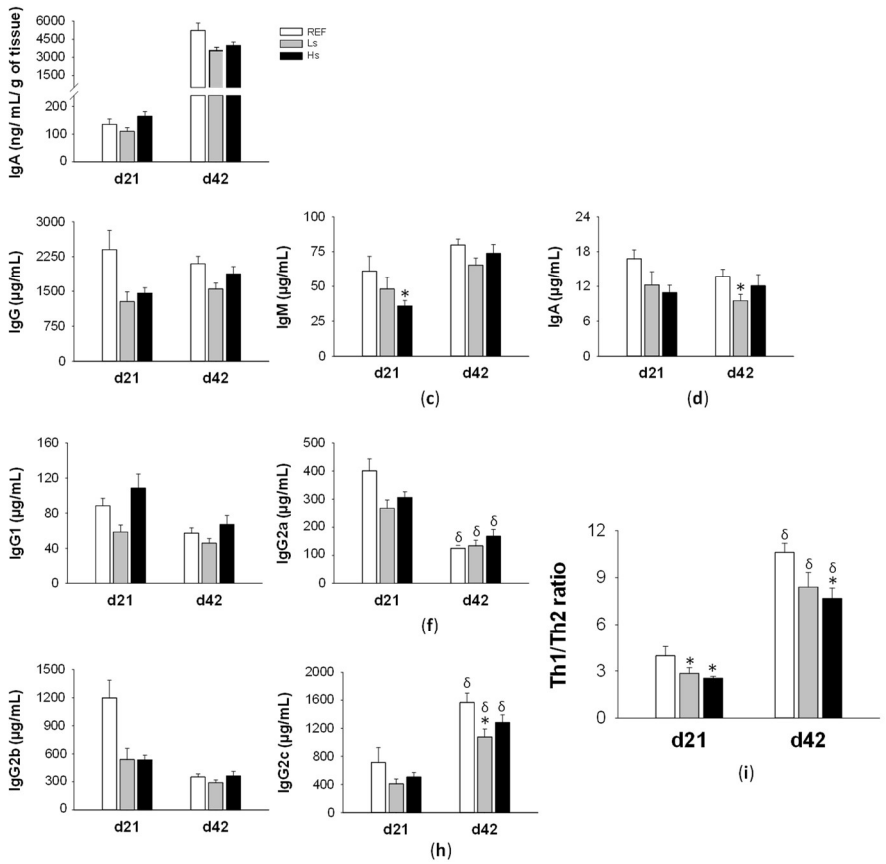


Figure 2. Fecal humidity during the study (from day 7 to day 42 of life) (a) and cecal content pH on day 21 (the end of the supplementation) and day 42 (three weeks after; the end of the study) (b). Results are expressed as mean ± SEM (n = 12-24 animals/group). Statistical differences: $^{\alpha}$ $p<0.05$ Ls *vs*. REF, $^{\beta}$ $p<0.05$ Hs *vs*. REF and $^{\gamma}$ $p<0.05$ Hs *vs*. Ls. REF: reference group; Ls: group supplemented with low dose of *S. epidermidis* and Hs: group supplemented with high dose of *S. epidermidis*.

3.3 Immunoglobulin's profile and plasma cytokines

Intestinal IgA and plasma concentrations of IgG, IgM and IgA isotypes, IgG subclasses, as well as the Th1/Th2 ratio were quantified at the end of the supplementation (day 21 of life) and three weeks after (day 42 of life; the end of the study) (Figure 3). On day 21, the intestinal levels of IgA in both supplemented groups were similar to the control one, however, the highest dose induced higher increase in IgA with respect to the low dose ($p<0.05$) (Figure 3a). On the contrary, on day 42, a lower intestinal IgA concentration was found in Ls group compared to REF one ($p<0.05$). Intestinal IgA levels were higher at day 42 than at day 21 for all the groups of study ($p<0.05$) independently of the intervention.



300

301 **Figure 3.** Concentration of immunoglobulins in plasma at the end of the supplementation (day 21 of life) and
302 three weeks after (day 42 of life; the end of the study). Results are expressed as mean ± SEM (n = 12
303 animals/group). Statistical differences: * $p<0.05$ *vs.* REF, # $p<0.05$ Hs *vs.* Ls and δ day 42 vs. day 21. Th1/Th2
304 ratio refers to the relationship between IgG2b+IgG2c: IgG1+IgG2a. REF: reference group; Ls: group
305 supplemented with low dose of *S. epidermidis* and Hs: group supplemented with high dose of *S. epidermidis*.

306 Important changes were observed in plasma Ig concentrations (Figure 3 and Supplementary Table 2).
307 On day 21, IgG concentration in Ls animals was lower than in REF ones whereas in Hs animals all
308 three isotypes levels (IgG, IgM and IgA) were lower in Hs group than in REF group (Figure 3b, 3c
309 and d, respectively). It can also be noted that age associated changes were only found for IgM, but
310 not for IgA or IgG.

311 With regard to IgG subclasses (Figures 3e-h), on day 21 IgG1, IgG2a and IgG2b levels were lower in
312 Ls group than in REF animals, whereas only a significant reduction in IgG2b was observed in Hs
313 group. On day 42, the previous changes were not maintained and only a reduction in IgG2c was

observed in Ls group with respect to REF group on day 42. Overall, the changes observed in the IgG subclasses led to a decreased Th1/Th2 ratio in both Ls and Hs groups on day 21 and in Hs on day 42.

In addition, although IgG levels are constant through age a reduction in IgG1, IgG2a and IgG2b and an increase in IgG2c can be observed with age. These changes lead to an increase in Th1/Th2 ratio associated to age.

Furthermore, plasma cytokine levels were also measured at the end of the supplementation (day 21 of life) and three weeks after (day 42 of life; the end of the study). Neither the age of the animals nor the bacterial overloads were conditions able to induce changes in the plasmatic cytokine pattern (Table 2).

Table 2. Plasma cytokines concentration at the end of the supplementation (day 21 of life) and three weeks after (day 42 of life).

Cytokine (pg/mL)	REF	Ls	Hs
Day 21			
G-CSF3	4.4 ± 2.2 (100 %)	6.6 ± 3.1 (80 %)	5.1 ± 1.7 (80 %)
IL-1-α	62.1 ± 62.1 (10 %)	120.9 ± 113.7 (40 %)	21.7 ± 14.6 (20 %)
IL-10	101.3 ± 93.8 (30 %)	189.0 ± 131.5 (60 %)	125.0 ± 53.0 (60 %)
IL-6	0.0 ± 0.0 (0 %)	1.2 ± 1.2 (10 %)	0.0 ± 0.0 (0 %)
IL-1-β	162.8 ± 54.5 (70 %)	48.2 ± 20.5 (80 %)	47.2 ± 21.5 (80 %)
IL-2	30.0 ± 11.5 (70 %)	7.4 ± 3.7 (70 %)	6.0 ± 2.6 (70 %)
IL-4	0.80 ± 0.4 (100 %)	1.0 ± 0.6 (60 %)	1.0 ± 0.4 (60 %)
IFN- γ	2.7 ± 1.5 (70 %)	3.7 ± 2.4 (70 %)	6.5 ± 2.9 (60 %)
IL-5	2.3 ± 2.0 (50 %)	5.3 ± 3.6 (50 %)	2.3 ± 1.0 (50 %)
IL-13	34.1± 17.1 (60 %)	7.6 ± 4.2 (80 %)	5.3 ± 3.0 (70 %)
IL-12p70	48.4 ± 42.7 (80 %)	14.0 ± 7.8 (80 %)	20.3 ± 9.2 (90 %)
GM-CSF	1.2 ± 1.2 (10 %)	2.8 ± 2.8 (10 %)	0.0 ± 0.0 (0 %)
TNF-α	12.2 ± 4.2 (70 %)	3.1 ± 1.5 (60 %)	3.3 ± 1.4 (70 %)
IL-17-α	2.0 ± 1.6 (30 %)	4.8 ± 2.4 (60 %)	2.3 ± 0.8 (60 %)
Day 42			
G-CSF3	7.4 ± 5.1 (80 %)	7.4 ± 4.6 (100 %)	3.6 ± 0.9 (100 %)
IL-1-α	177.7 ± 164.5 (20 %)	177.7 ± 164.5 (20 %)	13.8 ± 12.2 (30 %)
IL-10	237.6 ± 206.0 (50 %)	265.2 ± 199.0 (50 %)	79.7 ± 37.3 (70 %)
IL-6	1.7 ± 1.7 (10 %)	1.6 ± 1.6 (10 %)	0.0 ± 0.0 (0 %)
IL-1-β	93.06 ± 25.5 (70 %)	202.0 ± 105.7 (70 %)	50.6 ± 18.3 (70 %)
IL-2	11.9 ± 4.1 (80 %)	29.7 ± 13.8 (70 %)	6.5 ± 1.9 (90 %)
IL-4	1.5 ± 1.1 (80 %)	1.5 ± 0.9 (100 %)	0.7 ± 0.2 (100 %)
IFN- γ	4.4 ± 3.5 (50 %)	4.5 ± 3.4 (70 %)	1.5 ± 0.6 (80 %)
IL-5	5.5 ± 4.2 (50 %)	5.8 ± 4.2 (80 %)	2.6 ± 0.7 (100 %)
IL-13	10.3 ± 4.5 (80 %)	23.4 ± 8.9 (70 %)	7.1 ± 1.7 (90 %)
IL-12p70	11.7 ± 8.4 (70 %)	11.6 ± 7.0 (100 %)	4.0 ± 1.5 (100 %)
GM-CSF	4.4 ± 4.4 (10 %)	4.1 ± 4.1 (10 %)	0.0 ± 0.0 (0 %)
TNF-α	6.5 ± 1.8 (70 %)	11.8 ± 5.5 (70 %)	2.5 ± 1.0 (60 %)
IL-17-α	4.7 ± 3.4 (50 %)	5.1 ± 3.0 (70 %)	8.6 ± 6.6 (70 %)

Interleukin (IL), interferon (IFN)-γ, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), granulocyte colony stimulating factor 3 (G-CSF3) and tumor necrosis factor (TNF)-α. Percentage of detection is represented in parenthesis. Results are expressed as mean ± SEM (n = 10).

3.4 Phenotype of spleen cells

At day 21 and 42 of life, spleen cells were isolated to evaluate the influence of the overload of *S. epidermidis* on the phenotype of lymphocytes in terms of main subsets proportion, homing receptors and activation status. The percentages of the main cell types are summarized in **Table 3**. B, T, Th, Tc and NKT cell proportions were similar between groups at day 21 and 42.

Table 3. Main spleen lymphocyte populations at the end of the supplementation (day 21 of life) and three weeks later (day 42 of life).

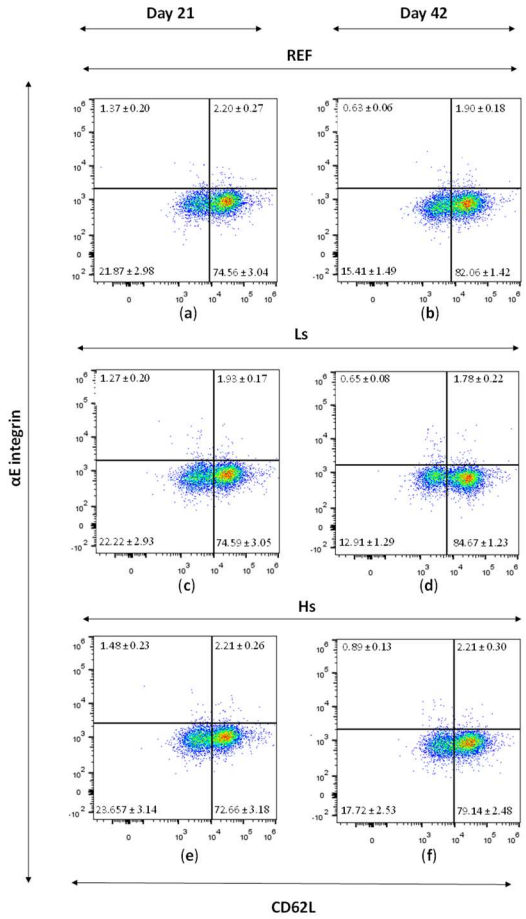
	REF	**Ls**	**Hs**
Day 21			
B cells ($CD45RA^+$)	60.88 ± 2.29	60.52 ± 2.37	65.01 ± 1.87
T cells ($TCR\alpha\beta^+$ NK^- y $TCR\gamma\delta^+$)	18.63 ± 1.79	20.93 ± 2.35	15.62 ± 1.28
Th cells ($CD4^+CD8^-TCR\alpha\beta^+$)	12.19 ± 1.18	13.77 ± 1.68	10.00 ± 0.83
Tc cells ($CD8^+$ $TCR\alpha\beta^+$ NK^- y $TCR\gamma\delta^+$)	5.21 ± 0.57	5.86 ± 0.61	4.57 ± 0.49
T cells $TCR\alpha\beta^+$ ($CD8^+$ $TCR\alpha\beta^+$ NK^-)	4.27 ± 0.49	4.89 ± 0.58	3.69 ± 0.42
T cells $TCR\gamma\delta^+$	0.94 ± 0.10	0.97 ± 0.10	0.88 ± 0.08
$CD8^-$ (%)	21.75 ± 2.65	25.51 ± 1.57	31.84 ± 2.83 *
$CD8^+$ (%)	78.25 ± 2.65	74.49 ± 1.57	68.16 ± 2.83 *
$CD8\alpha\alpha^+$ (%)	51.53 ± 2.50	47.36 ± 2.07	52.06 ± 2.39
$CD8\alpha\beta^+$ (%)	48.47 ± 2.50	52.64 ± 2.07	47.94 ± 2.39
NKT cells ($TCR\alpha\beta^+NK^+$)	3.50 ± 0.39	3.59 ± 0.37	3.01 ± 0.26
NK cells ($TCR\alpha\beta$- NK^+)	8.00 ± 0.86	7.32 ± 0.68	6.94 ± 0.62
$CD8^-$ (%)	27.06 ± 2.03	24.21 ± 1.45	29.39 ± 2.17
$CD8^+$ (%)	72.94 ± 2.03	75.79 ± 1.45	70.61± 2.17
$CD8\alpha\alpha^+$ cells	4.84 ± 0.50	5.23 ± 0.70	4.49 ± 0.36
$CD8\alpha\beta^+$ cells	6.13 ± 0.86	6.44 ± 0.57	4.83 ± 0.42
Ratio CD8αα/CD8αβ	0.84 ± 0.06	0.81 ± 0.09	1.05 ± 0.15
Day 42			
B cells ($CD45RA^+$)	48.96 ± 1.13 $^\delta$	50.14 ± 1.67 $^\delta$	49.58 ± 1.73 $^\delta$
T cells ($TCR\alpha\beta^+$ NK^- y $TCR\gamma\delta^+$)	39.48 ± 1.27 $^\delta$	37.27 ± 1.69 $^\delta$	35.31 ± 1.76 $^\delta$
Th cells ($CD4^+CD8^-TCR\alpha\beta^+$)	24.61 ± 1.00 $^\delta$	22.66 ± 0.98 $^\delta$	21.26 ± 1.11 $^\delta$
Tc cells ($CD8^+$ $TCR\alpha\beta^+$ NK^- y $TCR\gamma\delta^+$)	13.29 ± 1.43 $^\delta$	13.00 ± 0.98 $^\delta$	12.24 ± 0.92 $^\delta$
T cells $TCR\alpha\beta^+$ ($CD8^+$ $TCR\alpha\beta^+$ NK^-)	12.23 ± 0.68 $^\delta$	11.83 ± 0.92 $^\delta$	11.08 ± 0.88 $^\delta$
T cells $TCR\gamma\delta^+$	1.07 ± 0.07 $^\delta$	1.18 ± 0.12 $^\delta$	1.16 ± 0.05 $^\delta$
$CD8^-$ (%)	21.60 ± 1.02	19.00 ± 1.20 $^\delta$	19.63 ± 1.55 $^\delta$
$CD8^+$ (%)	78.40 ± 1.02	81.00 ± 1.20 $^\delta$	80.37 ± 1.55 $^\delta$
$CD8\alpha\alpha^+$ (%)	39.02 ± 1.33 $^\delta$	41.44 ± 1.80	46.93 ± 2.75 *
$CD8\alpha\beta^+$ (%)	60.98 ± 1.33 $^\delta$	58.56 ± 1.80	53.07 ± 2.75 *
NKT cells ($TCR\alpha\beta^+NK^+$)	3.86 ± 0.20 $^\delta$	4.07 ± 0.22 $^\delta$	4.00 ± 0.27 $^\delta$
NK cells ($TCR\alpha\beta$- NK^+)	6.97 ± 0.42	7.42 ± 0.43	8.71 ± 0.23 *#
$CD8^-$ (%)	20.52 ± 0.97 $^\delta$	18.35 ± 1.29 $^\delta$	17.91 ± 0.97 $^\delta$
$CD8^+$ (%)	79.48 ± 0.97 $^\delta$	81.65 ± 1.29 $^\delta$	82.09 ± 0.97 $^\delta$
$CD8\alpha\alpha^+$ cells	6.77 ± 0.41 $^\delta$	6.96 ± 0.64 $^\delta$	7.26 ± 0.30 * $^\delta$
$CD8\alpha\beta^+$ cells	12.68 ± 0.80 $^\delta$	12.23 ± 1.39 $^\delta$	9.87 ± 0.96 * $^\delta$
Ratio CD8αα/CD8αβ	0.55 ± 0.05 $^\delta$	0.60 ± 0.06 $^\delta$	0.81 ± 0.08 * $^\delta$

Results are expressed as the percentage of total lymphocytes (mean ± SEM) (n=12 animals/group). Statistical significance: * $p<0.05$ *vs*. REF, # Hs *vs.* Ls and $^\delta$ day 42 *vs*. day 21. REF: reference group; Ls: group supplemented with low dose of *S. epidermidis* and Hs: group supplemented with high dose of *S. epidermidis*.

However, T TCRγδ$^+$ cells displayed some differences. Although no changes were observed in total T TCRγδ$^+$ cells, at day 21, a higher proportion of T TCRγδ$^+$ CD8$^-$ cells and a lower proportion of T TCRγδ$^+$ CD8$^+$ cells were found in Hs group compared to REF group ($p<0.05$). Furthermore, at day 42, a higher percentage of T TCRγδ$^+$ CD8αα$^+$ cells and a lower percentage of T TCRγδ$^+$ CD8αβ$^+$ cells were observed in Hs animals compared to REF group ($p<0.05$). Moreover, even though no changes were observed in the proportion of NK cells at day 21, at day 42 it was higher in Hs group compared to REF and Ls animals ($p<0.05$). In addition to this, only at 42 days, the proportion of CD8αβ$^+$ cells was lower, thus resulting in an increase of CD8αα$^+$ cells percentage and CD8αα/CD8αβ ratio in Hs group compared to REF animals ($p<0.05$).

The main subsets (B, T, Th, Tc and NKT) were influenced by age (by comparing day 42 with day 21) in all groups with the exception of NK cells, which did not change. In addition, some differences associated to age in particular groups also appeared. In Ls and Hs T TCRγδ$^+$ CD8$^-$ and T TCRγδ$^+$ CD8$^+$ cell proportions were reduced and increased, respectively, at day 42 compared to day 21. The proportion of T TCRγδ$^+$ CD8αα$^+$ cells and T TCRγδ$^+$ CD8αβ$^+$ were also reduced and increased, respectively, only in REF animals at day 42 compared to day 21 ($p<0.05$).

The αE integrin/CD62L molecular pattern was measured in the total lymphocytes (**Figure 4**) and in the B, Th and Tc subsets (**Table 4**). In the total lymphocytes, the αE integrin/CD62L pattern was similar between groups at day 21 and 42, being most of the cells αE$^-$CD62L$^+$ (**Figure 4**).



358

359 **Figure 4.** αE integrin/CD62L molecular pattern in the total lymphocytes of the spleen of REF (a), Ls (b), Hs
360 (c) animals at day 21 and REF (d), Ls (e), Hs (f) animals at day 42. Representative histograms for each group.
361 Results are expressed as mean ± S.E.M. (n = 12 animals/group). REF: reference group; Ls: group
362 supplemented with low dose of *S. epidermidis* and Hs: group supplemented with high dose of *S. epidermidis*.

363363

364

365

366

367 **Table 4.** Expression of the integrin αE and the selectin CD62L in Th, Tc and B lymphocytes in the spleen at
368 the end of the supplementation (day 21 of life) and three weeks later (day 42 of life).

369369

	REF	Ls	Hs
Day 21			
$\alpha E^{+}CD62L^{-}$			
B cells ($CD45RA^{+}$)	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.04 ± 0.01
Th cells $CD4^{+}CD8^{-}$	1.88 ± 0.31	1.90 ± 0.32	2.41 ± 0.38
Tc cells $CD4^{-}CD8^{+}$	2.17 ± 0.23	1.85 ± 0.30	1.99 ± 0.26
$\alpha E^{+}CD62L^{+}$			
B cells ($CD45RA^{+}$)	2.30 ± 0.32	2.28 ± 0.34	2.17 ± 0.36
Th cells $CD4^{+}CD8^{-}$	1.12 ± 0.12	1.50 ± 0.26	1.54 ± 0.33
Tc cells $CD4^{-}CD8^{+}$	3.19 ± 0.62	2.01 ± 0.24	2.93 ± 0.57
$\alpha E^{-}CD62L^{+}$			
B cells ($CD45RA^{+}$)	95.66 ± 0.41	95.84 ± 0.32	95.74 ± 0.28
Th cells $CD4^{+}CD8^{-}$	60.44 ± 4.02	61.35 ± 3.12	55.69 ± 3.40
Tc cells $CD4^{-}CD8^{+}$	67.58 ± 2.99	66.57 ± 4.04	66.55 ± 2.60
αE-CD62L-			
B cells ($CD45RA^{+}$)	1.99 ± 0.33	1.82 ± 0.35	2.04 ± 0.27
Th cells $CD4^{+}CD8^{-}$	36.57 ± 3.81	35.26 ± 2.94	40.38 ± 3.67
Tc cells $CD4^{-}CD8^{+}$	27.05 ± 3.51	29.57 ± 3.89	28.53 ± 3.25
Day 42			
$\alpha E^{+}CD62L^{-}$			
B cells ($CD45RA^{+}$)	0.24 ± 0.06 $^{\delta}$	0.19 ± 0.03 $^{\delta}$	0.32 ± 0.10 $^{\delta}$
Th cells $CD4^{+}CD8^{-}$	0.89 ± 0.08 $^{\delta}$	1.07 ± 0.12 $^{\delta}$	1.27 ± 0.22 $^{\delta}$
Tc cells $CD4^{-}CD8^{+}$	0.76 ± 0.09 $^{\delta}$	0.68 ± 0.10 $^{\delta}$	1.10 ± 0.23 $^{\delta}$
$\alpha E^{+}CD62L^{+}$			
B cells ($CD45RA^{+}$)	3.00 ± 0.31 $^{\delta}$	2.92 ± 0.47 $^{\delta}$	4.03 ± 0.58 $^{\delta}$
Th cells $CD4^{+}CD8^{-}$	1.15 ± 0.10	1.26 ± 0.20	0.98 ± 0.18
Tc cells $CD4^{-}CD8^{+}$	1.54 ± 0.17 $^{\delta}$	1.17 ± 0.17 $^{\delta}$	1.62 ± 0.18 $^{\delta}$
$\alpha E^{-}CD62L^{+}$			
B cells ($CD45RA^{+}$)	92.83 ± 0.57 $^{\delta}$	92.48 ± 0.58 $^{\delta}$	91.67 ± 0.97 $^{\delta}$
Th cells $CD4^{+}CD8^{-}$	75.64 ± 1.22 $^{\delta}$	77.54 ± 0.94 $^{\delta}$	68.45 ± 4.17 $^{\delta}$
Tc cells $CD4^{-}CD8^{+}$	77.72 ± 1.23 $^{\delta}$	83.98 ± 1.47 $^{*\delta}$	77.31 ± 3.90 $^{\delta}$
$\alpha E^{-}CD62L^{-}$			
B cells ($CD45RA^{+}$)	3.93 ± 0.36 $^{\delta}$	4.42 ± 0.42 $^{\delta}$	3.92 ± 0.44 $^{\delta}$
Th cells $CD4^{+}CD8^{-}$	22.32 ± 1.19 $^{\delta}$	20.15 ± 0.84 $^{\delta}$	29.29 ± 4.07 $^{\#\delta}$
Tc cells $CD4^{-}CD8^{+}$	19.99 ± 1.25	14.18 ± 1.61 $^{*\delta}$	19.96 ± 3.79 $^{\delta}$

370 Results are expressed as the percentage of total lymphocytes (mean ± SEM) (n=12 animals/group). Statistical
371 significance: * $p<0.05$ *vs*. REF, $^{\#}$ Hs vs Ls and $^{\delta}$ day 42 *vs*. day 21. REF: reference group; Ls: group
372 supplemented with low dose of *S. epidermidis* and Hs: group supplemented with high dose of *S. epidermidis*.

373 When these adhesion markers were studied in more specific subsets, as it can be observed in **Table 4**,
374 some changes were found due to the *S. epidermidis* administration only at day 42. Cells from Ls
375 group showed a higher percentage of Tc cells with $\alpha E^{-}CD62L^{+}$ phenotype and a lower proportion of
376 Tc cells with the $\alpha E^{-}CD62L^{-}$ pattern compared to those found in the REF group ($p<0.05$). A higher
377percentage of Th cells with $\alpha E^{-}CD62L^{-}$ characteristics were also found in Hs animals compared to Ls 378
group ($p<0.05$).

Age-associated changes were also found in the αE integrin and the CD62L selectin pattern of B, Th and Tc cells in all groups except for the Tc $\alpha E^{-}CD62L^{-}$ cell proportion, in which no age-associated modification was found in REF animals and Th $\alpha E^{+}CD62L^{+}$ which did not change in any group either.

Finally, the expression of the CD25 in Th, Tc and B lymphocytes was measured in the spleen cells on days 21 and 42 (**Table 5**). No influence of the bacterial overload was found either at day 21 or at day 42. Interestingly, the age associated increase of $CD25^{+}$ Tc cell proportion, and its consequent reduction in that of the $CD25^{-}$ Tc subset, was found in all groups, although an interaction (group x age) was only found in the Hs group (p=0.048).

Table 5. Expression of the CD25 in Th, Tc and B lymphocytes in the spleen at the end of the supplementation (day 21 of life) and three weeks later (day 42 of life).

	REF	Ls	Hs
Day 21			
$CD25^{+}$			
B cells ($CD45RA^{+}$)	0.27 ± 0.04	0.49 ± 0.17	0.33 ± 0.06
Th cells $CD4^{+}CD8^{-}$	7.30 ± 0.50	6.30 ± 0.31	6.85 ± 0.64
Tc cells $CD4^{-}CD8^{+}$	0.37 ± 0.02	0.34 ± 0.03	0.32 ± 0.04
Day 42			
$CD25^{+}$			
B cells ($CD45RA^{+}$)	0.42 ± 0.09	0.26 ± 0.07	0.30 ± 0.06
Th cells $CD4^{+}CD8^{-}$	5.73 ± 0.24	5.41 ± 0.33	6.05 ± 0.30
Tc cells $CD4^{-}CD8^{+}$	0.35 ± 0.02 $^{\delta}$	0.42 ± 0.03 $^{\delta}$	0.44 ± 0.03 $^{\delta}$

Results are expressed as the percentage of total lymphocytes (mean ± SEM) (n=12 animals/group). Statistical significance: * p<0.05 *vs*. REF, $^{\#}$ Hs vs Ls and $^{\delta}$ day 42 *vs*. day 21. REF: reference group; Ls: group supplemented with low dose of *S. epidermidis* and Hs: group supplemented with high dose of *S. epidermidis*.

3.5 Intestinal gene expression

The gene expression of different molecules involved in the intestinal barrier function (mucin [MUC] 2, MUC3, claudin [Cldn] 2, Cldn4 and occludin [Ocldn]), intestinal immunity (FcRn and Gpr43), and microbiota-host signaling receptors (TLR 2, 4, 5 and 9) was measured at the end of the intervention (day 21 of life) and three weeks after (day 42 of life; the end of the study) (**Figure 5**). At day 21, no influence of the bacterial overload was found in any of the genes analyzed. At day 42, in Hs group a marked increase in the expression of FcRn was observed, being more than two times higher than that in the REF group (p<0.05) and also the expression of TLR2 was 1.7 times lower compared to Ls (p<0.05). Moreover, the levels of Cldn2 and FcRn showed an age-associated reduction and increase, respectively, in all groups, whereas the rest of the genes studied did not show an age-dependent pattern. The FcRn gene expression was the only one showeinf an age-intervention interaction (p<0.05).

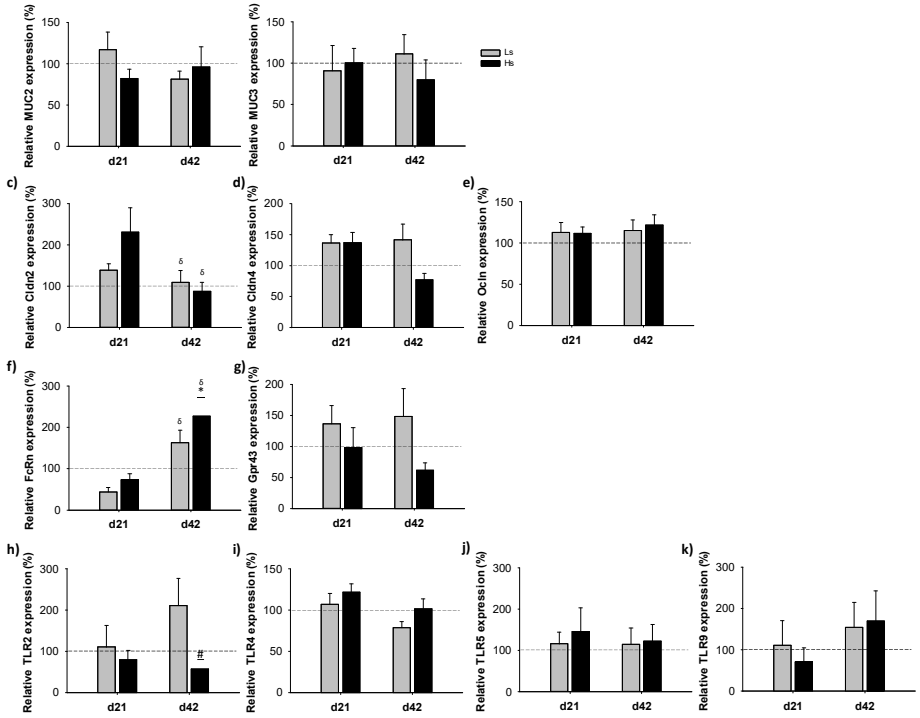


Figure 5. Relative gene expression of mucin (MUC) 2 (a) and MUC 3 (b), s claudin (Cldn) 2, Cldn4 (c and d, respectively) and occludin (Ocldn) (e), FcRn (f), GPR43 (g) and Toll like receptors (TLR) 2 (h), TLR4 (i), TLR5 (j), TLR9 (k) were quantified by real-time PCR at day 21 and 42. Relative gene expression was calculated with respect to REF animals, which corresponded to 100% of transcription. Results are expressed as mean ± S.E.M. (n = 9 animals/group). Statistical significance: * $p<0.05$ *vs*. REF, # *vs*. Ls. REF: reference group; Ls: group supplemented with low dose of *S. epidermidis* and Hs: group supplemented with high dose of *S. epidermidis*.

4 Discussion

S. epidermidis is the first causal agent of mastitis, which causes the inflammation of the mammary gland in lactating mothers (8). Many studies in humans and animal models have only focused on the impact of this situation in the maternal health or in the dysbiosis induced in the breast milk due to the drastically predominance of the pathogen and resulting reduction in the rest of the bacterial groups (7). However, very few studies have focused on the impact of this process in the breastfed baby.

As it has been shown that an overload of *S. epidermidis* can be transferred via breast milk to the neonate (7) it is plausible to hypothesize that it can affect baby's health, and particularly, its immune development. For this reason, this study includes a preclinical approach in which two different doses of *S. epidermidis* have been administered to neonatal rats, one reflecting a subclinical mastitis and

another one mimicking a clinical mastitis. The possible impact of this bacteria overload on the offspring has been studied at the end of the lactation and also later in time, specifically three weeks after the last bacterial administration.

One of the aims of this study was to investigate if the daily overload of *S. epidermidis* during the whole suckling period had an impact on growth. Overall, the interventions did not influence the body or organs weights either at the end of the suckling period or three weeks later, and just a punctual effect by the two doses at day 42 was observed in the body length. It can be then suggested that the *S. epidermidis* overload during suckling may affect the development of rats in the long term. In this regard, a study by K. Griffiths *et al*. reported lower growth rates in the offspring of dams with clinical mastitis at weaning (31) however this finding is not in agreement with the increase observed at 42 days.

With regard to the hematological variables, some changes due to the bacterial overload were found. In our study, the animals receiving a high dose of *S. epidermidis* displayed leukocytosis at day 21, which persisted until day 42. Infection, stress and trauma are the most common causes of leukocytosis (32). In fact, leukocytosis is a good indicator of an infectious process (33) and most patients at an emergency room with a suspicion of an infection have leukocytosis (34). Neutrophils are the most abundant leukocyte in this context (35) and most of acute bacterial infections cause neutrophilia, but some of them causes lymphocytosis such as the bacteria *Bordetella pertussis*, *Treponema pallidum*, *Bartonella henselae* or the genus *Brucella* (36). There is non-available data about whether neonates whose mother have infectious mastitis also present changes in WBC counts. However, in other bacterial infections alterations in hematological variables in neonates have also been observed (37,38). Therefore, the leukocytosis observed in the Hs animals suggests that the intervention with an overload of *S. epidermidis* induces systemic changes in WBC, specially increasing the levels of lymphocytes to fight the bacteria overload and control it. However, the process does not seem to be resolved at day 42 as suggested by the higher levels of lymphocytes, monocytes and granulocytes present in Hs group compared to REF animals.

The gastrointestinal tract of the pups received a huge number of the *S. epidermidis* for 21 days, thus allowing us to think that this may have an impact on the intestinal ecosystem. None of the doses assayed of *S. epidermidis* overload affected the fecal humidity during suckling although they reduced the humidity of the feces at certain point after weaning. These changes could be due to a gut dysbiosis caused by the bacterial overload during suckling. Furthermore, cecal pH was not affected either by the *S. epidermidis* overload. To our knowledge, no data is available in the literature with regard to changes in the fecal humidity, pH or microbiota as a result of maternal infectious mastitis neither in animals nor in humans. However, previous studies from our group reported that suckling rats under an infective process (gastroenteritis caused by rotavirus) showed higher fecal pH (39). On the other hand, healthy suckling rats supplemented with galactooligosaccharides and fructooligosaccharides had intestinal microbiota alterations and changes in fecal consistency but not in fecal pH (19). Therefore, humidity and pH could be correlated with the composition of the intestinal microbiota, thus suggesting a change in the microbiota composition of weaned rats after receiving *S. epidermidis* overload during suckling.

Focusing on the effect of the intervention on the development of the immune system, several aspects were studied, such as the plasma Ig levels and the Th1 or Th2 type of response. It is well known that in the developing neonatal immune system a Th2 type response is induced when microorganisms are first encountered, while in a mature immune system a correct balance between Th1 and Th2 responses can be found (40). In the present study, at the end of the intervention, Ls showed lower

concentration of IgG subclasses that resulted in a lower Th1/Th2 ratio. Moreover, the high dose of *S. epidermidis* overload also reduced the levels of IgG, IgM and IgA and IgG2b showing again a lower Th1/Th2 ratio. These results suggest that the two interventions induced changes in the immune system development reducing their maturation by means of a delay in the Th1/Th2 balance. However, it has to be taken into account that in this stage to life, the Ig-enriched maternal milk influences the pups' plasma Ig levels, as observed in previous studies (22). But, on day 42 of life, the quantification of pups' plasma Ig levels is not affected by their mother, and we still found a bias towards a Th2 response in Hs animals compared to REF group and, in Ls group, the levels of IgG, IgA and IgM were lower compared to REF animals but, unexpectedly, not in Hs group. It has been described that early development of dysbiosis alters the Th1/Th2 response towards a Th2 response (41,42). Hence, the overload of *S. epidermidis* may affect the intestinal microbiota and, therefore, the immune system Th1/Th2 balance of suckling rats. In future studies it would be necessary to study the composition of the pups' intestinal microbiota and its relationship with the immune development. This preclinical evidence could be in line with the outcome of a recent clinical trial in which a higher presence of *Staphylococcus* in breast milk and also in infant feces was associated to an increase in the risk of respiratory infections in the infants (43).

To further study the Th2 response found in the animals, the cytokine levels in pups' plasma were also studied at the end of the intervention (day 21) and three weeks after (day 42). No differences were observed between groups. In line with the previous findings, no data was found in the literature concerning cytokine production in newborns fed with breast milk from a mother with infectious mastitis either in humans or in animals. Our animal model did not imply changes in the lactating mother; however, it can be plausible that in a real scenario, the *S. epidermidis* would also have an impact on the mother at the systemic levels and in the breast milk composition. In line with this, some results in cows presenting mastitis can be also of interest. Lactating cows suffering from subclinical mastitis showed higher levels of IL-6 and lower concentration of IL-4 and IL-10 (44). M. Akhtar *et al*. found that cow mothers with mastitis had higher mRNA expression levels of TNF-α, IL-1β and IL-6 (45). These changes could modify the cytokine composition of milk and be transferred to the offspring through breastfeeding and affect their immune system development. Taking all together, we cannot discard that although no changes in proinflammatory cytokines have been found in our intervention, the breast milk of mothers suffering from mastitis could contribute to an altered cytokine profile in the milk and in the baby.

During suckling, phenotypical changes in the systemic immune system of neonatal rats correlate with their maturation (46). NK/NKT and B cells seem to develop earlier than T cells in neonates; which mature later, during the second half of suckling period, in terms of phenotype and proliferative ability (46). In this regard, the interventions only induced small changes in spleen lymphocytes subpopulation from Hs animals such as changes of CD8 in $TCR\gamma\delta^+$ T cells at day 21 and in $CD8\alpha\alpha^+$pattern of $TCR\gamma\delta^+$ cells and $CD8\alpha\alpha/CD8\alpha\beta$ ratio at day 42. In addition, the expression of CD25 (alpha chain of the trimeric IL-2 receptor), which is considered a hall mark of cellular activation that is expressed constitutively on the surface of several lymphocytes (47), was not influenced by the interventions in B, Th and Tc cells. For the study of the intestinal homing, the expression of the adhesion molecules CD62L selectin and αE integrin were measured. The αE integrin (CD103) is a receptor for E-cadherin, its interaction allows the adhesion between epithelial cells and T lymphocytes, but it is also expressed on the cell surface of tissue-resident memory $CD8^+$ T cells (48). The CD62L selectin is a cell adhesion molecule that is expressed on most circulating leukocytes (49). Naïve $CD8^+$ T cells express CD62L, however effector $CD8^+$ T cells lack its expression (50). The two *S. epidermidis* overloads during suckling did not show any change in the homing pattern at the end of the intervention, but, at day 42, the presence of αE^-CD62L^+ Tc cells from Ls group was higher than in

524 REF animals. To our knowledge, no information is available regarding αE integrin and CD62L
525 pattern in infants fed with breast milk after an infectious mastitis, however, in lactating cows with
526 mastitis a decreased expression of CD62L has been reported (51,52). Therefore, our results suggest
527 that Tc cell development is delayed in Ls group, but unexpectedly not in Hs animals. Future studies
528 would be necessary to go in depth in the study of the differential effect of each dose in the pattern of
529 αE and CD62L in Tc cells.

530 Finally, the intestinal gene expression was measured at day 21 and 42. *S. epidermidis* overload did
531 not influence the molecules involved in the intestinal barrier function assayed (MUC2, MUC3,
532 Cldn2, Cldn4 and Ocln), and microbiota-host signalling receptors (TLR 2, 4, 5 and 9). However, the
533 levels of FcRn in Hs group were higher on day 42 compared to REF animals. In the proximal small
534 intestine epithelium of neonatal rats, FcRn mediates the transcytosis of the IgG present in breast milk
535 (53). After weaning, immature epithelium is replaced by an adult-type epithelium, which does not
536 express FcRn (53). Therefore, as the reduction of FcRn is associated with intestinal epithelial barrier
537 maturation, the higher expression of FcRn in Hs animals compared to REF group, suggests that the
538 maturation of the small gut is also delayed.

539 5 Conclusions

540 The intervention with *S. epidermidis* overload during suckling, mimicking what happens when the
541 infant is fed with breast milk from mothers during a mastitis process, affects the immune system
542 development in short and long term. The doses assayed induce small changes in lymphocyte
543 subpopulations, reduce the plasma Ig levels and delay the Th1/Th2 balance causing a bias towards a
544 Th2 response. The low dose affects Tc cells intestinal homing pattern while the high dose has an
545 impact on the hematological variables causing leukocytosis and lymphocytosis and disrupting the
546 intestinal barrier maturation.

547 6 Conflict of Interest

548 The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial
549 relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

550 7 Author Contributions

551 The authors' contributions were as follows: M.O, M.J.R.-L. and F.J.P.-C. conceived and designed the
552 research; C.M-F, M.O., À.F., M.C., M.J.R.-L., and F.J.P.-C carried out the experiments and the data
553 analysis and were involved in the interpretation of the data; C.M-F. M.J.R.-L. and F.J.P.-C.
554 contributed to the initial draft of the manuscript; all authors were involved in the critical revision of
555 the manuscript; M.O., M.J.R.-L. and F.J.P.-C. have primary responsibility for the final content. All
556 authors have read and approved the final version of the manuscript for publication**.**

557 8 Funding

558 This research has been developed within the framework of the Research and Development Project
559 GESTA HEALTH: TOWARDS HEALTHIER GESTATION AND LACTATION THROUGH
560 MICROBIOTA MODULATION IN WOMEN (IDI-20181226), supported by the Centre for the
561 Development of Industrial Technology (CDTI) and co-financed by the European Regional
562 Development Fund (ERDF) through the Spanish Multi-regional Program 2014-2020".

563 9 Acknowledgments

The authors would like to thank Jaume Comas for his help and advice with the cytometer in the CCiT-UB.

10 References

1. Organización Mundial de la Salud. Mastitis: Causas y manejo. Salud y Desarro del niño y del Adolesc. 2000;1–49.

2. Mutic AD, Jordan S, Edwards SM, Ferranti EP, Thul TA, Yang I. The Postpartum Maternal and Newborn Microbiomes. MCN Am J Matern Nurs. 2017;42(6):326–31.

3. Wilson E, Woodd SL, Benova L. Incidence of and Risk Factors for Lactational Mastitis: A Systematic Review. J Hum Lact. 2020;36(4):673–86.

4. Mediano P, Fernández L, Rodríguez JM, Marín M. Case-control study of risk factors for infectious mastitis in Spanish breastfeeding women. BMC Pregnancy Childbirth. 2014;14(1):13–5.

5. Beltrán Vaquero DA, Crespo Garzón AE, Rodriguez Bravo TC, Iglesias ÁG. Mastitis infecciosa: Nueva solución para un viejo problema. Nutr Hosp. 2015;31:89–95.

6. Angelopoulou A, Field D, Ryan CA, Stanton C, Hill C, Ross RP. The microbiology and treatment of human mastitis. Med Microbiol Immunol [Internet]. 2018;207(2):83–94. Available from: http://dx.doi.org/10.1007/s00430-017-0532-z

7. Delgado S, Arroyo R, Jiménez E, Fernández L, Rodríguez JM. Mastitis infecciosas durante la lactancia: un problema infravalorado (I). Acta Pediatr Esp. 2009;67(2):77–84.

8. Jiménez E, Delgado S, Arroyo R, Fernández L, Rodríguez JM. Mastitis infecciosas durante la lactancia: Un problema infravalorado (y II). Acta Pediatr Esp. 2009;67(3):125–32.

9. Lee E, Anjum F. Staphylococcus epidermidis. StatPearls [Internet]. 2021;527–527.

10. Ingman W V., Glynn DJ, Hutchinson MR. Mouse models of mastitis - How physiological are they? Int Breastfeed J. 2015;10(1).

11. Notebaert S, Meyer E. Mouse models to study the pathogenesis and control of bovine mastitis . A review of bovine mastitis . A review. 2011;2176:1–13.

12. Pérez-Cano FJ, Franch À, Castellote C, Castell M, Franch Á, Castellote C, et al. The suckling rat as a model for immunonutrition studies in early life. Clin Dev Immunol [Internet]. 2012 Jan [cited 2015 Apr 28];2012:537310. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22899949

13. Eea JL, Aapeb MJP, Haoa XZ. Original article Recombinant bovine soluble CD14 reduces severity of experimental Escherichia coli mastitis in mice. 2003;34:307–16.

14. Gu B, Miao J, Zhu Y, Deng Y, Zou S. Protective effect of retinoid against endotoxin-induced mastitis in rats. 2009;58:81–8.

15. Miao J, Zhu Y, Gu B. Evaluation of the changes of immune cells during lipopolysaccharide-

induced mastitis in rats. 2007;40:135–43.

16. Wang J, Wei Z, Zhang X, Wang Y, Fu Y, Yang Z. Butyrate protects against disruption of the blood-milk barrier and moderates in fl ammatory responses in a model of mastitis induced by lipopolysaccharide. 2017;3811–22.

17. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: Final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. J Nutr. 1993;123(11):1939–51.

18. Azagra-Boronat I, Massot-Cladera M, Mayneris-Perxachs J, Knipping K, Van't Land B, Tims S, et al. Immunomodulatory and Prebiotic Effects of 2'-Fucosyllactose in Suckling Rats. Front Immunol. 2019;10(July):1773.

19. Morales-ferré C, Azagra-boronat I, Massot-cladera M, Tims S, Knipping K, Garssen J, et al. Effects of a Postbiotic and Prebiotic Mixture on Suckling Rats' Microbiota and Immunity. Nutrients. 2021;13(2975):1–22.

20. Rigo-Adrover M, Saldaña-Ruíz S, van Limpt K, Knipping K, Garssen J, Knol J, et al. A combination of scGOS/lcFOS with Bifidobacterium breve M-16V protects suckling rats from rotavirus gastroenteritis. Eur J Nutr. 2017;56(4):1657–70.

21. Boix-Amorós A, Hernández-Aguilar MT, Artacho A, Collado MC, Mira A. Human milk microbiota in sub-acute lactational mastitis induces inflammation and undergoes changes in composition, diversity and load. Sci Rep [Internet]. 2020;10(1):1–14. Available from: https://doi.org/10.1038/s41598-020-74719-0

22. Azagra-Boronat I, Tres A, Massot-Cladera M, Franch À, Castell M, Guardiola F, et al. Associations of breast milk microbiota, immune factors, and fatty acids in the rat mother–offspring pair. Nutrients. 2020;12(2):1–19.

23. Azagra-Boronat I, Tres A, Massot-Cladera M, Franch À, Castell M, Guardiola F, et al. Lactobacillus fermentum CECT5716 Supplementation in Rats during Pregnancy and Lactation Impacts Maternal and Offspring Lipid Profile, Immune System and Microbiota. Cells. 2020;9(3).

24. Kojima T, Nishimura M, Yajima T, Kuwata T. Effect of intermittent feeding on the development of disaccharidase activities in artificially reared rat pups. 1998;121(Comparative Biochemistry and Physiology):289–97.

25. Camps-Bossacoma M, Pérez-Cano FJ, Franch À, Castell M. Gut microbiota in a rat oral sensitization model: effect of a cocoa-enriched diet. Oxid Med Cell Longev. 2017;2017:7417505.

26. Azagra-Boronat I, Massot-Cladera M, Knipping K, Van't Land B, Stahl B, Garssen J, et al. Supplementation With 2'-FL and scGOS/lcFOS Ameliorates Rotavirus-Induced Diarrhea in Suckling Rats. Front Cell Infect Microbiol. 2018;8(October):372.

27. Ramos-Romero S, Pérez-Cano FJ, Castellote C, Castell M, Franch À. Effect of cocoa-enriched diets on lymphocytes involved in adjuvant arthritis in rats. Br J Nutr. 2012;107(3):378–87.

637 28. Marín-Gallén S, Pérez-Cano FJ, Castell M, Castellote C, Franch À. Intestinal intraepithelial
638 NK and NKT cell ontogeny in Lewis rats. Dev Comp Immunol. 2008;32(12):1405–8.

639 29. Azagra-Boronat I, Massot-Cladera M, Knipping K, Van't Land B, Tims S, Stahl B, et al.
640 Oligosaccharides Modulate Rotavirus-Associated Dysbiosis and TLR Gene Expression in
641 Neonatal Rats. Cells. 2019;8(8):876.

642 30. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time
643 Quantitative PCR and the 2−ΔΔCT Method. Methods [Internet]. 2001;25(4):402–8. Available
644 from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1046202301912629

645 31. Griffiths KJ, Ridler AL, Compton CWR, Corner-Thomas RA, Kenyon PR. Associations
646 between lamb growth to weaning and dam udder and teat scores. N Z Vet J [Internet].
647 2019;67(4):172–9. Available from: https://doi.org/10.1080/00480169.2019.1596524

648 32. Mank V, Brown K. Leukocytosis [Internet]. StatPearls Publishing LLC. 2021 [cited 2021 Aug
649 12]. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK560882/

650 33. Murray MT. 11 - Erythrocyte Sedimentation Rate [Internet]. Fifth Edit. Textbook of Natural
651 Medicine. Elsevier Inc.; 2020. 121-124.e1 p. Available from: https://doi.org/10.1016/B978-0-
652 323-43044-9.00011-X

653 34. Indino P, Lemarchand P, Bady P, de Torrenté A, Genné L, Genné D. Prospective study on
654 procalcitonin and other systemic infection markers in patients with leukocytosis. Int J Infect
655 Dis. 2008;12(3):319–24.

656 35. Chabot-Richards DS, George TI. Leukocytosis. Int J Lab Hematol. 2014;36(3):279–88.

657 36. Hamad H, Mangla A. Lymphocytosis. StatPearls Publ LLC. 2021;

658 37. Esposito A, Leite D, Elisabete S. The role of respiratory virus infection in suspected pertussis :
659 A prospective study. J Microbiol Immunol Infect [Internet]. 2021;54(3):379–84. Available
660 from: https://doi.org/10.1016/j.jmii.2019.06.009

661 38. Tai Y, Chi H, Chiu N, Lin C, Huang DT, Huang C, et al. ScienceDirect Clinical features of
662 neonatal listeriosis in Taiwan : A hospital-based study. J Microbiol Immunol Infect [Internet].
663 2020;53(6):866–74. Available from: https://doi.org/10.1016/j.jmii.2019.08.001

664 39. Azagra-Boronat I, Massot-Cladera M, Knipping K, Garssen J, Ben Amor K, Knol J, et al.
665 Strain-specific probiotic properties of bifidobacteria and lactobacilli for the prevention of
666 diarrhea caused by rotavirus in a preclinical model. Nutrients. 2020;12(2):1–15.

667 40. Restori KH, Srinivasa BT, Ward BJ, Fixman ED. Neonatal immunity, respiratory virus
668 infections, and the development of asthma. Front Immunol. 2018;9(JUN):1–18.

669 41. Björkstén B, Sepp E, Julge K, Voor T, Mikelsaar M. Allergy development and the intestinal
670 microflora during the first year of life. J Allergy Clin Immunol. 2001;108(4):516–20.

671 42. Cahenzli J, Köller Y, Wyss M, Geuking MB, McCoy KD. Intestinal microbial diversity during
672 early-life colonization shapes long-term IgE levels. Cell Host Microbe. 2013;14(5):559–70.

673 43. Pastor-Villaescusa B, Hurtado JA, Gil-Campos M, Uberos J, Maldonado-Lobón JA, Díaz-
674 Ropero MP, et al. Effects of Lactobacillus fermentum CECT5716 Lc40 on infant growth and
675 health: A randomised clinical trial in nursing women. Benef Microbes. 2020;11(3):235–44.

676 44. Bochniarz M, Zdzisińska B, Wawron W, Szczubiał M, Dąbrowski R. Milk and serum IL-4,
677 IL-6, IL-10, and amyloid A concentrations in cows with subclinical mastitis caused by
678 coagulase-negative staphylococci. J Dairy Sci. 2017;100(12):9674–80.

679 45. Akhtar M, Guo S, Guo Y fang, Zahoor A, Shaukat A, Chen Y, et al. Upregulated-gene
680 expression of pro-inflammatory cytokines (TNF-α, IL-1β and IL-6) via TLRs following NF-
681 κB and MAPKs in bovine mastitis. Acta Trop [Internet]. 2020;207(February):105458.
682 Available from: https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2020.105458

683 46. Pérez-Cano FJ, Castellote C, Marín-Gallén S, González-Castro A, Franch À, Castell M.
684 Phenotypic and functional characteristics of rat spleen lymphocytes during suckling. Dev
685 Comp Immunol. 2007;31(12):1264–77.

686 47. Reddy M, Eirikis E, Davis C, Davis HM, Prabhakar U. Comparative analysis of lymphocyte
687 activation marker expression and cytokine secretion profile in stimulated human peripheral
688 blood mononuclear cell cultures: An in vitro model to monitor cellular immune function. J
689 Immunol Methods. 2004;293(1–2):127–42.

690 48. Topham DJ, Reilly EC. Tissue-resident memory CD8+ T cells: From phenotype to function.
691 Front Immunol. 2018;9(MAR).

692 49. Ivetic A, Green HLH, Hart SJ. L-selectin: A major regulator of leukocyte adhesion, migration
693 and signaling. Front Immunol. 2019;10(MAY):1–22.

694 50. Schlub TE, Badovinac VP, Sabel JT, Harty JT, Davenpor MP. Predicting CD62L expression
695 during the CD8+ T cell response in vivo. Immunol Cell Biol. 2010;88(2):157–164.

696 51. Diez-Fraile A, Meyer E, Duchateau L, Burvenich C. L-selectin and β2-integrin expression on
697 circulating bovine polymorphonuclear leukocytes during endotoxin mastitis. J Dairy Sci
698 [Internet]. 2003;86(7):2334–42. Available from: http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-
699 0302(03)73826-0

700 52. Soltys J, Quinn MT. Selective recruitment of T-cell subsets to the udder during staphylococcal
701 and streptococcal mastitis: Analysis of lymphocyte subsets and adhesion molecule expression.
702 Infect Immun. 1999;67(12):6293–302.

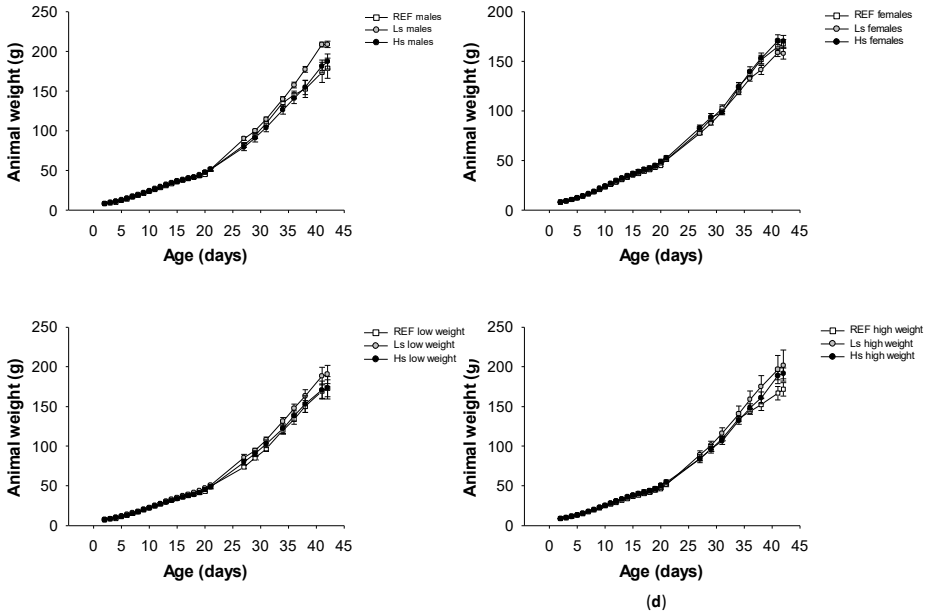
703 53. Arévalo Sureda E, Weström B, Pierzynowski SG, Prykhodko O. Maturation of the intestinal
704 epithelial barrier in neonatal rats coincides with decreased FcRn expression, replacement of
705 vacuolated enterocytes and changed blimp-1 expression (PLoS ONE (2016) 11:10 (e0164775)
706 DOI: 10.1371/journal.pone.0164775. PLoS One. 2017;12(1):1–18.

707

708

709 **11 Supplementary Material**

710



711

712 **Supplementary Figure 1.** Body weight (g) of males (a), females (b), low weight (c) and high weight (d) rats
713 during the study (from day 2 to day 42 of life). Results are expressed as mean ± SEM (n = 12 animals/group).
714 REF: reference group; Ls: group supplemented with low dose of S. epidermidis and Hs: group supplemented
715 with high dose of S. epidermidis.

716

717

718

719

720

721

722

723

724 **Supplementary Table 1.** Growth-associated measurements and relative weight of organs at the end of the
725 supplementation (day 21 of life) and three weeks after (day 42 of life).

	REF	Ls	Hs
Day 21			
Naso-anal length (body, cm)	12.3 ± 0.1	12.2 ± 0.1	12.3 ± 0.2
Anus-tail length (tail, cm)	7.0 ± 0.1	6.9 ± 0.1	6.9 ± 0.2
Naso-tail length (cm)	19.2 ± 0.2	19.1 ± 0.2	19.2 ± 0.3
Body/Tail length ratio	1.8 ± 0.0	1.8 ± 0.0	1.8 ± 0.0
Body mass index (g/cm^2)	0.4 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.4 ± 0.0
Lee index (g$^{0.33}$/cm, x1000)	307.4 ± 2.5	304.7 ± 1.8	307.2 ± 2.3
Spleen weight/BW (%)	0.6 ± 0.0	0.6 ± 0.0	0.6 ± 0.0
Thymus weight / BW (%)	0.5 ± 0.0	0.5 ± 0.0	0.5 ± 0.0
Kidney weight / BW (%)	0.6 ± 0.0	0.6 ± 0.0	0.5 ± 0.0
Liver weight / BW (%)	4.3 ± 0.1	4.3 ± 0.1	4.4 ± 0.1
Stomach weight / BW (%)	0.9 ± 0.0	0.9 ± 0.0	0.9 ± 0.0
Small int. weight / BW (%)	4.5 ± 0.1	4.4 ± 0.1	4.4 ± 0.1
Large int. weight / BW (%)	2.1 ± 0.1	2.1 ± 0.1	2.0 ± 0.1
Small int. length/ BW (cm/g)	94.5 ± 3.1	100.2 ± 3.9	98.4 ± 5.2
Large int. length/ BW (cm/g)	21.2 ± 1.2	23.2 ± 1.5	23.8 ± 1.7
Day 42			
Naso-anal length (body, cm)	18.8 ± 0.2 $^{\delta}$	19.5 ± 0.3 $^{*\,\delta}$	19.5 ± 0.2 $^{*\,\delta}$
Anus-tail length (tail, cm)	14.0 ± 0.2 $^{\delta}$	14.3 ± 0.2 $^{\delta}$	14.2 ± 0.2 $^{\delta}$
Naso-tail length (cm)	32.8 ± 0.4 $^{\delta}$	33.8 ± 0.4 $^{\delta}$	33.6 ± 0.3 $^{\delta}$
Body/Tail length ratio	1.3 ± 0.0 $^{\delta}$	1.4 ± 0.0 $^{\delta}$	1.4 ± 0.0 $^{\delta}$
Body mass index (g/cm^2)	0.5 ± 0.0 $^{\delta}$	0.5 ± 0.0 $^{\delta}$	0.5 ± 0.0 $^{\delta}$
Lee index (g$^{0.33}$/cm, x1000)	295.5 ± 1.8 $^{\delta}$	293.8 ± 1.4 $^{\delta}$	290.5 ± 1.6 $^{\delta}$
Spleen/BW ratio (%)	0.4 ± 0.0 $^{\delta}$	0.4 ± 0.0 $^{\delta}$	0.4 ± 0.0 $^{\delta}$
Thymus/ BW ratio (%)	0.4 ± 0.0 $^{\delta}$	0.3 ± 0.0 $^{\delta}$	0.4 ± 0.0 $^{\delta}$
Kidneys/ BW ratio (%)	0.5 ± 0.0 $^{\delta}$	0.5 ± 0.0 $^{\delta}$	0.5 ± 0.0 $^{\delta}$
Liver/ BW ratio (%)	4.6 ± 0.1 $^{\delta}$	4.7 ± 0.1 $^{\delta}$	4.6 ± 0.1 $^{\delta}$
Stomach/ BW ratio (%)	0.7 ± 0.0 $^{\delta}$	0.7 ± 0.0 $^{\delta}$	0.7 ± 0.0 $^{\delta}$
Small int./ BW ratio (%)	4.3 ± 0.1	4.5 ± 0.1	4.5 ± 0.2
Large int./ BW ratio (%)	6.5 ± 0.4 $^{\delta}$	6.4 ± 0.2 $^{\delta}$	6.0 ± 0.2 $^{\delta}$
Small int. length/ BW (cm/g)	34.1 ± 1.4 $^{\delta}$	33.8 ± 0.8 $^{\delta}$	32.7 ± 1.0 $^{\delta}$
Large int. length/ BW (cm/g)	10.2 ± 0.4 $^{\delta}$	10.0 ± 0.3 $^{\delta}$	9.9 ± 0.4 $^{\delta}$

726 Relative weight of organs is expressed as percentage (%) with respect to the body weight (BW) and growth-
727 associated measurements are expressed as mean ± SEM (n = 12). Statistical significance: * $p<0.05$ *vs*. REF.
728 REF: the reference group; Ls: group supplemented with low dose of *S. epidermidis* and Hs: group
729 supplemented with high dose of *S. epidermidis*.

730

Supplementary Table 2. Percentage of immunoglobulins in plasma at the end of the supplementation (day 21 of life) and three weeks later (day 42 of life; the end of the study).

Ig type (%)	REF	Ls	Hs
Day 21			
IgG	96.7 ± 0.3	95.7 ± 0.3 *	97.0 ± 0.2 $^{\#}$
IgG1	3.8 ± 0.3	4.7 ± 0.4	7.1 ± 0.8 $^{*\#}$
IgG2a	17.6 ± 1.7	21.8 ± 1.6	20.6 ± 0.8
IgG2b	48.7 ± 1.7	38.0 ± 2.5 *	35.8 ± 2.2 *
IgG2c	26.7 ± 3.3	31.2 ± 1.8	33.5 ± 2.4
IgM	2.6 ± 0.3	3.7 ± 0.3 *	2.4 ± 0.2 $^{\#}$
IgA	0.7 ± 0.1	0.8 ± 0.1	0.7 ± 0.1
Day 42			
IgG	95.6 ± 0.3 $^{\delta}$	95.3 ± 0.3 $^{\delta}$	95.5 ± 0.3 $^{\delta}$
IgG1	2.6 ± 0.2 $^{\delta}$	2.8 ± 0.3 $^{\delta}$	3.4 ± 0.4 $^{\delta}$
IgG2a	5.8 ± 0.5	8.2 ± 0.9 $^{*\delta}$	8.3 ± 0.9 $^{*\delta}$
IgG2b	16.2 ± 1.2 $^{\delta}$	18.7 ± 1.9 $^{\delta}$	18.2 ± 1.8 $^{\delta}$
IgG2c	70.9 ± 1.5 $^{\delta}$	65.6 ± 2.7 $^{\delta}$	65.7 ± 2.3 $^{\delta}$
IgM	3.8 ± 0.3 $^{\delta}$	4.1 ± 0.3 $^{\delta}$	3.9 ± 0.3 $^{\delta}$
IgA	0.7 ± 0.1	0.6 ± 0.1	0.6 ± 0.1

The percentage of 100% of the isotypes corresponds to the sum of IgG+IgM+IgA and the percentage 100% of the subtypes of IgG corresponds to the sum of IgG1+IgG2a+IgG2b+IgG2c. Results are expressed as mean ± SEM (n = 12). Statistical significance: $^{*}p<0.05$ *vs*. REF, $^{\#}$ Hs *vs.* Ls. REF: reference group; Ls: group supplemented with low dose of *S. epidermidis* and Hs: group supplemented with high dose of *S. epidermidis*.

Article 2

"Sexual Dimorphism Has Low Impact on the Response against Rotavirus Infection in Suckling Rats"

Morales-Ferré, C.; Azagra-boronat, I.; Massot-Cladera, M.; Franch, À.; Castell, M.; Rodríguez-Lagunas, M. J.; Pérez-Cano, F. J.

***Vaccines* 2020, *8* (3): 345**

(doi:10.3390/vaccines8030345.)

Índex d'impacte (2020): 4.422

Categoria: 74/162 Q2 (Immunology)

Els resultats d'aquest article han estat presentats en les següents comunicacions a congressos:

- *Sexual dimorphism of the response against rotavirus infection.* Morales Ferré, C., Azagra Boronat , I., Massot Cladera , M., Kalousová , P., Franch, À., Castell, M., Rodríguez Lagunas, M.J., Pérez Cano, F.J. al IV Workshop de l'Institut de Recerca en Nutrició i Seguretat Alimentària de la Universitat de Barcelona (INSA UB): Ciència i propietats del cava i el vi (Santa Coloma de Gramenet), novembre 2018.

- *Sexual dimorphism of rat gut microbiota: key factor in nutritional interventions.* Massot-Cladera M., Azagra-Boronat, I., Morales-Ferré, C., Kalousová, P., Franch, À., Castell, M., Rodríguez-Lagunas, M.J., Pérez-Cano, F.J al X Workshop de la Sociedad Española de Probióticos y Prebióticos (Las Palmas de Gran Canaria), febrer 2019.

Resum

Objectiu: Analitzar la influència del dimorfisme sexual sobre la incidència i la gravetat de la infecció causada per RV i la seva resposta immunitària en un model de rata lactant.

Material i mètodes: Es van utilitzar rates Lewis lactants que van rebre oralment la inoculació amb RV a dia 5-7 de vida. Diàriament, es van obtenir mostres fecals i es van puntuar de l'u al quatre per tal de poder determinar la incidència, la durada i la gravetat de la diarrea. Es va mesurar l'excreció de partícules víriques en femtes, la permeabilitat intestinal i els nivells d'Ig anti-RV (mitjançant la tècnica ELISA), el perfil d'Ig plasmàtiques (mitjançant la tècnica ProcartaPlex™ Multiplex Immunoassays) i l'expressió gènica intestinal (mitjançant la tècnica PCR a temps real).

Resultats: Els mascles van mostrar una major gravetat de la diarrea, pes fecal i eliminació viral comparat amb les femelles. La resposta immunitària dels mascles enfront el RV van mostrar uns nivells menors d'IgG1 i un augment de la relació Th1/Th2 en comparació amb les femelles, les quals van mostrar uns nivells menors de IgG2a. La resposta d'anticossos específica anti-RV, l'expressió gènica i la permeabilitat intestinal enfront el RV no es van veure influenciades pel sexe.

Conclusions: La gravetat de la diarrea causada per la infecció per RV es veu lleugerament influenciada pel dimorfisme sexual, on els mascles sofreixen una gravetat major, però no està associada a una diferent resposta immunitària específica contra el virus.

vaccines

MDPI

Article

Sexual Dimorphism Has Low Impact on the Response against Rotavirus Infection in Suckling Rats

Carla Morales-Ferré [1,2], Ignasi Azagra-Boronat [1,2], Malén Massot-Cladera [1,2], Àngels Franch [1,2], Margarida Castell [1,2], María José Rodríguez-Lagunas [1,2,*] and Francisco J. Pérez-Cano [1,2]

1 Physiology Section, Department of Biochemistry and Physiology, Faculty of Pharmacy and Food Science, University of Barcelona (UB), 08028 Barcelona, Spain; carla.moralesferre@ub.edu (C.M.-F.); ignasiazagra@ub.edu (I.A.-B.); malen.massot@ub.edu (M.M.-C.); angelsfranch@ub.edu (À.F.); margaridacastell@ub.edu (M.C.); franciscoperez@ub.edu (F.J.P.-C.)

2 Nutrition and Food Safety Research Institute (INSA-UB), 08921 Santa Coloma de Gramenet, Spain

* Correspondence: mjrodriguez@ub.edu

Received: 3 June 2020; Accepted: 27 June 2020; Published: 29 June 2020



Abstract: Rotaviruses (RVs) are the leading pathogens causing severe and acute diarrhea in children and animals. It is well known that sex contributes to shaping immune responses, thus it could also influence the incidence and severity of the RV infection. The aim of this study was to analyze the influence of sexual dimorphism on RV infection and its antibody (Ab) immune response in a suckling rat model. Neonatal suckling rats were intragastrically RV-inoculated and clinical indexes derived from fecal samples, as well as immune variables were evaluated. Higher severity of diarrhea, fecal weight and viral elimination were observed in males compared to females ($p < 0.05$). Regarding the adaptative immunity, the RV shaped the immune response to lower IgG1 levels and an increased Th1/Th2-associated Ab response ($p < 0.05$). Although females had lower IgG2a levels than males ($p < 0.05$), the specific anti-RV antibody levels were not sex influenced. In fact, at this age the passive transfer of anti-RV antibodies through breast milk was the critical factor for clustering animals, independently of their sex. It can be concluded that male and female diarrhea severity in RV infection is slightly influenced by sexual dimorphism and is not associated with the specific immune response against the virus.

Keywords: rotavirus; dimorphism; immunity; diarrhea

1. Introduction

It is widely accepted that males and females have differences in their immune system. Females generally show stronger humoral and cellular immune responses to infection or antigenic stimulation than males, which can provide protection against pathogens but can lead to an aberrant inflammatory response increasing the risk of autoimmune diseases [1–4].

Several studies have documented the gender-specific differences in the infection rate of certain bacterial, parasitic and viral infective agents, such as *Mycobacterium tuberculosis*, Plasmodium parasites, West Nile virus, human immunodeficiency virus and several hantaviruses, with males being those with the highest susceptibility to these infections [4]. Moreover, there are also sex differences in the severity of some viral infections [4–6]. For instance, some studies have demonstrated that women suffering from acute infection of Hepatitis C virus are more likely to spontaneously eliminate the virus. In addition, during the chronical stage of this infection, women have less risk of cirrhosis compared to men [7].

The mechanisms for these sexual differences are diverse, and include genetic, epigenetic, hormonal and environmental factors [4,5,8]. Different immunological responses observed between sexes are attributed to the biased response derived from the X chromosome, which contains a large number of immune-related genes that encode receptors, microRNAs and transcription factors involved in the regulation of the immune system [5]. In addition, sex-specific epigenetic mechanisms such as DNA methylation and chromatin remodeling also modulate the immune system [6]. In this regard, sexual hormones like estrogens, progesterone and testosterone quantitatively and qualitatively modulate the responses of immune cells [6,8,9]. Moreover, several studies have reported that gut microbiota composition differs from males to females [10–12], which in turn can influence the immune system. Eventually, all the above differences could have an influence on the degree of protection in vaccination.

Rotavirus (RV) is a non-enveloped virus of the family Reoviridae with a double-stranded RNA genome that infects enterocytes of the small intestine. Its replication in the duodenal mucosa of infants causes disruption to cellular homeostasis resulting in enterocyte damage and cell death [13–15]. RV is the leading causative agent of acute diarrhea in children and is responsible for approximately 20−30% of all cases of severe gastroenteritis that require treatment in hospitals [14,16]. The severity of RV diarrhea is associated with dehydration, as well as other risk factors, such as nutritional status, age under two years, and early complementary feeding [15,17,18].

The use of animal models of RV infection has allowed us to understand the pathogenesis of this infection, the immune response and to test vaccine efficacy [14,15,19]. The RV infection model in rodents has been widely used to study the diarrhea process due to short gestations and multiparous births, which allow us to incorporate large numbers of animals in a short period of time in the studies [20–24]. Even though there are many studies about the different susceptibility and severity for infections in each sex, to our knowledge, there is almost no information on the gender-specific differences in RV infection. For this reason, this study aimed to determine the differences between sexes on the incidence and severity of diarrhea and the subsequent immune response in an RV-infected neonatal rat model.

2. Materials and Methods

1. *Animals*

A total of 23 Lewis pregnant rats obtained from Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, France) and Harlan (Barcelona, Spain) were used. Animals included in this study were derived from previous independent studies [20,21,25,26], allowing enough power analysis to draw conclusions. In all cases, gestating rats were housed individually in cages, monitored daily and allowed to deliver at term. The day of birth was registered as day 1 of life. Litters were unified to the same number of pups per lactating dam based on the original study, with free access to the nipples and rat diet. The dams were fed with a commercial diet corresponding to the AIN-93G formulation [27] and given mineral water ad libitum. Animal handling was performed during the first hours of the light phase on a scheduled basis to limit the disturbance and influence of biological rhythms. The animals were housed under controlled temperature and humidity conditions, in a 12:12-h light/dark cycle. They were located in a special safe and isolated room designed and authorized for working under biosecurity level 2 conditions at the Animal Service of the Faculty of Pharmacy and Food Science, in the University of Barcelona. All experimental procedures were conducted in accordance with the institutional guidelines for the care and use of laboratory animals and were approved by the Ethical Committee for Animal Experimentation of the University of Barcelona and the Catalonia Government (DAAM9268, DAAM3406 and DAAM10176), in full compliance with national legislation following the EU-Directive 2010/63/EU for the protection of animals used for scientific purposes.

2. Experimental Design

Upon natural delivery, pups were distributed into two groups: the reference (REF) group and the RV-infected (RV) group. Body weight was recorded daily throughout the study to assess weight gain.

The simian SA-11 RV strain was obtained from the group Virus Entèrics from the University of Barcelona (Dr. A. Bosch and Dr. R. Pintó). Viruses were propagated in fetal African green monkey kidney cells (MA-104) and titered as TCID50/ mL (TCID, tissue culture infection dose) [23]. SA-11 was intragastrically inoculated (~2 $\times 10^8$ $TCID_{50}$ RV/rat) in 100 µL of phosphate buffered saline (PBS) to suckling rats at days 5–7 of life, depending on the initial study, as previously described [23]. The RV was inoculated after 1 h of separation from their dams to avoid interference between the RV and milk components.

Clinical evaluation was performed daily from the day before inoculation (considered in all studies as day −1 day post-inoculation—DPI) until the end of the study 11 days later (11 DPI). Animals were euthanized at two different time points: a group of the animals was euthanized on 3 DPI (n = 42), whereas the others were euthanized at 11 DPI (n = 139). To analyze the data, rats were divided into 4 groups taking into consideration their sex (male REF (n = 39), female REF (n = 46), male RV (n = 39), and female RV (n = 57) groups). From each original study, the number of males and females in both REF and RV groups included a similar number of pups.

3. Clinical Indexes and Fecal Specimen Collection

SA-11 infection was evaluated from day −1 to 11 DPI by the growth rate and clinical indexes derived from fecal samples. Growth rate was expressed as body weight increase calculating the difference in weight during the pre-diarrhea period (from −3 DPI to 0 DPI), diarrhea period (from 1 DPI to 5 DPI) and post-diarrhea period (from 6 DPI to 9 DPI). Collection of individual fecal samples was performed daily by gently pressing and massaging the abdomen. Specimens were immediately scored, weighed and frozen for further analysis. The severity of diarrhea was expressed by the fecal weight and by scoring stools from 1 to 4 (diarrhea index (DI)) as described: normal (1), loose yellow-green (2), totally loose yellow-green (3), and high amount of watery (4) feces. Diarrhea scores ≥ 2 indicate diarrheic feces, whereas scores of DI < 2 indicate absence of diarrhea [23].

The area under the curve of severity (sAUC) from 0 to 6 DPI—the last day with signs of diarrhea in some animals—was calculated as a global value of severity. The maximum diarrhea index (MDI) was defined as the highest score during the diarrhea period. Incidence of diarrhea was expressed as the percentage of diarrheic animals (% DA, consisting of the percentage of animals presenting diarrhea in each group) and by percentage of diarrheic feces (% DF, taking into consideration the number of total samples collected every day in each group). The AUCs of % DA and % DF (daAUC and dfAUC) during 0–6 DPI were calculated as global values of incidence. The maximum percentage of diarrheic animals (MDA) and diarrheic feces (MDF) were defined as the highest values during the diarrhea period. The days when MDI, MDA and MDF were achieved were also used as indicators (MDId, MDAd and MDFd, respectively). The diarrhea period (DP) was calculated for each animal as the interval between the first (day of diarrhea beginning, DDB) and the last day (day of diarrhea ending, DDE) of diarrhea. The actual number of days with diarrhea within the diarrhea period were also counted (days with diarrhea, DwD).

4. Fecal SA-11 Shedding

Fecal samples from 1 DPI were diluted in PBS (up to 10 mg/mL) and homogenized using Pellet Pestles Cordless Motor (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain). Homogenates were centrifuged (170 g, 5 min, 4 °C) and supernatants were frozen at −20 °C until use. SA-11 particles were quantified by ELISA, as previously described [23]. Titrated dilutions of SA-11 particles, ranging from 10^6 to 10^4/mL, were used for the standard curve. Data were expressed as SA-11 particles/mg fecal sample. In addition,

the total RV in feces was calculated multiplying the concentration of RV and the weight of the feces from 1 DPI.

5. Sample Collection and Processing

At day 3 DPI or 11 DPI, animals were intramuscularly anesthetized with ketamine (90 mg/kg) (Merial Laboratories S.A., Barcelona, Spain) and xylazine (10 mg/kg) (Bayer A.G., Leverkusen, Germany). On those days, collected blood samples were used to determine the immunoglobulin (Ig) pattern and anti-RV antibodies (Ab) from plasma. Small intestine was excised and a 0.5 cm portion of the distal jejunum was immediately conserved in RNAlater® (Ambion, Applied Biosystems, Austin, TX, USA), incubated at 4 °C overnight and stored at −20 °C until PCR analysis. The remaining part of the small intestine was opened lengthwise, cut into 5 mm pieces, incubated with 2 mL of PBS in a shaker (10 min, 37 °C) and then centrifuged in order to obtain the gut wash (GW), which enabled the quantification of the intestinal permeability. Furthermore, at 11 DPI the stomach content of exclusive suckling rats was used as equivalent sample of their corresponding mother's breast milk and was used to study the passive transfer of anti-RV antibodies.

6. Anti-RV Antibodies in Plasma

Anti-RV IgM and total anti-RV Ab in pups' and dams' plasma were quantified by ELISA. A fraction of frozen stomach content from rats at 11 DPI was homogenized and diluted in PBS and tested for the presence of anti-RV Ab. Following previous procedures [23,26], UV-inactivated SA-11 particles at 10^5/mL were used for coating the 96-well plates (Nunc MaxiSorp, Wiesbaden, Germany). After blocking with 1% bovine serum albumin (BSA in PBS) for 1 h at room temperature (RT), appropriate diluted plasma (1/6) was added (3 h, RT). Biotin anti-rat IgM (BD Biosciences, Heidelberg, Germany) was added for measuring anti-RV IgM and goat peroxidase-conjugated anti-rat IgG, IgA and IgM (H + L) (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) for 1 h each were added for measuring total anti-RV. For measuring IgM, extravidin-peroxidase conjugate (4 µg/mL in PBS-Tween-1% BSA; Sigma–Aldrich, Madrid, Spain) was added for 30 min at RT. Subsequently, in both cases, substrate solution (o-phenylenediamine plus hydrogen peroxide in 0.2 M phosphate, 0.1 M citrate buffer, pH 5; Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) was added. Absorbance was measured at 492 nm after stopping the enzymatic reaction with 3 M H_2SO_4 on a microtiter plate photometer (Labsystems, Helsinki, Finland). Data were interpolated by means of Multiskan Ascent v.2.6 software (Thermo Fisher Scientific SLU, Barcelona, Spain). Pooled serum from dams of inoculated litters was used as a standard in each plate. Dilutions of dam serum ranged from 1/80 to 1/5120 and from 1/10 to 1/800 to measure IgM and total anti-RV Ab, respectively. Results were normalized giving RV females of each experiment the value of 100%.

7. Immunoglobulins in Plasma

Plasma concentrations of IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG2c, IgM and IgA were quantified on 11 DPI using ProcartaPlexTM Multiplex immunoassay (eBioscience, San Diego, CA, USA) as in previous studies [21], in which, specific color-coded capture beads were bound to the Ig of interest. Then, different detection antibodies conjugated to phycoerythrin (PE) were added. The specific concentration of each analyte was obtained by MAGPIX® analyzer (Luminex Corporation, Austin, TX, USA) at the Scientific and Technological Centers of the University of Barcelona (CCiT-UB). The sensitivity of the assay was as follows: 0.02 ng/mL for IgM; 0.78 ng/mL for IgG1; 0.02 ng/mL for IgG2a; 0.11 ng/mL for IgG2b; 0.19 pg/mL for IgG2c and 0.48 pg/mL for IgA.

8. Intestinal Permeability

The quantification of α1-antitrypsin (A1AT) in the gut wash, as a marker of intestinal permeability, was performed with the rat SERPINA1/Alpha 1 Antitrypsin ELISA kit (LifeSpan Biosciences Inc., Seattle, WA, USA) following the manufacturer's instructions as in previous studies [21]. The standard

concentrations ranged from 100 to 1.563 ng/mL. Assay sensitivity was 1.56 ng/mL. Results were normalized giving REF females of each experiment the value of 100%.

9. Gene Expression Analysis

A 0.5 cm portion of the central section of the small intestine of 3-DPI pups (during the peak of disease) and of 11-DPI rats (after the diarrhea was resolved) were homogenized for 30 s in lysing matrix tubes (MP Biomedicals, Illkirch, France) using a FastPrep-24 instrument (MP Biomedicals), as previously described [21]. After RNA isolation with the RNeasy® Mini Kit (Qiagen, Madrid, Spain) its purity and concentration was determined with a NanoPhotometer (BioNova Scientific S.L., Fremont, CA, USA) and the corresponding cDNA was obtained using a thermal cycler PTC-100 Programmable Thermal Controller and TaqMan® Reverse Transcription Reagents (Applied Biosystems, AB, Weiterstadt, Germany).

The specific PCR TaqMan® primers (AB) used to assess gene expression with real-time PCR (ABI Prism 7900 HT, AB) were directed to the detection of barrier function molecules such as Muc2 (Rn01498206_m1, inventoried (I)), Ocln (Rn00580064_m1, I) and Cldn2 (Rn02063575_s1, I) as well as to toll-like receptors (TLR), such as Tlr2 (Rn02133647_s1, I), Tlr4 (Rn00569848_m1, I), Tlr5 (Rn04219239_s1, I), Tlr7 (Rn01771083_s1, I) and Tlr9 (Rn01640054_m1, I). The relative gene expression was normalized to the housekeeping gene Gusb (Rn00566655_m1, I) using the 2-ΔΔCt method. Results were expressed as the percentage of expression in each experimental group normalized to the mean value obtained for the female REF group of each experiment, which was set at 100%.

10. Statistical Analysis

Results are expressed as mean ± SEM. The Statistical Package for Social Sciences (SPSS v22.0) (IBM, Chicago, IL, USA) was used for statistical analysis. Data were tested for homogeneity of variance and normality distribution by Levene's and Shapiro-Wilk tests, respectively. When data were homogeneous and had a normal behavior, a conventional one-way ANOVA test was performed. Otherwise, the nonparametric Kruskal-Wallis test followed by the post hoc Mann-Whitney U test was carried out. The chi-square test was performed to compare frequencies of DA and DF. Finally, the Spearman correlation coefficient was used to search for correlation between weight and clinical variables and between immunological variables. Significant differences were established when $p < 0.05$.

A principal components analysis (PCA) was performed with Simca v14.1 (Umetrics, Umea, Sweden) to analyze the natural clustering of samples. Two data matrices were constructed consisting of 96 rows and 12 variables (DI on 1-5 DPI, MDI, MDId, sAUC, DP, DwD, DDE and DDB), in order to analyze the variance observed in the clinical indicators of diarrhea, and 21 rows and 15 variables (total anti-RV Ig, anti-RV IgM, IgG, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG2c, total Ig, % IgM, % IgA, % IgG, Th1/Th2 and RV shedding), in order to analyze the variance observed in the anti-RV response. In the preprocessing of the PCA, Pareto scaling was applied. Data were represented in score and loading plots.

3. Results

1. Body Weight

Body weight (BW) was recorded between days 2 and 16 of life. To analyze the possible effect of viral infection on the BW, the increase in BW gain was calculated during the pre-diarrhea (from −3 DPI to 0 DPI), diarrhea (from 1 DPI to 5 DPI) and post-diarrhea (from 6 DPI to 9 DPI) periods (Figure 1). Although RV infection causes intestinal malabsorption, with associated fluid loss and dehydration inducing BW loss, in our study no changes in BW were observed. Thus, similar BW gain during the diarrhea period was observed for both sexes and also during the post-diarrhea period. Overall, BW was not influenced by sex in the context of RV infection.

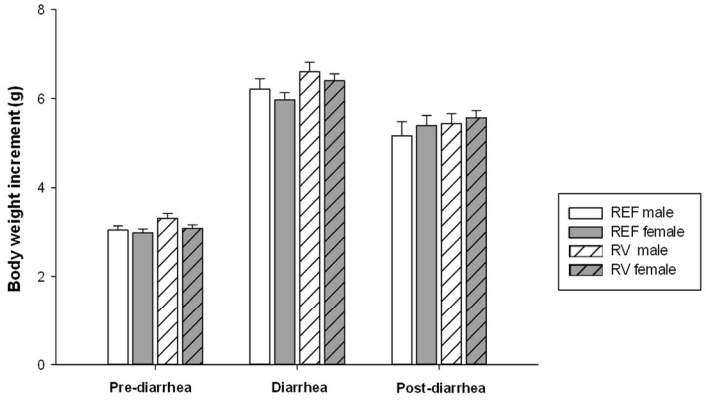


Figure 1. Body weight gain (g) during the pre-diarrhea period (from −3 DPI to 0 DPI), diarrhea period (from 1 DPI to 5 DPI) and post-diarrhea period (from 6 DPI to 9 DPI). Results are expressed as mean ± SEM (n = 39–57 animals/group).

3.2. *Incidence of Diarrhea*

The incidence of RV-induced diarrhea was evaluated using two approaches: the percentage of diarrheic animals (% DA) and the percentage of diarrheic feces (% DF) (Figure 2). Looking at the % DA during the whole period, most of the animals (85% of males and 89% of females) displayed diarrhea at some time point without differences between sexes.

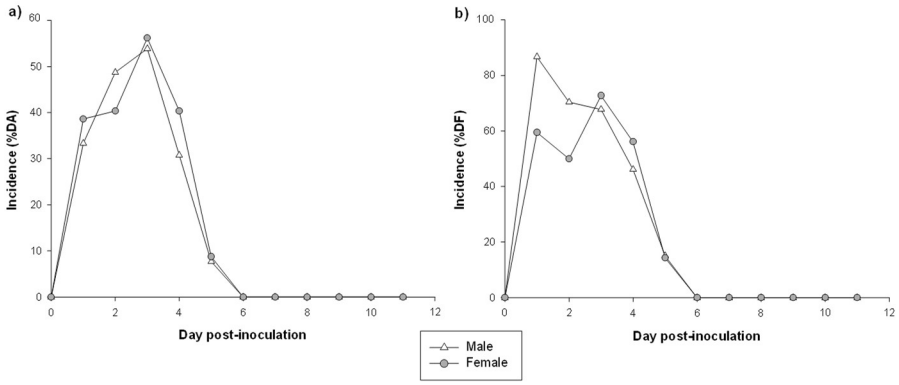


Figure 2. Incidence of RV infection expressed as percentage of diarrheic animals (% DA) (**a**) and diarrheic faces (% DF) (**b**) from 0 DPI to 11 DPI in RV infected group (n = 39–57 animals/ group).

Specifically, as can be observed in Figure 2a, the %DA in males was 33% on 1 DPI. It increased to 49% on 2 DPI reaching the maximum incidence on 3 DPI (54%). From 4 DPI to 5 DPI it decreased to 31% and 8%, respectively. On 6 DPI none of the males had diarrhea. The %DA in females was similar to males: the %DA was 39% on 1 DPI, remained constant on 2 DPI (40%), increased to 56% on 3 DPI and decreased from 4 DPI to 5 DPI (40% and 9% respectively). On 6 DPI none of the females had diarrhea (Figure 2a).

Alternatively, the %DF in males was 87% on 1 DPI. It decreased to 70% on 2 DPI, the incidence was similar on 3 DPI (68%) and almost half of males had diarrhea on 4 DPI. Later, on 5 DPI, only 15% of males still had some diarrhea and, on 6 DPI, none of the males had diarrhea (Figure 2b). When the diarrhea incidence was studied in females, this group showed a tendency to have lower %DF on 1

DPI (59%) and 2 DPI (50%) compared to males (87% and 70%, respectively), but without statistical significance ($p = 0.06$ and $p = 0.09$, respectively). On 3 DPI it increased to 73%, reaching the maximum %DF. On 4 and 5 DPI it decreased to 56% and 14%, respectively. Later, on 6 DPI, as occurred in the males, none of the females had diarrhea (Figure 2b).

If we focus on the maximum incidences found and the days they were obtained (Table 1), both groups achieved similar MDA percentages on 3 DPI. However, males had the MDF one day after the induction whereas females reached similar characteristics of MDF three days after induction ($p < 0.05$). No differences were observed in the dfAUC and daAUC between sexes.

Table 1. Clinical variables determining the diarrhea process in the RV group.

Clinical Outcome	Variable	Males (n =39)	Females (n =57)
Incidence	MDA	53.85%	56.14%
	MDAd	3 DPI	3 DPI
	daAUC	174.36	184.21
	MDF	86.67%	72.73%
	MDFd	1 DPI	3 DPI *
	dfAUC	285.93	252.57
Duration	DDB	1.78 ± 0.16 DPI	2.05 ± 0.17 DPI
	DDE	3.37 ± 0.21 DPI	3.45 ± 0.16 DPI
	DP	1.48 ± 0.24 DPI	1.28 ± 0.19 DPI
	DwD	2.03 ± 0.21 DPI	2.00 ± 0.17 DPI
Severity	MDI	2.49 ± 0.09 *	2.28 ± 0.06
	MDId	2.26 ± 0.20 * DPI	2.76 ± 0.14 DPI
	sAUC	4.53 ± 0.35 *	3.76 ± 0.21

Results are expressed as mean ± SEM (n = 39–57 animals/group). MDA, maximum percentage of diarrheic animals; MDAd, day with maximum percentage of diarrheic animals; daAUC, area under the curve of diarrheic animals; MDF, maximum percentage of diarrheic feces; MDFd, day with maximum percentage of diarrheic feces; dfAUC, area under the curve of diarrheic feces. DDB, day of diarrhea beginning (DPI); DDE, day of diarrhea ending (DPI); DP, diarrhea period; DwD, days with diarrhea. MDI, maximum diarrhea index; MDId, day of maximum diarrhea index (DPI); sAUC, area under the curve of severity. Statistical differences: *: $p < 0.05$ males vs. females.

Focusing on the duration of the diarrhea process, in both groups, diarrhea started 1–2 days after inoculation (DDB) and ended around 3 DPI (DDE) but no differences were observed in the DP and DwD between sexes (Table 1).

3.3. Severity of Diarrhea

Overall, males had a higher sAUC compared to females ($p < 0.05$, Table 1). As can be observed in Figure 3a, the mean severity on 1 and 2 DPI was higher in males compared to females ($p < 0.05$). After that, on 3 DPI, the mean severity in both sexes was similar in males and females and at 4 DPI, the mean score in both sexes was under two showing a similar reduction pattern and meaning that most animals did not have diarrhea.

The mean DI corresponding to the three periods (pre-diarrhea, diarrhea and the post-diarrhea periods) allows a better observation of this difference. It shows that males had a higher mean severity during the diarrhea period compared to females ($p < 0.05$) (Figure 3b). If we focus on the maximum diarrhea index (Table 1), a higher MDI was observed in males compared to females ($p < 0.05$). In addition, the day of maximum diarrhea index (MDId, Table 1) was achieved earlier in males than in females ($p < 0.05$). The PCA showed that the natural clustering of RV-infected animals overlapped between males and females (Figure 4).

However, a subgroup of females clustered on the right part of the scores plot (Figure 4a) and these were characterized mainly by achieving a later MDId (Figure 4b).

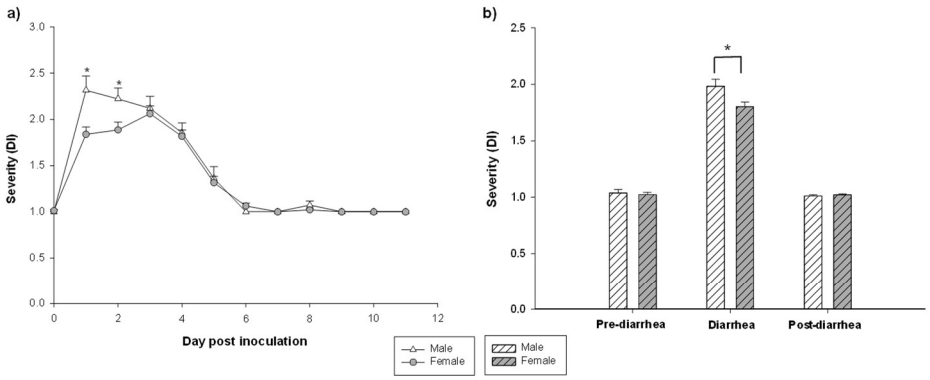


Figure 3. Severity of diarrhea along the study (**a**), and grouped in the pre-diarrhea, diarrhea and post-diarrhea periods (**b**). The pre-diarrhea last from −3 DPI to 0 DPI, diarrhea from 1 DPI to 5 DPI and post-diarrhea period from 6 DPI to 11 DPI. Results are expressed as mean ± SEM (n = 39–57 animals/group). Statistical differences: *: $p < 0.05$ males vs. females.

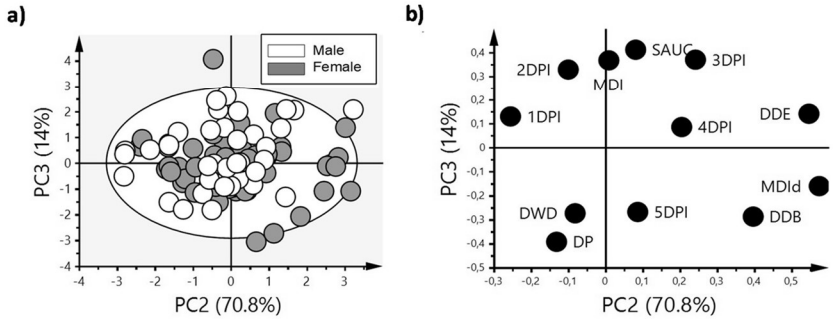


Figure 4. Principal components analysis of the clinical variables of diarrhea. (**a**) Scores plot graph, showing the natural clustering of samples and (**b**) loadings plot, showing how the variables contribute to the variance. Results are derived from n = 96 animals (57 females and 39 males).

3.4. Fecal Weight

Fecal weight was also measured as an objective severity variable of the diarrheic process (Figure 5). Before the induction of RV infection, the fecal weight among groups was similar. A statistically significant increase of 48% in fecal weight was observed in males on 1 DPI compared to females ($p < 0.05$). Later, it decreased in males on 2 DPI and increased on 3 DPI, whereas in females, fecal weight increased on 2 DPI and reached its highest value on 3DPI. From 4 DPI to 6 DPI the fecal weight progressively decreased in both sexes without significant differences.

We observed a positive correlation between animal weight and the fecal weight on 1 DPI in both RV (R = 0.444, $p < 0.05$) and REF groups (R = 0.306, $p < 0.05$), but not on 0 DPI. When clustering the animals depending on the sex, this correlation was only observed in the females of the RV group (R = 0.381, $p < 0.05$). Moreover, in all cases the fecal weight displayed high correlation with the DI (R = 0.743 in females and R = 0.807 in males, $p < 0.05$).

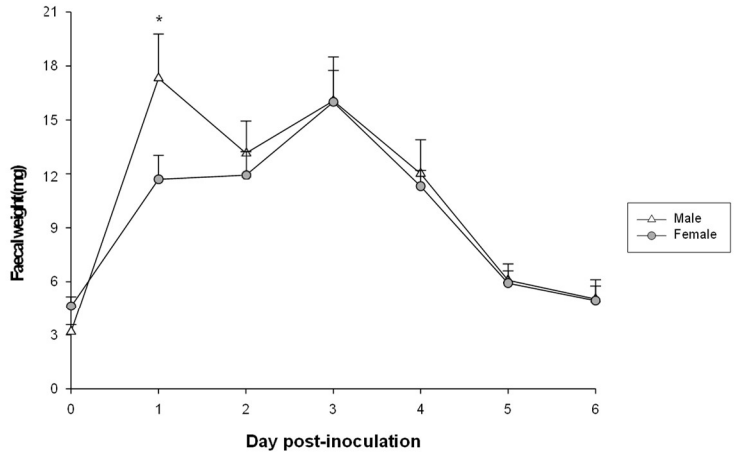


Figure 5. Fecal weight (mg) from 0 DPI to 6 DPI in RV infected group. Results are expressed as mean ± SEM (n = 10–38 samples/group, depending on the number of fecal samples obtained each day). Statistical differences: *: $p < 0.05$ males vs. females.

3.5. Fecal SA-11 Shedding and Intestinal Barrier Function

The viral shedding in feces (Figure 6a) was quantified by ELISA at the day of maximum elimination, 1 DPI [27]. Although, both sexes eliminated 2–3 × 10^6 RV particles/mg of feces without differences between sexes, the total amount of RV cleared by fecal sample from 1 DPI was higher in males than in females ($p < 0.05$).

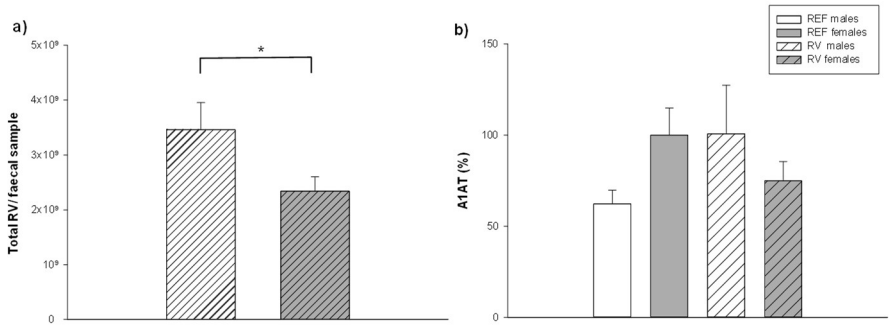


Figure 6. Viral shedding in feces from animals in the RV group and assessment of intestinal barrier function in both, REF and RV groups. The viral shedding was assessed at the peak of viral elimination (1 DPI). Results are represented by and total RV/ fecal sample (**a**). The percentage of alpha-1 antitrypsin (A1AT) concentration in the gut wash (**b**) was analyzed as a measure of the intestinal barrier disruption. Results are expressed as mean ± SEM (n = 39–57 samples/group). Statistical differences: *: $p < 0.05$ RV males vs. RV females.

In addition, the A1AT levels in the gut (Figure 6b), as an indicator of intestinal permeability, were measured by ELISA on 3 DPI. During the inflammatory response, the levels of A1AT in plasma are elevated and can be transported into the intestinal lumen due to the increase in the permeability of the intestinal barrier (21). There were no statistically significant differences between sexes either in the REF or the RV groups. However, the males, but not the females, showed a tendency ($p = 0.07$) to have a 1.5 increase in the levels of A1AT in the gut wash.

3.6. Intestinal Gene Expression

To ascertain the involvement of the barrier function proteins and signaling receptors involved in cross-talking in the sex-differential clinical outcomes the gene expression of mucin, claudin 2 (Cldn2), occludin (Ocln) and toll-like receptors (TLRs) was measured on 3 and 11 DPI (Figure 7).

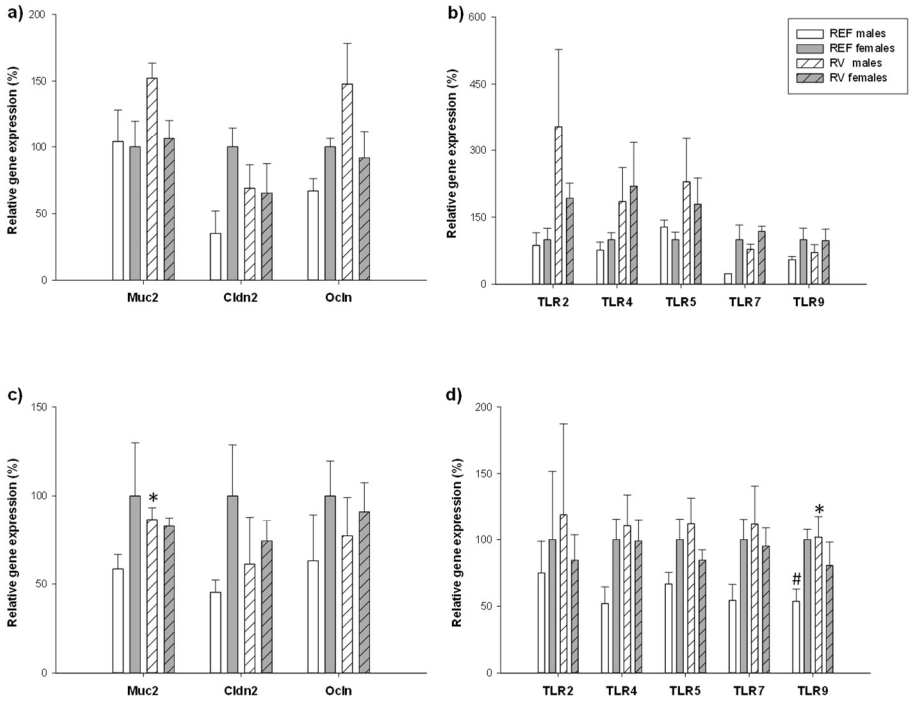


Figure 7. Relative expression of mucin (Muc2). tight junction molecules claudin (Cldn2) and occludin (Ocln), and toll like receptors (TLR) 2, TLR4, TLR5, TLR7 and TLR9 was quantified by real-time PCR on 3 DPI (**a**,**b**) and 11 DPI (**c**,**d**). Relative gene expression was calculated with respect to REF females, which corresponded to 100% of transcription. Results are expressed as mean ± S.E.M. (n = 3–6 animals/group). * $p < 0.05$ vs. non-infected matched group; # $p < 0.05$ vs. female matched group.

On 3 DPI, the gene expression of molecules involved in barrier integrity and bacteria host crosstalk was similar between sexes in basal conditions (REF group). However, REF females showed a tendency to have higher levels of Cldn2, Ocln and TLR7 (×2 times) compared to the REF males ($p = 0.06$ in all cases). In the context of RV infection, males had a tendency to increase the expression of the same genes and also TLR4 (×1.5–2 times) in comparison to REF males ($p = 0.08$ in all cases). Without being statistically significant, RV females' levels of TLR2 and TLR4 were two times higher than those of REF females ($p = 0.05$ and $p = 0.09$, respectively). No differences were observed in the expression of TLR5 and TLR9 (Figure 7a,b).

On 11 DPI, the only difference between sexes in REF conditions was found for TLR9, with the levels in females being two times higher than in males ($p < 0.05$). In the RV group, the gene expression of Muc2 and TLR9 in males was 1.5–2 times higher than in REF males ($p < 0.05$) and showed a tendency to increase TLR4 and TLR7 levels ($p = 0.08$). No differences were observed in the gene expression of Cldn2, Ocln, TLR2 and TLR5 between groups. (Figure 7c,d).

3.7. Antibody Production

Plasma concentrations of IgG, IgM and IgA isotypes, IgG subclasses, as well as the Th1/Th2 ratio were quantified on 11 DPI, once the infection was resolved. As can be observed in Table 2, there was no difference associated with sex in noninfected animals (REF males vs. REF females). In line with this, RV males and RV females at this early age showed a similar concentration of IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG2c, total IgG, IgA and IgM and a similar Th1/Th2 ratio. However, the immune response against the virus led to a decrease in the concentration of IgG1 (Th2-associated subclass) in both RV males and RV females compared to their non-infective groups ($p < 0.05$). This change led to shaping the Ig pattern to a more Th1 response in the RV groups as shown by a higher Th1/Th2 ratio ($p < 0.05$). In addition, RV females showed a reduction in IgG2a (Th2-associated subclass) compared to REF females ($p < 0.05$), whereas in males this change was not statistically significant.

Table 2. Concentration of immunoglobulins (mg/mL) in plasma at the end of the study (11 DPI).

Immunoglobulins	REF Males	REF Females	RV Males	RV Females
IgA	18.5 ± 1.82	38.0 ± 9.5	47.7 ± 1.74	46.0 ± 11.3
IgM	23.6 ± 2.73	22.3 ± 1.43	21.9 ± 1.72	20.4 ± 0.75
IgG	3070 ± 520	3400 ± 191	3820 ± 895	3610 ± 498
IgG1	279 ± 30.1	239 ± 28.4	159 ± 21.0 *	150 ± 11.4 *
IgG2a	549 ± 67.6	648 ± 60.6	512 ± 65.9	492 ± 45.4 *
IgG2b	1180 ± 207	1280 ± 99.2	2090 ± 813	1930 ± 45.2
IgG2c	1070 ± 252	1230 ± 1114	1060 ± 126	1040 ± 67.7
Th1/Th2 #	2.61 ± 0.29	2.88 ± 0.20	4.55 ± 0.93 *	4.56 ± 0.52 *

Results are expressed as mean ± S.E.M (n = 6–14 animals/group). Statistical differences: * $p < 0.05$ RV males vs. REF males or RV females vs. REF females. # Th1/Th2 ratio refers to the relationship between Th1 (IgG2b + IgG2c) and Th2 (IgG1 + IgG2a) immunoglobulins.

Anti-RV antibodies were measured in pregnant dams' plasma and in plasma and the milk from the stomach of pups on 11 DPI. The total anti-RV antibodies in dams' plasma had the highest levels, followed by those in pups' plasma, and then in milk ($p < 0.05$) (Figure 8a).

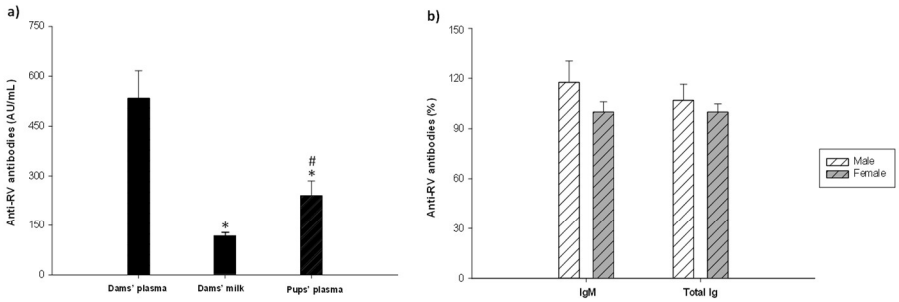


Figure 8. Concentration of total anti-RV antibodies in dams' plasma, milk and pups' plasma expressed in Arbitrary Units/mL (**a**) and anti-RV antibodies (IgM and total Ig) in plasma of male and female rats at the end of the study (11 DPI) in the RV group (**b**). Results are expressed as mean ± S.E.M (n = 16–30 animals/group). Statistical differences: * $p < 0.05$ vs. dams' plasma; # $p < 0.05$ vs. milk.

In order to explore the anti-RV passive transfer from dams to pups in more depth, the correlation of total anti-RV antibodies concentration between dams' milk, dams' plasma and pups' plasma was investigated. Although no correlation coefficient was observed between dams' plasma and milk ($R = 0.09$ and $p = 0.78$), a positive correlation was observed between dams' milk and pups' plasma ($R = 0.45$ and $p < 0.05$), indicating the role of milk Ab transfer at this stage of life. Focusing on pups'

plasma, no differences were observed between sexes in total or IgM anti-RV antibodies in pups' plasma (Figure 8b).

Upon PCA analysis taking together both types of data (Ig subtypes/subclasses and anti-RV Ab levels, Figure 9), the score's plot revealed that the natural clustering of the infected animals showed three different groups, although none of them showed separation of males and females (Figure 9a). In addition, we identified that the samples of siblings (sharing the same mother) always clustered together. In fact, most of the variance of the samples, as observed in the loading plot (Figure 9b), was determined by IgG2a (upper-right cluster) or IgG2b and IgG2c (bottom-left and -right clusters, respectively).

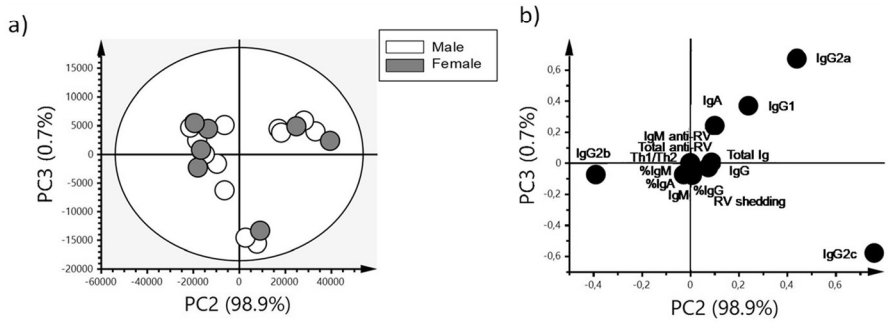


Figure 9. Principal components analysis of variables of the anti-RV response. Scores plot graph, showing the natural clustering of samples (**a**) and loadings plot, showing how the variables contribute to the variance (**b**). Results are derived from n = 21 animals (14 females and 7 males).

4. Discussion

Many reports document a wide variation in the susceptibility to disease and in the immune response between males and females during viral infection due to genetic, epigenetic, hormonal and environmental factors [4,5,8]. Viral gastroenteritis is frequently associated with contaminated food or water. The main causative pathogens worldwide are RVs but also norovirus pathogens and in lower proportions some others such as adenovirus types 40 and 41, astrovirus, calicivirus, and small round structured viruses [28]. However, taking into consideration that the infections are mild and self-limiting there is no need to specifically identify the etiological agent. Therefore, it is difficult to clinically distinguish the etiological agent as well as the sex response to it. Thus, having a controlled animal model to study sex differences in the immune response to a specific pathogen is necessary. In the case of the RV infection the susceptibility and severity of RV infection based on sex differences has not been thoroughly studied. For this reason, a rat neonatal RV gastroenteritis model was used herein.

One of the main features of human RV infection is the consequent diarrhea and associated fluid loss and dehydration, which may result in body weight loss. The present model, as expected and observed in previous studies [20,21,23,26], induces moderate diarrhea without weight loss in neonatal rats. In an attempt to ascertain whether this effect was not observed due to the male and female pooling of results, animals were properly sex-stratified, but again no differences were found. However, we cannot discard the possibility that this effect could also be differentially presented in males and females and this should be further studied in some RV diarrhea animal models with more virulent strains that induce serious fluid loss and affect body weight [29]. In this sense, there is non-available data in humans.

With regard to incidence, we observed that the maximum percentage of animals displaying diarrhea tended to be lower in females ($p < 0.06$), but overall, no statistical differences were found due to sex after the experimental inoculation. In spite of this tendency, the lack of evidence is in line with other works showing similar incidences of RV infection in male and female human individuals [30–32].

However, there are some studies indicating higher prevalence of RV infection in boys than in girls [33,34] and in some cases with a very clear boys-to-girls infection ratio of 1.8:1 [35]. In contrast, a higher susceptibility to RV infection has also been reported in female buffalo calves compared to males [36]. In addition, in our study we observed a similar duration of diarrhea between sexes. To our knowledge, there are no studies about the differential duration of diarrhea between males and females during RV infection either in humans or in animal models. Overall, although without statistical significance, our results reinforce the idea of higher susceptibility to infection in males which can be related to the lower humoral and cellular immune responses [1–4].

In children with RV infection, the most common clinical features are diarrhea, vomiting, fever and dehydration. There is a variety of severity classification systems, such as hydration status, the Vesikari Clinical Severity scoring system or the need for hospitalization. Therefore, it is difficult to compare the severity of RV infection between studies in children, making it more difficult to compare it with the rat model [37]. In the present work, males showed a 26 % increase in severity of diarrhea compared to females. Moreover, the severity of diarrhea was also observed by the fecal weight increase during the diarrhea period, which also displayed differences between sexes. Thus, both severity indicators, diarrhea index and fecal weight, demonstrated that males had more severe diarrhea than females. It is obvious that these differences are limited, but the agreement between a subjective measure—the score—and an objective one—the fecal weight—reinforces the result. In addition, our results are in agreement with other authors, which have suggested that male children suffer more from diarrhea than females, even if their results did not achieve statistical significance [38]. On the other hand, Muendo C. et al. did not observe differences in severity between boys and girls using the Vesikari Clinical Severity scoring system [37]. To our knowledge, this is the first experimental approach demonstrating differences in diarrhea severity between males and females in the context of RV infection. In the future, it would be important to properly record this type of information at a clinical level in order to be able to confirm these preclinical results.

It is widely accepted that females have a reduced susceptibility to viral infections because they immunoreact more strongly than males. This knowledge is in line with the lower severity found herein for female rats. However, it is also suggested that females, as a consequence of their higher active immune response are more predisposed to develop some immune-pathogenic effects (associated with higher inflammatory response involving chemokines and cytokines) of the viral infection and consequently to present more severe symptoms [39]. This rationale does not agree with the reduction in severity of the RV-diarrhea shown here. Thus, the mechanisms involved in controlling the disease such as the viral elimination and the antibody response merit further study.

In humans, as stated before, the etiological causative agent in gastroenteritis is not always identified and if it is, the viral elimination quantification is not the usual approach performed. In our controlled model of RV diarrhea, we have been able to quantify the RV particles in feces as a reflection of the infection [20,21,23,26]. The sex-stratified analysis of SA-11 shedding showed that males had a higher viral load in feces compared to females the day after infection, a result that seems to be in line with other studies [35]. This value reflects how the organism is able to destroy and eliminate the virus in the early phase, when the peak is maximum. Thus, this result indicates that females were able to more efficiently control the virus, maybe by triggering mechanisms that reduce the adhesion of the virus to the host. Viruses blocked by maternal IgA are not detected by this technique, however the variability in this load provided by the lactating dam cannot be a confounding factor, because each litter was composed of a similar number of females and males. In addition, the level of plasma anti-RV Ig in gestating dams was also checked showing similar results between siblings, independently of their sex.

In women, higher levels of Igs and specific Igs against viruses and vaccines have been described [6]. Thus, we wanted to study whether the clinical variation observed was due to a different immune response (i.e. Ig and anti-RV titers). No differences were appreciated in the levels of overall Ig in basal conditions on 11 DPI. Conversely, the pattern of Ig changed in RV-infected animals displaying a

higher Th1/Th2 ratio associated with Ig. This change was mainly due to a reduction in IgG1, a Th2 associated Ig, for both males and females and also to a reduction in IgG2a, which was only observed in females. This differential Ig pattern between reference and infected animals has been previously observed when considering both males and females together [40]. It has to be taken into account that the Ig-enriched maternal milk strongly influences the pups' plasma Ig levels, as observed in previous studies [41]. Therefore, the developing immune sexual dimorphism in early life [42], such as this punctual dimorphism in IgG2a levels in the infected groups can be masked by the Ig absorbed from breast milk in this period. Regarding the specific response, the levels of anti-RV antibodies on 11 DPI indicated that the Ig profile after the resolution of the infection was similar between sexes. Indeed, the anti-RV adaptive response at that stage is probably low or absent, because of a still developing and immature immune system [43]. In line with this, the fact that siblings displayed similar levels of Ig subtypes and subclasses and anti-RV Ab levels, and clustered together in the PCA, reinforces the idea that passive breast milk transfer is critical in the immune response against the virus. This is further reinforced by the correlation of anti-RV Ab levels in breast milk and those in pups. However, the transplacental route should also be taken into account. To our knowledge, this is the first study evaluating the sex-associated immune response against RV, both in animal models or in humans and its influence on passive immunity. However, it would have been interesting to asses, rather than just Ab levels, their neutralization capacity against the virus, in order to better explore the role of sex in the anti-viral response.

In our results, the humoral immune response was not different between sexes, thus some other mechanisms should explain the lower incidence and severity of diarrhea found in females. In fact, besides adaptive immunity, innate immunity has also been observed to be sex-associated [44,45]. This led us to explore whether the local innate defense strategies such as intestinal barrier function (mucin production or tight junction protein levels) and TLR were involved. In this regard, previous studies with this model have shown that RV-infected animals increased mucin production [21] and TLR activation [46] as a response to injury. In our case, the gene expression of those molecules at 3 DPI (at very early age and during the peak of diarrhea) was not sex-associated, but on 11 DPI (in a later stage of development and after infection resolution), besides many tendencies that should be confirmed, higher mucin and TLR9 gene expression was found. It still remains to be confirmed whether these innate mechanisms are subjected to sexual dimorphism and, if so, whether they are, at least in part, responsible for the differential clinical outcomes.

Overall, the mechanisms involved in the sexual dimorphism against viral infections are poorly understood. As we mentioned before, the X chromosome plays an important role in regulating the immune function and the Y chromosome also contains regulatory response genes [4]. For this reason, the dimorphism observed in the immune response could result from the direct effects of the sex chromosomes or from their indirect effects, such as from sex hormones [47]. For this reason, a careful examination of X-linked genes would have also been helpful in terms of explaining the mechanisms involved in the differences in the RV-symptoms found here.

In addition, it has been demonstrated that gut microbiota also differ between sexes [10,12,47–52], although the timing in which this dimorphism appeared remains unclear [53]. The interaction between the intestinal microbiota and the intestinal immune system can be reciprocal and each can influence the other. Previous studies in humans and in our rat model have also shown a disbiosis associated with the infection and have shown how the modulation of the microbiota composition is associated with clinical amelioration [46]. Specific bacterial strains and particular prebiotics have been shown to improve RV gastroenteritis by both direct and indirect mechanisms, such as pathogen aggregation or immunomodulation, respectively [25,28]. Therefore, gut microbiota sexual dimorphism should also be addressed in future studies.

In addition, the two live attenuated oral vaccines, RotaTeq (Merck and Co, West Point, PA, USA) and Rotarix (GSK Biologicals, Rixensart, Belgium), have shown safety and efficacy in children but, the existing studies have not addressed properly the different responses in boys and girls [54–56]. Thus,

these data lead us to suggest an interest in further studying this response in the context of vaccination and prevention of future reinfections.

5. Conclusions

Our animal study demonstrates that the susceptibility and the host response to viral infections are slightly different between sexes. Many studies of human and rodent viral infections use only one sex or do not report the sex of their subjects. The results obtained without checking the possible influence of the sex could lead to wrong conclusions. For this reason, the inclusion of sex as a criterion will improve the understanding of the sex-specific differences in the response to infections and the development of treatments against viral infections.

Author Contributions: C.M.-F., I.A.-B., M.M.-C., M.J.R.-L., À.F., M.C. and F.J.P.-C. were involved in the experiments; C.M.-F., M.J.R.-L. and F.J.P.-C. analyzed and interpreted the results and drafted the paper; all the authors contributed to the critical revision of the manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: C.M.-F. is hired by a grant from the project DIM-2-ELI from "Marató de TV3" foundation (2018-27-30)" and IAB holds a fellowship from the Spanish Ministry of Education, Culture and Sport (FPU15-02719).

Acknowledgments: The authors thank A. Bosch and R.M. Pintó from the group of "Virus Entèrics-UB" for the production of the virus; Jaume Comas Riu (CCiT-UB) for his help and advice with the Luminex in the CCiT-UB; "Animal Service of the Faculty of Pharmacy and Food Science, University of Barcelona" for the care of the rats used in this study, and all the Master's students involved for their support and assistance in the laboratory work.

Conflicts of Interest: The authors declare that they have no conflicts of interest.

References

1. Jaillon, S.; Berthenet, K.; Garlanda, C. Sexual dimorphism in innate immunity. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* **2019**, *56*, 308–321. [CrossRef]
2. Giefing-Kröll, C.; Berger, P.; Lepperdinger, G.; Grubeck-Loebenstein, B. How sex and age affect immune responses, susceptibility to infections, and response to vaccination. *Aging Cell* **2015**, *14*, 309–321. [CrossRef] [PubMed]
3. McCombe, P.; Greer, J.; Mackay, I. Sexual dimorphism in autoimmune disease. *Curr. Mol. Med.* **2009**, *9*, 1058–1079. [CrossRef] [PubMed]
4. Markle, J.G.; Fish, E.N. SeXX matters in immunity. *Trends Immunol.* **2014**, *35*, 97–104. [CrossRef] [PubMed]
5. Fischer, J.; Jung, N.; Robinson, N.; Lehmann, C. Sex differences in immune responses to infectious diseases. *Infection* **2015**, *43*, 399–403. [CrossRef] [PubMed]
6. Ruggierii, A.; Anticoli, S.; D'ambrosio, A.; Giordani, L.; Mora, M. The influence of sex and gender on immunity, infection and vaccination. *Ann. Ist. Super. Sanita* **2016**, *52*, 198–204.
7. Grebely, J.; Page, K.; Sacks-davis, R.; van der Loeff, M.S.; Rice, T.M.; Bruneau, J.; Morris, M.D.; Hajarizadeh, B.; Amin, J.; Cox, A.L.; et al. The effects of female sex, viral genotype and IL28B genotype on spontaneous clearance of acute hepatitis C virus infection. *Hepatology* **2014**, *59*, 109–120. [CrossRef]
8. Klein, S.L.; Flanagan, K.L. Sex Differences in immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* **2016**, *16*, 626–638. [CrossRef]
9. Posma, E.; Moes, H.; Heineman, M.J.; Faas, M.M. The effect of testosterone on cytokine production in the specific and non-specific immune response. *Am. J. Reprod. Immunol.* **2004**, *52*, 237–243. [CrossRef]
10. Elderman, M.; Hugenholtz, F.; Belzer, C.; Boekschoten, M.; van Beek, A.; de Haan, B.; Savelkoul, H.; de Vos, P.; Faas, M. Sex and strain dependent differences in mucosal immunology and microbiota composition in mice. *Biol. Sex Differ.* **2018**, *9*, 26. [CrossRef]
11. Yurkovetskiy, L.; Burrows, M.; Khan, A.A.; Graham, L.; Volchkov, P.; Becker, L.; Antonopoulos, D.; Umesaki, Y.; Chervonsky, A.V. Gender bias in autoimmunity is influenced by microbiota. *Immunity* **2013**, *39*, 400–412. [CrossRef]
12. Haro, C.; Rangel-Zúñiga, O.A.; Alcalá-Díaz, J.F.; Gómez-Delgado, F.; Pérez-Martínez, P.; Delgado-Lista, J.; Quintana-Navarro, G.M.; Landa, B.B.; Navas-Cortés, J.A.; Tena-Sempere, M.; et al. Intestinal microbiota is influenced by gender and body mass index. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0154090. [CrossRef]

13. Greenberg, H.B.; Estes, M.K. Rotaviruses: From pathogenesis to vaccination. *Gastroenterology* **2009**, *136*, 1939–1951. [CrossRef]
14. Lundgren, O.; Svensson, L. Pathogenesis of rotavirus diarrhea. *Microbes Infect.* **2001**, *3*, 1145–1156. [CrossRef]
15. Crawford, S.E.; Ramani, S.; Tate, J.E.; Parashar, U.D.; Svensson, L.; Hagbom, M.; Franco, M.A.; Greenberg, H.B.; O'Ryan, M.; Kang, G.; et al. Rotavirus infection. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **2017**, *3*. [CrossRef]
16. Sadiq, A.; Bostan, N.; Yinda, K.C.; Naseem, S.; Sattar, S. Rotavirus: Genetics, pathogenesis and vaccine advances. *Rev. Med. Virol.* **2018**, *28*, 1–13. [CrossRef] [PubMed]
17. Odimayo, M.S.; Olanrewaju, W.I.; Omilabu, S.A.; Adegboro, B. Prevalence of rotavirus-induced diarrhoea among children under 5 years in Ilorin, Nigeria. *J. Trop. Pediatr.* **2008**, *54*, 343–346. [CrossRef]
18. Carneiro, N.B.; Diniz-Santos, D.R.; Fagundes, S.Q.; Neves, L.L.; Reges, R.M.B.; Lima, E.K.P.; De Oliva Quadros, V.H.; De Jesus Soares, L.E.; Silva, F.S.R.; De Gouvêa Schneiter, H.; et al. Clinical and epidemiological aspects of children hospitalized with severe rotavirus-associated gastroenteritis in Salvador, BA, Brazil. *Braz. J. Infect. Dis.* **2005**, *9*, 525–528. [CrossRef] [PubMed]
19. Kirkwood, C.D.; Ma, L.F.; Carey, M.E.; Steele, A.D. The rotavirus vaccine development pipeline. *Vaccine* **2019**, *37*, 7328–7335. [CrossRef] [PubMed]
20. Rigo-Adrover, M.D.M.; Knipping, K.; Garssen, J.; Saldaña-Ruíz, S.; Franch, À.; Castell, M.; Pérez-Cano, F.J. Rotavirus double infection model to study preventive dietary interventions. *Nutrients* **2019**, *11*, 131. [CrossRef]
21. Azagra-Boronat, I.; Massot-Cladera, M.; Knipping, K.; Van't Land, B.; Stahl, B.; Garssen, J.; Rodríguez-Lagunas, M.J.; Franch, À.; Castell, M.; Pérez-Cano, F.J. Supplementation with 2'-FL and ScGOS/LcFOS ameliorates rotavirus-induced diarrhea in suckling rats. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2018**, *8*, 372. [CrossRef]
22. Ciarlet, M.; Conner, M.E.; Finegold, M.J.; Estes, M.K. Group a rotavirus infection and age-dependent diarrheal disease in rats: A new animal model to study the pathophysiology of rotavirus infection. *J. Virol.* **2002**, *76*, 41–57. [CrossRef] [PubMed]
23. Pérez-Cano, F.J.; Castell, M.; Castellote, C.; Franch, À. Characterization of clinical and immune response in a rotavirus diarrhea model in suckling Lewis rats. *Pediatr. Res.* **2007**, *62*, 658–663. [CrossRef] [PubMed]
24. Ventola, H.; Lehtoranta, L.; Madetoja, M.; Simonen-Tikka, M.L.; Maunula, L.; Roivainen, M.; Korpela, R.; Holma, R. Effects of the viability of lactobacillus Rhamnosus GG on rotavirus infection in neonatal rats. *World J. Gastroenterol.* **2012**, *18*, 5925–5931. [CrossRef]
25. Azagra-Boronat, I.; Massot-Cladera, M.; Knipping, K.; Garssen, J.; Ben Amor, K.; Knol, J.; Franch, À.; Castell, M.; Rodríguez-Lagunas, M.J.; Pérez-Cano, F.J. Strain-specific probiotic properties of bifidobacteria and lactobacilli for the prevention of diarrhea caused by rotavirus in a preclinical model. *Nutrients* **2020**, *12*, 498. [CrossRef] [PubMed]
26. Rigo-Adrover, M.; Saldaña-Ruíz, S.; van Limpt, K.; Knipping, K.; Garssen, J.; Knol, J.; Franch, A.; Castell, M.; Pérez-Cano, F.J. A combination of ScGOS/LcFOS with bifidobacterium breve M-16V protects suckling rats from rotavirus gastroenteritis. *Eur. J. Nutr.* **2017**, *56*, 1657–1670. [CrossRef]
27. Reeves, P.G.; Nielsen, F.H.; Fahey, G.C. AIN-93 Purified diets for laboratory rodents: Final report of the american institute of nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J. Nutr.* **1993**, *123*, 1939–1951. [CrossRef]
28. Azagra-Boronat, I.; Rodríguez-Lagunas, M.J.; Castell, M.; Pérez-Cano, F.J. Prebiotics for Gastrointestinal Infections and Acute Diarrhea. In *Dietary Interventions in Gastrointestinal Diseases*; Watson, R., Preedy, V., Eds.; Academic Press: London, UK, 2019; pp. 179–191.
29. Jacobi, S.K.; Moeser, A.J.; Blikslager, A.T.; Rhoads, J.M.; Corl, B.A.; Harrell, R.J.; Odle, J. Acute effects of rotavirus and malnutrition on intestinal barrier function in neonatal piglets. *World J. Gastroenterol.* **2013**, *19*, 5094–5102. [CrossRef]
30. Iturriza-Gómara, M.; Dallman, T.; Bányai, K.; Böttiger, B.; Buesa, J.; Diedrich, S.; Fiore, L.; Johansen, K.; Korsun, N.; Kroneman, A.; et al. Rotavirus surveillance in Europe, 2005–2008: Web-enabled reporting and real-time analysis of genotyping and epidemiological data. *J. Infect. Dis.* **2009**, *200*, S215–S221. [CrossRef]
31. Staat, M.A.; Azimi, P.H.; Berke, T.; Roberts, N.; Bernstein, D.I.; Ward, R.L.; Pickering, L.K.; Matson, D.O. Clinical presentations of rotavirus infection among hospitalized children. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **2002**, *21*, 221–227. [CrossRef]

32. Sabbaj, D.L.; DePetre, E.E.; Gómez, J.A.; Sordo, M.E. Artículo original rotavirus En La diarrea aguda. *Arch. Argent. Pediatr.* **2001**, *99*, 486–490.
33. Hussein, A.M.; Hassan, M.K. Rotavirus infection among hospitalized children with acute watery diarrhea in Basrah-Iraq, Bahrain Med. *Bull* **2000**, *22*, 170–173.
34. Rytlewska, M.; Bako, W.; Ratajczak, B.; Marek, A.; Gwizdek, A.; Czarnecka-Rudnik, D.; Swiatkowska, H.; Tyl, J.; Korzon, M. Epidemiological and clinical characteristics of rotaviral diarrhoea in children from Gdansk, Gdynia and Sopot. *Med. Sci. Monit.* **2000**, *6*, 117–122.
35. Junaid, S.A.; Umeh, C.; Olabode, A.O.; Banda, J.M. Incidence of rotavirus infection in children with gastroenteritis attending Jos University Teaching Hospital, Nigeria. *Virol. J.* **2011**, *8*. [CrossRef]
36. Hasso, S.A.; Pandey, R. Possible sex differences in the susceptibility of calves to rotavirus infection. *Can. J. Vet. Res.* **1986**, *50*, 287–288. [PubMed]
37. Muendo, C.; Laving, A.; Kumar, R.; Osano, B.; Egondi, T.; Njuguna, P. Prevalence of rotavirus infection among children with acute diarrhoea after rotavirus vaccine introduction in Kenya, a Hospital Cross-Sectional Study. *BMC Pediatr.* **2018**, *18*. [CrossRef] [PubMed]
38. Ahmed, S.; Kabir, A.R.M.L.; Rahman, A.; Hussain, M.; Khatoon, S.; Hannan, A. Severity of rotavirus diarrhea in children: One year experience in a Children Hospital of Bangladesh. *Iran. J. Pediatr.* **2009**, *19*, 108–116.
39. Klein, S.L. The effects of hormones on sex differences in infection: From genes to behavior. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **2000**, *24*, 627–638. [CrossRef]
40. Azagra-Boronat, I.; Massot-Cladera, M.; Mayneris-Perxachs, J.; Knipping, K.; Van't Land, B.; Tims, S.; Stahl, B.; Garssen, J.; Franch, À.; Castell, M.; et al. Immunomodulatory and prebiotic effects of 2′-fucosyllactose in suckling rats. *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 1773. [CrossRef]
41. Azagra-Boronat, I.; Tres, A.; Massot-Cladera, M.; Franch, À.; Castell, M.; Guardiola, F.; Pérez-Cano, F.J.; Rodríguez-Lagunas, M.J. Associations of breast milk microbiota, immune factors, and fatty acids in the rat mother–offspring pair. *Nutrients* **2020**, *12*, 319. [CrossRef]
42. Christoforidou, Z.; Mora Ortiz, M.; Poveda, C.; Abbas, M.; Walton, G.; Bailey, M.; Lewis, M.C. Sexual dimorphism in immune development and in response to nutritional intervention in neonatal piglets. *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 1–17. [CrossRef]
43. Simon, A.K.; Hollander, G.A.; McMichael, A. Evolution of the immune system in humans from infancy to old age. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **2015**, *282*. [CrossRef] [PubMed]
44. Hewagama, A.; Patel, D.; Yarlagadda, S.; Strickland, F.; Richardson, B. Stronger Inflammatory/Cytotoxic T cell response in women identified by microarray analysis. *Genes Immun.* **2009**, *10*, 509–516. [CrossRef] [PubMed]
45. Oertelt-Prigione, S. The influence of sex and gender on the immune response. *Autoimmun. Rev.* **2012**, *11*. [CrossRef]
46. Azagra-Boronat, I.; Massot-Cladera, M.; Knipping, K.; van't Land, B.; Tims, S.; Stahl, B.; Knol, J.; Garssen, J.; Franch, À.; Castell, M.; et al. Oligosaccharides modulate rotavirus-associated dysbiosis and TLR gene expression in neonatal rats. *Cells* **2019**, *8*, 876. [CrossRef] [PubMed]
47. Bouman, A.; Jan Heineman, M.; Faas, M.M. Sex hormones and the immune response in humans. *Hum. Reprod. Update* **2005**, *11*, 411–423. [CrossRef]
48. Cross, T.W.L.; Kasahara, K.; Rey, F.E. Sexual dimorphism of cardiometabolic dysfunction: Gut microbiome in the play? *Mol. Metab.* **2018**, *15*, 70–81. [CrossRef]
49. Cui, M.; Xiao, H.; Li, Y.; Zhang, S.; Dong, J.; Wang, B.; Zhu, C.; Jiang, M.; Zhu, T.; He, J.; et al. Sexual dimorphism of gut microbiota dictates therapeutics efficacy of radiation injuries. *Adv. Sci.* **2019**, *6*. [CrossRef]
50. Elderman, M.; de Vos, P.; Faas, M. Role of microbiota in sexually dimorphic immunity. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 1–6. [CrossRef]
51. Dominianni, C.; Sinha, R.; Goedert, J.J.; Pei, Z.; Yang, L.; Hayes, R.B.; Ahn, J. Sex, Body mass index, and dietary fiber intake influence the human gut microbiome. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0124599. [CrossRef]
52. Martin, R.; Makino, H.; Yavuz, A.C.; Ben-Amor, K.; Roelofs, M.; Ishikawa, E.; Kubota, H.; Swinkels, S.; Sakai, T.; Oishi, K.; et al. Early-life events, including mode of delivery and type of feeding, siblings and gender, shape the developing gut microbiota. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0158498. [CrossRef] [PubMed]
53. Jašarevic', E.; Morrison, K.E.; Bale, T.L. Sex differences in the gut microbiome—Brain axis across the lifespan. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **2016**, *371*, 12–17. [CrossRef] [PubMed]

54. Clarke, E.; Desselberger, U. Correlates of protection against human rotavirus disease and the factors influencing protection in low-income settings. *Mucosal Immunol.* **2015**, *8*, 1–17. [CrossRef] [PubMed]
55. Bines, J.E.; Kirkwood, C.D. Conquering rotavirus: From discovery to global vaccine implementation. *J. Paediatr. Child Health* **2015**, *51*, 34–39. [CrossRef]
56. Mrozek-Budzyn, D.; Kieltyka, A.; Majewska, R.; Augustyniak, M. The effectiveness of rotavirus vaccine in preventing acute gastroenteritis during rotavirus seasons among Polish children. *Arch. Med. Sci.* **2016**, *12*, 614–620. [CrossRef]



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Article 3

"Effects of a postbiotic and prebiotic mixture on suckling rats' microbiota and immunity"

Carla Morales-Ferré, Ignasi Azagra-Boronat, Malén Massot-Cladera, Sebastian Tims, Karen Knipping, Johan Garssen, Jan Knol, Àngels Franch, Margarida Castell, María J. Rodríguez-Lagunas and Francisco J. Pérez-Cano

***Nutrients* 2021, 13 (9): 2975**

(doi:10.3390/nu13092975)

Índex d'impacte (2020): 5.717

Categoria: 17/88 (Q1)

Els resultats d'aquest article han estat presentats en les següents comunicacions a congressos:

- *Influence of a prebiotic and postbiotic combination on suckling rats' growth*. Morales-Ferré C, Azagra-Boronat I, Massot-Cladera M, Rio-Aige K, Franch À, Castell M, Rodríguez-Lagunas MJ, Pérez-Cano FJ al V Workshop de l'Institut de Recerca en Nutrició i Seguretat Alimentària de la Universitat de Barcelona (INSA UB): Al·lèrgies i intoleràncies alimentàries: de la sospita a la taula (Santa Coloma de Gramenet), novembre 2019.

- *Influence of a postbiotic dietary intervention on the immune system development in a preclinical model.* Morales-Ferré, C., Massot-Cladera, M., Rodríguez-Lagunas, M.J.,

Knipping, K., Garssen, J., Pérez-Cano, F.J. al XII ISIN Conference (Barcelona), juliol 2021.

- *Intestinal impact of the postbiotic Lactofidus^{TM} on healthy and rotavirus infected suckling rats*. Morales-Ferré, C.; Azagra-Boronat, I.; Castell, M.; Tims, S.; Knipping K.; Garssen, J.; Knol, J.; Rodríguez-Lagunas, M.J; Pérez-Cano, F.J. al VI Workshop de l'Institut de Recerca en Nutrició i Seguretat Alimentària de la Universitat de Barcelona (INSA UB): Revaloració i reaprofitament alimentari: la ciència darrere una alimentació i gastronomia sostenibles (Santa Coloma de Gramenet), febrer 2022.

Resum

Objectiu: L'objectiu d'aquest estudi era avaluar els efectes de la suplementació amb el postbiotic Lactofidus® i la seva combinació amb els prebiòtics galaactooligosacàrids de cadena curta (scGOS) i fructooligosacàrids de cadena llarga (lcFOS) en un model preclínic de rates lactants sanes.

Material i mètodes: Es van utilitzar rates Lewis lactants que van rebre oralment el Lactofidus®, i/o scGOS-lcFOS des del segon dia de vida fins al final de l'estudi. Diàriament es va registrat el pes corporal i la consistència de les femtes. Al final de l'estudi es va mesurar el perfil d'Ig (mitjançant la tècnica ProcartaPlex™ Multiplex Immunoassays), l'expressió gènica intestinal (mitjançant la tècnica PCR a temps real), la composició de la microbiota (mitjançant la seqüenciació Illumina) i els nivells d'àcids grassos de cadena curta (AGCC, mitjançant la tècnica de cromatografia de gasos-espectrometria de masses).

Resultats: Totes les intervencions nutricionals modulen el perfil d'Ig, però els prebiòtics i el postbiòtic indueixen efectes diferencials: mentre scGOS-lcFOS indueixen femtes més toves i modulen la composició de la microbiota i el perfil d'AGCC, el Lactofidus® augmenta l'expressió gènica dels receptors TLR. La combinació dels prebiòtics i el postbiòtic mostra els efectes observats amb els prebiòtics sols, però també un efecte sinèrgic en el creixement de l'animal.

Conclusions: La combinació dels dos productes sembla una bona estratègia per modular les característiques immunològiques i microbianes durant les primeres etapes de vida.

nutrients

MDPI

Article

Effects of a Postbiotic and Prebiotic Mixture on Suckling Rats' Microbiota and Immunity

Carla Morales-Ferré [1,2], Ignasi Azagra-Boronat [1,2], Malén Massot-Cladera [1,2], Sebastian Tims [3], Karen Knipping [3,4], Johan Garssen [3,4], Jan Knol [3,5], Àngels Franch [1,2], Margarida Castell [1,2], María J. Rodríguez-Lagunas [1,2,*] and Francisco J. Pérez-Cano [1,2]

1 Physiology Section, Department of Biochemistry and Physiology, Faculty of Pharmacy and Food Science, University of Barcelona (UB), 08028 Barcelona, Spain; carla.moralesferre@ub.edu (C.M.-F.); ignasiazagra@ub.edu (I.A.-B.); malen.massot@ub.edu (M.M.-C.); angelsfranch@ub.edu (À.F.); margaridacastell@ub.edu (M.C.); franciscoperez@ub.edu (F.J.P.-C.)
2 Nutrition and Food Safety Research Institute (INSA-UB), 08921 Santa Coloma de Gramenet, Spain
3 Danone Nutricia Research, 3584 CT Utrecht, The Netherlands; sebastian.tims@danone.com (S.T.); karen.knipping@danone.com (K.K.); johan.garssen@danone.com (J.G.); jan.knol@danone.com (J.K.)
4 Division of Pharmacology, Utrecht Institute for Pharmaceutical Sciences, Faculty of Science, Utrecht University, 3584 CA Utrecht, The Netherlands
5 Laboratory of Microbiology, Wageningen University, 6708 Wageningen, The Netherlands
* Correspondence: mjrodriguez@ub.edu; Tel.: +34-934-024-505

Abstract: Human milk serves as a model for infant formula providing nutritional solutions for infants not able to receive enough mother's milk. Infant formulas aim to mimic the composition and functionality of human milk by providing ingredients reflecting those of the latest human milk insights, such as prebiotics, probiotics and postbiotics. The aim of this study was to examine the effects of the supplementation with a postbiotic (Lactofidus™) and its combination with the prebiotics short-chain galactooligosaccharides (scGOS) and long-chain fructooligosaccharides (lcFOS) in a preclinical model of healthy suckling rats. Pups were supplemented daily with Lactofidus™ (POST group) and/or scGOS/lcFOS (P+P and PRE groups, respectively). Body weight and fecal consistency were analyzed. At the end of the study, immunoglobulin (Ig) profile, intestinal gene expression, microbiota composition and short chain fatty acid (SCFA) proportion were quantified. The supplementation with all nutritional interventions modulated the Ig profile, but the prebiotic mixture and the postbiotic induced differential effects: whereas scGOS/lcFOS induced softer feces and modulated microbiota composition and SCFA profile, Lactofidus™ upregulated Toll-like receptors gene expression. The use of the combination of scGOS/lcFOS and Lactofidus™ showed the effects observed for the oligosaccharides separately, as well as showing a synergistic impact on animal growth. Thus, the combined use of both products seems to be a good strategy to modulate immune and microbial features in early life.

Keywords: postbiotic; prebiotic; suckling rats; Lactofidus; scGOS/lcFOS; microbiota; SCFA

check for updates

Citation: Morales-Ferré, C.; Azagra-Boronat, I.; Massot-Cladera, M.; Tims, S.; Knipping, K.; Garssen, J.; Knol, J.; Franch, À.; Castell, M.; Rodríguez-Lagunas, M.J.; et al. Effects of a Postbiotic and Prebiotic Mixture on Suckling Rats' Microbiota and Immunity. *Nutrients* **2021**, *13*, 2975. https://doi.org/10.3390/nu13092975

Academic Editor: Connie Weaver

Received: 13 July 2021
Accepted: 25 August 2021
Published: 27 August 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

1. Introduction

Breast milk is the best nutrition for the newborn, and provides all the essential nutrients and bioactive compounds such as oligosaccharides (natural prebiotics), immune cells and bacteria (natural probiotics) and their metabolites (natural postbiotics) in order to promote his/her development [1,2]. However, in some cases, breastfeeding might not be possible, and then, an infant formula is the best substitute for breast milk. Thus, manufacturers infant formulas aim to mimic the composition of breast milk by adding bioactive agents to their formulas such as prebiotics, probiotics and more recently, postbiotics [3,4].

Prebiotics are defined as non-digestible compounds that are selectively metabolized by the microorganisms in the gut, thus modulating the composition and/or activity of the

gut microbiota, conferring a health benefit on the host [5,6]. In this regard, the short-chain galactooligosaccharides (scGOS) and long-chain fructooligosaccharides (lcFOS) mixtures are the most studied prebiotics in infant formula. [7]. Clinical research has demonstrated that scGOS and lcFOS supplements change the stool consistency and fecal microbiota composition making them more similar to that of breastfed infants [7–9]. In addition, during early life, the incidence of atopic dermatitis, allergy, and infections such as respiratory tract and gastrointestinal infections in babies fed with this type of infant formula were lower than those receiving formulas lacking these components [10–16].

Moreover, breast milk is also a source of live bacteria [1,17], thus, probiotic bacteria are often added to infant formula. Probiotics are defined as live, natural microorganisms, that when administered in adequate amounts, confer health benefits to the host [18,19]. The most commonly commercialized probiotic bacteria are strains from the genera *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* [20–22]. Probiotics have the potential to modulate baby's immune maturation and even to prevent or treat different diseases such as allergies, type 2 diabetes, diarrhea, respiratory infections, infant colic, ulcerative colitis, obesity and irritable bowel syndrome throughout life, their effects being strain specific [10,21,23–25].

Finally, postbiotics are described as a preparation of inanimate microorganisms and/or their components that confers a health benefit on the host [26]. Postbiotics are a safe and novel strategy to obtain the beneficial effects of probiotic bacteria without their possible disadvantages such as the rare case reports of probiotic-related infections and the fact that probiotics could express virulence factors and transfer antibiotic resistance genes to pathogenic bacteria in the gut [27–29]. The various procedures (heat, high pressure, ionizing irradiation or sonication) used to inactivate bacteria affect the microorganisms involved in the fermentation process differently and can modify the postbiotic composition and the host's response to the postbiotic [21,30]. Postbiotics have attractive properties such as a favorable absorption, distribution and excretion abilities, safety dose parameters and longer shelf life [31]. Moreover, these properties might indicate a higher capacity to generate biological responses in different organs and tissues in the host [31]. The effects of specific postbiotics differ between individuals and also can depend on the temporal changes in gut microbiota composition [21]. Although the mechanisms of action of postbiotics still remain unclear [27], postbiotics can change the composition of gut microbiota and their function and many of their outcomes rely on microbial metabolites, organic acids, carbohydrates, proteins, lipids, cell wall components and other fermented products generated in the matrix [21]. Short-chain fatty acids (SCFA) are the major end products of gut microbiota activity and are associated with healthy gut microbiota composition and function as well as enhancement of mucosal immunity and intestinal barrier function [2,21]. Some of these postbiotics, such as the SCFA, are current components present in breast milk [2].

In recent years, the use of postbiotics as a nutritional strategy has increased and their effects have been studied both at preclinical and clinical levels [21]. It has been observed that postbiotics are useful in inflammatory diseases such as irritable bowel syndrome, colitis, gout, arthritis, atopic dermatitis and asthma [21,22,32,33]. Moreover, postbiotics could prevent or treat infectious diseases such as gastroenteritis, respiratory tract or enteric infections caused by *Escherichia coli* or *Salmonella enteritidis serovar*, *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli K1* infection [27,34–36]. Finally, other uses of postbiotics could be in neurological and cardiometabolic disorders [37,38].

For a long time, literature mainly focused on the beneficial effects of prebiotics and probiotics in infant milk formula, but after the appearance of postbiotics in this field the advantages compared to probiotics and their many applications have been identified. Therefore, the present study aimed to examine the effects of a daily supplementation with a formulation with a postbiotic and prebiotic mixture, as happens in breast milk. The postbiotic is comprised of an inactivated fermented milk infant formula obtained from *Bifidobacterium breve* and *Streptococcus thermophilus* activity by an innovative fermentation process (Lactofidus™). Although these microorganisms are not found in breast milk, they are known to produce 3-galactosyllactose (3-GL), a human milk oligosaccharide (HMO)

present in breast milk, and frequently used in pediatric population [2]. The prebiotic is based on a mixture of scGOS and lcFOS. The products alone or in combination were administered to healthy suckling rats. This study aims to elucidate the specific effects of this particular postbiotic, but also to ascertain whether its combination with prebiotics, which is also observed in breast milk, modifies the health outcomes in rat pups. For that, some growth and immune variables, microbiota composition and SCFA production, among others, were evaluated.

2. Materials and Methods

1. *Animals*

Pregnant Lewis rats (G14) provided by Janvier (Le Genest St Isle, France) were individually housed in cages (2184L Eurostandard Type II L, Tecniplast, West Chester, PA, USA), monitored daily and allowed to deliver at term. The cages contained bedding of large fibrous particles (Souralit 1035, Bobadeb S.L., Santo Domingo de la Calzada, Spain) and tissue papers (Gomà-Camps S.A.U., La Riba, Spain) as cage enrichment. The day of birth was registered as day 1 of life. On day 2, litters were randomly assigned to four experimental groups and were unified to 8 pups per lactating dam with a similar proportion (40–60%) of each sex in each litter. Pups had free access to maternal milk and rat diet. Dams were given a commercial diet corresponding to the American Institute of Nutrition 93 G formulation [39] (Teklad Global Diet 2014, Envigo, Indianapolis, IN, USA) and water ad libitum. Animal handling was performed during the first hours of the light phase on a scheduled basis, to limit the disturbance and biological rhythms' influence. After separating all the mothers and keeping the pups in the home-cage, handling and oral administration was performed once a day. Afterwards, the dam was reunited with her litter. Animals were housed under controlled conditions of temperature (20–24 °C) and humidity (40–60%) in a 12 h light−12 h dark cycle (lights on at 8:00 a.m and lights off at 8:00 p.m), at the Faculty of Pharmacy and Food Science animal facility (University of Barcelona, Spain). Cage cleaning was performed weekly. All experimental procedures were conducted in accordance with the institutional guidelines for the care and use of laboratory animals and were approved by the Ethical Committee for Animal Experimentation of the University of Barcelona and the Catalonia Government (CEEA/Ref. 255/18 and PAMN/Ref.10176, respectively), in full compliance with national legislation following the EU-Directive 2010/63/EU for the protection of animals used for scientific purposes. Sample size estimation was calculated by the Appraising Project Office's program from the Universidad Miguel Hernández de Elche (Alicante, Spain). The minimal number of animals to provide statistically significant differences among groups, using plasma immunoglobulin (Ig) G as a variable and assuming that there is no dropout rate and type I error of 0.05 (two-sided), was three litters per group, as in previous studies, because of the remarkable variability among litters [15,40–42].

2. *Experimental Design and Sample Collection*

Upon natural delivery, pups were distributed into four groups of 24 animals each (3 litters of 8 animals/group): the reference (REF) group and three groups supplemented with a mixture of scGOS and lcFOS (PRE), Lactofidus™ (POST), and the combination of both (P+P). All supplementations were provided by Danone Nutricia Research (Utrecht, The Netherlands).

Suckling rats were orally administered once daily, as previously described [10], with normalized volume/body weight of vehicle, prebiotic, postbiotic or their combination (9 µL/g/day), from the second to the sixteenth day of life, corresponding to the strict lactation period. The PRE group was supplemented with 0.8 g of scGOS/lcFOS per 100 g of body weight. GOS/FOS is a mixture of GOS (Vivinal GOS, Borculo Domo, Zwolle, The Netherlands) with a degree of polymerisation (dp) of 3–8, and long-chain FOS (Raftiline HP, Orafti, Wijchen, The Netherlands; average dp > 23) in a 9:1 ratio.

The POST group received 0.92 g/100 g body weight of an infant formula that contained heat inactivated milk fermented by the bacteria *Bifidobacterium breve* and *Streptococcus ther-*

mophilus (Lactofidus™) [43–46]. Particularly, the Lactofidus™ process is a well-controlled fermentation process in which the two unique and proprietary strains mentioned before are used to ferment a milk matrix. During fermentation, both strains are metabolically active and produce bioactive compounds (postbiotics). After the fermentation process the milk matrix is spray dried and then used in the present study.

The P+P group were fed with both products at the same doses as when given separately and maintaining the volume of administration (9 µL/g/day). Finally, a matched volume of water was administered to the REF group. The product dose selections were based on previous studies with similar approaches [10,12,41,42,47].

Body weight was recorded daily. Moreover, the naso-anal and tail lengths were measured to determine the body/tail ratio. In addition, body mass index (BMI) was calculated as body $weight/lenght^2$ (g/cm^2), and the Lee Index was calculated as ($weight^{0.33}/length$) × 1000 ($g^{0.33}/cm$).

During the study, fecal samples were obtained after gentle abdominal massage, to determine changes in consistency and fecal weight. Stool consistency was scored from 1 to 4 in a blinded manner based on texture and amount as described: normal (1); soft (2); totally loose (3); and high amount of watery (4) feces. The sampling was performed always at the same time, after the pups were separated from their mothers and weighted, and prior to its administration.

Animals were euthanized at two different time points by randomly selecting 4 pups from each dam maintaining sex equality on each day: half of the litter on day 8 and the other half on day 16, to obtain tissue samples each time. Rats were intramuscularly anesthetized with ketamine (90 mg/kg) (Merial Laboratories S.A., Barcelona, Spain) and xylazine (10 mg/kg) (Bayer A.G., Leverkusen, Germany) and exsanguinated. Plasma was obtained in order to determine the Ig pattern. The weight of liver, stomach, spleen, thymus, small intestine and large intestine was also recorded. Moreover, the length of small and large intestines was measured. Then, a 1 cm central portion of the small intestine was immediately conserved in RNAlater®(Ambion, Applied Biosystems, Austin, TX, USA), incubated at 4 °C overnight and stored at −20 °C until PCR analysis. Moreover, cecal content was obtained on day 16 for the analysis of the microbiota composition and SCFA profile.

3. *pH of Stools and Stomach Content*

For pH determination, fecal samples from days 7–9 (middle of the study) and 14–16 (end of the study) were diluted in distilled water (up to 200 mg/mL) and gently agitated before the measurement. In contrast, stomach content samples from day 8 and 16 were measured directly without previous dilution. In both cases, pH was measured using a 5207 pH electrode for surfaces and a micropH 2001 pH meter (Crison Instruments, Barcelona, Spain).

4. *Quantification of Immunoglobulins*

At the end of the nutritional intervention, on day 16, plasma concentration of IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG2c, IgM and IgA was quantified using ProcartaPlex™ Multiplex immunoassay (Thermo Fisher Scientific, Barcelona, Spain) as described in previous studies [12], in which specific color-coded capture beads were bound to the Ig of interest. Then, different detection antibodies conjugated to phycoerythrin (PE) were added. The specific concentration of each analyte was obtained by MAGPIX®analyzer (Luminex Corporation, Austin, TX, USA) at the Scientific and Technological Centers of the University of Barcelona (CCiT-UB). The sensitivity of the assay was as follows: 0.02 ng/mL for IgM; 0.78 ng/mL for IgG1; 0.02 ng/mL for IgG2a; 0.11 ng/mL for IgG2b; 0.19 pg/mL for IgG2c and 0.48 pg/mL for IgA.

2.5. Gene Expression Analysis

A 1 cm of a central portion of the small intestine of 16-day-old pups was homogenized for 30 s in lysing matrix tubes (MP Biomedicals, Illkirch, France) using a FastPrep-24 instrument (MP Biomedicals), as previously described [47]. After RNA isolation with the RNeasy®Mini Kit (Qiagen, Madrid, Spain) its purity and concentration was determined with a NanoPhotometer (BioNova Scientific S.L., Fremont, CA, USA). Later, the corresponding cDNA was obtained using thermal cycler PTC-100 Programmable Thermal Controller and TaqMan®Reverse Transcription Reagents (Applied Biosystems, AB, Weiterstadt, Germany).

The specific PCR TaqMan®primers (AB) used to assess gene expression with real-time PCR (ABI Prism 7900 HT, AB) were directed to the detection of IgA (4331348, made to order), barrier function molecules such as Muc2 (Rn01498206_m1, inventoried [I]), Muc3 (Rn01481134_m1, I) Ocln (Rn00580064_m1, I) and Cldn2 (Rn02063575_s1, I), Cldn4 (Rn01196224_s1, I) as well as to Toll-like Receptors (TLR), such as Tlr2 (Rn02133647_s1, I), Tlr3 (Rn01488472_g1, I) Tlr4 (Rn00569848_m1, I), Tlr5 (Rn04219239_s1, I), Tlr7 (Rn01771083_s1, I), Tlr9 (Rn01640054_m1, I), and maturation markers such as Fcgrt (Rn00583712_m1, I, encoding for FcRn), and Prdm1 (Rn03416161_m1, I, encoding for Blimp-1). The relative gene expression was normalized to the housekeeping gene Gusb (Rn00566655_m1, I) using the 2-ΔΔCt method [48]. Results were expressed as the percentage of expression in each experimental group normalized to the mean value obtained for the REF group, which was set at 100%, as in previous studies [40].

6. Microbiota Composition

DNA from samples of cecal content collected on day 16 (6 rats/group corresponding to 2 rats of each of the 3 litters constituting each experimental group) were amplified 25 PCR cycles. A negative control of the DNA extraction was included as well as a positive Mock Community control to ensure quality control. They were later sequenced in the V3-V4 variable region of the 16S rRNA gene. The Illumina Miseq sequencing 300 × 2 approach was assessed (Illumina Inc, San Diego, CA, USA) and sequences were merged and processed using MiSeq run and MiSeq Reporter (on-system software) in collaboration with (Microomics, Barcelona, Spain).

To estimate the alpha biodiversity, the number of observed operational taxonomic units (OTUs, i.e., richness), Pielou's evenness and Shannon's diversity indexes were calculated and to assess the beta diversity Unweighted Unifrac distance was measured. The taxonomic assignment of phylotypes was performed using a Bayesian Classifier trained with Silva database version 132- 99% OTUs full-length sequences [49]. The relative proportions of families and genera were calculated and represented with stacked bars. The category "others" represented in each graph includes those families whose presence was lower than 1% in the REF group and those genera whose presence was lower than 3% in the same group.

In order to study the presence or absence of taxonomic ranks (family and genera) in the experimental groups, Venn diagrams were created. A bacterial group was considered as present in the group when all 6 animals displayed proportions higher than 0.001%, while the bacterial groups detected in less animals were regarded as absent in the group.

7. Quantification of Short-Chain Fatty Acids in the Cecal Content

Cecal content samples of 16-day-old suckling rats were acidified in 0.1 M formic acid and homogenized using Pellet Pestles Cordless Motor (Sigma-Aldrich, Barcelona, Spain) to reach the concentration of 200 mg/mL to measure cecal SCFA levels by headspace-gas chromatography-mass spectrometry (HS-GC-MS) at the GC-MS unit of the CCiT-UB, as previously described [12]. Acetic, propionic, isobutyric, butyric, isovaleric and valeric acids were quantified. The lower limits of detection (μmol/g of feces) were as follows: 0.404 for acetic acid, 0.068 for propionic acid, 0.003 for isobutyric acid, 0.020 for butyric acid, 0.001 for isovaleric acid, and 0.001 for valeric acid.

2.8. Statistical Analysis

Results are expressed as mean ± SEM. The Statistical Package for Social Sciences (SPSS v22.0) (IBM, Chicago, IL, USA) was used for statistical analysis. Data were tested for homogeneity of variance and normality distribution by Levene's and Shapiro–Wilk tests, respectively. When data were homogeneous and had a normal behavior, conventional one-way ANOVA test was carried out followed by the post hoc Bonferroni. Otherwise, the nonparametric Kruskal–Wallis test followed by the post hoc Mann–Whitney U test was performed. The Spearman correlation coefficient was used to search for correlation between gut microbiota and SCFA production.

With regard to microbiota composition, alpha diversity comparisons were carried out using Kruskal–Wallis test. Beta diversity distance matrices were used to calculate principal coordinates analysis (PCoA) and to make ordination plots using R software package version 3.6.0. Permanova and ANOSIM tests were used to determine the significance of groups present in community structure. Moreover, Permdisp test was used to identify location vs. dispersion effects [50]. Differential relative abundance of taxa was tested using two methods: ANCOM [51] and Kruskal–Wallis test. After Kruskal–Wallis test, Conover's test with FDR Benjamini-Hochberg correction was added for pairwise comparison. Finally, Biodiversity R version 2.11-1, PMCMR version 4.3, RVAide Memoire version 0.9-7 and vegan version 2.5-5 packages were used for the different statistical analysis preformed.

A principal components analysis (PCA) was performed with Simca v14.1 (Umetrics, Umea, Sweden) to analyze the natural clustering of samples. Two data matrices consisting of 40 rows and 8 variables (IgA, IgG, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG2c, IgM and Th1/Th2 ratio) were constructed in order to analyze the variance observed in the Ig profile, and 34 rows and 6 variables (TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR7 and TLR9) in order to analyze the variance observed in the TLRs' expression. Data were represented in score plots. Significant differences were established when $p < 0.05$.

3. Results

1. Growth and Morphometry

As it can be observed in Figure 1, animals from the P+P group showed higher body weight than those from the REF, PRE and POST groups ($p < 0.05$). The highest differences were observed at the end of the study (day 16), when P+P showed an ~18% increase compared to the REF group. On day 8, a slightly increase in body weight was observed in the PRE animals compared to REF ones ($p < 0.05$). Finally, POST group had similar weights compared to those of REF (Figure 1). The BMI was not affected due to the diets (Table 1).

Table 1. Growth-associated measurements and relative weight of organs at the end of the study (day 16 of life).

	REF	PRE	POST	P+P
Naso-anal (Body, cm)	9.10 ± 0.16	9.44 ± 0.10	9.38 ± 0.10	9.75 ± 0.07 *# φ
Anus-tail (Tail, cm)	4.78 ± 0.11	4.58 ± 0.07	5.00 ± 0.07 #	4.99 ± 0.07 #
Naso-tail (cm)	13.88 ± 0.24	14.03 ± 0.16	14.38 ± 0.08	14.74 ± 0.13 *# φ
Body/Tail length ratio	1.91 ± 0.03	2.06 ± 0.02 *	1.88 ± 0.04 #	1.96 ± 0.02 #
Body mass index (g/cm^2)	0.32 ± 0.01	0.32 ± 0.00	0.33 ± 0.01 #	0.34 ± 0.00 #
Lee index ($g^{0.33}$/cm, ×1000)	327.35 ± 2.53	321.97 ± 1.00 *	329.16 ± 2.78	327.21 ± 1.42 #
Spleen/BW ratio (%)	0.43 ± 0.03	0.47 ± 0.02	0.47 ± 0.02	0.49 ± 0.02
Thymus/BW ratio (%)	0.45 ± 0.01	0.44 ± 0.01	0.45 ± 0.01	0.45 ± 0.01
Liver/BW ratio (%)	3.40 ± 0.05	3.47 ± 0.06	3.42 ± 0.10	3.54 ± 0.08 *
Large int./BW ratio (%)	0.60 ± 0.01	0.71 ± 0.02 *	0.57 ± 0.02 #	0.68 ± 0.02 * φ
Small int./BW ratio (%)	3.48 ± 0.09	5.32 ± 0.09 *	3.45 ± 0.07 #	5.06 ± 0.15 * φ
Large int. length/BW (cm/g)	24.91 ± 1.48	22.78 ± 0.77	21.63 ± 1.28	20.41 ± 0.54 *#
Small int. length/BW (cm/g)	134.96 ± 6.49	142.73 ± 6.53	127.35 ± 2.86 #	120.41 ± 5.72 #
Stomach/BW ratio (%)	0.76 ± 0.02	0.75 ± 0.02	0.70 ± 0.01 #	0.71 ± 0.01

Relative weight of organs was expressed as percentage (%) with respect to the body weight (BW) and growth-associated measurements are expressed as mean ± SEM (n = 8–12). Statistical significance: * $p < 0.05$ vs. REF, # vs. PRE and φ vs. POST. REF: reference group; PRE: group supplemented with a mixture of scGOS and lcFOS; POST: group supplemented with Lactofidus™; P+P: group supplemented with the combination of both.

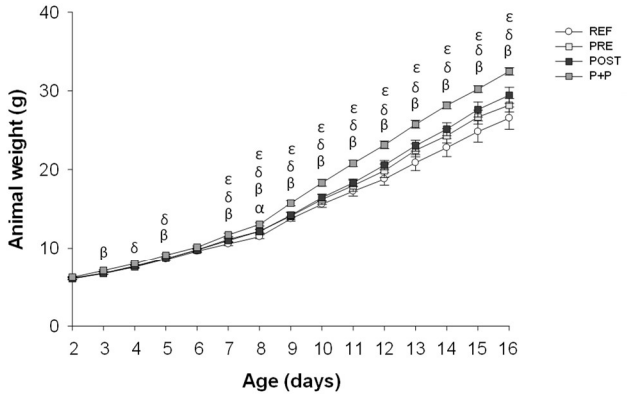


Figure 1. Body weight of pups (g) during the study (from day 2 to day 16 of life). Results are expressed as mean ± SEM (n = 24 animals/group). Statistical differences: α $p < 0.05$ PRE vs. REF, β P+P vs. REF, δ P+P vs. PRE and ϵ P+P vs. POST. REF: reference group; PRE: group supplemented with a mixture of scGOS and lcFOS; POST: group supplemented with Lactofidus™; P+P: group supplemented with the combination of both.

Some differences were observed in the naso-anal, naso-tail, body/tail length ratio and Lee index on day 16 (Table 1. On day 16, prebiotic and postbiotic supplementation increased the naso-anal and the naso-tail measures compared to REF, PRE and POST animals ($p < 0.05$) (Table 1). Moreover, the PRE group showed a higher body/tail length ratio compared to REF, POST and P+P ($p < 0.05$) and a lower Lee index compared to REF group ($p < 0.05$). No differences were observed in the POST group compared to REF animals.

In addition, on day 8, some of these changes were already present. Specifically, POST group showed a ~5% increase in naso-anal length and a ~2% reduction in Lee index compared to REF animals $p < 0.05$). P+P group had also a higher naso-anal length (~3.5%) and body/tail length ratio (~6%) compared to REF group ($p < 0.05$) and the Lee index was also higher (~2.5%) than that in the POST group (321.49 ± 1.72; $p < 0.05$).

With regard to organ weights, as it can be observed in Table 1, on day 16, PRE and P+P groups showed a higher relative weight of the large and small intestine compared to REF and POST animals ($p < 0.05$). In addition, P+P group showed a higher relative weight of the liver and a lower large intestine length/weight ratio compared to REF group ($p < 0.05$). No differences were observed in the POST group compared to REF animals (Table 1).

On day 8, after a few days of supplementation, other changes also appeared. A ~20% increase in spleen relative weight was observed in PRE and P+P groups (compared to REF animals ($p < 0.05$). In addition, PRE group showed a 9–40% lower relative weight increase in liver compared to REF, POST and P+P animals $p < 0.05$), whereas in POST group it was higher compared to REF. All supplemented groups showed an increase in the relative small intestine weight, especially P+P group, which showed the highest value compared to all groups ($p < 0.05$), whereas POST showed the lower value of the supplemented groups ($p < 0.05$). In addition, P+P animals showed a 25% reduction in the length/weight ratio of the large intestine with respect to REF ones ($p < 0.05$).

Only on day 16, the POST group showed higher platelets count compared to REF and PRE animals ($p < 0.05$), whereas PRE group showed a lower hematocrit compared to REF group ($p < 0.05$). P+P group had a reduction in the mean cell volume of erythrocytes compared to REF and POST animals ($p < 0.05$) (Supplementary Table S1). On day 8, the hematological variables in all supplemented groups were similar to REF ones (data not shown).

3.2. Fecal and Stomach Content Variables

Stool samples were collected and scored (scale 1–4) daily during all the studied period. The PRE and P+P supplementations induced changes in fecal consistency increasing the number of soft feces ($p < 0.05$). In contrast, the supplementation with the postbiotic did not affect the stool score (Figure 2a).

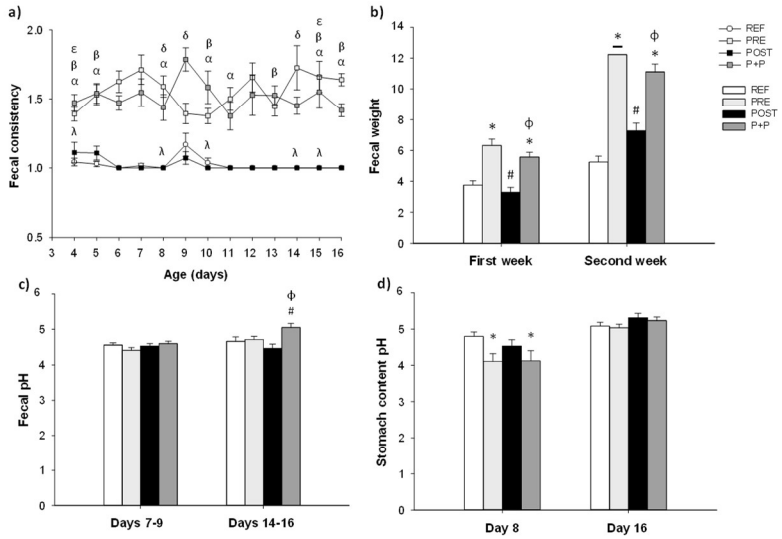


Figure 2. Fecal consistency during the study (from day 4 to day 16 of life) **(a)** and mean fecal weight from day 4 to day 7 (first week) and from day 8 to day 16 (second week) **(b)**, fecal pH (on days 7–9 and 14–16) **(c)**, and stomach content pH (on day 8 and 16) **(d)**. Results are expressed as mean ± SEM (n = 12–24 animals/group). Statistical differences: α $p < 0.05$ PRE vs. REF, β P+P vs. REF, λ POST vs. PRE, δ P+P vs. PRE and ϵ P+P vs. POST **(a)**, * vs. REF, # vs. PRE and ϕ vs. POST **(b–d)**. REF: reference group; PRE: group supplemented with a mixture of scGOS and lcFOS; POST: group supplemented with Lactofidus™; P+P: group supplemented with the combination of both.

As it can be observed in Figure 2b, during the first (from day 4 to day 7) and second (from day 8 to day 16) week of life, PRE and P+P groups had a higher fecal weight compared to REF and POST animals ($p < 0.05$). POST group showed similar fecal weight compared to REF ones, however, a tendency to increase the fecal weight was observed during the second week ($p = 0.05$).

The fecal pH and the stomach content pH were also measured (Figure 2c,d, respectively). P+P showed a higher fecal pH compared to PRE and POST groups at days 14–16 ($p < 0.05$). No differences in the fecal pH were observed between any of the supplemented groups and the REF animals, although a tendency to reduce the fecal pH in the PRE group was observed ($p = 0.09$) on days 7–9 and a tendency to increase the fecal pH in the P+P group was observed on days 14–16 ($p = 0.08$) (Figure 2c). Moreover, on day 8, PRE and P+P groups showed a reduction in the pH of the stomach content compared to REF animals ($p < 0.05$, Figure 2d).

3.3. Immunoglobulins in Plasma

Plasma concentrations of IgG, IgM and IgA isotypes, IgG subclasses, as well as the Th1/Th2 ratio were quantified at the end of the study (day 16, Table 2).

Table 2. Concentration of immunoglobulins in plasma at the end of the study (day 16).

Ig (µg/mL)	REF	PRE	POST	P+P
IgG	3117.81 ± 271.58	2968.14 ± 194.43	2341.86 ± 202.01 *	1985.85 ± 110.81 *#
	(98.64 ± 0.04%)	(98.52 ± 0.03% *)	(98.47 ± 0.06% *)	(98.41 ± 0.05% *)
IgG1	260.53 ± 25.42	208.69 ± 14.56	142.05 ± 15.73 *#	130.10 ± 8.56 *#
	(8.97 ± 1.06%)	(7.02 ± 0.11%)	(6.07 ± 0.42%)	(6.56 ± 0.23%)
IgG2a	551.53 ± 38.91	499.33 ± 28.96	394.47 ± 31.40 *#	363.66 ± 19.07 *#
	(18.01 ± 0.65%)	(17.35 ± 1.27%)	(17.01 ± 0.79%)	(18.49 ± 0.69%)
IgG2b	1193.30 ± 109.62	1255.98 ± 93.37	813.73 ± 78.19 *#	758.59 ± 46.86 *#
	(38.12 ± 0.45%)	(42.11 ± 0.65% *)	(34.61 ± 0.66% *#)	(38.15 ± 0.88% #φ)
IgG2c	1112.44 ± 131.36	1004.12 ± 84.37	991.60 ± 87.20	733.49 ± 52.67 *#φ
	(34.91 ± 1.21%)	(33.52 ± 0.94%)	(42.30 ± 0.35% *#)	(36.79 ± 1.39% φ)
IgM	23.02 ± 1.55	26.86 ± 2.18	23.21 ± 3.14	20.46 ± 1.23 #
	(0.74 ± 0.02%)	(0.89 ± 0.03% *)	(0.96 ± 0.07% *)	(1.02 ± 0.04% *#)
IgA	18.97 ± 1.05	17.68 ± 0.76	13.30 ± 0.81 *#	11.61 ± 0.96 *#
	(0.62 ± 0.02%)	(0.6 ± 0.02%)	(0.57 ± 0.02%)	(0.57 ± 0.02%)
Th1/Th2 ratio [a]	2.81 ± 0.20	3.20 ± 0.22 *	3.34 ± 0.08 *	3.03 ± 0.14

The percentage of 100% of the isotypes corresponds to the sum of IgG + IgM + IgA and the percentage 100% of the subtypes of IgG corresponds to the sum of IgG1 + IgG2a + IgG2b + IgG2c. Results were expressed as mean ± SEM (n = 8–12). Statistical significance: * $p < 0.05$ vs. REF, # vs. PRE and φ vs. POST. [a] Th1/Th2 ratio refers to the relationship between IgG2b + IgG2c: IgG1+IgG2a. REF: reference group; PRE: group supplemented with a mixture of scGOS and lcFOS; POST: group supplemented with Lactofidus™; P+P: group supplemented with the combination of both.

PRE group showed an increase in the percentage of IgM caused by a reduction in that for IgG ($p < 0.05$), although the percentage of IgG2b subclass was higher compared to REF animals ($p < 0.05$). POST group showed a higher percentage of IgM whereas the levels of IgA, IgG and the subclasses IgG1, IgG2a, IgG2b were lower compared to REF group ($p < 0.05$). Moreover, although the percentage of IgG and IgG2b were reduced ($p < 0.05$), the proportion of the IgG2c subclass was higher ($p < 0.05$) in animals from POST group than in REF animals. Finally, in line with the POST group, a higher percentage of IgM and a reduction in IgA, IgG, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG2c levels were observed in the P+P group compared to REF ($p < 0.05$). Overall, the PRE and POST groups showed a higher Th1/Th2 ratio. The Ig profile between supplemented groups was also different. POST and P+P groups displayed lower levels of IgA, IgG1, IgG2a and IgG2b compared to PRE ($p < 0.05$). The percentage of IgG2b was lower in POST group whereas IgG2c was higher compared to PRE animals. On the other hand, P+P showed lower levels of IgG and IgM whereas the percentage of IgM increased compared to PRE group ($p < 0.05$) and the levels of IgG2c decreased compared to PRE and POST groups and the percentage of IgG2b was higher compared to POST ($p < 0.05$). The overall impact of the diets on the Ig pattern, is clearly observed in a PCA representation: the POST and P+P groups were clustered differently to REF, whereas the PRE group was intermediately distributed (Supplementary Figure S1a).

3.4. Gene Expression

The gene expression of molecules involved in the intestinal barrier capacity (mucin [MUC] 2, MUC3, claudin [Cldn] 2, Cldn4 and occludin [Ocldn]), intestinal immunity (IgA, FcRn and Blimp-1), and microbiota-host signaling receptors (TLR 2, 3, 4, 5, 7 and 9) were measured at the end of the supplementation period (on day 16) (Figure 3).

The gene expression of MUC2 was lower in the PRE group compared to REF and POST animals ($p < 0.05$. Figure 3a). As it can be observed in Figure 3b, the levels of MUC3 were higher in P+P group compared to REF and POST group ($p < 0.05$). Although no differences were observed in the expression of Cldn2, Cldn4 and Ocldn, in the P+P group there was a tendency to increase the levels of Cldn 4 (×1.5 times; $p = 0.07$) compared to REF animals (Figure 3c–e).

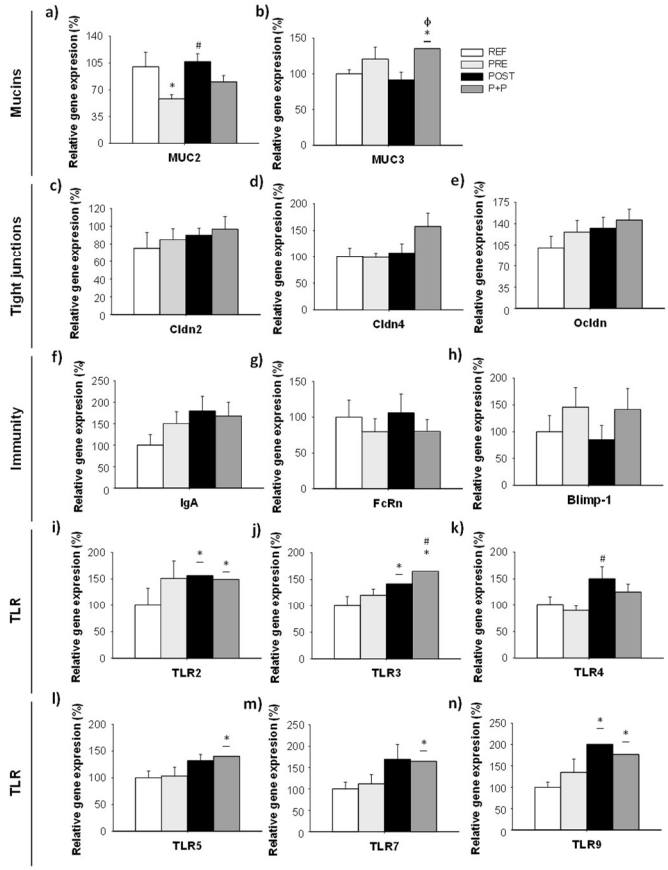


Figure 3. Relative gene expression of mucin (MUC) 2 **(a)** and MUC 3 **(b)**, tight junction proteins claudin (Cldn) 2, Cldn4 **(c**,**d**, respectively) and occludin (Ocldn) **(e)**, immunity related molecules IgA **(f)**, FcRn **(g)** and Blimp-1 **(h)** and Toll-like receptors (TLR) 2 **(i)**, TLR3 **(j)**, TLR4 **(k)**, TLR5 **(l)**, TLR7 **(m)** and TLR9 **(n)** was quantified by real-time PCR on day 16. Relative gene expression was calculated with respect to REF animals, which corresponded to 100% of transcription. Results are expressed as mean ± S.E.M. (n = 8–9 animals/group). Statistical significance: * $p < 0.05$ vs. REF, # vs. PRE and ϕ vs. POST. REF: reference group; PRE: group supplemented with a mixture of scGOS and lcFOS; POST: group supplemented with Lactofidus™; P+P: group supplemented with the combination of both.

With regard to the expression of molecules involved in the immune system maturation and functionality, no differences were observed in the levels of IgA, FcRn and Blimp-1 (Figure 3f–h). However, POST group showed a tendency to increase the expression of IgA compared to REF group (×1.8 times; p = 0.07).

Finally, POST group showed higher levels of TLR2, TLR3 and TLR9 compared to REF animals being 1.5 times higher than REF animals ($p < 0.05$) and higher levels of TLR4 compared to PRE group (×1.7 times; $p < 0.05$). In addition, an increase in the expression of TLR2, TLR3, TLR5, TLR7 and TLR9 (×1.4–1.8 times) was observed in P+P group compared to REF group (Figure 3i–n) and higher levels of TLR3 compared to PRE group (×1.4 times;

$p < 0.05$). No differences were observed in the PRE group, although, a tendency to increase the levels of TLR2 was observed (1.5 times; $p = 0.07$). Thus, it seems that most of the effects of the postbiotic are maintained in the mixture, as it can be observed in the PCA from Supplementary Figure S1b, in which the POST and P+P groups showed a cluster that differed from that of the REF; in contrast, PRE group formed an intermediate cluster.

3.5. Microbiota

The cecal microbiota composition was analyzed on day 16 (Figure 4). The alpha diversity of microbial populations was assessed by richness, Pielou's evenness and Shannon's indexes. The group supplemented with the postbiotic had a higher richness compared to REF, PRE and P+P animals ($p < 0.05$; Figure 4a) and a higher Shannon's index compared to P+P group ($p < 0.05$), whereas the PRE group showed a lower Pielou's evenness (Figure 4b) compared to REF and a reduced Shannon's (Figure 4c) index compared to REF and POST group ($p < 0.05$). The beta diversity calculated by measuring the Unweighted Unifrac distance (Figure 4d) showed that the POST group formed a cluster appart from the other groups.

The proportion of bacteria at the family level was different between groups. The rats supplemented with the prebiotic and with the combination of prebiotic and postbiotic showed a lower relative abundance of Akkermansiaceae and higher levels of Clostridiaceae 1 compared to REF animals ($p < 0.05$) and the levels of Clostridiaceae 1 in P+P group were also higher compared to POST group ($p < 0.05$). In addition, the relative abundance of Peptostreptococcaceae were increased in PRE group compared to REF and POST animals ($p < 0.05$) (Figure 4e). POST group showed lower levels of Enterobacteriaceae compared to PRE and P+P animals ($p < 0.05$). The minority families together constituting the group "others", displayed some differences when analysed separately. Four rats from PRE group showed some levels of Bifidobacteriaceae (0.21 ± 0.11) compared to REF and POST group which did not have detectable values of this family in any animal ($p < 0.05$) confirming the bifidogenic effect of this prebiotic. In addition, the Chitinophagaceae proportion was lower in samples from POST group compared to those from the REF group (0.01 ± 0.01 and 0.11 ± 0.04, respectively; $p < 0.05$).

In order to gain a deeper understanding of the presence or the absence of bacterial groups after the different supplementations, Venn diagrams were created. The Venn diagrams were restrictive, and only when all the animals of the group had a count of that bacterial family, this family was considered to be present in the group. Therefore, Muribaculaceae and Prevotellaceae were only present in the POST group and Clostridiaceae 1 was present only in the P+P group. All the groups supplemented with the prebiotics, postbiotic or both of them, but not the REF group, showed the presence of the Peptostreptococcaceae and Burkholderiaceae families (Figure 4f).

The proportion of the majority genera was not statistically different between groups except for the reduction observed in the Akkermansia genus in the groups PRE and P+P compared to REF animals ($p < 0.05$) (Figure 4g). In the minority genera, no Bifidobacterium, Tyzzerella 3, Turicibacter and Enterobacter were found in REF nor POST, however some animals in the PRE group (four animals in Bifidobacterium, Tyzzerella 3 and Turicibacter and five animals, in Enterobacter) showed these genera (0.22 ± 0.12, 0.85 ± 0.40, 0.08 ± 0.03 and 0.11 ± 0.03, respectively; $p < 0.05$). Romboutsia abundance was higher in PRE and P+P group (3.31 ± 0.43, 3.81 ± 0.69, respectively) compared to REF group (1.58 ± 0.28; $p < 0.05$), whereas in POST group Romboutsia abundance was lower compared to the other groups (0.44 ± 0.05; $p < 0.05$). Vibrionimona proportions were reduced in POST compared to REF group (0.01 ± 0.01 and 0.12 ± 0.05, respectively; $p < 0.05$). In contrast to REF, PRE and P+P groups, Eubacterium nodatum group was found only in four animals from the POST group (0.27 ± 0.09; $p < 0.05$). The relative abundance of Clostridium ASF356 was higher in POST (0.70 ± 0.18) group compared to P+P animals (0.01 ± 0.01; $p < 0.05$). No animal from REF and PRE group showed levels of Clostridium ASF356. POST group had an increase in Faecalibacterium UBA1819 (1.35 ± 0.59) compared to PRE

animals (0.03 ± 0.02; $p < 0.05$). No animal from REF and P+P groups showed levels of Faecalibacterium UBA1819. Anaerotruncus increased its proportion in P+P (8.36 ± 1.01) compared to REF group (2.91 ± 0.94, respectively; $p < 0.05$).

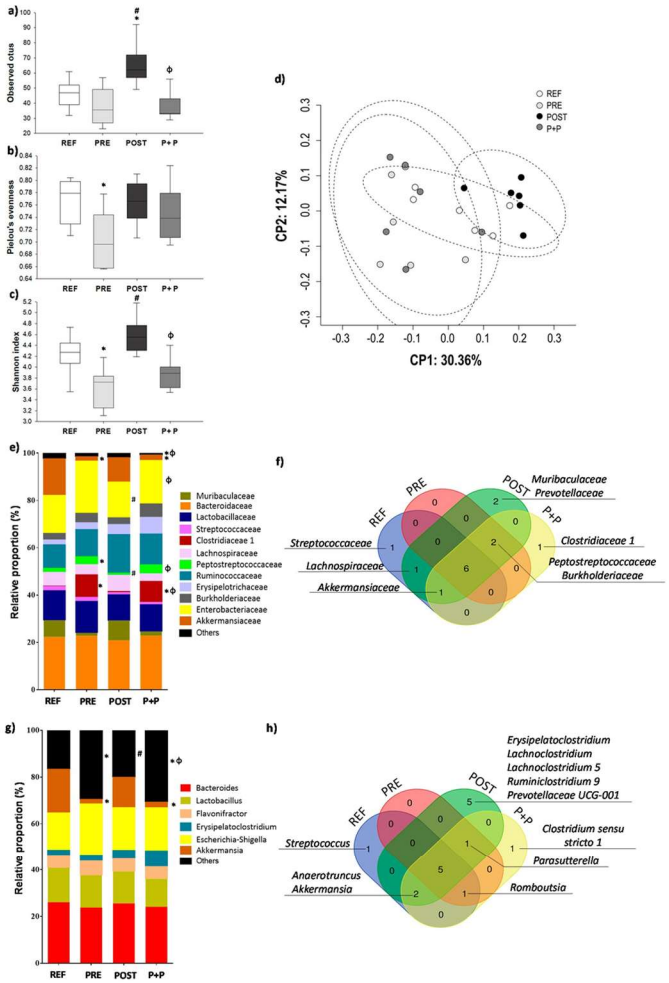


Figure 4. Assessment of cecal microbiota composition. The sequencing of the amplicon targeting the V3-V4 variable region of the 16S rRNA was performed using the Illumina Miseq sequencing 300x2 approach. The alpha diversity is represented by the richness (**a**), Pielou's evenness (**b**) and Shannon's indexes (**c**). The beta diversity was calculated measuring the Unweighted Unifrac distance (**d**). The taxonomic abundances of the main groups corresponding to family (**e**) and genera (**g**) are represented in stacked bars. The qualitative assessment of microbiota is represented in a Venn Diagram at the level of family (**f**) and genera (**h**). Results are derived from n = 6 animals/ group. Statistical significance: * $p < 0.05$ vs. REF, # vs. PRE and ϕ vs. POST. REF: reference group; PRE: group supplemented with a mixture of scGOS and lcFOS; POST: group supplemented with Lactofidus™; P+P: group supplemented with the combination of both.

Regarding the Venn diagram information, POST group had the exclusive presence of the genera Erysipelatoclostridium, Lachnoclostridium, Lachnoclostridium 5, Lachnoclostridium 9 and Prevotellaceae UCG-001. Moreover, P+P group was the only one that showed Clostridium sensu stricto 1. Finally, Parasutterella was observed in the animals supplemented with all the products tested but not in the REF group (Figure 4h).

3.6. Cecal SCFA Production

The amount of total SCFA and acetic, propionic, isobutyric, butyric, isovaleric and valeric acid proportion in the cecum of the suckling rats were measured at the end of the study (Figure 5).

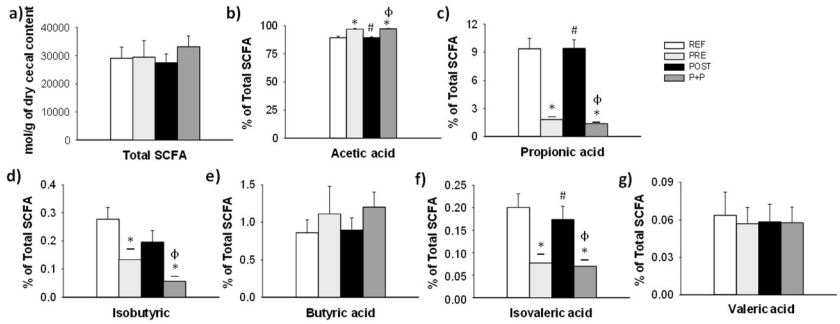


Figure 5. SCFA production in cecal samples of 16-day-old suckling rats. Total SCFA (**a**), acetic (**b**), propionic (**c**), butyric (**d**), isobutyric (**e**), isovaleric (**f**) and valeric (**g**) acid proportion (µmol/g of cecal content). Results are represented as mean ± SEM (n = 8–12 samples/group). Statistical significance: * $p < 0.05$ vs. REF, # vs. PRE and ϕ vs. POST. REF: reference group; PRE: group supplemented with a mixture of scGOS and lcFOS; POST: group supplemented with Lactofidus^{TM}; P+P: group supplemented with the combination of both.

The total SCFA levels in the caecum was similar between groups (Figure 5a). However, the percentage of acetic acid was higher in PRE and P+P groups compared to REF and POST animals ($p < 0.05$) (Figure 5b). On the other hand, the proportion of propionic, isobutyric and isovaleric acids was lower in PRE and P+P groups compared to those in the REF and POST groups ($p < 0.05$). No differences were observed in the percentages of butyric and valeric acids between groups.

The acetic acid levels correlated positively with the relative proportion of Clostridiaceae 1 (r = 0.80, $p < 0.05$) (Clostridium sensu stricto 1 genus) Bifidobacteriaceae (r = 0.43, $p < 0.05$) (Bifidobacterium genus), Peptostreptococcaceae (r = 0.78, $p < 0.05$) and Enterobacteriaceae (r = 0.68, $p < 0.05$) families and negatively with Akkermansiaceae (r = −0.56, $p < 0.05$), Lachnospiraceae (r = −0.57, $p < 0.05$) Family XII (r = −0.49 $p < 0.05$), Muribaculaceae (r = −0.70 $p < 0.05$) and Prevotella (r = −0.69 $p < 0.05$) families. With regard to the propionic acid levels, a positive correlation was observed with the relative proportion of Akkermansiaceae (r = 0.56, $p < 0.05$), Prevotella (r = 0.69, $p < 0.05$), Family XII (r = 0.49, $p < 0.05$), Muribaculaceae (r = 0.62, $p < 0.05$) and Lachnospiraceae (r = 0.55, $p < 0.05$) families, whereas Clostridiaceae 1 (r = −0.80, $p < 0.05$), Enterobacteriaceae (r = −0.70, $p < 0.05$) Bifidobacteriaceae (r = −0.43, $p < 0.05$) and Peptostreptococcaceae (r = -0.72, $p < 0.05$) showed a negative correlation. Butyric acid correlated positively with Eggerthellaceae (r = 0.62, $p < 0.05$). Isobutyric acid correlated positively with the relative abundance of Akkermansiaceae (r = 0.58 $p < 0.05$) and isobutyric and isovaleric acids correlated negatively with Enterobacteriaceae (r = −0.67 and r = −0.55, respectively; $p < 0.05$) and Clostridiaceae 1 family abundance (r = −0.73 and r = −0.70, respectively; $p < 0.05$) whereas Muribaculaceae (r = 0.61 and r = 0.49, respectively; $p < 0.05$) Lachnospiraceae (r = 0.50 and r = 0.64,

respectively; $p < 0.05$) and Prevotella (r = 0.53 and r = 0.49, respectively; $p < 0.05$) were correlated positevely (Supplementary Figure S2).

4. Discussion

There is evidence supporting the beneficial effects of prebiotics, postbiotics and probiotics, modulating the gut microbiota [11,20,35,37]. Formulas with postbiotics and prebiotics have been shown to support normal infant growth and are safe and well-tolerated in healthy infants [45,52,53]. In addition, prebiotics and probiotics have been demonstrated to result in stool consistency and frequency closer to breast-fed infants. Moreover, decreasing stool pH, increasing SCFA and modulating gastrointestinal microbiota towards a breast-fed infant profile [21,54,55]. In this study, we analysed the effects of a postbiotic (Lactofidus™) and its combination with a prebiotic mixture usually used in infant formulas (scGOS/lcFOS) in suckling rats, as a preclinical model for studying the immune system maturation.

In our study, the P+P group, but not the prebiotic or the postbiotic alone, showed a consistent higher growth rate during the suckling period compared to REF animals. In previous studies using this animal model, the administration of the same prebiotic mixture of scGOS/lcFOS alone—without the postbiotic—also showed this lack of effect on body weight [10] or just a slight increase at the end of suckling period [12]. Additionally, Morel F.B et al. did not observe an effect on growth and body weight of pre-weaning rats after GOS-Inulin supplementation [56]. With regard to humans, whereas a supplementation with GOS-FOS in early life showed an increase in the body weight and length of infants [13], other studies did not find these effects [9,45]. Focusing on the impact of the postbiotics used alone in growing infants, no effect has been previously observed [4]. In line with this, the studies evaluating infant weight/growth using a combination of scGOS/lcFOS with Lactofidus™ also demonstrated adequate growth [52] or even an impact on the infant's length [57]. The possible rationale for this growth promoting effect in this preclinical study only when scGOS/lcFOS and the postbiotic are combined may involve a potentiation effect of the postbiotic on the well described capacity of oligosaccharides to increase intestinal calcium absorption [58–60].

It is widely known that scGOS/lcFOS mixture can prevent constipation that can occur in formula-fed infants by inducing a softer stool consistency and making it more similar to that of breastfed infants [9,54,57]. This feature of softer stools is also observed in our study after the PRE administration. In contrast, the postbiotic supplement alone did not affect the stool consistency. However, the combination of both compounds maintained the consistency observed in the PRE group. In this regard, besides the literature reporting this effect by the prebiotic mixture scGOS/lcFOS [9,21,55,61] it has been shown that the infant formula enrichment with Lactofidus™ combined with scGOS/lcFOS also induces softer stool consistency [46,52]. Same effect was confirmed by Huet F. et al., who also observed that infant's fecal consistency after Lactofidus™ supplementation was higher compared to scGOS/lcFOS alone or scGOS/lcFOS combined with different percentages of Lactofidus™ (15% or 50%) [57].

Changes in stool consistency may be accompanied by an increase in fecal water and pH alterations. However, in our study the fecal pH was not significantly affected by any of the interventions compared to that in non-supplemented animals, although the PRE supplementation had a tendency to reduce the fecal pH during the first week. Previous studies in our group with this same prebiotic mixture in suckling rats, although under an infective process, showed some acidification effect [42]. In humans, some studies also observed that scGOS/lcFOS supplementation reduced the fecal pH [9,52,61]. Huet F. et al. reported that the infant formula supplemented with Lactofidus™ induced an increase in the fecal pH [57] whereas Béghin L. et al. observed that fecal pH was lower in infants that received infant formula containing scGOS/lcFOS with or without a postbiotic [52]. Moreover, during the first week in our study, the prebiotic and also its combination with the postbiotic induced a reduction in the stomach content pH. Very few data are available regarding the effect of these compounds in this compartment neither in animals nor humans.

The result reported here could suggest a positive effect on the prevention of pathogen entry into the gastrointestinal tract as it occurs in the case of the lower fecal pH [61,62].

The Ig profile changed in all supplemented groups, higher IgM proportion and lower IgG levels were observed leading to an increase in the Th1/Th2 ratio. During the first weeks of life, the main circulating Ig are maternal IgG which are even in higher levels than the developing infant production of IgG and IgM and finally IgA [63]. Despite the lower levels of IgG, the increase in the proportion of IgM due to the prebiotic, postbiotic and its combination administration in early life could indicate a positive effect on the maturation of the immune system. In addition, after all supplementations an increase in an isotype associated with the Th1 response (rat IgG2b) and a decrease in an isotype associated with the Th2 response (rat IgG1) thus leading to a Th1 promoting effect was also observed, thereby suggesting again an enhancement of the immune system maturation. This effect on Th1 response is also observed at the end of suckling period in a model of rotavirus infection in rats supplemented with the scGOS/lcFOS mixture [12]. In humans, the Th1/Th2 IgG subclasses are different from rats whereas IgG1, IgG2 and IgG3 are associated with a Th1 response, IgG4 is related to a Th2 response. Van Hoffen E. et al. observed that infants at risk for allergy fed with infant hypoallergenic whey formula enriched in scGOS/lcFOS, or in maltodextrin for comparison, had a significant reduction in the Th1 associated IgG subclasses (i.e., IgG1, IgG2 and IgG3 for human) [64]. To our knowledge, this is the first report of a postbiotic intervention indicating changes in the Ig profile similar to that induced by a prebiotic intervention.

Intestinal mucins have a role in the innate defense through the limitation and the neutralization of invasive pathogens [65]. The two most abundant intestinal mucins are the secretory MUC2 and the membrane bound MUC3 [66]. The prebiotic intervention induced a reduction in the levels of MUC2 gene expression, in agreement with a reduction also observed in a gastrointestinal infection model in suckling rats supplemented with this prebiotic mixture [12]. However, both rat and mice supplementation with GOS or FOS later in life, did not allow to observe this effect on MUC2 [67,68]. *Akkermansia* species are mucin degrading intestinal bacteria [69], thus a possible explanation for the reduction in MUC2 in this study after the scGOS/lcFOS intervention could be the reduction in *Akkermansiaceae* family observed in the PRE group. In this regard, in the PRE group could not need to continuously replace the mucus layer because there were less *Akkermansia* using mucus as energy source. Alternatively, the combination of the prebiotics with the postbiotic (P+P group) increased the MUC3 gene expression levels, suggesting a reinforcement in the innate barrier function of the suckling rats. In this regard, although it has been described that rats supplemented with GOS or FOS do not show differences in the expression of MUC3 [67], there is no available literature regarding the influence of a postbiotic alone or in combination.

Tight junction proteins have an important role in the intestinal barrier function regulating the permeability of molecules and acting as a physical barrier [70]. After the different supplementations, no differences were observed in their gene expression which differs compared to other studies evaluating GOS supplementation effect on the jejunum of piglets [71]. In addition, the expression of the genes FcRn, IgA and Blimp, which are related to the immune maturation and regulation, was not modified due to the interventions. However, the intestinal gene expression of the TLRs, which play a role in sensing pathogen-associated molecular patterns and contributing to eliminate pathogens and establishing the adaptative immunity [72], were highly modulated by the postbiotic intervention, and its combination with the prebiotic mixture. Upregulation of TLR2, TLR3 and TLR9 gene expression due to the postbiotic intervention was observed in the combination of the postbiotic and the prebiotic. In addition, only the combination was able to induce the increase in TLR5 and TLR7 expression, indicating that both types of compounds acting together are required to induce such an effect. To our knowledge, there is no literature about the expression of these genes after supplementation of a postbiotic alone or in combination with? in healthy rats or infants. However, this enhancement may suggest that the postbiotic, alone

or in combination, can prepare the intestinal immune system for a better response against infections by strengthening the microorganism-host interaction.

In addition to the impact of these supplements on the immune system of the suckling rats, the microbiota composition and its functionality was evaluated. Although the number of samples per group (N = 6) could have been increased for clearer results, we found that the alpha diversity of microbial populations was able to be measured by three indexes, and whereas the intervention with the postbiotic induced a higher richness or number of observed OTUs, the prebiotic intervention led to lower Pielou's and Shannon's indexes, indicating lower overall biodiversity or lower equity in community proportion distribution. Although a FOS intervention in piglets affected diversity [73], very little is known about the postbiotics, in preclinical models or humans in this regard. Moreover, specific changes in microbial composition due to the interventions were observed in the PRE and the P+P group. The postbiotic alone did not change the microbial composition, however in combination it maintained the changes induced by the prebiotic supplementation in addition to some other slight differences. In this regard, the PRE and P+P groups showed a lower abundance of *Akkermansiaceae* family and *Akkermansia* genus compared to REF animals. *Akkermansia muciniphila* belongs to *Akkermansiaceae* family and this specie has been associated with health and inversely correlated to different diseases such as colitis and Crohn's disease [74] or even Parkinson [75]. The reduction in the abundance of this bacterium could be due to the lower expression of MUC2 in both groups, specially the scGOS/lcFOS group. This reduction could decrease the formation of mucus and therefore the bacterium would have less substrate for growing.

Moreover, some animal studies have demonstrated the promoting effect of FOS on *Akkermansia muciniphila* growth [76], thus the combination with GOS or the postbiotic and the early age could have a role in our differential result. In addition, some studies also showed an inverse correlation of *A. muciniphila* abundance with body weight [77,78], a fact that could be also involved in the growth promoting effect observed in P+P supplemented animals in our study. In addition, our results showed that all the interventions promoted the presence of *Peptostreptococcaceae* family in all the animals supplemented. Moreover, the abundance of this family was increased in the PRE goup with respect to the REF group. Very few data are available for this family and its modulation by diet, but it has been described to be in lower proportion in diabetic people [79] or in a depression induced rat model [80]. In addition, PRE and P+P groups showed higher abundance of *Clostridiaceae 1* family, in the P+P group mainly due to the presence of *Clostridium sensu stricto 1* genus as it was the only group in which all animals presented this genus. In contrast with our results, neonatal porcine supplemented with GOS showed a reduction in the abundance of *Clostridium sensu stricto 1* [81]. However, the higher abundance of these bacteria observed in our study due to the prebiotic supplementation may be involving some positive effect in the intestinal ecosystem because it is in line with lower abundance of this genus in diarrheal neonatal piglets [82]. The prebiotic intervention, but not the postbiotic or the combination confirmed the already described bifidogenic effect, which has also been described in previous studies in rat pups [56] and infants [9,57,61,83]. It should be taken into account that the relative abundances of bifidobacteria in this suckling rat model is much lower compared to the bifidobacterial levels observed in an infant, thus the early life microbiota response to these microbial-modulator products should be interpreted cautiously.

In our study, only the postbiotic group displayed *Prevotellaceae* and *Muribaculaceae* families and the genus *Prevotellaceae UCG-001*, *Erysipelatoclostridium*, *Lachnoclostridium*, *Lachnoclostridium 5* and *Ruminiclostridium 9* in all the animals supplemented. This particular growth promoting effect is of importance in basis of the current literature. On the one hand, the presence of *Prevotellaceae* in the microbiota of the postbiotic supplemented animals is in line with the observation that the supplementation with only FOS in piglets induced a higher relative abundance in *Prevotella* species, among others [73]. The healt promoting effect of this change is based on the fact that *Prevotellaceae UCG 001* is negatively correlated with markers of glucose and lipid metabolism disorders [84], and that patients with chronic

kidney disease had lower *Prevotellaceae UCG-001* than healthy controls [85]. However, a spontaneous diabetes type 2 rat model showed higher levels of *Prevotellaceae UCG-001* compared with healthy Wistar rats [86]. On the other hand, although the higher abundance of *Muribaculaceae* in the POST group, which is described to be inversely associated with body weight [87,88], no effect was found in this regard in the present study. With respect to *Lachnoclostridium*, some species of this genus can protect mice against colitis [89], their abundance is lower in gastrointestinal tract neoplasia [90], even though higher levels of *Lachnoclostridium* were observed in adenoma [91]. Finally, *Ruminiclostridium 9,* also present after the POST intervention, are SCFA-producing microbes [92] associated with body weight regulation, obesity, inflammation and aging [92,93]. Overall, the biological relevance of these changes induced by the postbiotic in this context should be further elucidated.

With regard to microbial functionality, SCFAs are the main products of microbial fermentation in the gut and play an important role in the interaction between diet, gut microbiota and host immune response [22,94]. SCFAs are considered anti-inflammatory mediators [22] with regulatory roles in energy homeostasis, glucose and lipid metabolism, and inulin sensitivity [31,37]. Although, none of the nutritional interventions modified the total amount of SCFAs, some qualitative changes were observed in the animals receiving the prebiotic mixture, alone or in combination with the postbiotic. Particularly, a profile of SCFAs with lower proportion of propionic, isobutyric and isovaleric acid and higher proportion of acetic acid was found. In accordance with our results, Frédéric Huet et al. observed that the presence of scGOS/lcFOS in an infant formula modulated the children microbiota and was associated with a change in SCFA pattern, which contained higher proportion of acetate and a lower proportion of propionate and other SCFAs [57]. Moreover, also in infants, the intestinal acetic acid production was increased in GOS supplemented formula making the profile more similar to that found in breastfed infants [83]. In agreement with our results, L. Beghin et al. also observed that isovaleric acid was reduced in infants fed with a fermented infant formula supplemented with scGOS/lcFOS, although they also observed changes in butyric acid [52] that we did not observe in our study. However, other similar approaches in early life, such as those using GOS in piglets showed an increase in butyric acid, among other changes [71,81].

To further study the changes observed in the relative abundances of gut microbiota and the modification in the pattern of SCFA production, the two variables were correlated. We observed that propionic acid production was correlated positively and negatively with some bacterial families in agreement with the literature [69,95]. The present study also showed some correlations regarding the acetic acid production, as described in other studies [96–98], as well with isovalerate and isobutyrate [99,100]. Overall, these correlations showed that the supplementation with scGOS/lcFOS and their combination with Lactofidus™ changed the relative abundances of gut microbiota and consequently modified the pattern of SCFA production.

5. Conclusions

The nutritional supplementation with the prebiotic (scGOS/lcFOS), the postbiotic (Lactofidus™) and the combination of both, modulated the Ig profile, but the prebiotic mixture and the postbiotic induced differential effects: whereas scGOS/lcFOS induced softer feces and modulated microbiota composition and SCFA profile, Lactofidus™ upregulated TLR gene expression. The use of the combination of scGOS/lcFOS and Lactofidus™ kept both effects observed separately, but also showed a synergistic impact on animal growth. Thus, the combined use of both products seems to be a good strategy to modulate immune and microbial features in early life.

Supplementary Materials: The following are available online at https://www.mdpi.com/article/10.3390/nu13092975/s1.

Author Contributions: C.M.-F., I.A.-B., M.M.-C., S.T., K.K., J.G., J.K., M.J.R.-L., À.F., M.C., F.J.P.-C. were involved in the experiments; C.M.-F., M.J.R.-L. and F.J.P.-C. analyzed and interpreted the results

and drafted the paper; all the authors contributed to the critical revision of the manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study was supported by a grant from Danone Nutricia Research (FBG309956). IAB holds a fellowship from the Spanish Ministry of Education, Culture and Sport (FPU15-02719).

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the Ethical Committee for Animal Experimentation of the University of Barcelona and the Catalonia Government (CEEA/Ref. 255/18 and PAMN/Ref.10176, respectively).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Acknowledgments: The authors thank the Genomic Unit of the CCiTUB and Microomics for their support and assistance in the gene expression and microbiota composition analysis, respectively.

Conflicts of Interest: The authors declare that they have a financial relationship with the organization that sponsored the research. K.K., J.G. and J.K. are employees of Danone Nutricia Research. J. Garssen is head of the Division of Pharmacology, Utrecht Institute for Pharmaceutical Sciences, Faculty of Science at the Utrecht University and partly employed by Danone Nutricia Research. The other authors declare that they have no conflicts of interest.

References

1. Ballard, O.; Morrow, A.L. Human milk composition: Nutrients and bioactive factors. *Pediatr. Clin. N. Am.* **2013**, *60*, 49–74. [CrossRef]
2. Salminen, S.; Stahl, B.; Vinderola, G.; Szajewska, H. Infant formula supplemented with biotics: Current knowledge and future perspectives. *Nutrients* **2020**, *12*, 1952. [CrossRef] [PubMed]
3. Martin, C.R.; Ling, P.-R.; Blackburn, G.L. Review of infant feeding: Key features of breast milk and infant formula. *Nutrients* **2016**, *8*, 279. [CrossRef] [PubMed]
4. Szajewska, H.; Skórka, A.; Pies´cik-Lech, M. Fermented infant formulas without live bacteria: A systematic review. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2015**, *174*, 1413–1420. [CrossRef]
5. Suárez, J.E. Microbiota autóctona, probióticos y prebióticos. *Nutr. Hosp.* **2015**, *31*, 3–9. [CrossRef]
6. Gibson, G.R.; Hutkins, R.; Sanders, M.E.; Prescott, S.L.; Reimer, R.A.; Salminen, S.J.; Scott, K.; Stanton, C.; Swanson, K.S.; Cani, P.D.; et al. Expert consensus document: The international scientific association for probiotics and prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2017**, *14*, 491–502. [CrossRef] [PubMed]
7. Marques, T.M.; Wall, R.; Ross, R.; Fitzgerald, G.F.; Ryan, C.A.; Stanton, C. Programming infant gut microbiota: Influence of dietary and environmental factors. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2010**, *21*, 149–156. [CrossRef] [PubMed]
8. Veereman-Wauters, G.; Staelens, S.; Van de Broek, H.; Plaskie, K.; Wesling, F.; Roger, L.; McCartney, A.; Assam, P. Physiological and bifidogenic effects of prebiotic supplements in infant formulae. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **2011**, *52*, 763–771. [CrossRef]
9. Moro, G.; Minoli, I.; Mosca, M.; Fanaro, S.; Jelinek, J.; Stahl, B.; Boehm, G. Dosage-related bifidogenic effects of galacto- and fructooligosaccharides in formula-fed term infants. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **2002**, *34*, 291–295. [CrossRef]
10. Rigo-Adrover, M.; Saldaña-Ruíz, S.; Van Limpt, K.; Knipping, K.; Garssen, J.; Knol, J.; Franch, A.; Castell, M.; Pérez-Cano, F.J. A combination of scGOS/lcFOS with bifidobacterium breve M-16V protects suckling rats from rotavirus gastroenteritis. *Eur. J. Nutr.* **2016**, *56*, 1657–1670. [CrossRef]
11. Arslanoglu, S.; Moro, G.E.; Schmitt, J.; Tandoi, L.; Rizzardi, S.; Boehm, G. Early dietary intervention with a mixture of prebiotic oligosaccharides reduces the incidence of allergic manifestations and infections during the first two years of life. *J. Nutr.* **2008**, *138*, 1091–1095. [CrossRef]
12. Azagra-Boronat, I.; Massot-Cladera, M.; Knipping, K.; Land, B.V.; Stahl, B.; Garssen, J.; Rodríguez-Lagunas, M.J.; Franch, À.; Castell, M.; Pérez-Cano, F.J. Supplementation with $2^{\text{ξ}}$-FL and scGOS/lcFOS ameliorates rotavirus-induced diarrhea in suckling rats. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2018**, *8*, 372. [CrossRef]
13. Bruzzese, E.; Volpicelli, M.; Squeglia, V.; Bruzzese, D.; Salvini, F.; Bisceglia, M.; Lionetti, P.; Cinquetti, M.; Iacono, G.; Amarri, S.; et al. A formula containing galacto- and fructo-oligosaccharides prevents intestinal and extra-intestinal infections: An observational study. *Clin. Nutr.* **2009**, *28*, 156–161. [CrossRef]
14. Grathwohl, D. Early supplementation of prebiotic oligosaccharides protects formula-fed infants against infections during the first six months of life. *J. Nutr.* **2008**, *138*, 1520. [CrossRef]
15. Rigo-Adrover, M.; Perez-Berezo, T.; Ramos-Romero, S.; van Limpt, K.; Knipping, K.; Garssen, J.; Knol, J.; Franch, À.; Castell, M.; Pérez-Cano, F.J. A fermented milk concentrate and a combination of short-chain galacto-oligosaccharides/long-chain fructo-oligosaccharides/pectin-derived acidic oligosaccharides protect suckling rats from rotavirus gastroenteritis. *Br. J. Nutr.* **2017**, *117*, 209–217. [CrossRef] [PubMed]
16. Osborn, D.A.; Shin, J.K.H. Prebiotics in infants for prevention of allergic disease and food allergy. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2013**. [CrossRef]

17. Fernández, L.; Langa, S.; Martin, V.; Maldonado, A.; Jiménez, E.; Martín, R.; Rodríguez, J.M. The human milk microbiota: Origin and potential roles in health and disease. *Pharmacol. Res.* **2013**, *69*, 1–10. [CrossRef]
18. Pineiro, M.; Stanton, C. Probiotic bacteria: Legislative framework—Requirements to evidence basis. *J. Nutr.* **2007**, *137*, 850S–853S. [CrossRef] [PubMed]
19. FAO; WHO. *Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food*; WHO: Geneva, Switzerland, 2002; pp. 1–11.
20. Soccol, C.R.; Vandenberghe, L.P.D.S.; Spier, M.R.; Medeiros, A.B.P.; Yamaguishi, C.T.; De Dea Lindner, J.; Pandey, A.; Thomaz-Soccol, V. The Potential of probiotics: A review. *Food Technol. Biotechnol.* **2010**, *48*, 413–434.
21. Wegh, C.A.M.; Geerlings, S.Y.; Knol, J.; Roeselers, G.; Belzer, C. Postbiotics and their potential applications in early life nutrition and beyond. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 4673. [CrossRef] [PubMed]
22. Vieira, A.T.; Fukumori, C.; Ferreira, C.M. New insights into therapeutic strategies for gut microbiota modulation in inflammatory diseases. *Clin. Transl. Immunol.* **2016**, *5*, e87. [CrossRef] [PubMed]
23. Walsh, C.; Guinane, C.; O'Toole, P.; Cotter, P.D. Beneficial modulation of the gut microbiota. *FEBS Lett.* **2014**, *588*, 4120–4130. [CrossRef] [PubMed]
24. Xiang, Q.; Wu, X.; Pan, Y.; Wang, L.; Cui, C.; Guo, Y.; Zhu, L.; Peng, J.; Wei, H. Early-life intervention using fecal microbiota combined with probiotics promotes gut microbiota maturation, regulates immune system development, and alleviates weaning stress in piglets. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 503. [CrossRef] [PubMed]
25. Broom, L.J.; Kogut, M.H. The role of the gut microbiome in shaping the immune system of chickens. *Veter- Immunol. Immunopathol.* **2018**, *204*, 44–51. [CrossRef] [PubMed]
26. Salminen, S.; Collado, M.C.; Endo, A.; Hill, C.; Lebeer, S.; Quigley, E.M.M.; Sanders, M.E.; Shamir, R.; Swann, J.R.; Szajewska, H.; et al. The international scientific association of probiotics and prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of postbiotics. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2021**, 1–19. [CrossRef]
27. Malagón-Rojas, J.N.; Mantziari, A.; Salminen, S.; Szajewska, H. Postbiotics for preventing and treating common infectious diseases in children: A systematic review. *Nutrients* **2020**, *12*, 389. [CrossRef]
28. Chuah, L.-O.; Foo, H.L.; Loh, T.C.; Alitheen, N.B.M.; Yeap, S.K.; Mutalib, N.E.A.; Rahim, R.A.; Yusoff, K. Postbiotic metabolites produced by *Lactobacillus plantarum* strains exert selective cytotoxicity effects on cancer cells. *BMC Complement. Altern. Med.* **2019**, *19*, 1–12. [CrossRef]
29. Kareem, K.Y.; Loh, T.C.; Foo, H.L.; Asmara, S.A.; Akit, H. Influence of postbiotic RG14 and inulin combination on cecal microbiota, organic acid concentration, and cytokine expression in broiler chickens. *Poult. Sci.* **2017**, *96*, 966–975. [CrossRef] [PubMed]
30. De Almada, C.N.; Almada, C.N.; Martinez, R.C.R.; Sant'Ana, A.S. Paraprobiotics: Evidences on their ability to modify biological responses, inactivation methods and perspectives on their application in foods. *Trends Food Sci. Technol.* **2016**, *58*, 96–114. [CrossRef]
31. Aguilar-Toalá, J.E.; Varela, R.G.; Garcia, H.; Mata-Haro, V.; González-Córdova, A.; Vallejo-Cordoba, B.; Hernández-Mendoza, A. Postbiotics: An evolving term within the functional foods field. *Trends Food Sci. Technol.* **2018**, *75*, 105–114. [CrossRef]
32. Compare, D.; Rocco, A.; Coccoli, P.; Angrisani, D.; Sgamato, C.; Iovine, B.; Salvatore, U.; Nardone, G. Lactobacillus casei DG and its postbiotic reduce the inflammatory mucosal response: An ex-vivo organ culture model of post-infectious irritable bowel syndrome. *BMC Gastroenterol.* **2017**, *17*, 53. [CrossRef] [PubMed]
33. Simeoli, R.; Raso, G.M.; Pirozzi, C.; Lama, A.; Santoro, A.; Russo, R.; Montero-Melendez, T.; Canani, R.B.; Calignano, A.; Perretti, M.; et al. An orally administered butyrate-releasing derivative reduces neutrophil recruitment and inflammation in dextran sulphate sodium-induced murine colitis. *Br. J. Pharmacol.* **2017**, *174*, 1484–1496. [CrossRef] [PubMed]
34. Popovic´, N.; Djokic´, J.; Brdaric, E.; Dinic, M.; Terzic´-Vidojevic´, A.; Golic´, N.; Veljovic´, K. The influence of heat-killed enterococcus faecium BGPAS1-3 on the tight junction protein expression and immune function in differentiated caco-2 cells infected with listeria monocytogenes ATCC 19111. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 412. [CrossRef]
35. Gao, J.; Li, Y.; Wan, Y.; Hu, T.; Liu, L.; Yang, S.; Gong, Z.; Zeng, Q.; Wei, Y.; Yang, W.; et al. A novel postbiotic from lactobacillus rhamnosus gg with a beneficial effect on intestinal barrier function. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 477. [CrossRef]
36. Dunand, E.; Burns, P.; Binetti, A.; Bergamini, C.V.; Peralta, G.H.; Forzani, L.; Reinheimer, J.; Vinderola, G. Postbiotics produced at laboratory and industrial level as potential functional food ingredients with the capacity to protect mice against salmonella infection. *J. Appl. Microbiol.* **2019**, *127*, 219–229. [CrossRef]
37. Brial, F.; Le Lay, A.; Dumas, M.-E.; Gauguier, D. Implication of gut microbiota metabolites in cardiovascular and metabolic diseases. *Cell. Mol. Life Sci.* **2018**, *75*, 3977–3990. [CrossRef] [PubMed]
38. Maguire, M.; Maguire, G. Gut dysbiosis, leaky gut, and intestinal epithelial proliferation in neurological disorders: Towards the development of a new therapeutic using amino acids, prebiotics, probiotics, and postbiotics. *Rev. Neurosci.* **2018**, *30*, 179–201. [CrossRef]
39. Reeves, P.G.; Nielsen, F.H.; Fahey, G.C., Jr. AIN-93 Purified diets for laboratory rodents: Final report of the american institute of nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J. Nutr.* **1993**, *123*, 1939–1951. [CrossRef]
40. Azagra-Boronat, I.; Massot-Cladera, M.; Mayneris-Perxachs, J.; Knipping, K.; Land, B.V.; Tims, S.; Stahl, B.; Garssen, J.; Franch, À.; Castell, M.; et al. Immunomodulatory and prebiotic effects of 2^F-fucosyllactose in suckling rats. *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 1773. [CrossRef]

41. Rigo-Adrover, M.D.M.; Knipping, K.; Garssen, J.; Van Limpt, K.; Knol, J.; Franch, À.; Castell, M.; Rodríguez-Lagunas, M.J.; Pérez-Cano, F.J. Prevention of rotavirus diarrhea in suckling rats by a specific fermented milk concentrate with prebiotic mixture. *Nutrients* **2019**, *11*, 189. [CrossRef]
42. Rigo-Adrover, M.D.M.; Van Limpt, K.; Knipping, K.; Garssen, J.; Knol, J.; Costabile, A.; Franch, À.; Castell, M.; Pérez-Cano, F.J. Preventive effect of a synbiotic combination of galacto- and fructooligosaccharides mixture with bifidobacterium breve M-16V in a model of multiple rotavirus infections. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 1318. [CrossRef]
43. Ayechu-Muruzabal, V.; Xiao, L.; Wehkamp, T.; van Ark, I.; Hoogendoorn, E.; Leusink-Muis, T.; Folkerts, G.; Garssen, J.; Willemsen, L.; Land, B.V. A fermented milk matrix containing postbiotics supports Th1- and Th17-type immunity In Vitro and modulates the influenza-specific vaccination response In Vivo in association with altered serum galectin ratios. *Vaccines* **2021**, *9*, 254. [CrossRef] [PubMed]
44. Abrahamse, E.; Huybers, S.; Alles, M.S.; Renes, I.B.; Knol, J.; Bouritius, H.; Ludwig, T. Fermented infant formula increases ileal protein digestibility and reduces ileal proteolytic activity compared with standard and hydrolyzed infant formulas in piglets. *J. Nutr.* **2015**, *145*, 1423–1428. [CrossRef]
45. Vandenplas, Y.; De Halleux, V.; Arciszewska, M.; Lach, P.; Pokhylko, V.; Klymenko, V.; Schoen, S.; Abrahamse-Berkeveld, M.A.; Mulder, K.; Rubio, R.P.; et al. A partly fermented infant formula with postbiotics including 3^{t}-GL, specific oligosaccharides, 2^{t}-FL, and milk fat supports adequate growth, is safe and well-tolerated in healthy term infants: A double-blind, randomised, controlled, multi-country trial. *Nutrients* **2020**, *12*, 3560. [CrossRef]
46. Rodriguez-Herrera, A.; Mulder, K.; Bouritius, H.; Rubio, R.; Muñoz, A.; Agosti, M.; Lista, G.; Corvaglia, L.; Ludwig, T.; Abrahamse-Berkeveld, M.; et al. Gastrointestinal tolerance, growth and safety of a partly fermented formula with specific prebiotics in healthy infants: A double-blind, randomized, controlled trial. *Nutrients* **2019**, *11*, 1530. [CrossRef]
47. Azagra-Boronat, I.; Massot-Cladera, M.; Knipping, K.; Land, B.V.; Tims, S.; Stahl, B.; Knol, J.; Garssen, J.; Franch, À.; Castell, M. Oligosaccharides modulate rotavirus-associated dysbiosis and TLR gene expression in neonatal rats. *Cells* **2019**, *8*, 876. [CrossRef] [PubMed]
48. Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative pcr and the $2^{-\Delta\Delta C}{}_{T}$ method. *Methods* **2001**, *25*, 402–408. [CrossRef] [PubMed]
49. Wang, Q.; Garrity, G.M.; Tiedje, J.M.; Cole, J.R. Naive bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl. Environ. Microbiol.* **2007**, *73*, 5261–5267. [CrossRef] [PubMed]
50. Anderson, M.J.; Walsh, D.C.I. Permanova, anosim, and the mantel test in the face of heterogeneous dispersions: What null hypothesis are you testing? *Ecol. Monogr.* **2013**, *83*, 557–574. [CrossRef]
51. Mandal, S.; Van Treuren, W.; White, R.A.; Eggesbø, M.A.; Knight, R.T.; Peddada, S.D. Analysis of composition of microbiomes: A novel method for studying microbial composition. *Microb. Ecol. Health Dis.* **2015**, *26*, 27663. [CrossRef] [PubMed]
52. Béghin, L.; Tims, S.; Roelofs, M.; Rougé, C.; Oozeer, R.; Rakza, T.; Chirico, G.; Roeselers, G.; Knol, J.; Rozé, J.C.; et al. Fermented infant formula (with *Bifidobacterium breve* C50 and *Streptococcus thermophilus* O65) with prebiotic oligosaccharides is safe and modulates the gut microbiota towards a microbiota closer to that of breastfed infants. *Clin. Nutr.* **2021**, *40*, 778–787. [CrossRef]
53. Toca, M.D.C.; Burgos, F.; Fernández, A.; Giglio, N.; Orsi, M.; Sosa, P.; Tabacco, O.; Ursino, F.; Ussher, F.; Vinderola, G. Gut ecosystem during infancy: The role of "biotics". *Arch. Argent. Pediatr.* **2020**, *118*, 278–285. [CrossRef]
54. Vandenplas, Y.; De Greef, E.; Veereman, G. Prebiotics in infant formula. *Gut Microbes* **2015**, *5*, 681–687. [CrossRef]
55. Vandenplas, Y.; Zakharova, I.; Dmitrieva, Y. Oligosaccharides in infant formula: More evidence to validate the role of prebiotics. *Br. J. Nutr.* **2015**, *113*, 1339–1344. [CrossRef]
56. Morel, F.B.; Oozeer, R.; Piloquet, H.; Moyon, T.; Pagniez, A.; Knol, J.; Darmaun, D.; Michel, C. Preweaning modulation of intestinal microbiota by oligosaccharides or amoxicillin can contribute to programming of adult microbiota in rats. *Nutrients* **2015**, *31*, 515–522. [CrossRef] [PubMed]
57. Huet, F.; Abrahamse-Berkeveld, M.; Tims, S.; Simeoni, U.; Beley, G.; Savagner, C.; Vandenplas, Y.; Hourihane, J.O. Partly Fermented infant formulae with specific oligosaccharides support adequate infant growth and are well-tolerated. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **2016**, *63*, e43–e53. [CrossRef] [PubMed]
58. Bryk, G.; Coronel, M.Z.; Lugones, C.; Mandalunis, P.; Rio, M.E.; Gualtieri, A.F.; De Portela, M.L.P.M.; Zeni, S.N. Effect of a mixture of GOS/FOS® on calcium absorption and retention during recovery from protein malnutrition: Experimental model in growing rats. *Eur. J. Nutr.* **2015**, *55*, 2445–2458. [CrossRef]
59. Bryk, G.; Coronel, M.Z.; Pellegrini, G.G.; Mandalunis, P.; Rio, M.E.; De Portela, M.L.P.M.; Zeni, S.N. Effect of a combination GOS/FOS®prebiotic mixture and interaction with calcium intake on mineral absorption and bone parameters in growing rats. *Eur. J. Nutr.* **2015**, *54*, 913–923. [CrossRef]
60. Abrams, S.A.; Griffin, I.J.; Hawthorne, K.M.; Liang, L.; Gunn, S.K.; Darlington, G.; Ellis, K.J. A combination of prebiotic short- and long-chain inulin-type fructans enhances calcium absorption and bone mineralization in young adolescents. *Am. J. Clin. Nutr.* **2005**, *82*, 471–476. [CrossRef] [PubMed]
61. Rao, S.; Srinivasjois, R.; Patole, S. Prebiotic supplementation in full-term neonates. *Arch. Pediatr. Adolesc. Med.* **2009**, *163*, 755–764. [CrossRef]
62. Beasley, D.; Koltz, A.M.; Lambert, J.E.; Fierer, N.; Dunn, R. The evolution of stomach acidity and its relevance to the human microbiome. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0134116. [CrossRef] [PubMed]

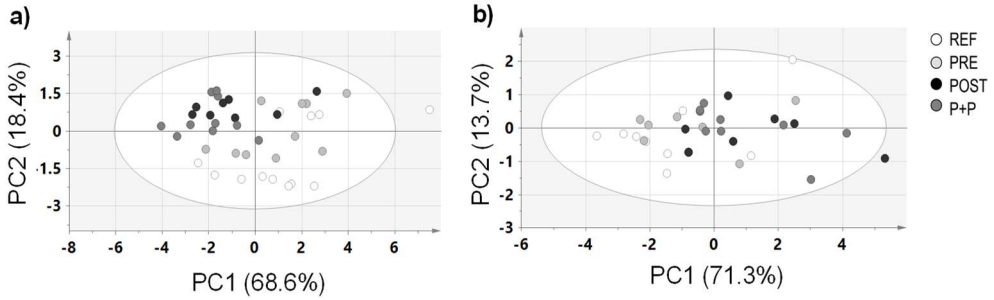
63. Penagos Paniagua, M.J.; Pérez, R.D.B.; Cruz, M.D.L.L.G.; Benítez, J.M.Z. El Sistema inmune del recién nacido. alergia, asma e inmunol. *Pediátricas* **2003**, *12*, 18–23.
64. Van Hoffen, E.; Ruiter, B.; Faber, J.; M'Rabet, L.; Knol, E.; Stahl, B.; Arslanoglu, S.; Moro, G.; Boehm, G.; Garssen, J. A specific mixture of short-chain galacto-oligosaccharides and long-chain fructo-oligosaccharides induces a beneficial immunoglobulin profile in infants at high risk for allergy. *Allergy* **2009**, *64*, 484–487. [CrossRef]
65. Kim, J.J.; Khan, W.I. Goblet cells and mucins: Role in innate defense in enteric infections. *Pathogens* **2013**, *2*, 55–70. [CrossRef] [PubMed]
66. Dharmani, P.; Srivastava, V.; Kissoon-Singh, V.; Chadee, K. Role of intestinal mucins in innate host defense mechanisms against pathogens. *J. Innate Immun.* **2008**, *1*, 123–135. [CrossRef] [PubMed]
67. Okazaki, Y.; Katayama, T. Consumption of non-digestible oligosaccharides elevates colonic alkaline phosphatase activity by up-regulating the expression of IAP-I, with increased mucins and microbial fermentation in rats fed a high-fat diet. *Br. J. Nutr.* **2019**, *121*, 146–154. [CrossRef]
68. Leforestier, G.; Blais, A.; Blachier, F.; Marsset-Baglieri, A.; Davila, A.-M.; Perrin, E.; Tomé, D. Effects of galacto-oligosaccharide ingestion on the mucosa-associated mucins and sucrase activity in the small intestine of mice. *Eur. J. Nutr.* **2009**, *48*, 457–464. [CrossRef]
69. Van Herreweghen, F.; De Paepe, K.; Roume, H.; Kerckhof, F.-M.; Van De Wiele, T. Mucin degradation niche as a driver of microbiome composition and *Akkermansia muciniphila* abundance in a dynamic gut model is donor independent. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2018**, *94*, 1–13. [CrossRef]
70. Suzuki, T. Regulation of the intestinal barrier by nutrients: The role of tight junctions. *Anim. Sci. J.* **2020**, *91*, e13357. [CrossRef] [PubMed]
71. Alizadeh, A.; Akbari, P.; DiFilippo, E.; Schols, H.A.; Ulfman, L.H.; Schoterman, M.H.C.; Garssen, J.; Fink-Gremmels, J.; Braber, S. The piglet as a model for studying dietary components in infant diets: Effects of galacto-oligosaccharides on intestinal functions. *Br. J. Nutr.* **2016**, *115*, 605–618. [CrossRef]
72. Kaisho, T.; Akira, S. Toll-like receptor function and signaling. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2006**, *117*, 979–987. [CrossRef]
73. Schokker, D.; Fledderus, J.; Jansen, R.; Vastenhouw, S.A.; De Bree, F.M.; Smits, M.A.; Jansman, A.A.J.M. Supplementation of fructooligosaccharides to suckling piglets affects intestinal microbiota colonization and immune development. *J. Anim. Sci.* **2018**, *96*, 2139–2153. [CrossRef] [PubMed]
74. Geerlings, S.Y.; Kostopoulos, I.; De Vos, W.M.; Belzer, C. *Akkermansia muciniphila* in the human gastrointestinal tract: When, where, and how? *Microorganisms* **2018**, *6*, 75. [CrossRef]
75. Nishiwaki, H.; Ito, M.; Ms, T.I.; Hamaguchi, T.; Maeda, T.; Kashihara, K.; Tsuboi, Y.; Ueyama, J.; Shimamura, T.; Mori, H.; et al. Meta-analysis of gut dysbiosis in parkinson's disease. *Mov. Disord.* **2020**, *35*, 1626–1635. [CrossRef]
76. Zhou, K. Strategies to promote abundance of *Akkermansia muciniphila*, an emerging probiotics in the gut, evidence from dietary intervention studies. *J. Funct. Foods* **2017**, *33*, 194–201. [CrossRef]
77. Shin, N.R.; Lee, J.C.; Lee, H.Y.; Kim, M.S.; Whon, T.W.; Lee, M.S.; Bae, J.W. An increase in the *Akkermansia spp.* population induced by metformin treatment improves glucose homeostasis in diet-induced obese mice. *Gut* **2014**, *63*, 727–735. [CrossRef]
78. Everard, A.; Belzer, C.; Geurts, L.; Ouwerkerk, J.P.; Druart, C.; Bindels, L.B.; Guiot, Y.; Derrien, M.; Muccioli, G.G.; Delzenne, N.M.; et al. Cross-talk between Akkermansia muciniphila and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, 9066–9071. [CrossRef]
79. Doumatey, A.P.; Adeyemo, A.; Zhou, J.; Lei, L.; Adebamowo, S.N.; Adebamowo, C.; Rotimi, C.N. Gut microbiome profiles are associated with type 2 diabetes in urban Africans. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2020**, *10*, 63. [CrossRef]
80. Yu, M.; Jia, H.; Zhou, C.; Yang, Y.; Zhao, Y.; Yang, M.; Zou, Z. Variations in gut microbiota and fecal metabolic phenotype associated with depression by 16S rRNA gene sequencing and LC/MS-based metabolomics. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2017**, *138*, 231–239. [CrossRef] [PubMed]
81. Tian, S.; Wang, J.; Yu, H.; Wang, J.; Zhu, W. Changes in ileal microbial composition and microbial metabolism by an early-life galacto-oligosaccharides intervention in a neonatal porcine model. *Nutrients* **2019**, *11*, 1753. [CrossRef] [PubMed]
82. Han, C.; Dai, Y.; Liu, B.; Wang, L.; Wang, J.; Zhang, J. Diversity analysis of intestinal microflora between healthy and diarrheal neonatal piglets from the same litter in different regions. *Anaerobe* **2019**, *55*, 136–141. [CrossRef] [PubMed]
83. Ben, X.-M.; Li, J.; Feng, Z.-T.; Shi, S.-Y.; Lu, Y.-D.; Chen, R.; Zhou, X.-Y. Low level of galacto-oligosaccharide in infant formula stimulates growth of intestinal *Bifidobacteria* and *Lactobacilli*. *World J. Gastroenterol.* **2008**, *14*, 6564–6568. [CrossRef] [PubMed]
84. Song, X.; Zhong, L.; Lyu, N.; Liu, F.; Li, B.; Hao, Y.; Xue, Y.; Li, J.; Feng, Y.; Ma, Y.; et al. Inulin can alleviate metabolism disorders in ob/ob mice by partially restoring leptin-related pathways mediated by gut microbiota. *Genom. Proteom. Bioinform.* **2019**, *17*, 64–75. [CrossRef] [PubMed]
85. Hu, X.; Ouyang, S.; Xie, Y.; Gong, Z.; Du, J. Characterizing the gut microbiota in patients with chronic kidney disease. *Postgrad. Med.* **2020**, *132*, 495–505. [CrossRef] [PubMed]
86. Kang, X.; Zhan, L.-B.; Lu, X.-G.; Song, J.-B.; Zhong, Y.; Wang, Y.; Yang, Y.-L.; Fan, Z.-W.; Jiang, X.Z.; Sun, R. Characteristics of gastric microbiota in gk rats with spontaneous diabetes: A comparative study. *Diabetes Metab. Syndr. Obes. Targets Ther.* **2020**, *13*, 1435–1447. [CrossRef]
87. Cao, W.; Chin, Y.; Chen, X.; Mi, Y.; Xue, C.; Wang, Y.; Tang, Q. The role of gut microbiota in the resistance to obesity in mice fed a high fat diet. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **2019**, *71*, 453–463. [CrossRef] [PubMed]

88. Hua, Y.; Fan, R.; Zhao, L.; Tong, C.; Qian, X.; Zhang, M.; Xiao, R.; Ma, W. Trans-fatty acids alter the gut microbiota in high-fat-diet-induced obese rats. *Br. J. Nutr.* **2020**, *124*, 1251–1263. [CrossRef] [PubMed]
89. Haange, S.-B.; Jehmlich, N.; Hoffmann, M.; Weber, K.; Lehmann, J.; Von Bergen, M.; Slanina, U. Disease development is accompanied by changes in bacterial protein abundance and functions in a refined model of dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis. *J. Proteome Res.* **2019**, *18*, 1774–1786. [CrossRef]
90. Youssef, O.; Lahti, L.; Kokkola, A.; Karla, T.; Tikkanen, M.; Ehsan, H.; Carpelan-Holmström, M.; Koskensalo, S.; Böhling, T.; Rautelin, H.; et al. Stool microbiota composition differs in patients with stomach, colon, and rectal neoplasms. *Dig. Dis. Sci.* **2018**, *63*, 2950–2958. [CrossRef]
91. Liang, J.Q.; Li, T.; Nakatsu, G.; Chen, Y.-X.; Yau, T.O.; Chu, E.; Wong, S.; Szeto, C.H.; Ng, S.C.; Chan, F.K.L.; et al. A novel faecal Lachnoclostridium marker for the non-invasive diagnosis of colorectal adenoma and cancer. *Gut* **2020**, *69*, 1248–1257. [CrossRef]
92. Li, N.; Huang, S.; Jiang, L.; Dai, Z.; Li, T.; Han, D.; Wang, J. Characterization of the early life microbiota development and predominant *Lactobacillus Species* at distinct gut segments of low- and normal-birth-weight piglets. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 797. [CrossRef]
93. Zhang, Y.; Chen, L.; Hu, M.; Kim, J.J.; Lin, R.; Xu, J.; Fan, L.; Qi, Y.; Wang, L.; Liu, W.; et al. Dietary type 2 resistant starch improves systemic inflammation and intestinal permeability by modulating microbiota and metabolites in aged mice on high-fat diet. *Aging* **2020**, *12*, 9173–9187. [CrossRef]
94. Ju, T.; Kong, J.Y.; Stothard, P.; Willing, B.P. Defining the role of Parasutterella, a previously uncharacterized member of the core gut microbiota. *ISME J.* **2019**, *13*, 1520–1534. [CrossRef]
95. Louis, P.; Flint, H.J. Formation of propionate and butyrate by the human colonic microbiota. *Environ. Microbiol.* **2017**, *19*, 29–41. [CrossRef] [PubMed]
96. Liu, L.; He, Y.; Wang, K.; Miao, J.L.; Zheng, Z. Metagenomics approach to the intestinal microbiome structure and function in high fat diet-induced obesity in mice fed with conjugated linoleic acid (CLA). *Food Funct.* **2020**, *11*, 9729–9739. [CrossRef] [PubMed]
97. Cheng, M.; Zhang, X.; Miao, Y.; Cao, J.; Wu, Z.; Weng, P. The modulatory effect of (-)-epigallocatechin 3-O-(3-O-methyl) gallate (EGCG3"Me) on intestinal microbiota of high fat diet-induced obesity mice model. *Food Res. Int.* **2017**, *92*, 9–16. [CrossRef] [PubMed]
98. Wüst, P.K.; Horn, M.A.; Drake, H.L. Clostridiaceae and Enterobacteriaceae as active fermenters in earthworm gut content. *ISME J.* **2010**, *5*, 92–106. [CrossRef] [PubMed]
99. Chen, Y.-T.; Zeng, Y.; Li, J.; Zhao, X.-Y.; Yi, Y.; Gou, M.; Kamagata, Y.; Narihiro, T.; Nobu, M.K.; Tang, Y.-Q. Novel syntrophic isovalerate-degrading bacteria and their energetic cooperation with methanogens in methanogenic chemostats. *Environ. Sci. Technol.* **2020**, *54*, 9618–9628. [CrossRef] [PubMed]
100. Petrognani, C.; Boon, N.; Ganigué, R. Production of isobutyric acid from methanol by *Clostridium luticellarii*. *Green Chem.* **2020**, *22*, 8389–8402. [CrossRef]

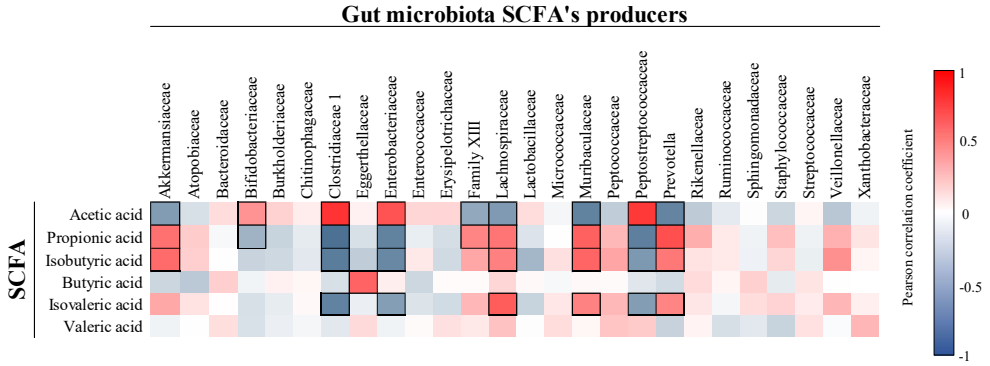
Supplementary Table 1. Hematological variables at the end of the study (day 16).

	REF	PRE	POST	P+P
WBC (10^9 cells/L)	2.17 ± 0.36	2.00 ± 0.22	2.33 ± 0.26	2.11 ± 0.24
LYM (%)	63.35 ± 5.70	65.97 ± 1.21	62.70 ± 2.34	65.96 ± 1.26
MID (%)	7.75 ± 0.82	7.19 ± 0.42	8.27 ± 1.27	7.45 ± 0.38
GRAN (%)	28.90 ± 2.80	26.84 ± 1.12	28.28 ± 1.62	26.59 ± 1.11
LYM (10^9 cells/L)	1.43 ± 0.22	1.27 ± 0.14	1.36 ± 0.11	1.30 ± 0.14
MID (10^9 cells/L)	0.14 ± 0.02	0.12 ± 0.02	0.18 ± 0.06	0.11 ± 0.02
GRAN (10^9 cells/L)	0.80 ± 0.14	0.62 ± 0.08	0.79 ± 0.11	0.93 ± 0.24
HGB (g/L)	103.67 ± 7.03	97.50 ± 6.52	95.63 ± 2.92	96.58 ± 5.59
HCT (%)	25.51 ± 0.49	23.28 ± 0.82*	23.95 ± 0.63	24.69 ± 1.09
MCV (fL)	68.68 ± 2.70	64.79 ± 1.08	65.85 ± 0.58	64.01 ± 0.48*φ
MCH (pg)	28.08 ± 2.53	27.23 ± 1.95	26.35 ± 1.25	25.15 ± 1.47
PLT (10^9 cells/L)	477.58 ± 26.52	475.75 ± 28.92	573.38 ± 25.62*#	510.50 ± 56.87
MPV (fL)	9.22 ± 0.32	8.35 ± 0.10	9.19 ± 0.39	8.73 ± 0.22

White Blood Cells (WBC), Lymphocyte (LYM), Monocytes, eosinophils, basophils, blasts and other precursor white cells (MID), Neutrophils, monocytes, eosinophils, and basophils (GRAN), Hemoglobin (HGB), Hematocrit (HCT), Mean Cell Volume (MCV), Mean Cell Hemoglobin (MCH), Platelets (PLT) and Mean Platelet Volume (MPV). Results were expressed ad mean ± SEM (n = 8-12). Statistical significance: * $p<0.05$ vs. REF, # vs. PRE and φ vs. POST. REF: the reference group; PRE: group supplemented with a mixture of scGOS and lcFOS; POST: group supplemented with LactofidusTM; P+P: group supplemented with the combination of both



Supplementary Figure 1. Principal components analysis of the levels of immunoglobulins in plasma (a) and TLRs expression (b) on day 16 of pups' life. Results derived from n = 8. REF: the reference group; PRE: group supplemented with a mixture of scGOS and lcFOS; POST: group supplemented with Lactofidus™; P+P: group supplemented with the combination of both.



Supplementary Figure 2. Correlation between the SCFA and the SCFA gut bacteria producers. The Scheme 0. are shown in a bold frame. Results derived from n = 6. SCFA: Short-chain fatty acids.

Article 4

"Preventive effect of a postbiotic and prebiotic mixture in a rat model of early life rotavirus induced-diarrhea "

Carla Morales-Ferré, Ignasi Azagra-Boronat, Malén Massot-Cladera, Sebastian Tims, Karen Knipping, Johan Garssen, Jan Knol, Àngels Franch, Margarida Castell, Francisco J. Pérez-Cano and María J. Rodríguez-Lagunas

***Nutrients,* sotmès a publicació (pendent de resposta)**

Enviat: 19/02/2022, referència: nutrients-1625603

Índex d'impacte (2020): 5.717

Categoria: 17/88 (Q1)

Els resultats d'aquest article han estat presentats en les següents comunicacions a congressos:

- *Prevention of rotavirus infection by the administration of a postbiotic in a suckling rat model.* Morales-Ferré C, Azagra-Boronat I, Massot-Cladera M, Rio-Aige K, Franch À, Castell M, Rodríguez-Lagunas MJ, Pérez-Cano FJ. XIII Congrés de la Societat Catalana d'Immunologia (Barcelona), novembre 2019.

- *Preventive immune effect of postbiotics in a preclinical model of rotavirus infection.* C. Morales-Ferré, I. Azagra-Boronat, M. Massot-Cladera, K.Rio-Aige, A. Franch, M. Castell, M.J. Rodríguez Lagunas, K. Van Limpt, K. Knipping, J. Garssen, F.J. Pérez Cano. Congrés World of Microbiome Pregnancy, Birth & Infancy (WoMPBI) (Viena), novembre 2020.

- *Intestinal impact of postbiotics in a model of suckling rat rotavirus infection.* Morales-Ferré C, Azagra-Boronat I, Massot-Cladera M, Rio-Aige K, Franch À, Castell M, Rodríguez-Lagunas MJ, van Limpt K, Knipping K, Garssen J, Pérez-Cano FJ. XIV Congrés de la Societat Catalana d'Immunologia (Barcelona), novembre 2020.

- *The postbiotic Lactofidus™ in combination with GOS-FOS prevents diarrhoea in a suckling rat model of rotavirus infection*. Morales-Ferré, C., Azagra-Boronat, I., Rodríguez-Lagunas, M.J., Knipping, K., Garssen, J., Pérez-Cano, F.J. XII ISIN Conference (Barcelona), juliol 2021.

- *Intestinal impact of the postbiotic Lactofidus^{TM} on healthy and rotavirus infected suckling rats*. Morales-Ferré, C.; Azagra-Boronat, I.; Castell, M.; Tims, S.; Knipping K.; Garssen, J.; Knol, J.; Rodríguez-Lagunas, M.J; Pérez-Cano, F.J. al VI Workshop de l'Institut de Recerca en Nutrició i Seguretat Alimentària de la Universitat de Barcelona (INSA UB): Revaloració i reaprofitament alimentari: la ciència darrere una alimentació i gastronomia sostenibles (Santa Coloma de Gramenet), febrer 2022.

Resum

Objectiu: Avaluar els efectes de la suplementació diària amb una fórmula basada en una barreja postbiòtica (Lactofidus®) i prebiòtica (scGOS-lcFOS) en un model d'infecció causada per RV en rates lactants.

Material i mètodes: Es van utilitzar rates Lewis lactants que van rebre per via oral el Lactofidus®, i/o scGOS-lcFOS diàriament i la inoculació amb RV a dia 5 de vida. Es van obtenir mostres fecals i es van puntuar de l'u al quatre per tal de poder determinar la incidència, la durada i la gravetat de la diarrea. Es va mesurar l'excreció de partícules víriques en femtes, la permeabilitat intestinal i els nivells d'Ig anti-RV (mitjançant la tècnica ELISA), el perfil d'Ig plasmàtiques (mitjançant la tècnica ProcartaPlex™ Multiplex Immunoassays), l'expressió gènica intestinal (mitjançant la tècnica PCR a temps real), la composició de la microbiota intestinal (mitjançant la seqüenciació Illumina) i el perfil d'àcid grassos de cadena curta (AGCC, mitjançant la tècnica de cromatografia de gasos-espectrometria de masses).

Resultats: Totes les intervencions van reduir la incidència i la gravetat de la diarrea. A més, van mostrar una activitat de bloqueig, canvis en el perfil d'Ig, en la microbiota intestinal i en l'expressió gènica intestinal. La barreja prebiòtica va reduir la permeabilitat intestinal i va canviar el perfil d'AGCC mentre que el postbiòtic va millorar l'expressió dels TLR i va reduir el pH fecal. La combinació va preservar la majoria dels efectes observats individualment i fins i tot va mostrar efectes que no es van veure per separat (és a dir, augment del reclutament de glòbuls blancs i limfòcits i regulació de l'expressió gènica TLR7 i TLR9).

Conclusions: L'ús d'ambdós productes ha estat una bona estratègia per millorar la prevenció i el tractament en el model de diarrea induïda per rotavirus en rates lactants, per la qual cosa aquesta combinació es podria suggerir com una bona candidata per ser utilitzada en fórmules infantils amb aquesta finalitat.

nutrients

MDPI

Article

Preventive effect of a postbiotic and prebiotic mixture in a rat model of early life rotavirus induced-diarrhea

Carla Morales-Ferré[1,2], Ignasi Azagra-Boronat[1,2], Malén Massot-Cladera[1,2], Sebastian Tims[3], Karen Knipping [3,4], Johan Garssen[3,4], Jan Knol [3,5], Àngels Franch [1,2], Margarida Castell [1,2], Francisco J. Pérez-Cano * [1,2] and María J. Rodríguez-Lagunas [1,2]

[1] Physiology Section, Department of Biochemistry and Physiology, Faculty of Pharmacy and Food Science, University of Barcelona (UB), 08028 Barcelona, Spain; carla.moralesferre@ub.edu (C.M-F); ignasiazagra@ub.edu (I.A.-B.); malen.massot@ub.edu (M.M.-C.); angelsfranch@ub.edu (À.F.); margaridacastell@ub.edu (M.C.); mjrodriguez@ub.edu (M.J R-L) franciscoperez@ub.edu (F.J.P.-C.)
[2] Nutrition and Food Safety Research Institute (INSA-UB), 08921 Santa Coloma de Gramenet, Spain
[3] Danone Nutricia Research, 3584 CT Utrecht, The Netherlands; sebastian.tims@danone.com (S.T.), karen.knipping@danone.com (K.K.); johan.garssen@danone.com (J.G.); jan.knol@danone.com (J.K.)
[4] Division of Pharmacology, Utrecht Institute for Pharmaceutical Sciences, Faculty of Science, Utrecht University, 3584 CA Utrecht, The Netherlands
[5] Laboratory of Microbiology, Wageningen University, 6708 Wageningen, The Netherlands
* Correspondence: franciscoperez@ub.edu ; Tel.: +34-934-024-505

Abstract: Rotavirus (RV) is the main cause of gastroenteritis in children. Prebiotics and more recently postbiotics are used for preventing and treating gastrointestinal infections. The aim of this study was to analyze the effects of a Lactofidus™, short-chain galacto-oligosaccharides (scGOS) and long-chain fructo-oligosaccharides (lcFOS) mixture and their combination on RV infection in rat model for early life diarrhea. Fifteen litters of suckling rats were intragastrically administered daily with the vehicle, the prebiotic mixture, the postbiotic or the combination. The RV was inoculated on day 5 and then fecal samples were clinically evaluated daily. Viral shedding, intestinal permeability assay, in vitro blocking assay, immunoglobulin profiles and anti-RV response were assessed at day 8 and 16 of life. Cecal microbiota composition, intestinal gene expression and short chain fatty acids (SCFAs) were analyzed at day 16. The incidence and severity of diarrhea were significantly reduced by all the supplementations. Moreover, they showed a blocking activity, changes in the immunoglobulin profiles, in gut microbiota and in the intestinal gene expression. The prebiotic mixture reduced gut permeability and changed the SCFA profile, whereas the postbiotic enhanced the expression of Toll like receptors (TLRs). The combination preserved most of the individual observed effects and furthermore complementary effects.

Keywords: Lactofidus; scGOS/LcFOS; rotavirus; suckling rats; microbiota

Citation: Lastname, F.; Lastname, F.; Lastname, F. Title. *Nutrients* **2022**, *14*, x. https://doi.org/10.3390/xxxxx

Academic Editor: Firstname Lastname

Received: date
Accepted: date
Published: date

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Copyright: © 2022 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

1. Introduction

Rotavirus (RV) is a nonenveloped virus of the family *Reoviridae* that infects the enterocytes of the small intestine causing diarrhea, vomiting and fever in children [1–3]. RV is the leading worldwide etiological agent of gastroenteritis and is responsible for approximately 20–30% of all cases that requires treatment in hospitals [4]. No specific curative treatment exists for RV gastroenteritis and the most common treatment is oral rehydration solutions [1,5]. RV infection can be prevented by vaccination, however its efficacy is lower in some African and Asian countries [4]. Dietary management is important in the care of infants with acute diarrhea. In countries where malnutrition is common, zinc

supplementation can improve the outcome of acute diarrhea [1]. The improvement of hygiene and sanitation conditions reduced the morbidity and mortality due to RV infection [4].

Human milk contains oligosaccharides and glycoproteins that provide protection against microorganisms' invasion [6]. Moreover, human milk is a source of commensal bacteria to the infant gut that could have immunomodulatory, anti-infectious and metabolic roles [7]. However, in some cases, breastfeeding is not possible and infant formula is the substitute for the baby's nutrition. Therefore, infant formulas try to mimic the composition of breast milk by adding prebiotics, probiotics and, recently, also paying attention to postbiotics [6,8,9].

Prebiotics are defined as a substrate that is selectively utilized by host microorganisms conferring a health benefit [10]. In this sense, human milk oligosaccharides (HMOs) are the main dietary oligosaccharide structures with prebiotic effect in human milk. In infant formula, short-chain galacto-oligosaccharides (scGOS) and long-chain fructo-oligosaccharides (lcFOS) are usually added [9]. Preclinical and clinical studies show that scGOS/lcFOS supplementation in infant formula reduce the incidence of atopic dermatitis, allergy, respiratory tract infections and gastrointestinal infections, included RV infection, during early life [11–14].

On the other hand, probiotics are defined as live microorganisms, which when administered in adequate amounts, confer a health benefit to the host [15]. Probiotics can also have a role in immune maturation [16] and prevent and/or treat different diseases, such as gastrointestinal and respiratory infections, colitis, irritable bowel syndrome and allergies [17].

Postbiotics are described as a preparation of inanimate microorganisms and/or their components that confers a health benefit on the host [15]. The use of postbiotics is a new strategy to obtain the beneficial effects of probiotic bacteria without their possible disadvantages. Even though probiotic-related infections have rarely been reported and the fear that probiotics could express virulence factors and transfer antibiotic resistance genes to pathogenic bacteria [18–20] remains controversial, the use of postbiotics could avoid those issues because the bacteria are inactivated by heat, high pressure, sonication or ionizing irradiation [21]. The mechanism of action of postbiotics are not yet well-known [22], and their efficacy depends on the type of the postbiotic used: microbial metabolites; carbohydrates; organic acids; lipids; proteins; cell wall components; or other fermented products generated in the matrix [17]. Many studies report that postbiotics could improve physiological functions [23] and prevent and treat diseases related to gut barrier dysfunction, gastroenteritis, respiratory tract and enteric infections [22,24–26].

For many years, the literature has focused on different nutritional interventions using prebiotics and probiotics in the context of gastrointestinal infections [1,13,27–29]. Recently, different research has showed the beneficial effects of postbiotics on gastrointestinal infections [11,22,24]. The present study aimed to examine the effects of a daily supplementation with a formulation based on a postbiotic and prebiotic mixture, as occurs in breast milk, in a model of RV infection in suckling. The postbiotic is constituted by an inactivated fermented milk infant formula obtained from *Bifidobacterium breve* and *Streptococcus thermophilus* activity by an innovative fermentation process (Lactofidus™). The prebiotic is based on a mixture of scGOS and lcFOS (9:1). The products were administrated separately or in combination and their actions on growth, immune variables, microbiota composition and short-chain fatty acid (SCFA) production, among others, were evaluated.

2. Materials and Methods

1. *Animals*

Fifteen pregnant Lewis rats (G14) purchased from Janvier (Le Genest St Isle, France) were individually housed in cages (2184L Eurostandard Type II L, Tecniplast, West Chester, PA, USA) that contained bedding of large fibrous particles and tissue papers (Souralit

1035, Bobadeb S.L., Santo Domingo de la Calzada, Spain and Gomà-Camps S.A.U., La Riba, Spain, respectively). Rats were monitored daily and allowed to deliver at term. The birth day was registered as day 1 of life. On day 2, litters were randomly assigned to five experimental groups and were culled to 8 neonatal rats per mother with a similar proportion (40–60%) of each sex/litter. Dams were fed with a commercial diet corresponding to the American Institute of Nutrition (AIN) 93 G formulation [30] (Teklad Global Diet 2014, Envigo, Indianapolis, IN, USA) and water *ad libitum*. Neonatal rats had free access to maternal milk and commercial diet. Animal handling was performed after separating the mother and keeping the suckling rats in the home-cage. Then, oral administration was performed randomly. Animals were housed under controlled conditions of temperature (20–24 °C) and humidity (40–60%) in a 12 h light−12 h dark cycle (lights on at 8h and lights off at 20h) in a special safe and isolated room designed and authorized for working under biosecurity level 2 conditions at the Animal Service of the Faculty of Pharmacy and Food Science, at the University of Barcelona.. Animal procedures were approved by the Ethical Committee for Animal Experimentation of the University of Barcelona and the Catalonia Government (CEEA/Ref. 255//18 and PAMN/Ref.10176, respectively), in accordance with the EU-Directive 2010/63/EU. The sample size required was calculated by the Appraising Project Office's program from the Universidad Miguel Hernández de Elche (Alicante). The minimal number of animals to provide statistically significant differences among groups, using the diarrhea score as variable and assuming that there was no dropout rate and type I error of 0.05 (two-sided), was 3 litters per group, as in previous studies, due to the high differences among litters [11,31,32].

2.2 *Experimental design*

Pups were distributed into 5 groups of 24 animals each (three litters of eight animals/group): the reference (REF) group, rotavirus-infected (RV) group and three RV-infected groups supplemented with: a mixture of scGOS and lcFOS in 9:1 ratio (RV+PRE), Lactofidus™ (RV+POST), and their combination (RV+P/P). Supplementations were obtained from Danone Nutricia Research (Utrecht, The Netherlands).

Pups were orally administered in daily basis by oral gavage, as previously described [27], with the normalized volume/body weight of vehicle, prebiotic, postbiotic or their combination (9 μL/g/day), from the day 2 of life to the 16 day of life - the end of the strict lactation period -. The animals from the RV+PRE group were supplemented with 0.8 g of scGOS/lcFOS per 100 g of body weight. GOS/FOS is a mixture of GOS (Vivinal GOS, Borculo Domo, Zwolle, The Netherlands) with a degree of polymerization (dp) of 3–8, and long-chain FOS (Raftiline HP, Orafti, Wijchen, The Netherlands; average dp>23) in a 9:1 ratio.

The RV+POST group was fed with 0.92 g/100 g body weight of a heat inactivated milk fermented by the bacteria *Bifidobacterium breve* and *Streptococcus thermophilus* (Lactofidus™) [33–36]. During the fermentation of the milk matrix, both strains were metabolically active and produce bioactive compounds (postbiotics); after that the milk matrix was spray dried and then used.

The RV+P/P group received both supplements at the same doses as when given separately and maintaining the volume of administration (9 μL/g/day). The REF and RV groups received a matched volume of water. The selection of the product doses was based on previous works [13,23,27,32,37,38].

The simian SA-11 RV strain was provided by the Virus Enteric group from the University of Barcelona. Viruses were propagated in fetal African green monkey kidney cells (MA-104) and titrated as $TCID_{50}$/ mL (TCID, tissue culture infection dose) [39]. On day 5 of life, SA-11 was inoculated by oral gavage (2 $x10^8$ $TCID_{50}$ RV/rat) in 100 μL of phosphate buffered saline (PBS) to suckling rats as previously described [39], with the exception of REF animals, which received the same volume of PBS. The RV was inoculated after 1 h of separation from their dams to avoid interference between the RV and milk components.

Body weight was recorded each day and clinical evaluation was performed daily from the day 4 of life to the day 16 of life at the same time to disturb the animals just once. The naso–anal and tail lengths were measured to calculate the body/tail ratio the end sampling day (day 8 or day 16). In addition, body mass index (BMI) was calculated as *body weight*/*length*^{2} (g/cm^2) and the Lee Index was calculated as (*weight*$^{0.33}$/*length*) x 1,000 (g$^{0.33}$/cm). Half of the animals of each litter were euthanized at day 8, to analyze variables associated at the peak of diarrhea and the other half at day 16, to determine the effects of the dietary interventions post-diarrhea.

2.3 Clinical evaluation and fecal specimen collection design

RV infection was evaluated from day 4 to 16 by the evaluation of the animal weight and clinical indexes derived from fecal samples. After gentle abdominal massage, fecal samples were obtained, scored and frozen at -20 °C for further analysis. The severity of diarrhea was expressed by fecal weight and by scoring fecal samples from 1 to 4 (diarrhea index [DI]) based on color, texture and amount as described: (1) – normal; (2) – soft yellow-green; (3) – totally loose yellow-green; and (4) – high amount of watery feces. Scores ≥ 2 indicate diarrheic feces, whereas scores < 2 indicate absence of diarrhea [39].

The area under the curve of severity (sAUC) during days 5 to 10 was calculated as a global value of severity. The maximum diarrhea index (MDI) - the highest value during the diarrhea period- was also calculated. Incidence of diarrhea was expressed as the percentage of diarrheic feces (%DF, considering the number of total feces collected daily in each group) and by the percentage of diarrheic animals (%DA, consisting of the percentage of pups presenting diarrhea in each group). The AUC of %DF and %DA (dfAUC and daAUC) from days 5 to 10 were measured as global values of incidence. The maximum percentage of diarrheic feces (MDF) and diarrheic animals (MDA) were defined as the highest scores during the diarrhea period. The days when MDI (MDId), MDF (MDFd) and MDA (MDAd) were achieved were also used as indicators. Finally, the interval between the day of diarrhea beginning (DDB) and the day of diarrhea ending (DDE) was measured to calculated the diarrhea period (DP) for each animal. The number of days with diarrhea within the diarrhea period were calculated (days with diarrhea, DwD).

The DI, MDI, sAUC, %DF, %DA, dfAUC, daAUC, MDF, MDA, DP and DwD were normalized in RV+PRE and RV+P/P groups due to intrinsic fecal aspects of scGOS/lcFOS intervention, as previously described [27]. The data from REF, RV and RV+POST were not normalized due to no basal effect was observed. The data normalization was calculated substracting the mean DI of the timepoints when there was no diarrhea in the RV group. The difference between this mean and the baseline score (DI=1) was subtracted to all values of DI. To ascertain the effects of scGOS/lcFOS and Lactofidus™-scGOS/lcFOS on RV infection, the normalized data reflects better their effect.

On day eight and sixteen, half of the pups/dam each day were intramuscularly anesthetized with ketamine (90 mg/kg) (Merial Laboratories S.A., Barcelona, Spain) and xylazine (10 mg/kg) (Bayer A.G., Leverkusen, Germany). On those days, morphometric variables such as the weight of stomach, small and large intestines, liver, thymus and spleen were obtained. Moreover, small and large intestines' length was recorded. A 1 cm central portion of small intestine was conserved in RNAlater® (Ambion, Applied Biosystems, Austin, TX, USA), incubated at 4°C overnight and frozen at -20°C until PCR analysis. To obtain gut wash, the remaining parts of the intestine were opened lengthwise, cut into 5 mm pieces, incubated with 2 mL of PBS in a shaker (10 min, 37°C) and centrifugated. The supernatants were frozen at -20°C until alpha-1 antitrypsin (A1AT) analysis. To measure the immunoglobulin (Ig) pattern and anti-RV antibodies (Ab), plasma samples were used. Furthermore, stomach content was obtained to measure the pH and to study the

anti-RV Ab levels. Moreover, colorectal content was used to study the microbiota composition (day 8). Finally, SCFAs were measured in the cecal content, at day 16.

2.4 Stool and stomach content pH

Fecal samples from the peak of diarrhea (days 7-9) and from the end of the study (days 14 -16) were diluted in distilled water (up to 200 mg/mL) and agitated, whereas stomach content samples from day eight and sixteen were measured directly without previous dilution. The measure of pH was performed using a 5207 pH electrode for surfaces and a micropH 2001 pH meter (Crison Instruments, Barcelona, Spain).

2.5 Fecal SA-11 shedding

Feces from day 6 were diluted in PBS (10 mg/mL), homogenized using Pellet Pestles Cordless Motor (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) and centrifuged (170 *g*, 5 min, 4°C). Supernatants were stored at −20°C until analysis. SA-11 virus particles were measured by ELISA, as previously described [11].

2.6 In vitro blocking assay

To test the ability of scGOS-lcFOS and the Lactofidus™ to bind the SA-11 particles, an in-house *in vitro* blocking assay was performed [13,27]. RV was diluted with 1% PBS-Tween to reach the concentration of $5x10^4$/mL - the highest concentration previously observed in stools of RV-infected suckling rats - [13]. Starting from the concentration administered to neonatal rats, different dilutions (from 1/2 to 1/32) of Lactofidus™ and/or scGOS/lcFOS were preincubated with the virus at 1/1 ratio for 30 min. Then, free, non-coated viral particles were quantified by ELISA, as described above (fecal SA-11 shedding).

2.7 Intestinal permeability assay

The rat SERPINA1/Alpha 1 Antitrypsin ELISA kit (LifeSpan Biosciences Inc., Seattle, WA, USA) was used to measure the levels of A1AT in the gut wash – a marker of intestinal permeability - as in previous works [13]. The standard concentrations ranged from 100 to 1.563 ng/mL. The assay sensitivity was 1.56 ng/mL.

2.8 Anti-RV antibodies

Anti-RV IgM and anti-RV total Ig in neonatal rats' plasma were measured by ELISA following previous procedures [27,39]. In addition, the frozen stomach content from 16-day-old rats was homogenized, diluted in PBS and tested to quantify anti-RV Ab.

2.9 Quantification of immunoglobulins

At day 16, plasma concentration of IgG isotypes, IgA and IgM was measured using ProcartaPlex™ Multiplex immunoassay (Thermo Fisher Scientific, Barcelona, Spain) as described in previous studies [13,23]. The specific concentration of each Ig was measured by MAGPIX® analyzer (Luminex Corporation, Austin, TX, USA) at the Scientific and Technological Centers of the University of Barcelona (CCiT-UB).

2.10 Gene expression analysis

On day 16, a 1 cm central portion of the small intestine was homogenized as previously described [38]. RNA was isolated with the RNeasy® Mini Kit (Qiagen, Madrid, Spain) and its purity and concentration was determined with a NanoPhotometer (BioNova Scientific S.L., Fremont, CA, USA). Afterwards, a thermal cycler PTC-100 Programmable Thermal Controller and TaqMan® Reverse Transcription Reagents (Applied Biosystems, AB, Weiterstadt, Germany) was used to obtain the corresponding cDNA .

The real-time PCR was performed using the ABI Prism 7900 HT (AB) with the specific PCR TaqMan® primers (AB): Blimp-1, FcRn, IgA, Cldn2 , Cldn4, Ocln, Muc2, Muc3, TLR 2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR7 and TLR9, normalized by the endogenous gene Gusb using the 2-ΔΔCt method. Results are expressed as the percentage of expression in each experimental group normalized to the mean value obtained for the REF group, which was set at 100%.

2.11 Colorectal microbiota composition

On day 8, DNA from samples of colorectal content obtained (6 animals/group) were amplified 25 PCR cycles. To ensure quality control a negative control of the DNA extraction and a positive Mock Community control were included. Later, they were sequenced in the V3–V4 variable region of the 16S rRNA gene. The Illumina Miseq sequencing 300x2 approach was assessed (Illumina Inc., San Diego, CA, USA) and sequences were merged and processed using MiSeq run and MiSeq Reporter (on-system software) in collaboration with (Microomics, Barcelona, Spain).

The number of observed operational taxonomic units (OTUs, i.e., richness), Pielou's evenness and Shannon's diversity indexes were calculated to estimate the alpha biodiversity. Unweighted Unifrac distance was measured to assess the beta diversity. The taxonomic assignment of phylotypes was performed using a Bayesian Classifier trained with Silva database version 132- 99% OTUs full-length sequences [40]. The relative proportions of families and genera were calculated and represented with stacked bars. The category "others" represented in each graph includes those families whose presence was lower than 1% in the REF group and those genera whose presence was lower than 3% in the same group.

Venn diagrams were created to study the presence or absence of taxonomic ranks (family and genera) in the experimental groups. A bacterial group was considered as present when all neonatal rats displayed proportions higher than 0.001%, while the bacterial groups detected in less pups or in lower proportion were regarded as absent.

2.12 Quantification of short-chain fatty acids in the cecal content

On day 16, cecal content samples were obtained to measure cecal SCFA (acetic, propionic, butyric, valeric, isobutyric and isovaleric acids) content by headspace-gas chromatography-mass spectrometry (HS-GC-MS) at the GC-MS unit of the CCiT-UB, as previously described [13,23] . The lower limits of detection (in μmol/g of feces) were 0.404 for acetic acid, 0.068 for propionic acid, 0.020 for butyric acid, 0.001 for valeric acid, 0.003 for isobutyric acid, and 0.001 for isovaleric acid.

2.13 Statistical analysis

Results are expressed as mean ± SEM. For statistical analysis, the Statistical Package for Social Sciences (SPSS v22.0) (IBM, Chicago, IL, USA) was used. Data were tested for normality distribution (by Shapiro-Wilk) and homogeneity of variance (by Levene's test). A conventional one-way ANOVA test was carried out followed by the post hoc Bonferroni when data had a normal behavior and were homogeneous. The nonparametric Kruskal–Wallis test followed by the post hoc Mann–Whitney U test was performed when data were neither equals nor normally distributed. This last test was also used for non-parametric variables such as the ID score. As sexual dimorphism has shown to have low impact on the response against RV-infected suckling rats [41] and the low sample size when distributing by sex, differential sex-effects were not compared.

Kruskal–Wallis test was assessed to analyze microbiota alpha diversity. To calculate principal coordinates analysis (PCoA) beta diversity distance matrices were used.

To determine the significance of groups present in community structure, R software package version 3.6.0. Permanova and ANOSIM tests were used. A Permdisp test was

used to identify location vs. dispersion effects [42]. ANCOM [43] and Kruskal–Wallis test were used to test differential relative abundance of taxa. After the Kruskal–Wallis test, Conover's test with FDR Benjamini–Hochberg correction was added for pairwise comparison. Finally, Biodiversity R version 2.11-1, PMCMR version 4.3, RVAide Memoire version 0.9-7 and vegan version 2.5-5 packages were used for the different statistical analysis performed. Significant differences were established when $p< 0.05$.

3. Results

3.1 Growth and morphometry

The body weight was recorded from day 2 to day 11 of life (Figure 1). The diarrhea of the animals was mild and did not affect their growth, even though the body weight of RV animals was higher compared to the REF group (on day 8 and day 10, $p<0.05$). In addition, RV+PRE showed an increase in body weight compared to REF animals (on day 10 and day 11). The body weight in RV+POST group was higher compared to REF (from day 3 to day 11), RV (from day 4 to day 11), RV+PRE (from day 3 to day 11) and RV+P/P (between day 3 and day 8). In addition, the body weight of RV+P/P increased compared to REF (from day 7 to day 11), RV (from day 9 to day 11) and RV+PRE (from day 8 to day 11) ($p<0.05$).

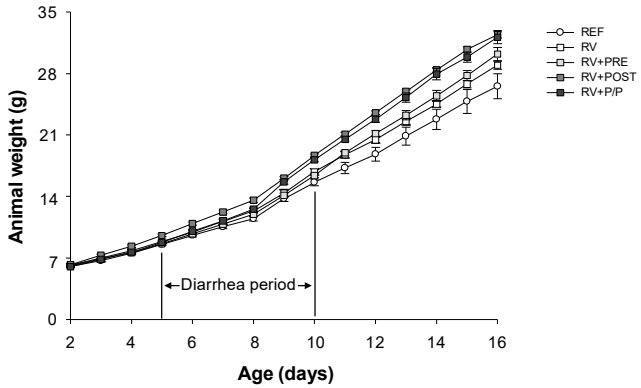


Figure 1. Body weight (g) during the study (day 2 to day 16 of life). Results are expressed as mean ± SEM (n = 24 animals/group). Statistical differences: [α] $p<0.05$ RV *vs.* REF, [β] RV+PRE *vs.* REF, [γ] RV+POST *vs.* REF, [δ] RV+P/P *vs.* REF, [ζ] RV+POST *vs.* RV, [η] RV+P/P *vs.* RV, [θ] RV+POST *vs.* RV+PRE, [ι] RV+P/P *vs.* RV+PRE and [κ] RV+P/P *vs.* RV+POST. REF: reference group; RV: rotavirus group; RV+PRE: rotavirus group supplemented with a mixture of scGOS/lcFOS; RV+POST: rotavirus group supplemented with Lactofidus™; RV+P/P: rotavirus group supplemented with the combination of both.

The growth-associated measurements and relative weight of organs were recorded at the peak of diarrhea (day 8) and at the end of the study (day 16). Despite observing no differences in growth-associated measurements or in the relative weight of organs between RV and REF groups on day 8 and day 16 (Table 1 and Supplementary Table 1, respectively), the supplemented groups showed some differences.

As can be observed in Table 1, the mean Lee index of the RV+PRE group was lower than that of the animals in the RV and RV+POST groups ($p<0.05$). In addition, RV+POST showed an increase in the BMI compared to REF and RV+PRE ($p<0.05$). The body/tail length ratio of RV+P+P was higher than that of the REF group, whereas the naso–tail measure was lower compared to RV+POST ($p<0.05$).

With regard to the relative weight of organs, thymus weight was lower in RV+PRE and RV+P/P compared to REF and RV+POST animals ($p<0.05$). In addition, RV+POST and RV+P/P increased the relative weight of the spleen compared to the REF and RV groups ($p<0.05$). An increase in the percentage of the relative weight of the small intestine was observed in all supplemented groups compared to the REF group with a statistical different between RV+PRE and RV+P/P with respect to RV and RV+POST groups ($p<0.05$). In addition, the large intestine length of RV+POST was reduced compared to REF, RV and RV+P/P, whereas RV+PRE only showed a reduction when it was compared to the REF group ($p<0.05$). The liver's weight was higher in RV+POST and RV+P/P compared to RV+PRE ($p<0.05$). Finally, the small intestine length was decreased in RV+POST compared to RV+PRE and RV+P/P animals ($p<0.05$) (Table 1).

Table 1. Growth-associated measurements and weight of organs normalized by body weight (BW) at the peak of diarrhea (day 8 of life).

	REF	RV	RV+PRE	RV+POST	RV+P/P
Growth measurements					
Naso-anal length (Body, cm)	6.82 ± 0.11	6.95 ± 0.09	6.97 ± 0.05	7.08 ± 0.11	6.91 ± 0.09
Anus-tail length (Tail, cm)	3.04 ± 0.03	3.06 ± 0.05	3.03 ± 0.04	3.12 ± 0.06	2.92 ± 0.07
Naso-tail length (cm)	9.83 ± 0.13	10.01 ± 0.11	10.00 ± 0.08	10.20 ± 0.15	9.83 ± 0.13 $^{\Delta}$
Body/Tail length ratio	2.23 ± 0.02	2.28 ± 0.04	2.31 ± 0.03	2.28 ± 0.04	2.38 ± 0.06 *
Body mass index (g/cm^2)	0.24 ± 0.01	0.25 ± 0.01	0.24 ± 0.01	0.27 ± 0.00 $^{*\Phi}$	0.25 ± 0.01
Lee index (g$^{0.33}$/cm, x1000)	329.65 ± 3.05	331.79 ± 3.75	325.54 ± 2.29 $^{\sharp}$	334.63 ± 2.56 $^{\Phi}$	329.91 ± 4.25
Weight of organs					
Spleen/BW ratio (%)	0.56 ± 0.03	0.53 ± 0.05	0.62 ± 0.04	0.73 ± 0.05 $^{*\sharp}$	0.69 ± 0.03 $^{*\sharp}$
Thymus/ BW ratio (%)	0.32 ± 0.02	0.29 ± 0.02	0.26 ± 0.01 *	0.32 ± 0.01 $^{\Phi}$	0.26 ± 0.01 $^{*\Delta}$
Liver/ BW ratio (%)	2.99 ± 0.05	2.90 ± 0.08	2.75 ± 0.09	3.09 ± 0.07 $^{\Phi}$	3.06 ± 0.05 $^{\Phi}$
Large intestine[1]/BW ratio (%)	0.43 ± 0.01	0.42 ± 0.02	0.49 ± 0.01	0.41 ± 0.02 $^{\Phi}$	0.43 ± 0.02
Small intestine[2]/ BW ratio (%)	3.26 ± 0.07	3.45 ± 0.13	4.86 ± 0.11 $^{*\sharp}$	3.51 ± 0.10 $^{*\Phi}$	5.09 ± 0.13 $^{*\sharp\Delta}$
Large intestine length/ BW (cm/g)	44.43 ± 1.62	40.86 ± 1.37	39.13 ± 0.04 *	36.47 ± 1.29 $^{*\sharp}$	39.98 ± 0.93 $^{\Delta}$
Small intestine length/ BW (cm/g)	233.68 ± 8.80	227.92 ± 7.36	239.00 ± 0.01	211.55 ± 7.04 $^{\Phi}$	243.62 ± 6.04 $^{\Delta}$
Stomach/ BW ratio (%)	0.70 ± 0.02	0.66 ± 0.02	0.74 ± 0.11	0.67 ± 0.02	0.70 ± 0.02

Relative weight of organs was expressed as percentage (%) with respect to the body weight (BW) and growth-associated measurements are expressed as mean ± SEM (n = 12 animals/group). Statistical significance: * $p<0.05$ RV *vs.* REF, $^{\sharp}$ $p<0.05$ *vs.* RV, $^{\Phi}$ *vs.* RV+PRE and $^{\Delta}$ *vs.* RV+POST. REF: reference group; RV: rotavirus group; RV+PRE: rotavirus group supplemented with a mixture of scGOS and lcFOS; RV+POST: rotavirus group supplemented with Lactofidus™; RV+P/P: rotavirus group supplemented with the combination of both. [1]Large intestine weight includes the intestinal content. [2]Small intestine was weighted after being rinsed with PBS.

On day 16 (Supplementary Table 1), RV+POST and RV+P/P groups showed an increase in the naso–anal length compared to REF and RV animals ($p<0.05$). Moreover, RV+POST showed higher naso–tail length compared to the REF and RV groups ($p<0.05$).

The BMI was increased in RV+POST and RV+P/P animals compared to RV ones ($p<0.05$). Similarly to day 8, on day 16 the relative spleen weight was higher in RV+POST and RV+P/P group compared to REF animals. RV+POST was the group with the highest relative thymus weight ($p<0.05$). The relative weight of large intestine of RV+POST was higher than that from the REF group whereas their length was reduced ($p<0.05$). RV+PRE and RV+P/P showed an increase in the weight of large and small intestines compared to other groups ($p<0.05$). Finally, the length of the large intestine was lower in RV+P/P compared to REF and RV animals ($p<0.05$) (Supplementary Table 1).

With regard to the hematological variables, on day 8 (Supplementary Table 2), RV showed higher mean platelet volume compared to REF and RV+PRE animals ($p<0.05$). The levels of hemoglobin, mean cell hemoglobin and platelet counts were higher in RV+PRE group compared to RV ($p<0.05$). The RV+P/P group showed the highest values of white blood cells, lymphocytes and mean red cell volume ($p<0.05$). Moreover, hemoglobin and mean cell hemoglobin were increased compared to REF, RV and RV+POST animals ($p<0.05$). Furthermore, neutrophil, monocyte, eosinophil and basophil counts were higher compared to the REF and RV groups ($p<0.05$). The levels of monocytes, eosinophils, basophils, blasts and other precursors of white cells in RV+P/P were present in higher abundance, whereas their percentage was reduced compared to RV ($p<0.05$). No differences were observed between RV+POST and REF or RV animals (Supplementary Table 2). On day 16 (Supplementary Table 3), the mean red cell volume in the RV+POST and RV+P/P groups was reduced compared to that in the REF group ($p<0.05$). The hematocrit of RV+P/P group was lower than that in REF animals ($p<0.05$). No differences were observed among REF, RV and RV+PRE

On the other hand, the fecal and stomach content pH were measured during the diarrheic process (on days 7–9 in feces and day 8 in stomach content) and after the diarrhea period (on days 14–16 in feces and day 16 in stomach content) (Supplementary Figure 1). RV+POST showed a lower fecal pH compared to REF and RV groups ($p<0.05$) during the diarrhea period (Supplementary Figure 1a). No changes were observed in fecal pH in the post-diarrhea period. If we focus on the stomach pH (Supplementary Figure 1b), all supplemented groups showed a decrease in stomach content pH during the diarrhea period compared to REF and RV animals ($p<0.05$). No differences were observed during the post-diarrhea period among groups.

3.2 Incidence and duration of the diarrhea process

The incidence of RV-induced diarrhea was evaluated from day 4 to 11. As can be observed in Figure 2, the incidence expressed as the percentage of animals displaying diarrhea (%DA) in the RV group was 33.33% on day 6, the following day it increased to 41.67% and on day 8 it reached the maximum proportion (58.33%). Afterwards, on day 9 the %DA decreased to 33% and on day 10 none of the animals in the RV group showed diarrhea. In contrast, the 3 diets tested were able to reduce the proportion of infected animals. Specifically, all supplemented groups displayed lower %DA ($p<0.05$) at day 8, when less than 25% of the animals displayed symptoms ($p<0.05$) (Figure 2a). After the normalization of data from RV+PRE and RV+P/P groups, the %DA in these groups was even lower, up to 4% (on days 6 and 7), whereas on day 8, none of the animals showed diarrhea ($p<0.05$) (Figure 2b).

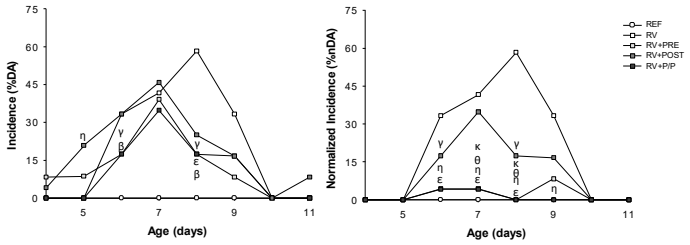


Figure 2. Incidence of RV infection expressed as percentage of diarrheic animals (% DA) by two approaches: non-normalized results (a) and normalized results (b) from day 4 to day 11 (n = 24 animals/ group). Statistical significance: $^{\alpha}$ p<0.05 RV vs. REF, $^{\beta}$ RV+PRE *vs.* REF, $^{\gamma}$ RV+POST *vs.* REF, $^{\delta}$ RV+P/P *vs.* REF, $^{\varepsilon}$ RV+PRE *vs.* RV, $^{\zeta}$ RV+POST *vs.* RV, $^{\eta}$ RV+P/P *vs.* RV, $^{\theta}$ RV+POST *vs.* RV+PRE, $^{\iota}$ RV+P/P *vs.* RV+PRE, $^{\kappa}$ RV+P/P *vs.* and RV+POST. REF: reference group; RV: rotavirus group; RV+PRE: rotavirus group supplemented with a mixture of scGOS/lcFOS; RV+POST: rotavirus group supplemented with Lactofidus™; RV+P/P: rotavirus group supplemented with the combination of both.

All the supplemented groups, tended to reduce other measures of incidence (e.g., maximum percentage of diarrheic animals, MDA) or the overall pattern (e.g., AUC of the incidence curve), especially the POST group (Table 2). The day of the maximum incidence of diarrhea (MDAd) was on day 8 in RV animals whereas it was one day before (day 7) in the supplemented groups.

Table 2. Clinical variables determining the diarrhea process in the RV groups.

Clinical Outcome	Variable	RV	RV+PRE	RV+POST	RV+P/P
Incidence					
	MDA	58.33	39.13	34.78	45.83
	MDAd	8.00	7.00	7.00	7.00
	daAUC	166.67	159.69	86.23	222.92
	MDF	82.35	47.37	50.00	68.75
	MDFd	8.00	7.00	6.00	7.00
	dfAUC	258.35	232.49	146.01	315.60
Duration					
	DDB	6.78 ± 0.32	7.22 ± 0.98	7.00 ± 0.33	6.82 ± 0.88
	DDE	8.33 ± 0.24	7.78 ± 1.01	7.63 ± 0.38	8.18 ± 0.87
	DP	1.17 ± 0.34	0.56 ± 0.24	0.42 ± 0.26	1.25 ± 0.49
	DwD	1.75 ± 0.37	1.42 ± 0.31	0.92 ± 0.23	2.25 ± 0.43 $^{\Delta}$
Severity					
	MDI	2.39 ± 0.15	2.02 ± 0.09	1.84 ± 0.15 $^{\#}$	2.25 ± 0.10 $^{\Delta}$
	MDId	7.48 ± 0.16	7.27 ± 0.43	7.18 ± 0.23	7.77 ± 0.61
	sAUC	3.73 ± 0.43	2.58 ± 0.23 $^{\#}$	2.58 ± 0.23 $^{\#}$	3.13 ± 0.25

Results are expressed as mean ± SEM (n = 12 animals/group). MDA, maximum percentage of diarrheic animals; MDAd, day with maximum percentage of diarrheic animals; daAUC, area under the curve of diarrheic animals no normalized; MDF, maximum percentage of diarrheic feces; MDFd, day with maximum percentage of diarrheic feces; dfAUC, area under the curve of diarrheic feces no normalized. DDB, day of diarrhea beginning (DPI); DDE, day of diarrhea ending (DPI); DP, diarrhea period; DwD, days

with diarrhea. MDI, maximum diarrhea index; MDId, day of maximum diarrhea index (DPI); sAUC, area under the curve of severity no normalized. Statistical differences: * *vs.* REF, $^{\sharp}$ *vs.* RV, $^{\varphi}$ *vs.* RV+PRE, $^{\Delta}$ *vs.* RV+POST. REF: reference group; RV: rotavirus group; RV+PRE: rotavirus group supplemented with a mixture of scGOS/lcFOS; RV+POST: rotavirus group supplemented with Lactofidus™; RV+P/P: rotavirus group supplemented with the combination of both.

If we focus on the duration of the diarrhea, the clinical symptoms started around day 6–7 in all groups and ended 2 days later (Table 2). The 2 measures of the duration of the diarrhea, the diarrhea period (DP) and the days with diarrhea (DwD) were clearly reduced by the intervention with the POST and also in the RV-PRE and RV-P/P if the normalized results are taken into account ($p<0.05$, Supplementary Table 4)

3.3 Severity of diarrhea

The severity of the diarrheic process was evaluated from day 4 to day 11 by two approaches: the diarrheic index (DI) and the fecal weight (Figure 3 and Figure 4a). As can be observed in Figure 3a, all supplemented groups showed an overall reduction in the diarrhea severity compared to RV animals, which was significantly different on day 8 ($p<0.05$). After the normalization of data (Figure 3b), the DI was reduced in RV+PRE from day 6 to 8 and from day 6 to 9 in RV+P/P group ($p<0.05$).

The sAUC was measured from day 5 to 10, last day with some animals displaying symptoms (Table 2). The RV animals showed a higher sAUC compared to RV+PRE and RV+POST ($p<0.05$). The maximum diarrhea index (MDI, Table 2) in the RV+POST supplemented group was the lowest and significantly different to that from the RV group, whereas the day the maximum score was achieved (MDId) was similar among groups. After the normalization of data (Supplementary Table 4), RV+PRE and RV+P/P also showed a reduction in MDI and sAUC compared to RV ($p<0.05$).

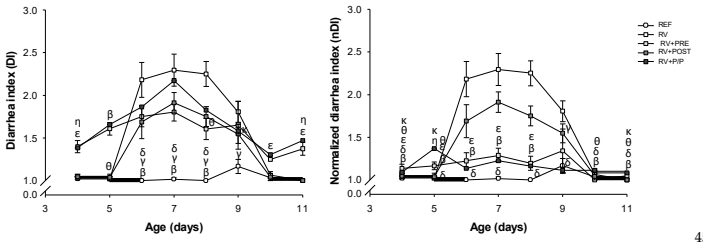


Figure 3. Severity of diarrhea from day 4 to day 11 by two approaches: non-normalized results (a) and normalized results (b). Results are expressed as mean ± SEM (n = 24 animals/group). Statistical significance: $^{\alpha}p<0.05$ RV vs. REF, $^{\beta}$ RV+PRE *vs.* REF, $^{\gamma}$ RV+POST *vs.* REF, $^{\delta}$ RV+P/P *vs.* REF, $^{\varepsilon}$ RV+PRE *vs.* RV, $^{\zeta}$ RV+POST *vs.* RV, $^{\eta}$ RV+P/P *vs.* RV, $^{\theta}$ RV+POST *vs.* RV+PRE, $^{\iota}$ RV+P/P *vs.* RV+PRE, $^{\kappa}$ RV+P/P *vs.* and RV+POST *vs.* RV+P/P. REF: reference group; RV: rotavirus group; RV+PRE: rotavirus group supplemented with a mixture of scGOS/lcFOS; RV+POST: rotavirus group supplemented with Lactofidus™; RV+P/P: rotavirus group supplemented with the combination of both.

Fecal weight is an objective severity variable of RV-induced diarrhea and was also measured as an indicator of severity (Figure 4a). Before the induction of RV infection, RV+PRE and RV+P/P showed higher fecal weight compared to REF and RV animals due to the prebiotic properties that reduce the fecal consistency increasing the number of soft

feces. However, during the diarrhea period, RV+PRE and RV+POST groups showed lower fecal weight compared to RV animals, indicating that the prebiotics and the postbiotic reduce the severity of diarrhea ($p<0.05$). In the post-diarrhea period, RV+PRE and RV+P/P showed higher fecal weight compared to REF and RV animals, whereas RV+POST group showed an increment compared to the REF group ($p<0.05$).

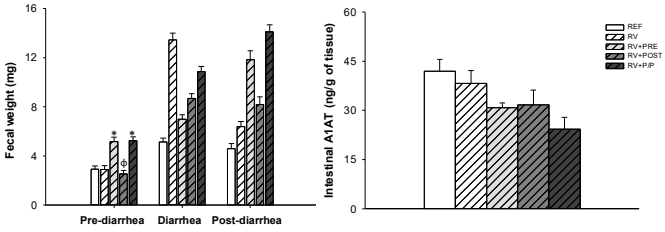


Figure 4. Fecal weight (mg) (a) and intestinal barrier permeability (b). The fecal weight was grouped in the pre-diarrhea, diarrhea and post-diarrhea periods (a). The pre-diarrhea last from day 0 to day 5, diarrhea from day 6 to day 9 and post-diarrhea period from day 10 today 16. Results are expressed as mean ± SEM (n = 24 animals/group). Statistical differences: * *vs.* REF, # *vs.* RV, Φ *vs.* RV+PRE, Δ *vs.* RV+POST. REF: reference group; RV: rotavirus group; RV+PRE: rotavirus group supplemented with a mixture of scGOS/lcFOS; RV+POST: rotavirus group supplemented with Lactofidus™; RV+P/P: rotavirus group supplemented with the combination of both.

3.4 Intestinal permeability

With respect to the intestinal permeability assay (Figure 4b) performed during the peak of the diarrheic process (day 8), the A1AT levels in the gut of RV animals was similar to the REF. However, RV+PRE and RV+P/P groups had a lower A1AT concentration compared to both REF and RV groups ($p<0.05$). No changes were observed in the RV+POST group.

3.5 Fecal SA-11 shedding and blocking assay

The viral shedding in feces (Figure 5a) was determined by ELISA at day 8, which corresponded to the day of maximum elimination of the virus [11]. As expected, an increase in SA-11 particles in feces was observed in the RV group. This increase was drastically reduced in RV+PRE and RV+P/P groups ($p<0.05$). In contrast, although not statistically different, a tendency to increase the concentration of viral particles was detected in RV+POST with respect to the RV group ($p=0.06$).

To assess the binding activity of scGOS/lcFOS and Lactofidus™, an in-house in vitro blocking assay was performed (Figure 5b). The highest percentage of inhibition of the RV+PRE, RV+POST and RV+P/P was 17%, 28% and 38%, respectively at the ½ dilution of the dose used in the in vivo study. Moreover, the combination of the prebiotic and the postbiotic showed a dose-dependent inhibition of RV detection.

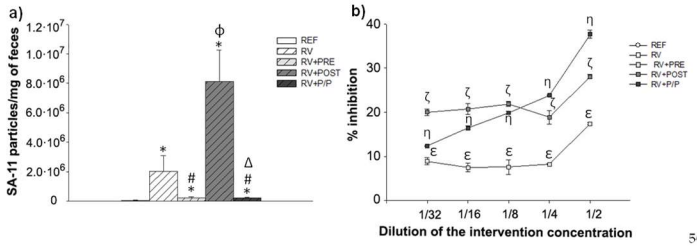


Figure 5. Viral shedding in feces (a), and blocking activity of the supplements, which was tested by an in-house in vitro blocking assay (b). Results are expressed as mean ± SEM (n = 24 animals/group. Statistical differences: * *vs.* REF, # *vs.* RV, Φ *vs.* RV+PRE, Δ *vs.* RV+POST (a) and ζ RV+PRE *vs.* RV, ϛ RV+POST *vs.* RV and η RV+P/P *vs.* RV (b). REF: reference group; RV: rotavirus group; RV+PRE: rotavirus group supplemented with a mixture of scGOS/lcFOS; RV+POST: rotavirus group supplemented with Lactofidus™; RV+P/P: rotavirus group supplemented with the combination of both.

3.6 Antibody production

The quantity of total anti-RV and IgM-anti RV antibodies in the plasma of suckling rats was measured at the end of the study (day 16). As can be observed in Figure 6a, the total anti-RV antibody levels were not modified due to the RV infection nor the supplementations, although a tendency to increase the levels of total anti-RV antibodies was found in RV+POST group compared to RV animals ($p=0.09$). With regard to the IgM anti-RV antibodies (Figure 6b), RV and RV+PRE groups showed higher levels than REF animals ($p<0.05$), whereas there was only a tendency to increase the levels in the RV+POST and RV+P/P groups compared to REF animals ($p=0.06$ in both cases). No differences were found between supplemented groups and RV animals.

The RV as well as the supplementations induced some changes in the Ig levels and only the levels of IgM were the least affected. A reduction in the plasma levels of IgA, IgG1 (Th2-associated isotype) and IgG2a (Th2-associated isotype) was observed in all groups with respect to the REF group and a reduction in IgG2c (Th1-associated isotype) was observed in all supplemented groups compared to REF ones and IgG2b (Th1-associated isotype) was reduced in RV+POST and RV+P/P compared to REF group ($p<0.05$). Therefore, the Th1/Th2 ratio increased in the RV and RV+PRE groups with respect to REF animals. This increase was not observed in the RV+POST and the RV+P/P, which were able to maintain the REF values.

3.7 Gene expression analysis

To further study the effect of the different supplementations on the intestinal function including intestinal barrier, the cross-talk with the microbiota, IgA production and intestinal maturation, the gene expression of different genes on day 16 was measured in the small intestine (Figure 7). The RV did not induce any change in all the genes assayed, however the supplementations modifed the expression of some of them. With regard to the mucins evaluated, only the RV+POST group showed an increase in the relative gene expression of MUC2 ($p<0.05$). In contrast, MUC3 showed higher values in the RV+PRE and RV+P/P groups compared to the REF and RV groups ($p<0.05$). No differences were observed in the relative gene expression of tight junction (TJ) proteins Cldn2, Cldn4 and Ocln.

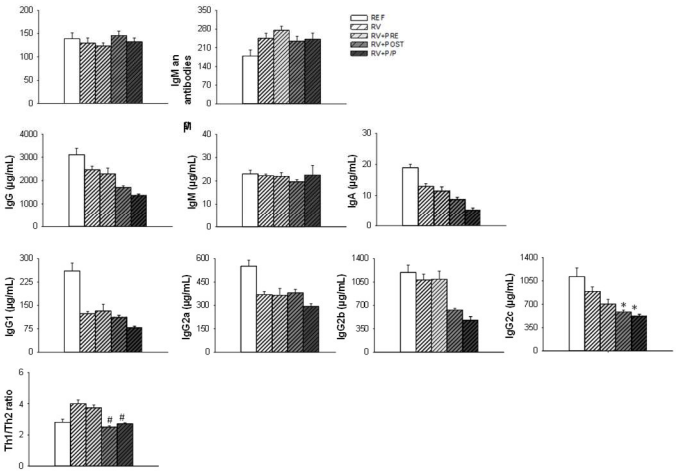


Figure 6. Concentration of total anti-RV antibodies (a), IgM anti-RV (b) and immunoglobulins in plasma (c-i) at the end of the study (day 16). Th1/Th2 ratio refers to the relationship between IgG2b+IgG2c and IgG1+IgG2a (j). Results are expressed as mean ± SEM (n = 12). Statistical differences: * *vs.* REF, # *vs.* RV, Φ *vs.* RV+PRE, △ *vs.* RV+POST. REF: reference group; RV: rotavirus group; RV+PRE: rotavirus group supplemented with a mixture of scGOS/lcFOS; RV+POST: rotavirus group supplemented with Lactofidus™; RV+P/P: rotavirus group supplemented with the combination of both.

No differences were observed in the relative expression of IgA, although a tendency to increase the levels was found in RV+PRE group compared to REF and RV animals (p=0.08 and p=0.07, respectively). With regard to the relative gene expression of intestinal maturation molecules (FcRn and Blimp-1) only a reduction in FcRn was observed in the RV+P/P group compared to RV animals. No differences were observed in the relative expression of IgA and Blimp-1 among groups, although a tendency to increase the levels of IgA was found in RV+PRE group compared to REF and RV animals (p=0.08 and p=0.07, respectively).

Finally, some changes in the relative gene expression of TLRs were observed, mainly in the RV+P/P group. An increase in RV+POST and RV+P/P was observed in TRL2 compared to REF (x1.9 and 3.5 times, respectively; $p<0.05$) and RV (x1.7 and x3.2 times, respectively; $p<0.05$) animals. Higher expression levels of TLR3 were found in RV+PRE, RV+POST and RV+P/P compared to the REF group (x1.5, x1.6, x2.5 times, respectively; $p<0.05$) and also were higher comparing RV+P/P to RV, RV+PRE and RV+POST animals ($p<0.05$). The RV+POST group showed an increase in the relative gene expression of TLR4 compared to the REF group (x1.6 times; $p<0.05$), whereas a tendency to increase was observed in RV+PRE and RV+P/P compared to REF animals (p=0.07 and p=0.08, respectively). Although no changes were observed in TLR5's expression compared to the REF and RV groups, RV+POST showed higher expression levels compared to RV+PRE ($p<0.05$) and tended to increase compared to REF levels (p=0.06). The RV+P/P was the only group that showed an increase in TLR 7 and TLR 9 (x2.9 and x2.2 times, respectively compared to REF group, and x2.3 and x2 times, respectively compared to RV animals; $p<0.05$).

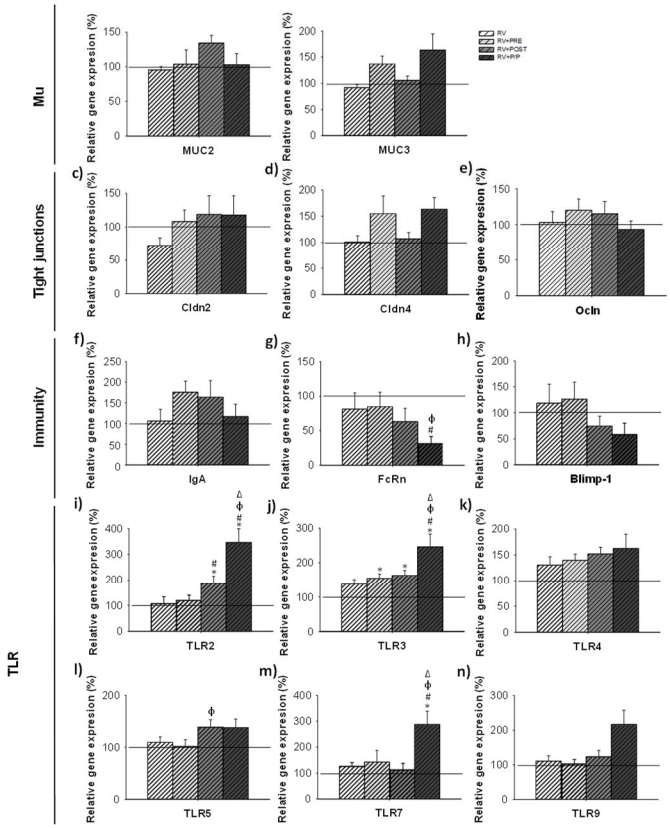


Figure 7. Relative gene expression of mucin (MUC) 2 (a) and MUC 3 (b), TJ proteins claudin (Cldn) 2, Cldn4 (c and d, respectively) and occludin (Ocln) (e), immunity related molecules IgA (f), FcRn (g) and Blimp-1 (h) and Toll like receptors (TLR) 2 (i), TLR3 (j), TLR4 (k), TLR5 (l), TLR7 (m) and TLR9 (n) was quantified by real-time PCR on day 16. Relative gene expression was calculated with respect to REF animals, which corresponded to 100% of transcription. Results are expressed as mean ± S.E.M. (n = 9 animals/group). Statistical differences: * *vs.* REF, # *vs.* RV, ϕ *vs.* RV+PRE, Δ *vs.* RV+POST. REF: reference group; RV: rotavirus group; RV+PRE: rotavirus group supplemented with a mixture of scGOS/lcFOS; RV+POST: rotavirus group supplemented with Lactofidus™; RV+P/P: rotavirus group supplemented with the combination of both.

3.8 Colorectal microbiota composition

The colorectal microbiota composition was analyzed on day 8 (Figure 8). The alpha diversity of microbial populations was measured by the richness, Pielou's evenness and Shannon's indexes (Figure 8 a, b, c, respectively). As can be observed in Figure 8a, the RV+P/P group showed a reduction in richness compared to REF animals. Moreover, the Shannon index of RV+POST was lower than that of RV+PRE animals (Figure 8c). No

changes were observed in Pielou's evenness between groups. Beta diversity was calculated measuring the Unweighted Unifrac distance (Figure 8d). In this analysis, rats from the REF group had a tendency to form a cluster apart from the other animals (RV, RV+PRE, RV+POST and RV+P/P groups) who showed similar beta diversity distances.

To further characterize the microbiota a presence/absence analysis of bacterial groups after the different supplementations was performed and visualized with Venn diagrams. This presence/absence analysis was restrictive, and only when a bacterial family was detected in all the animals of a group then this bacterial family considered as present in the group (Figure 8f). Only three families were present using this approach in all groups, thus being in the core of the Venn diagram: *Enterobacteriaceae*, *Lactobacillaceae*, and *Xanthobacteraceae*. Only in the RV+P/P group the family *Erypelotritrichaeae* was considered to be present. All supplemented groups and REF but not RV animals showed the presence of the *Staphylococcaceae* family. In addition, *Micrococcaceae* was found in REF, RV+PRE and RV+P/P. *Rhizobiaceae* was observed in RV, RV+PRE and RV+POST, whereas *Clostridiaceae 1* was found in RV and RV+P/P groups. *Streptococcaceae* was present only in RV+POST and RV+P/P. Finally, *Sphingomonadaceae* and *Chitinophagaceae* were not found in RV+P/P.

As we observed at family level, no differences were found between REF and RV animals in genus level. However, supplemented groups showed different relative proportions of bacteria (Figure 8g). The relative proportion of *Escherichia-Shigella* increased in all supplemented groups, whereas *Romboutsia* decreased in comparison to REF and RV animals ($p<0.05$). *Lactobacillus* levels decreased in RV+PRE compared to RV group ($p<0.05$). RV+POST group showed reduced levels of *Rothia* compared to REF animals ($p<0.05$). *Enterobacter* proportion decreased in RV+POST and RV+P/P compared to REF and RV groups ($p<0.05$). Finally, a reduction in *Bradyrhizobium* was found in RV+POST and RV+P/P compared to RV group ($p<0.05$). In addition, many minority genera were also affected by the infection and by the nutritional interventions (Supplementary Table 5).

With regard to the presence/absence analysis performed by Venn diagrams, only two genera (*Lactobacillus* and *Bradyrhizobium*) were present in the core of the Venn diagram using this restrictive approach. RV+P/P group had the exclusive presence of the genera *Turicibacter*. In addition, *Streptococcus* and *Escherichia-Shigella* were found only in RV+POST and RV+P/P. *Rothia* was found in REF, RV+PRE and RV+P/P. As we observed at family level, all supplemented groups and REF rats showed the *Staphylococcus* genre (Figure 8h).

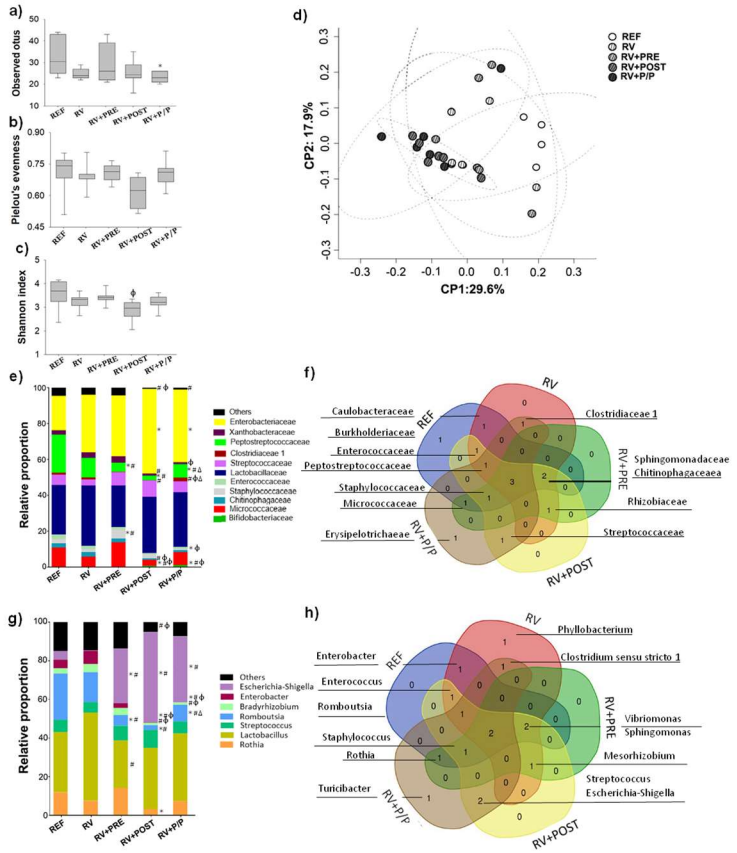


Figure 8. Assessment of fecal microbiota composition on day 8. The sequencing of the amplicon targeting the V3-V4 variable region of the 16S rRNA was performed using the Illumina Miseq sequencing 300x2 approach. The alpha diversity was represented by the richness (a), Pielou's evenness (b) and Shannon's indexes (c). The beta diversity was calculated measuring the Unweighted Unifrac distance (d). The main taxonomic group abundances corresponding to family (e) and genera (g) were represented in stacked bars. The qualitative assessment of microbiota was represented in a Venn Diagram at the level of family (f) and genera (h). In this last approach, a bacterial group was considered as present when all 6 animals displayed proportions higher than 0.001%, while the bacterial groups detected in less animals or in lower proportion were regarded as absent. Results derived from n = 6 animals/ group. Statistical differences: **vs.* REF, $^{\#}$*vs.* RV, $^{\phi}$*vs.* RV+PRE, $^{\Delta}$*vs.* RV+POST. REF: reference group; RV: rotavirus group; RV+PRE: rotavirus group supplemented with a mixture of scGOS/ lcFOS; RV+POST: rotavirus group supplemented with Lactofidus™; RV+P/P: rotavirus group supplemented with the combination of both.

3.9 Quantification of short-chain fatty acids

The amount of total SCFA and acetic, propionic, isobutyric, butyric, isovaleric and valeric acid proportion in the cecum of the suckling rats was measured on day 16 (Table 3).

Table 3. SCFA production in cecal samples at the end of the study (day 16).

	REF	RV	RV+PRE	RV+POST	RV+P/P
SCFA (µmol/g)	29019.90 ± 4043.90	25353.06 ± 2889.38	30680.63 ± 2873.36	27726.29 ± 3082.71	39014.80 ± 7066.49
Acetic acid (%)	89.26 ± 1.29	89.35 ± 1.59	97.00 ± 0.52 $^{*\#}$	91.47 ± 1.12 $^{\Phi}$	96.44 ± 0.52 $^{*\#\Delta}$
Propionic acid (%)	9.36 ± 1.11	9.09 ± 1.37	2.23 ± 0.44 $^{*\#}$	6.91 ± 0.96 $^{\Phi}$	1.71 ± 0.29 $^{*\#\Delta}$
Isobutyric acid (%)	0.28 ± 0.04	0.19 ± 0.03	0.08 ± 0.02 $^{*\#}$	0.22 ± 0.03 $^{\Phi}$	0.16 ± 0.04
Butyric acid (%)	0.86 ± 0.17	1.12 ± 0.32	0.56 ± 0.17	1.14 ± 0.28 $^{\Phi}$	1.50 ± 0.36 $^{\Phi}$
Isovaleric acid (%)	0.20 ± 0.03	0.19 ± 0.03	0.10 ± 0.01 $^{*\#}$	0.21 ± 0.03 $^{\Phi}$	0.12 ± 0.02 $^{\Delta}$
Valeric acid (%)	0.06 ± 0.02	0.07 ± 0.01	0.10 ± 0.02	0.05 ± 0.01	0.11 ± 0.02 $^{*\Delta}$

Results are represented as mean ± SEM (n = 12 samples/group). Total SCFA are expressed as µmol/g of dry feces Statistical differences: * *vs.* REF, $^{\#}$ *vs.* RV, $^{\Phi}$ *vs.* RV+PRE, $^{\Delta}$ *vs.* RV+POST. REF: reference group; RV: rotavirus group; RV+PRE: rotavirus group supplemented with a mixture of scGOS/lcFOS; RV+POST: rotavirus group supplemented with Lactofidus™; RV+P/P: rotavirus group supplemented with the combination of both.

The total SCFA levels in the cecum was similar between groups. However, the percentage of acetic acid was higher in RV+PRE and RV+P/P compared to REF and RV animals ($p<0.05$). On the other hand, the proportion of propionic, isobutyric and isovaleric were lower in RV+PRE compared to REF and RV whereas RV+P/P only showed a reduction in propionic acid compared to REF, RV and RV+POST animals ($p<0.05$). Moreover, RV+P/P increased the proportion of valeric acid compared to REF and RV+POST animals ($p<0.05$). No differences were observed in RV and RV+POST compared to the REF group. However, changes in all SCFAs except valeric acid were found between RV+POST and RV+PRE groups ($p<0.05$).

4. Discussion

RV is the main etiological agent of acute gastroenteritis in children. Vaccination, oral rehydration and dietary interventions are used as preventive and therapeutical treatments to manage gastrointestinal symptoms [1,4]. In the present work, scGOS-lcFOS, Lactofidus™ and their combination have been evaluated on a model of early life RV infection in suckling rats.

Despite the fact that RV infection causes intestinal malabsorption, which is normally associated with fluid loss and dehydration, inducing a reduction in the body weight, in the present study, the moderate diarrhea induced by RV SA-11 strain did not lead to a weight loss as in previous studies [13,27,32,37]. In this regard, supplemented animals showed a higher body weight compared to REF animals and also a higher body growth of RV+POST and RV+P/P animals. In previous studies from our group using this model a nutritional intervention, with scGOS-lcFOS slightly increased [13] or did not have an impact on body weight [11,27]. Moreover, other researchers did not find changes in body weight and growth in pre-weaning rats supplemented with scGOS-Inulin [37]. The impact of Lactofidus™ on growth has also been studied in healthy babies [8]. In infants fed with infant formula with Lactofidus™ and oligosaccharides, a positive effect on height with respect to each product alone has been found [44]. On the other hand, in the present study a trophic effect on small and large intestine was observed in all supplemented groups, along with an increase in spleen (RV+POST and RV+P/P animals) and thymus (RV+POST group) weight. A previous study from our group also observed that fermented milk combined with scGOS-lcFOS had a trophic effect on the intestines of suckling rats [37]. In

accordance with our work, F. Indrio et al. observed that fermented formula in healthy infants increased thymus size compared to infants fed with standard infant formula [45]. The increase in thymus size, as well as that of spleen could be linked to a better immune development and response to infection. [46].

With regard to clinical signs, all supplemented groups showed a reduction in the incidence and severity of diarrhea analyzed either by the score or the fecal weight obtained. The prebiotic mixture alone induced softened stools thus masking its effect against the RV, therefore, results were normalized as previously performed [27]. In addition, all the supplemented groups showed a reduction in the duration of diarrhea, suggesting the postbiotic, the prebiotic mixture and also the combination as useful tools in the diarrhea prevention repertoire. These positive results agree with previous studies, in which we also observed these changes after scGOS/lcFOS supplementation [13,27]. In addition, in one study, infants that were fed with infant formula fermented with *Bifidobacterium breve* c50 and *Streptococcus thermophilus* 065 also showed a reduction in the severity of diarrhea [47]. Besides the effect, the mechanisms of action of the interventions were evaluated.

On the one hand, we found that the POST reduced fecal pH of infected animals and that all interventions induce a reduction in the pH of the stomach content. Very few data are found in the literature regarding the effect of these compounds in this last compartment, either in animals or in humans. This result may suggest a positive effect on the prevention of pathogens' entry into the gastrointestinal tract similar to that of the lower fecal pH [48,49] and could explain the prevention of diarrhea in the supplemented groups.

Another possible mechanism involved in the amelioration of diarrhea could be the improvement in the intestinal barrier function conferring higher resistance to infection. It is well known that plasma levels of A1AT are elevated during the inflammatory response and can be transported to the intestinal lumen due to the increased permeability of the intestinal epithelial barrier [50]. Therefore, the lower levels of A1AT found in RV+PRE and RV+P/P groups could be due to an enhanced barrier effect thus protecting them from RV infection. In this regard, a previous study from our group also observed a decrease in the A1AT levels in suckling rats supplemented with scGOS/lcFOS and 2'-fucosyllactose [13]. Moreover, other researchers have demonstrated an improvement in the intestinal barrier in obese adults treated with scGOS [51].

The viral shedding reflects the viral particles produced in the intestine. RV+PRE and RV+P/P groups showed a drastic reduction in fecal SA-11 particles, which could be due to the scGOS/lcFOS ability to bind to the virus, as it has been previously reported as an important protection mechanism during RV infection [11,13]. Therefore, scGOS/lcFOS could partially block the pathogen reducing the ability of the RV to infect the host, consequently reducing the severity of diarrhea [11,27]. In contrast, postbiotic supplementation did not reduce the viral shedding, however in vitro it was able to partially block the RV suggesting that the main mechanism of action involved in the amelioration of the diarrhea is different from that of scGOS/lcFOS.

The titer of total anti-RV antibodies at this early age was not found to be increased after RV infection. As we previously reported [13], there is not a clear specific anti-RV Ig response to the virus due to the immaturity of the immune system of suckling rats. However, in the present study we only found that IgM anti-RV plasma levels increased in RV+PRE compared to the REF group. In previous work by our group we also found this increase in scGOS/lcFOS supplemented rats [27], however in another study we did not observe this [13]. The higher IgM anti-RV levels in this group could suggest that scGOS/lcFOS supplementation is inducing the maturation of immune system.

The Ig profile changed in the supplemented groups, with IgG and IgA levels reduced in all supplemented groups. In line with this, we previously showed a reduction in IgG1 plasma levels of suckling rats supplemented with scGOS/lcFOS [13]. Furthermore, it was reported that fermented milk combined with scGOS/lcFOS increased the levels of IgG (on

day 14 of life) and reduced the levels of IgG (on day 21) and IgA (on day 14) [37]. However, the most interesting issue is the overall control by the products of the RV-induced shift to Th1 response, especially those with the postbiotic. In this sense, the Th1/Th2 ratio associated Ig (Th1/Th2 ratio refers to the relationship between IgG2b+IgG2c and IgG1+IgG2a) which was raised by the RV infection in a attempt to control the infection was not found in RV+POST and RV+P/P groups. This may suggest that interventions by reducing the infection were consequently avoiding the activation of the pro-inflammatory Th1 response activated due to the RV. To further study the mechanisms responsible for the amelioration of the diarrhea induced by the supplements, we measured the gene expression of genes involved in the barrier function and maturation of the intestine. In the intestine, goblet cells form gel-forming mucins like MUC2 and enterocytes express transmembrane MUC3 [52]. Along with other immune components, the mucus and the glycocalix limit the number of intact bacteria that can reach the epithelium. The postbiotic increased the levels of MUC2 whereas scGOS/lcFOS combined or not with Lactofidus™ induced the expression of MUC3. These effects in the infection context on the expression of MUC genes agree with those found in a healthy model of suckling rats [23].We also observed that scGOS/lcFOS reduced the levels of MUC2 in 8-day-old suckling rats [13], however other studies did not observe those changes in MUC2 and MUC3 after scGOS or lcFOS intervention either in rats or in mice [53,54]. On the contrary, in an in vitro approach, S. Figueroa-Lozano et al. reported that scGOS containing lactose incremented the expression of MUC2 in LS174T cells [55]. The enhancement of both mucins observed in this study suggests a reinforcement of the intestinal barrier function of the suckling rats that may explain the amelioration of the RV-induced diarrhea. This reinforcement might be only at the mucus level because no differences were observed in TJ proteins such as Cldn2, Cldn4 and Ocln gene expression, as also observed in a healthy environment [23]. TJ proteins present in the basolateral membrane of the enterocytes form a barrier that, among other functions, protect the organisms against the entry of pathogens [56,57]. In agreement with our results, Alizadeh et al. did not observe changes in Cldn1-4 in piglets supplemented with scGOS, however they did observe an increase in the expression of Ocln [58]. In contrast, a previous study from our group showed an increase in Cldn2 in rats infected with SA-11 and supplemented with scGOS/lcFOS [13].

The expression of genes related to immune maturation and regulation (IgA, FcRn and Blimp-1) were also studied. The levels of FcRn were reduced in the RV+P/P group, indicating an increase in the maturation of the intestine of these animals as it has been reported that lower levels of FcRn correlate with a higher level of intestinal epithelial barrier maturation [59]. In this study, the postbiotic or scGOS/lcFOS alone did not modify the expression of these genes, in line with that found in a recent study in healthy suckling rats [23]. TLRs are pattern recognition receptors that play a role in the induction of innate immune and inflammatory responses [60]. An increase in TLR gene expression was observed, and some differences regarding the induced changes in noninfected vs. infected rats appeared [23]. In the infection scenario, the combination – but not the products alone – was able to increase the expression of TLR7 and TLR9 genes. This effect could suggest that the combination of scGOS/lcFOS and Lactofidus™ is more effective in enhancing the immune system to fight against infections than the prebiotics or the postbiotics alone.

Gut microbiota composition was also evaluated to study the effects of prebiotic and/or postbiotic supplements in the RV-induced animal model. The alpha diversity of the microbial population showed that RV+P/P decreased the number of observed OTUs compared to those of the REF group. Thus, although a great impact of the infection or the products was not observed, again, the combination is more effective than the products alone, which is in line with a previous study [23]. In the present study, changes in microbial composition were found due to interventions. *Bifidobacteriaceae*, suggesting the prebiotic effect of these compounds, and *Enterobacteriaceae* families increased in RV+POST and RV+P/P. If we focus on the genus level of these bacteria families, *Escherichia-Shigella* was increased in all supplemented animals. These groups are usually present in infant

faeces but their role in early life is not well stablished. It is difficult then to conclude the impact of the change observed due to the postbiotic intervention. However, a reduction in *Escherichia-Shigella* abundance in diarrheal neonatal piglets with respect to their healthy siblings has been reported [61]. Thus, the increase in *Escherichia-Shigella* in all supplemented groups makes us consider that this genus could promote some positive effect during the RV infection. This effect will need further attention in future studies.

With regard to SCFA production, none of the supplementations modified the total amount of SCFAs. However, some changes were observed in their proportion. In agreement with our results, the presence of scGOS/lcFOS in an infant formula changed the SCFA pattern, increasing the proportion of acetate and reducing the proportion of propionate and other SCFAs [44]. Furthermore, infants fed with a fermented infant formula with *Bifidobacterium breve C50* and *Streptococcus thermophilus O65* and/or the prebiotics scGOS/lcFOS had lower isovaleric acid levels, although they also found reduced levels in butyric acid in the fermented infant formula with the postbiotics and prebiotics [62]. Previous work by our group showed a reduction in the total SCFAs and in the concentration of acetic, isobutyric, butyric and isovaleric acids after scGOS/lcFOS supplementation [13]. These differences could be explained by the fact that in the present study we took into consideration the weight of dry cecal content after 12 h in a stove and the amount of water used in the previous homogenization to avoid the effect of the type of supplement in the quantification of the SCFAs. In fact, in a recent paper, using this approach in a non-infection model, the interventions did not affect the cecal levels of SCFA [23]

5. Conclusions

In conclusion, the supplementation of suckling rats with scGOS/lcFOS, Lactofidus™ and their combination prevented and ameliorated the diarrhea caused by RV. All supplementations showed changes in the immunoglobulin profile, intestinal gene expression and gut microbiota. scGOS/lcFOS and Lactofidus™ seem to ameliorate the diarrhea through different mechanisms. The prebiotic mixture reduced gut permeability and changed the SCFA profile. On the other hand, the postbiotic enhanced the expression of TLRs and reduced pH in feces. The combination of scGOS/lcFOS and Lactofidus™ kept most individually observed effects and even showed effects that were not seen separately (i.e., increase in white blood cells and lymphocytes recruitment and upregulation of TLR7 and TLR9 gene expression). The use of both products has been a good strategy to improve the prevention and treatment in the early life rotavirus induced diarrhea rat model, thus this combination could be suggested as a good candidate to be used in infants' formulas for this purpose.

Author Contributions: Conceptualization, Francisco J. Pérez-Cano; Data curation, Carla Morales-Ferré, Sebastian Tims, Johan Garssen and Jan Knol; Formal analysis, Carla Morales-Ferré; Funding acquisition, Karen Knipping and Francisco J. Pérez-Cano; Investigation, Carla Morales-Ferré, Ignasi Azagra-Boronat, Malén Massot-Cladera, Àngels Franch, Margarida Castell, Maria J. Rodríguez-Lagunas and Francisco J. Pérez-Cano; Project administration, Francisco J. Pérez-Cano; Supervision, Maria J. Rodríguez-Lagunas and Francisco J. Pérez-Cano; Validation, Sebastian Tims, Karen Knipping, Johan Garssen, Jan Knol and Francisco J. Pérez-Cano; Writing – original draft, Carla Morales-Ferré, Maria J. Rodríguez-Lagunas and Francisco J. Pérez-Cano; Writing – review & editing, Ignasi Azagra-Boronat, Malén Massot-Cladera, Sebastian Tims, Karen Knipping, Johan Garssen, Jan Knol, Àngels Franch, Margarida Castell, Maria J. Rodríguez-Lagunas and Francisco J. Pérez-Cano. All authors read and approved the final version of the manuscript for publication.

Funding: This study was supported by a grant from Danone Nutricia Research (FBG309956).

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the Ethical Committee for Animal Experimentation of the University of Barcelona and the Catalonia Government (CEEA/Ref. 255/18 and PAMN/Ref.10176, respectively).

Data Availability Statement: The datasets generated and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Acknowledgments: The authors thank the Genomic Unit of the CCiTUB and Microomics for their support and assistance in the gene expression and microbiota composition analysis, respectively..

Conflicts of Interest: The authors declare that they have a financial relationship with the organization that sponsored the research. KK, ST and JK are employees of Danone Nutricia Research. JG is head of the Division of Pharmacology, Utrecht Institute for Pharmaceutical Sciences, Faculty of Science at the Utrecht University and partly employed by Danone Nutricia Research. The other authors declare that they have no conflicts of interest.

References

1. Crawford, S. E.; Ramani, S.; Tate, J. E.; Parashar, U. D.; Svensson, L.; Hagbom, M.; Franco, M. A.; Greenberg, H. B.; O'Ryan, M.; Kang, G.; Desselberger, U.; Estes, M. K. Rotavirus Infection. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **2017**, *3*; DOI:10.1038/nrdp.2017.83.

2. Lundgren, O.; Svensson, L. Pathogenesis of Rotavirus Diarrhea. *Microbes and Infection*, 2001, *3*, 1145–1156; DOI:10.1016/S1286-4579(01)01475-7.

3. Greenberg, H. B.; Estes, M. K. Rotaviruses: From Pathogenesis to Vaccination. *Gastroenterology* **2009**, *136* (6), 1939–1951; DOI:10.1053/j.gastro.2009.02.076.

4. Sadiq, A.; Bostan, N.; Yinda, K. C.; Naseem, S.; Sattar, S. Rotavirus: Genetics, Pathogenesis and Vaccine Advances. *Rev. Med. Virol.* **2018**, *28* (6), 1–13; DOI:10.1002/rmv.2003.

5. Prashar, U. D.; Nelson, E. A. S.; Kang, G. Diagnosis, Management, and Prevention of Rotavirus Gastroenteritis in Children. *BMJ* **2018**, *347*.

6. Martin, C. R.; Ling, P. R.; Blackburn, G. L. Review of Infant Feeding: Key Features of Breast Milk and Infant Formula. *Nutrients*. 2016, pp 1–11; DOI:10.3390/nu8050279.

7. Fernández, L.; Langa, S.; Martín, V.; Maldonado, A.; Jiménez, E.; Martín, R.; Rodríguez, J. M. The Human Milk Microbiota: Origin and Potential Roles in Health and Disease. *Pharmacol. Res.* **2013**, *69* (1), 1–10; DOI:10.1016/j.phrs.2012.09.001.

8. Szajewska, H.; Skórka, A.; Pieścik-Lech, M. Fermented Infant Formulas without Live Bacteria: A Systematic Review. *Eur. J. Pediatr.* **2015**, *174* (11), 1413–1420; DOI:10.1007/s00431-015-2629-y.

9. Salminen, S.; Stahl, B.; Vinderola, G.; Szajewska, H. Infant Formula Supplemented with Biotics: Current Knowledge and Future Perspectives. *Nutrients* **2020**, *12* (7), 1–20; DOI:10.3390/nu12071952.

10. Gibson, G. R.; Hutkins, R.; Sanders, M. E.; Prescott, S. L.; Reimer, R. A.; Salminen, S. J.; Scott, K.; Stanton, C.; Swanson, K. S.; Cani, P. D.; Verbeke, K.; Reid, G. Expert Consensus Document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) Consensus Statement on the Definition and Scope of Prebiotics. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2017**, *14* (8), 491–502; DOI:10.1038/nrgastro.2017.75.

11. Rigo-Adrover, M.; Pérez-Berezo, T.; Ramos-Romero, S.; van Limpt, K.; Knipping, K.; Garssen, J.; Knol, J.; Franch, À.; Castell, M.; Pérez-Cano, F. J. A Fermented Milk Concentrate and a Combination of Short-Chain Galacto-Oligosaccharides/Long-Chain Fructo-Oligosaccharides/Pectin-Derived Acidic Oligosaccharides Protect Suckling Rats from Rotavirus Gastroenteritis. *Br. J. Nutr.* **2017**, *117* (02), 209–217; DOI:10.1017/S0007114516004566.

12. Arslanoglu, S.; Moro, G. E.; Schmitt, J.; Tandoi, L.; Rizzardi, S.; Boehm, G. Early Dietary Intervention with a Mixture of Prebiotic Oligosaccharides Reduces the Incidence of Allergic Manifestations and Infections during the First Two Years of

Life. *J. Nutr.* **2008**, *138* (6), 1091–1095; DOI:10.1093/jn/138.6.1091.

13. Azagra-Boronat, I.; Massot-Cladera, M.; Knipping, K.; Van't Land, B.; Stahl, B.; Garssen, J.; Rodríguez-Lagunas, M. J.; Franch, À.; Castell, M.; Pérez-Cano, F. J. Supplementation With 2′-FL and ScGOS/LcFOS Ameliorates Rotavirus-Induced Diarrhea in Suckling Rats. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2018**, *8* (October), 372; DOI:10.3389/fcimb.2018.00372.

14. Bruzzese, E.; Volpicelli, M.; Squeglia, V.; Bruzzese, D.; Salvini, F.; Bisceglia, M.; Lionetti, P.; Cinquetti, M.; Iacono, G.; Amarri, S.; Guarino, A. A Formula Containing Galacto- and Fructo-Oligosaccharides Prevents Intestinal and Extra-Intestinal Infections: An Observational Study. *Clin. Nutr.* **2009**, *28* (2), 156–161; DOI:10.1016/j.clnu.2009.01.008.

15. Salminen, S.; Collado, M. C.; Endo, A.; Hill, C.; Lebeer, S.; Quigley, E. M. M.; Sanders, M. E.; Shamir, R.; Swann, J. R.; Szajewska, H.; Vinderola, G. The International Scientific Association of Probiotics and Prebiotics (ISAPP) Consensus Statement on the Definition and Scope of Postbiotics. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2021**, *0123456789*; DOI:10.1038/s41575-021-00440-6.

16. Shin, D.; Chang, S. Y.; Bogere, P.; Won, K. H.; Choi, J. Y.; Choi, Y. J.; Lee, H. K.; Hur, J.; Park, B. Y.; Kim, Y.; Heo, J. Beneficial Roles of Probiotics on the Modulation of Gut Microbiota and Immune Response in Pigs. *PLoS One* **2019**, *14* (8), 1–23; DOI:10.1371/journal.pone.0220843.

17. Wegh, C. A. M.; Geerlings, S. Y.; Knol, J.; Roeselers, G.; Belzer, C. Postbiotics and Their Potential Applications in Early Life Nutrition and Beyond. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20* (19); DOI:10.3390/ijms20194673.

18. Borriello, S. P.; Hammes, W. P.; Holzapfel, W.; Marteau, P.; Schrezenmeir, J.; Vaara, M.; Valtonen, V. Safety of Probiotics That Contain Lactobacilli or Bifidobacteria. *Clin. Infect. Dis.* **2003**; DOI:10.1086/368080.

19. Rowan, N. J.; Deans, K.; Anderson, J. G.; Gemmell, C. G.; Hunter, I. S.; Chaithong, T. Putative Virulence Factor Expression by Clinical and Food Isolates of Bacillus Spp. after Growth in Reconstituted Infant Milk Formulae. *Appl. Environ. Microbiol.* **2001**, *67* (9), 3873–3881; DOI:10.1128/AEM.67.9.3873-3881.2001.

20. Gueimonde, M.; Sánchez, B.; de los Reyes-Gavilán, C. G.; Margolles, A. Antibiotic Resistance in Probiotic Bacteria. *Front. Microbiol.* **2013**, *4* (JUL), 1–6; DOI:10.3389/fmicb.2013.00202.

21. de Almada, C. N.; Almada, C. N.; Martinez, R. C. R.; Sant'Ana, A. S. Paraprobiotics: Evidences on Their Ability to Modify Biological Responses, Inactivation Methods and Perspectives on Their Application in Foods. *Trends Food Sci. Technol.* **2016**, *58*, 96–114; DOI:10.1016/j.tifs.2016.09.011.

22. Malagón - rojas, J. N.; Mantziari, A.; Salminen, S.; Szajewska, H. Postbiotics for Preventing and Treating Common Infectious Diseases in Children: A Systematic Review. *Nutrients* **2020**, *12* (2); DOI:10.3390/nu12020389.

23. Morales-ferré, C.; Azagra-boronat, I.; Massot-cladera, M.; Tims, S.; Knipping, K.; Garssen, J.; Knol, J.; Franch, À.; Castell, M.; Rodriguez, M. J.; Pérez-Cano, F. J. Effects of a Postbiotic and Prebiotic Mixture on Suckling Rats' Microbiota and Immunity. *Nutrients* **2021**, *13* (2975), 1–22; DOI:doi.org/10.3390/nu13092975.

24. Gao, J.; Li, Y.; Wan, Y.; Hu, T.; Liu, L.; Yang, S.; Gong, Z.; Zeng, Q.; Wei, Y.; Yang, W.; Zeng, Z.; He, X.; Huang, S. H.; Cao, H. A Novel Postbiotic from Lactobacillus Rhamnosus GG with a Beneficial Effect on Intestinal Barrier Function. *Front. Microbiol.* **2019**, *10* (MAR), 1–14; DOI:10.3389/fmicb.2019.00477.

25. Popović, N.; Djokić, J.; Brdarić, E.; Dinić, M.; Terzić-Vidojević, A.; Golić, N.; Veljović, K. The Influence of Heat-Killed Enterococcus Faecium BGPAS1-3 on the Tight Junction Protein Expression and Immune Function in Differentiated Caco-2 Cells Infected with Listeria Monocytogenes ATCC 19111. *Front. Microbiol.* **2019**, *10* (MAR), 1–12; DOI:10.3389/fmicb.2019.00412.

26. Dunand, E.; Burns, P.; Binetti, A.; Bergamini, C.; Peralta, G. H.; Forzani, L.; Reinheimer, J.; Vinderola, G. Postbiotics Produced at Laboratory and Industrial Level as Potential Functional Food Ingredients with the Capacity to Protect Mice against Salmonella Infection. *J. Appl. Microbiol.* **2019**, *127* (1), 219–229; DOI:10.1111/jam.14276.

27. Rigo-Adrover, M.; Saldaña-Ruíz, S.; van Limpt, K.; Knipping, K.; Garssen, J.; Knol, J.; Franch, A.; Castell, M.; Pérez-Cano, F. J. A Combination of ScGOS/LcFOS with Bifidobacterium Breve M-16V Protects Suckling Rats from Rotavirus Gastroenteritis. *Eur. J. Nutr.* **2017**, *56* (4), 1657–1670; DOI:10.1007/s00394-016-1213-1.

28. Isolauri, E.; Juntunen, M.; Rautanen, T.; Sillanaukee, P.; Koivula, T. A Human Lactobacillus Strain (Lactobacillus Casei Sp Strain GG) Promotes Recovery from Acute Diarrhea in Children. *Pediatrics* **1991**, *88* (1), 90–97.

29. Oli, M. W.; Petschow, B. W.; Buddington, R. K. Evaluation of Fructooligosaccharide Supplementation of Oral Electrolyte Solutions for Treatment of Diarrhea. Recovery of the Intestinal Bacteria. *Dig. Dis. Sci.* **1998**, *43* (1), 138–147; DOI:10.1023/A:1018892524790.

30. Reeves, P. G.; Nielsen, F. H.; Fahey, G. C. AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents: Final Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet. *J. Nutr.* **1993**, *123* (11), 1939–1951; DOI:10.1093/jn/123.11.1939.

31. Azagra-Boronat, I.; Massot-Cladera, M.; Mayneris-Perxachs, J.; Knipping, K.; Van't Land, B.; Tims, S.; Stahl, B.; Garssen, J.; Franch, À.; Castell, M.; Rodríguez-Lagunas, M. J.; Pérez-Cano, F. J. Immunomodulatory and Prebiotic Effects of 2'-Fucosyllactose in Suckling Rats. *Front. Immunol.* **2019**, *10* (July), 1773; DOI:10.3389/fimmu.2019.01773.

32. Rigo-Adrover, M. del M.; van Limpt, K.; Knipping, K.; Garssen, J.; Knol, J.; Costabile, A.; Franch, À.; Castell, M.; Pérez-Cano, F. J. Preventive Effect of a Synbiotic Combination of Galacto- and Fructooligosaccharides Mixture with Bifidobacterium Breve M-16V in a Model of Multiple Rotavirus Infections. *Front. Immunol.* **2018**, *9* (JUN); DOI:10.3389/fimmu.2018.01318.

33. Ayechu-Muruzabal, V.; Xiao, L.; Wehkamp, T.; van Ark, I.; Hoogendoorn, E. J.; Leusink-Muis, T.; Folkerts, G.; Garssen, J.; Willemsen, L. E. M.; Van'T Land, B. A Fermented Milk Matrix Containing Postbiotics Supports Th1-and Th17-Type Immunity in Vitro and Modulates the Influenza-Specific Vaccination Response in Vivo in Association with Altered Serum Galectin Ratios. *Vaccines* **2021**, *9* (3), 1–17; DOI:10.3390/vaccines9030254.

34. Abrahamse, E.; Huybers, S.; Alles, M. S.; Renes, I. B.; Knol, J.; Bouritius, H.; Ludwig, T. Fermented Infant Formula Increases Ileal Protein Digestibility and Reduces Ileal Proteolytic Activity Compared with Standard and Hydrolyzed Infant Formulas in Piglets. *J. Nutr.* **2015**, *145* (7), 1423–1428; DOI:10.3945/jn.114.208314.

35. Vandenplas, Y.; de Halleux, V.; Arciszewska, M.; Lach, P.; Pokhylko, V.; Klymenko, V.; Schoen, S.; Abrahamse-Berkeveld, M.; Mulder, K. A.; Rubio, R. P. A Partly Fermented Infant Formula with Postbiotics Including 3′-GL, Specific Oligosaccharides, 2′-FL, and Milk Fat Supports Adequate Growth, Is Safe and Well-Tolerated in Healthy Term Infants: A Double-Blind, Randomised, Controlled, Multi-Country Trial. *Nutrients* **2020**, *12* (11), 1–17; DOI:10.3390/nu12113560.

36. Rodriguez-herrera, A.; Mulder, K.; Bouritius, H.; Rubio, R.; Muñoz, A.; Agosti, M.; Lista, G.; Corvaglia, L.; Ludwig, T.; Abrahamse-berkeveld, M.; Perez-Navero, J. L. Gastrointestinal Tolerance, Growth and Safety of a Partly Fermented Formula with Specific Prebiotics in Healthy Infants: A Double-Blind, Randomized, Controlled Trial. *Nutrients* **2019**, *11*, 1530.

37. Rigo-Adrover, M. D. M.; Knipping, K.; Garssen, J.; van Limpt, K.; Knol, J.; Franch, À.; Castell, M.; Rodríguez-Lagunas, M. J.; Pérez-Cano, F. J. Prevention of Rotavirus Diarrhea in Suckling Rats by a Specific Fermented Milk Concentrate with Prebiotic Mixture. *Nutrients* **2019**, *11* (1); DOI:10.3390/nu11010189.

38. Azagra-Boronat, I.; Massot-Cladera, M.; Knipping, K.; Van't Land, B.; Tims, S.; Stahl, B.; Knol, J.; Garssen, J.; Franch, À.;

Castell, M.; Pérez-Cano, F. J.; Rodríguez-Lagunas, M. J. Oligosaccharides Modulate Rotavirus-Associated Dysbiosis and TLR Gene Expression in Neonatal Rats. *Cells* **2019**, *8* (8), 876; DOI:10.3390/cells8080876.

39. Pérez-Cano, F. J.; Castell, M.; Castellote, C.; Franch, À. Characterization of Clinical and Immune Response in a Rotavirus Diarrhea Model in Suckling Lewis Rats. *Pediatr. Res.* **2007**, *62* (6), 658–663; DOI:10.1203/PDR.0b013e318159a273.

40. Wang, Q.; Garrity, G. M.; Tiedje, J. M.; Cole, J. R. Naïve Bayesian Classifier for Rapid Assignment of RRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy. *Appl. Environ. Microbiol.* **2007**, *73* (16), 5261–5267; DOI:10.1128/AEM.00062-07.

41. Morales-ferré, C.; Azagra-boronat, I.; Massot-cladera, M.; Franch, À.; Castell, M.; Rodríguez-Lagunas, M. J.; Pérez-Cano, F. J. Sexual Dimorphism Has Low Impact on the Response against Rotavirus Infection in Suckling Rats. *Vaccines* **2020**, *8* (345), 1–18; DOI:10.3390/vaccines8030345.

42. Anderson, M. J.; Walsh, D. C. I. PERMANOVA, ANOSIM, and the Mantel Test in the Face of Heterogeneous Dispersions: What Null Hypothesis Are You Testing? *Ecol. Monogr.* **2013**, *83* (4), 557–574; DOI:10.1890/12-2010.1.

43. Mandal, S.; Van Treuren, W.; White, R. A.; Eggesbø, M.; Knight, R.; Peddada, S. D. Analysis of Composition of Microbiomes: A Novel Method for Studying Microbial Composition. *Microb. Ecol. Heal. Dis.* **2015**, *26* (0), 1–7; DOI:10.3402/mehd.v26.27663.

44. Huet, F.; Abrahamse-Berkeveld, M.; Tims, S.; Simeoni, U.; Beley, G.; Savagner, C.; Vandenplas, Y.; Hourihane, J. O. B. Partly Fermented Infant Formulae With Specific Oligosaccharides Support Adequate Infant Growth and Are Well-Tolerated. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **2016**, *63* (4), e43–e53; DOI:10.1097/MPG.0000000000001360.

45. Indrio, F.; Ladisa, G.; Mautone, A.; Montagna, O. Effect of a Fermented Formula on Thymus Size and Stool PH in Healthy Term Infants. *Pediatr. Res.* **2007**, *62* (1), 98–100; DOI:10.1203/pdr.0b013e31806772d3.

46. Bowman, E. P.; Kuklin, N. A.; Youngman, K. R.; Lazarus, N. H.; Kunkel, E. J.; Pan, J.; Greenberg, H. B.; Butcher, E. C. The Intestinal Chemokine Thymus-Expressed Chemokine (CCL25) Attracts IgA Antibody-Secreting Cells. *J. Exp. Med.* **2002**, *195* (2), 269–275; DOI:10.1084/jem.20010670.

47. Thibault, H.; Aubert-Jacquin, C.; Goulet, O. Effects of Long-Term Consumption of a Fermented Infant Formula (with Bifidobacterium Breve C50 and Streptococcus Thermophilus 065) on Acute Diarrhea in Healthy Infants. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **2004**, *39* (2), 147–152; DOI:10.1097/00005176-200408000-00004.

48. Rao, S.; Srinivasjois, R.; Patole, S. Prebiotic Supplementation in Full-Term Neonates. *Arch. Pediatr. Adolesc. Med.* **2009**, *163* (8), 755–764; DOI:10.1001/archpediatrics.2009.94.

49. Beasley, D. E.; Koltz, A. M.; Lambert, J. E.; Fierer, N.; Dunn, R. R. The Evolution of Stomach Acidity and Its Relevance to the Human Microbiome. *PLoS One* **2015**, *10* (7), 1–12; DOI:10.1371/journal.pone.0134116.

50. Yang, X.; Twitchell, E.; Li, G.; Wen, K.; Weiss, M.; Kocher, J.; Lei, S.; Ramesh, A.; Ryan, E. P.; Yuan, L. High Protective Efficacy of Rice Bran against Human Rotavirus Diarrhea via Enhancing Probiotic Growth, Gut Barrier Function, and Innate Immunity. *Sci. Rep.* **2015**, *5* (October), 15004; DOI:10.1038/srep15004.

51. Krumbeck, J. A.; Rasmussen, H. E.; Hutkins, R. W.; Clarke, J.; Shawron, K. Probiotic Bifidobacterium Strains and Galactooligosaccharides Improve Intestinal Barrier Function in Obese Adults but Show No Synergism When Used Together as Synbiotics. **2018**, 1–16.

52. Pelaseyed, T.; Bergström, J. H.; Gustafsson, J. K.; Ermund, A.; Birchenough, G. M. H.; Schütte, A.; van der Post, S.; Svensson, F.; Rodríguez-Piñeiro, A. M.; Nyström, E. E. L.; Wising, C.; Johansson, M. E. V.; Hansson, G. C. The Mucus and Mucins of the Goblet Cells and Enterocytes Provide the First Defense Line of the Gastrointestinal Tract and Interact with the Immune

System. *Immunol. Rev.* **2014**, *260* (August), 8–20; DOI:10.1111/imr.12182.

53. Leforestier, G.; Blais, A.; Blachier, F.; Marsset-Baglieri, A.; Davila-Gay, A. M.; Perrin, E.; Tomé, D. Effects of Galacto-Oligosaccharide Ingestion on the Mucosa-Associated Mucins and Sucrase Activity in the Small Intestine of Mice. *Eur. J. Nutr.* **2009**, *48* (8), 457–464; DOI:10.1007/s00394-009-0036-8.

54. Okazaki, Y.; Katayama, T. Consumption of Non-Digestible Oligosaccharides Elevates Colonic Alkaline Phosphatase Activity by up-Regulating the Expression of IAP-I, with Increased Mucins and Microbial Fermentation in Rats Fed a High-Fat Diet. *Br. J. Nutr.* **2019**, *121* (2), 146–154; DOI:10.1017/S0007114518003082.

55. Figueroa-Lozano, S.; Ren, C.; Yin, H.; Pham, H.; Van Leeuwen, S.; Dijkhuizen, L.; De Vos, P. The Impact of Oligosaccharide Content, Glycosidic Linkages and Lactose Content of Galacto-Oligosaccharides (GOS) on the Expression of Mucus-Related Genes in Goblet Cells. *Food Funct.* **2020**, *11* (4), 3506–3515; DOI:10.1039/d0fo00064g.

56. Paradis, T.; Bègue, H.; Basmaciyan, L.; Dalle, F.; Bon, F. Tight Junctions as a Key for Pathogens Invasion in Intestinal Epithelial Cells. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22* (5), 1–21; DOI:10.3390/ijms22052506.

57. Suzuki, T. Regulation of the Intestinal Barrier by Nutrients: The Role of Tight Junctions. *Anim. Sci. J.* **2020**, *91* (1), 1–12; DOI:10.1111/asj.13357.

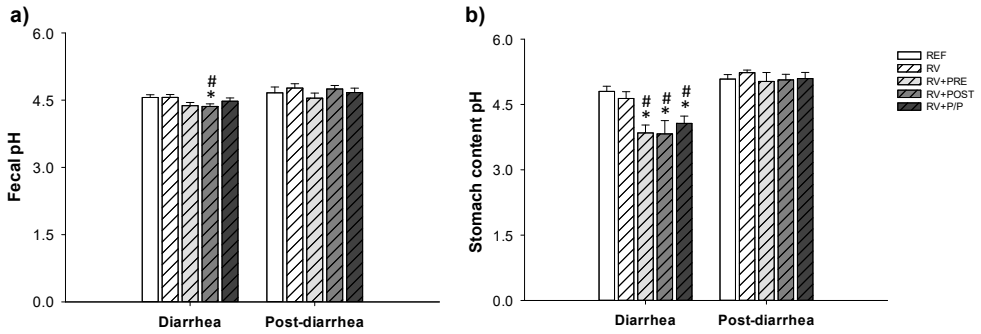
58. Alizadeh, A.; Akbari, P.; Difilippo, E.; Schols, H. A.; Ulfman, L. H.; Schoterman, M. H. C.; Garssen, J.; Fink-Gremmels, J.; Braber, S. The Piglet as a Model for Studying Dietary Components in Infant Diets: Effects of Galacto-Oligosaccharides on Intestinal Functions. *Br. J. Nutr.* **2016**, *115* (4), 605–618; DOI:10.1017/S0007114515004997.

59. Arévalo Sureda, E.; Weström, B.; Pierzynowski, S. G.; Prykhodko, O. Maturation of the Intestinal Epithelial Barrier in Neonatal Rats Coincides with Decreased FcRn Expression, Replacement of Vacuolated Enterocytes and Changed Blimp-1 Expression (PLoS ONE (2016) 11:10 (E0164775) DOI: 10.1371/Journal.Pone.0164775. *PLoS One* **2017**, *12* (1), 1–18; DOI:10.1371/journal.pone.0169724.

60. Fitzgerald, K. A.; Kagan, J. C. Toll-like Receptors and the Control of Immunity. *Cell* **2020**, *180* (6), 1044–1066; DOI:10.1016/j.cell.2020.02.041.

61. Han, C.; Dai, Y.; Liu, B.; Wang, L.; Wang, J.; Zhang, J. Diversity Analysis of Intestinal Microflora between Healthy and Diarrheal Neonatal Piglets from the Same Litter in Different Regions. *Anaerobe* **2019**, *55*, 136–141; DOI:10.1016/j.anaerobe.2018.12.001.

62. Béghin, L.; Tims, S.; Roelofs, M.; Rougé, C.; Oozeer, R.; Rakza, T.; Chirico, G.; Roeselers, G.; Knol, J.; Rozé, J. C.; Turck, D. Fermented Infant Formula (with Bifidobacterium Breve C50 and Streptococcus Thermophilus O65) with Prebiotic Oligosaccharides Is Safe and Modulates the Gut Microbiota towards a Microbiota Closer to That of Breastfed Infants. *Clin. Nutr.* **2020**, 40(3), 778-787; DOI:10.1016/j.clnu.2020.07.024.



Supplementary Figure 1. Fecal pH (a) and stomach content pH (b) in diarrhea (on days 7-9 in feces and day 8 in stomach content) and post-diarrhea periods (on days 14-16 in feces and day 16 in stomach content). Results are expressed as mean ± SEM (n = 24 animals/group. Statistical differences: * vs. REF, # vs. RV, φ vs. RV+PRE, Δ vs. RV+POST. REF: reference group; RV: rotavirus group; RV+PRE: rotavirus group supplemented with a mixture of scGOS and lcFOS; RV+POST: rotavirus group supplemented with LactofidusTM; RV+P/P: rotavirus group supplemented with the combination of both.

Supplementary Table 1. Growth-associated measurements and relative weight of organs at the end of the study (day 16 of life).

	RV	RV+PRE	RV+POST	RV+P/P
Naso-anal (Body, cm)	9.39 ± 0.08	9.50 ± 0.12	9.72 ± 0.05 *#	9.68 ± 0.08 *#
Anus-tail (Tail, cm)	4.84 ± 0.09	4.91± 0.06	5.04 ± 0.10	4.82 ± 0.10
Naso-tail (cm)	14.23 ± 0.14	14.41 ± 0.15	14.76 ± 0.10 *#	14.5 ± 0.16
Body/Tail length ratio	1.95 ± 0.03	1.94 ± 0.03	1.94 ± 0.04	2.02 ± 0.03
Body mass index (g/cm^2)	0.32 ± 0.01	0.34 ± 0.01	0.34 ± 0.00 #	0.34 ± 0.00 #
Lee index ($g^{0.33}$/cm, x1000)	324.32 ± 3.45	327.91 ± 2.43	328.16 ± 1.32	328.41 ± 2.20
Spleen/BW ratio (%)	0.48 ± 0.03	0.47 ± 0.03	0.52 ±0.02 *	0.54 ± 0.04 *
Thymus/ BW ratio (%)	0.48 ± 0.03	0.46 ± 0.04	0.53 ± 0.03 *# φ	0.44 ± 0.01 Δ
Liver/ BW ratio (%)	3.75 ± 0.19	3.62 ± 0.16	3.70 ± 0.17	3.81 ± 0.10 *
Large int./BW ratio (%)	0.62 ± 0.02	0.73 ± 0.04 *#	0.69 ± 0.04 *	0.74 ± 0.01 *# Δ
Small int./ BW ratio (%)	3.47 ± 0.19	5.22 ± 0.29 *#	3.53 ± 0.17 φ	5.44 ± 0.12 *#Δ
Large int. length/ BW (cm/g)	22.22 ± 1.21	21.72 ± 1.55	19.70 ± 0.95 *	18.87 ± 0.64 *#
Small int. length/ BW (cm/g)	134.50 ± 5.47	148.94 ± 8.79	131.54 ± 7.06	133.09 ± 1.92
Stomach/ BW ratio (%)	0.79 ± 0.03	0.81 ± 0.06	0.80 ± 0.05	0.67 ± 0.06

Growth-associated measurements were expressed as mean ± SEM. Relative weight of organs is expressed as percentage (%) with respect to the body weight and (n = 12). Statistical differences: * vs. REF, # vs. RV, φ vs. RV+PRE, Δ vs. RV+POST. REF: reference group; RV: rotavirus group; RV+PRE: rotavirus group supplemented with a mixture of scGOS/lcFOS; RV+POST: rotavirus group supplemented with LactofidusTM; RV+P/P: rotavirus group supplemented with the combination of both.

Supplementary Table 2. Hematological variables at the end of the study (day 8).

	REF	RV	RV+PRE	RV+POST	RV+P/P
WBC (10^9 cells/L)	2.17 ± 0.36	2.83 ± 0.49	4.09 ± 0.75	4.15 ± 0.76	6.24 ± 0.51 *# φ Δ
LYM (%)	63.35 ± 5.70	65.63 ± 3.49	65.47 ± 2.96	69.15 ± 2.33	72.86 ± 2.73
MID (%)	7.75 ± 0.82	6.45 ± 0.30	7.09 ± 0.52	6.22 ± 0.53	4.99 ± 0.35 # φ
GRAN (%)	28.90 ± 2.80	27.93 ± 3.47	27.44 ± 2.80	24.64 ± 2.49	22.15 ± 2.45
LYM (10^9 cells/L)	1.43 ± 0.22	1.79 ± 0.35	2.68 ± 0.55	2.41 ± 0.45	4.46 ± 0.40 *# φ Δ
MID (10^9 cells/L)	0.14 ± 0.02	0.14 ± 0.04	0.23 ± 0.04	0.22 ± 0.04	0.25 ± 0.03 #
GRAN (10^9 cells/L)	0.80 ± 0.14	0.89 ± 0.15	1.18 ± 0.19	1.09 ± 0.21	1.52 ± 0.20 *#
HGB (g/L)	103.67 ± 7.03	76.67 ± 6.23	102.00 ± 13.13 #	82.55 ± 6.42	113.55 ± 7.80 *#Δ
HCT (%)	25.51 ± 0.49	23.28 ± 1.48	23.45 ± 1.01	25.61 ± 1.76	26.39 ± 0.85 φ
MCV (fL)	68.68 ± 2.70	96.50 ± 1.16	96.83 ± 0.83	98.55 ± 0.62	100.99 ± 0.59 *# φ Δ
MCH (pg)	28.08 ± 2.53	31.53 ± 1.60	41.13 ± 5.28 #	31.75 ± 1.42 φ	44.40 ± 4.61 *#Δ
PLT (10^9 cells/L)	477.58 ± 26.52	227.75 ± 58.78	388.78 ± 55.28 #	288.27 ± 67.51	377.91 ± 44.24
MPV (fL)	9.22 ± 0.32	15.07 ± 1.92 *	10.66 ± 1.41#	11.91 ± 2.00	10.71 ± 0.77

White Blood Cells (WBC), Lymphocyte (LYM), Monocytes, eosinophils, basophils, blasts and other precursor white cells (MID), Neutrophils, monocytes, eosinophils, and basophils (GRAN), Hemoglobin (HGB), Hematocrit (HCT), Mean Cell Volume (MCV), Mean Cell Hemoglobin (MCH), Platelets (PLT) and Mean Platelet Volume (MPV). Results are expressed ad mean ± SEM (n = 12). Statistical differences: * vs. REF, # vs. RV, φ vs. RV+PRE, Δ vs. RV+POST. REF: reference group; RV: rotavirus group; RV+PRE: rotavirus group supplemented with a mixture of scGOS/lcFOS; RV+POST: rotavirus group supplemented with LactofidusTM; RV+P/P: rotavirus group supplemented with the combination of both.

Supplementary Table 3. Hematological variables at the end of the study (day 16).

	RV	RV+PRE	RV+POST	RV+P/P
WBC (10^9 cells/L)	2.59 ± 0.33	2.08 ± 0.38	2.37 ± 0.38	2.37 ± 0.33
LYM (%)	65.43 ± 1.95	66.81 ± 11.66	66.04 ± 1.59	66.07 ± 2.00
MID (%)	7.53 ± 0.53	7.93 ± 1.46	7.68 ± 0.30	6.80 ± 0.32
GRAN (%)	27.03 ± 1.82	25.26 ± 4.50	26.28 ± 1.53	27.13 ± 1.90
LYM (10^9 cells/L)	1.63 ± 0.19	1.34 ± 0.25	1.50 ± 0.27	1.48 ± 0.18
MID (10^9 cells/L)	0.15 ± 0.03	0.11 ± 0.02	0.15 ± 0.04	0.11 ± 0.03
GRAN (10^9 cells/L)	0.68 ± 0.09	0.63 ± 0.12	0.72 ± 0.09	0.78 ± 0.13
HGB (g/L)	98.33 ± 6.93	103.75 ± 19.04	111.42 ± 9.42	90.17 ± 4.50
HCT (%)	25.59 ± 1.63	25.58 ± 4.75	28.53 ± 2.41	23.92 ± 0.64 *
MCV (fL)	65.08 ± 0.92	64.36 ± 11.22	63.82 ± 0.54 *	64.24 ± 0.55 *
MCH (pg)	24.98 ± 1.07	26.19 ± 4.63	25.13 ± 1.40	24.07 ± 0.93
PLT (10^9 cells/L)	454.58 ± 43.04	498.00 ± 91.08	448.00 ± 47.05	479.00 ± 41.26
MPV (fL)	8.64 ± 0.18	8.33 ± 1.46	8.98 ± 0.24	8.95 ± 0.21 φ

White Blood Cells (WBC), Lymphocyte (LYM), Monocytes, eosinophils, basophils, blasts and other precursor white cells (MID), Neutrophils, monocytes, eosinophils, and basophils (GRAN), Hemoglobin (HGB), Hematocrit (HCT), Mean Cell Volume (MCV), Mean Cell Hemoglobin (MCH), Platelets (PLT) and Mean Platelet Volume (MPV). Results are expressed ad mean ± SEM (n = 12). Statistical differences: * vs. REF, # vs. RV, φ vs. RV+PRE, Δ vs. RV+POST. REF: reference group; RV: rotavirus group; RV+PRE: rotavirus group supplemented with a mixture of scGOS/lcFOS; RV+POST: rotavirus group supplemented with LactofidusTM; RV+P/P: rotavirus group supplemented with the combination of both.

Supplementary Table 4. Clinical variables determining the diarrhea process in the RV groups without normalization process.

Clinical Outcome	Variable	RV	RV+PRE	RV+POST	RV+P/P
Incidence					
	MDA	58.33	12.50	34.78	4.17
	MDAd	8.00	9.00	7.00	7.00
	daAUC	166.67	29.53	86.23	8.33
	MDF	82.35	20.00	50.00	7.14
	MDFd	8.00	9.00	6.00	7.00
	dfAUC	258.35	44.91	146.01	12.70
Duration					
	DDB	6.78 ± 0.32	7.33 ± 0.88	7.00 ± 0.33	7.00 ± 0.00
	DDE	8.33 ± 0.24	7.33 ± 0.88	7.63 ± 0.38	7.33 ± 0.33
	DP	1.17 ± 0.34	0.00 ± 0.00 #	0.42 ± 0.26	0.09 ± 0.09 #
	DwD	1.75 ± 0.37	0.27 ± 0.14 #	0.92 ± 0.23 φ	0.36 ± 0.20 #
Severity					
	MDI	2.39 ± 0.15	1.52 ± 0.08 #	1.84 ± 0.15 #φ	1.43 ± 0.07 #Δ
	MDId	7.48 ± 0.16	7.79 ± 0.67	7.18 ± 0.23	7.81 ± 0.71
	sAUC	3.73 ± 0.43	0.68 ± 0.13 #	2.58 ± 0.23 #φ	0.53 ± 0.14 #Δ

Results are expressed as mean ± SEM (n = 12 animals/group). MDA, maximum percentage of diarrheic animals; MDAd, day with maximum percentage of diarrheic animals; daAUC, area under the curve of diarrheic animals normalized; MDF, maximum percentage of diarrheic feces; MDFd, day with maximum percentage of diarrheic feces; dfAUC, area under the curve of diarrheic feces normalized. DDB, day of diarrhea beginning (DPI); DDE, day of diarrhea ending (DPI); DP, diarrhea period; DwD, days with diarrhea. MDI, maximum diarrhea index; MDId, day of maximum diarrhea index (DPI); sAUC, area under the curve of severity normalized. Statistical differences: * vs. REF, # vs. RV, φ vs. RV+PRE, Δ vs. RV+POST. REF: reference group; RV: rotavirus group; RV+PRE: rotavirus group supplemented with a mixture of scGOS and lcFOS; RV+POST: rotavirus group supplemented with LactofidusTM; RV+P/P: rotavirus group supplemented with the combination of both.

Supplementary Table 5. Relative proportion of the minority families and genres of the gut microbiota with statistical significance among groups.

	REF	RV	RV+PRE	RV+POST	RV+P/P
Minority families					
Caulobacteraceae	0.19 ± 0.05	0.26 ± 0.08	0.20 ± 0.06	0.03 ± 0.01 *♯ φ	0.04 ± 0.02*♯ φ
Sphingomonadaceae	1.29 ± 0.41	1.33 ± 0.39	2.17 ± 0.95	0.36 ± 0.10 *♯	0.27 ± 0.06 *♯ φ
Rhizobiaceae	1.15 ± 0.41	1.40 ± 0.41	1.83 ± 0.90	0.21 ± 0.07 ♯ φ	0.16 ± 0.04 *♯φ
Burkholderiaceae	0.41 ± 0.17	0.38 ± 0.18	0.50 ± 0.25	0.06 ± 0.02	0.01 ± 0.01 *
Beijerinckiaceae	0.17 ± 0.06	0.09 ± 0.03	0.08 ± 0.04	-	0.02 ± 0.01 *
Erysipelotrichaceae	1.36 ± 0.59	0.43 ± 0.18	0.47 ± 0.27	0.11 ± 0.03	0.69 ± 0.15 Δ
Propionibacteriaceae	0.04 ± 0.02	-	0.02 ± 0.01	-	-
Minority genres					
Sphingomonas	1.45 ± 0.43	1.76 ± 0.34	2.26 ± 0.97	0.36 ± 0.10 *♯ φ	0.29 ± 0.06 *♯ φ
Ralstonia	0.39 ± 0.15	0.27 ± 0.12	0.51 ± 0.25	0.05 ± 0.02 *	0.01 ± 0.01 *
Methylobacterium	0.19 ± 0.03	0.12 ± 0.03	0.08 ± 0.05	-	0.02 ± 0.01 *♯
Vibrionimonas	2.72 ± 0.75	3.42 ± 0.47	2.25 ± 0.50	0.87 ± 0.24 ♯	1.22 ± 0.23 ♯
Staphylococcus	2.87 ± 0.61	2.19 ± 0.49	5.44 ± 1.11 ♯	2.28 ± 0.83 φ	0.91 ± 0.23 * φ
Mesorhizobium	0.60 ± 0.18	1.31 ± 030	1.53 ± 0.80	0.19 ± 0.05 ♯ φ	0.17 ± 0.04 ♯ φ
Turicibacter	1.59 ± 0.66	0.64 ± 0.22	0.48 ± 0.27	0.12 ± 0.04	0.72 ± 0.14 Δ
Clostridium stricto sensu 1	1.20 ± 0.47	1.47 ± 0.46	0.21 ± 0.08 ♯	0.14 ± 0.04 ♯	2.12 ± 1.05 φ Δ
Bifidobacterium	-	-	-	0.46 ± 0.17	0.89 ± 0.20
Cutibacterium	0.04 ± 0.02	-	0.03 ± 0.02	-	-
Methylobacterium	0.188 ± 0.06	0.12 ± 0.03	0.08 ± 0.05	-	0.02 ± 0.01
Phyllobacterium	0.51 ± 0.18	0.52 ± 0.08	0.38 ± 0.14	-	-

Results are expressed as mean ± SEM (n = 6 animals/group). Statistical differences: * vs. REF, ♯ vs. RV, φ vs. RV+PRE, Δ vs. RV+POST. REF: reference group; RV: rotavirus group; RV+PRE: rotavirus group supplemented with a mixture of scGOS and lcFOS; RV+POST: rotavirus group supplemented with LactofidusTM; RV+P/P: rotavirus group supplemented with the combination of both.

DISCUSSIÓ

El sistema immunitari neonatal es troba en desenvolupament i la seva resposta immunitària enfront els elements externs és diferent a la de l'adult. Per aquesta raó, hi ha una major susceptibilitat a patir infeccions durant les primeres etapes de vida. Aquests patògens poden provenir directament de la mare, a través de la llet materna -com en el cas de les mastitis infeccioses- o de l'ambient -com en el cas dels rotavirus-. Aquesta tesi aborda ambdues situacions.

La mastitis és una inflamació de la glàndula mamària que pot anar acompanyada o no d'una infecció, que pot ser mortal si no es tracta adequadament [94]. La majoria dels casos de mastitis tenen una etiologia infecciosa [95,96]. El *S. epidermidis* és el primer agent causal de la mastitis [97]. Molts estudis en éssers humans i models animals han centrat la seva atenció en l'impacte d'aquesta situació en la salut materna, i també en la disbiosi induïda a la microbiota de la llet materna pel predomini dràstic de l'agent causal i la reducció resultant de la resta de grups bacterians [99]. No obstant això, molt pocs estudis s'han centrat en l'impacte d'aquest procés en el nadó alletat.

Com s'ha demostrat que la sobrecàrrega d'aquest bacteri es pot transferir a través de la llet materna al nounat [99], és plausible la hipòtesi de que aquesta sobrecàrrega pugui afectar a la salut del nadó i, en particular, al seu desenvolupament immunològic. El nostre grup de recerca ha caracteritzat prèviament el patró de desenvolupament del sistema immunitari de les rates des del naixement fins al final del període de lactància, on s'ha vist que aquest es desenvolupa durant les primeres setmanes de vida (lactància i deslletament) [1]. Per tant, la rata lactant és un bon model animal per estudiar el desenvolupament del sistema immunitari durant les primeres etapes de vida, ja que es desenvolupa ràpidament i permet estudiar la seva evolució en poques setmanes [1].

Aquesta tesi inclou un estudi (**Article 1**) amb un enfocament preclínic en el qual s'han administrat dues dosis diferents de *S. epidermidis* a rates neonatals. La dosi baixa reflecteix una mastitis subclínica, mentre que la dosi alta imita la d'una mastitis clínica, és a dir, on la sobrecàrrega és tan important que provoca manifestacions. El possible efecte també es va estudiar més tard, tres setmanes després de l'última dosi bacteriana per tal d'avaluar la persistència dels possibles efectes causats.

En primer lloc es va mesurar l'impacte de la sobrecàrrega bacteriana sobre el pes corporal de les rates lactants. En general, les intervencions no van influir en el pes corporal ni en el pes dels òrgans durant la lactància ni durant les tres setmanes posteriors, i només es va observar un augment puntual a la longitud corporal d'ambdues dosis a dia 42 de vida. Per tant, es podria suggerir que la sobrecàrrega de *S. epidermidis* durant la lactància pot afectar a llarg termini el desenvolupament de les rates. Aquesta alteració inesperada i única en el nostre model s'hauria de confirmar en nous estudis centrats en aquest aspecte. Encara que no hi ha bibliografia semblant en aquest sentit,

altres autors van descriure unes taxes de creixement menors en xais quan les seves mares tenien mastitis clínica al part o al deslletament [173].

La infecció, l'estrès i el traumatisme són les causes més freqüents de leucocitosi [174]. De fet, la leucocitosi és un bon indicador d'un procés infecciós [175] i la majoria dels pacients d'urgències amb sospita d'infecció tenen leucocitosi [176]. Els neutròfils són els leucòcits més abundants en aquest context [177] i la majoria de les infeccions bacterianes agudes causen neutrofília, però algunes d'elles provoquen també limfocitosi, com és el cas dels bacteris *Bordetella pertussis*, *Treponema pallidum*, *Bartonella henselae* o el gènere *Brucella* [178]. En el present estudi es van analitzar les variables hematològiques al final de les intervencions amb *S. epidermidis* (dia 21 de vida) i tres setmanes després (dia 42 de vida). Els animals que van rebre la dosi alta d'aquest bacteri presentaven leucocitosi el dia 21, que va persistir fins al dia 42. No hi ha dades disponibles al respecte en nounats quan la seva mare tenia mastitis infecciosa. Tanmateix, en altres infeccions bacterianes com la listeriosis o la tosferina, s'han observat aquestes alteracions a les variables hematològiques dels nounats [179,180]. Els animals que van rebre la sobrecàrrega més elevada de *S. epidermidis*, mostraven especialment augmentats els nivells de limfòcits per combatre la sobrecàrrega bacteriana i controlar-la. Tanmateix, la resolució del procés semblava que encara no s'havia resolt a dia 42, tal com suggerien els nivells més alts de limfòcits, monòcits i granulòcits d'aquest grup en comparació amb els animals del grup referència. Seran necessaris estudis futurs per aprofundir en la leucocitosi observada al final de l'estudi i els seus efectes a llarg termini.

Centrant-se en l'efecte de la intervenció en el desenvolupament del sistema immunitari, es van estudiar diversos aspectes, com els nivells d'Ig i la seva associació amb la resposta de tipus Th1 o Th2. Se sap que el sistema immunitari neonatal tendeix a induir respostes de tipus Th2 quan els microorganismes es troben per primera vegada, ja que la capacitat de resposta Th1 encara no és prou efectiva, i és durant el seu desenvolupament, quan el sistema immunitari ha d'aconseguir un equilibri correcte entre les respostes Th1 i Th2 [181]. En aquest estudi, al final de la intervenció, tant els grups que van rebre la dosi baixa de *S. epidermidis* com els que van rebre la dosi alta, van mostrar una menor concentració d'IgG i també una reducció dels nivells d'IgG2b (isotip associat a la resposta de tipus Th1), donant lloc a una menor relació Th1/Th2. A més, la dosi alta de la sobrecàrrega bacteriana també va reduir els nivells d'IgM i IgA. Aquests resultats suggereixen que ambdues intervencions van induir canvis en el desenvolupament del sistema immunitari reduint la seva maduració a través del retard en l'assoliment de l'equilibri Th1/Th2. Tanmateix, cal tenir en compte que en aquesta etapa de vida, la llet materna enriquida amb Ig influeix en els nivells plasmàtics d'Ig de les cries, tal com s'ha observat en estudis anteriors del nostre grup de recerca [15]. En canvi, al dia 42 de vida, la quantificació dels nivells d'Ig plasmàtiques quan no es troba

afectada per la seva mare, encara mostra un biaix cap a la resposta Th2 en els animals que van rebre la dosi alta de *S. epidermidis* en comparació amb el grup referència. A més, en el grup que va rebre la dosi baixa de la sobrecàrrega bacteriana, els nivells d'IgG, IgA i IgM eren inferiors en comparació amb els animals referència però, inesperadament, no en el grup que va rebre la dosi alta del bacteri. S'ha descrit que el desenvolupament primerenc de la disbiosi altera la resposta Th1/Th2 cap a la resposta Th2 [182,183]. Per tant, la sobrecàrrega de *S. epidermidis* pot afectar la microbiota intestinal i, per tant, l'equilibri Th1/Th2 del sistema immunitari de les rates lactants. En estudis futurs caldria estudiar la composició de la microbiota intestinal de les cries de rata i la seva relació amb el desenvolupament immunitari. Aquesta evidència preclínica podria estar en línia amb el resultat d'un assaig clínic recent en què una càrrega més alta d'estafilococ a la llet materna i també a les femtes infantils es va associar a un augment del risc d'infeccions respiratòries dels nadons [183].

Com que el patró d'Ig va mostrar un biaix cap a la resposta Th2, els nivells de citocines al plasma de les cries de rates també es van estudiar al final de la intervenció (dia 21) i tres setmanes després (dia 42). Malauradament, no es van observar diferències entre grups. D'acord amb els comentaris anteriors, no hi ha dades a la literatura sobre la producció de citocines en nounats quan la mare dels quals tenia mastitis infecciosa ni en animals ni en humans. El nostre model animal no va implicar canvis en la mare lactant; tanmateix, pot ser plausible que en un escenari real, el *S. epidermidis* també tingués un impacte a nivell sistèmic o en la composició de la llet materna. En aquesta línia, poden ser d'interès alguns resultats en vaques amb mastitis. S'ha descrit que les vaques mares que patien mastitis subclínica van mostrar nivells més alts d'IL-6 i concentracions menors d'IL-4 i IL-10 [184]. Altres autors van observar que les vaques mares amb mastitis tenien nivells d'expressió d'ARNm més alts de TNF-α, IL-1β i IL-6 [185]. Aquests canvis podrien modificar la composició de citocines de la llet i transferir-se al nadó a través de la lactància materna i per tant afectar al desenvolupament del seu sistema immunitari. Tot plegat, no es pot descartar que en una situació real de mastitis, sí que existissin canvis en les citocines pro-inflamatòries o en el tipus de resposta immunitària específica (per exemple, Th1 o Th2) dels nadons.

Finalment, es va estudiar l'efecte d'ambdues sobrecàrregues bacterianes sobre les diferents subpoblacions limfocitàries mitjançant l'estudi del seu fenotip i el seu patró de migració. Durant la lactància, els canvis fenotípics en el sistema immunitari sistèmic de la rata neonatal són un reflex de la seva maduració [186]. Les cèl·lules NK/NKT i els limfòcits B semblen desenvolupar-se abans que els limfòcits T; que maduren més tard, durant la segona meitat del període de lactància, en termes de fenotip i capacitat proliferativa [186]. En aquest sentit, ambdues intervencions només van induir petits canvis a la subpoblació de limfòcits a dia 21 i a dia 42 de vida, com ara modificacions a les proporcions de limfòcits CD8 i NK en animals que van rebre la dosi alta de *S.*

epidermidis en comparació amb el grup referència. També es van trobar canvis en el patró d'expressió de la molècula CD8 en limfòcits TCRγδ$^+$ en ambdós grups que van rebre el *S. epidermidis* durant la lactància en comparació amb els animals referència. A més, l'expressió de CD25 (cadena alfa del receptor trimèric per la IL-2), que es considera un marcador d'activació cel·lular que s'expressa de manera constitutiva a la superfície de diversos limfòcits [187], no es va veure influenciada per les intervencions en els limfòcits B, Th ni Tc.

Per a l'estudi de la migració intestinal, es va mesurar l'expressió de dues molècules d'adhesió claus; la selectina CD62L i la integrina αE. La integrina αE (CD103) és un receptor per la E-cadherina, la seva interacció permet l'adhesió entre cèl·lules epitelials i limfòcits T, però també s'expressa a la superfície cel·lular dels limfòcits T CD8$^+$ de memòria resident en teixits [188]. La selectina CD62L és una molècula d'adhesió cel·lular que s'expressa a la majoria de leucòcits circulants [189]. Els limfòcits T CD8$^+$ nadius expressen CD62L, però els limfòcits T CD8$^+$ efectors perden la seva expressió [190]. Les dues sobrecàrregues de *S. epidermidis* durant la lactància no van mostrar cap canvi en el patró de migració al final de la intervenció, però, al dia 42 de vida, la subpoblació αE$^-$CD62L$^+$ dels limfòcits Tc del grup que va rebre la dosi baixa de *S. epidermidis* va ser superior a la dels animals del grup referència. Segons el nostre coneixement, no hi ha altres dades a la literatura sobre el patró d'expressió de la integrina αE i la selectina CD62L durant o després de la mastitis infecciosa materna ni en animals ni en humans nounats. Tanmateix, en vaques mares amb mastitis s'ha descrit que l'expressió de CD62L era menor [191,192]. Per tant, els nostres resultats suggereixen que el desenvolupament dels limfòcits Tc es va retardar en el grup que va rebre la dosi baixa de *S. epidermidis*, però inesperadament no en els animals que van rebre la dosi bacteriana alta. Serien necessaris estudis addicionals per confirmar els resultats obtinguts al final de l'estudi i aprofundir en l'efecte diferencial de cada dosi en el patró d'αE i CD62L als limfòcits Tc.

A més dels canvis sistèmics, el fet que el tracte gastrointestinal de les cries de rata va rebre durant 21 dies una gran quantitat de *S. epidermidis*, podria tenir un impacte en l'ecosistema intestinal. Cap de les sobrecàrregues amb *S. epidermidis* va afectar la humitat fecal de manera consistent al llarg de l'estudi, tot i que van induir una menor humitat. Aquest canvi puntual podria ser causat per la plausible disbiosi intestinal causada per la sobrecàrrega bacteriana durant la lactància. Aquest canvi, però, no va anar acompanyat d'una alteració del pH cecal, ja que tampoc es va veure afectat per la sobrecàrrega bacteriana. No es troben altres dades a la literatura sobre els canvis en la humitat fecal, el pH o l'impacte de la microbiota durant o després de la mastitis infecciosa materna ni en animals ni en humans, per això caldrà ratificar aquests resultats. Tanmateix, estudis anteriors del nostre grup van mostrar que les rates lactants sota un procés infecciós (gastroenteritis causada per rotavirus) mostraven un pH fecal

més elevat [193]. D'altra banda, les rates lactants sanes suplementades amb GOS i FOS modifiquen la microbiota intestinal i la consistència fecal, però no el pH fecal (**Article 3**). Per tant, tant la humitat com el pH podrien estar correlacionats amb la composició de la microbiota intestinal, aspecte clau a tenir en compte en estudis futurs.

Com s'ha mencionat anteriorment, la gran quantitat de *S. epidermidis* que va rebre el tracte gastrointestinal de les rates podria tenir un impacte en l'ecosistema intestinal i, per tant, també en la maduració del sistema immunitari, ja que la microbiota intestinal interacciona amb aquest contribuint a la seva maduració i promovent la immunitat de la barrera intestinal [37]. Es va mesurar l'expressió gènica de molècules implicades en la funció de barrera, com són les mucines (MUC) 2 i MUC3 i les proteïnes associades a les unions estretes epitelials com la claudina (Cldn) 2, Cldn4 i la ocludina (Ocln). La sobrecàrrega de *S. epidermidis*, tant a dosi baixa com a una dosi alta, no va influir en aquestes molècules (MUC2, MUC3, Cldn2, Cldn4 i Ocln) i per tant es pot concloure que no hi afectació de la capacitat de barrera intestinal.

Per determinar les interaccions entre hoste i microorganismes, es va estudiar l'expressió gènica dels TLR, els quals són glicoproteïnes transmembrana de tipus 1 que reconeixen una elevada quantitat de molècules derivades de bacteris, virus, fongs i protozous [194] i juguen un paper molt important en la inducció de la resposta immunitària innata i respostes inflamatòries [195]. Tant la sobrecàrrega de *S. epidermidis* a dosi baixa com a dosi alta, no va modificar l'expressió dels TLR2, TLR4, TLR5 i TLR9. Per tant, no s'observa cap canvi en la capacitat de reconeixement bacterià que afavoreixi la resposta del sistema immunitari per combatre la sobrecàrrega d'estafilococ.

També es van estudiar gens relacionats amb la maduració del sistema immunitari. Les rates que van rebre la dosi alta de *S. epidermidis*, van mostrar uns nivells del receptor d'immunoglobulines de tipus FcRn més alts a dia 42 de vida en comparació amb el grup referència. A l'epiteli de l'intestí prim proximal, el FcRn regula la transferència d'IgG de la llet materna en rates neonatals [196]. Després del deslletament, l'epiteli immadur es substitueix per un epiteli de tipus adult, que no expressa FcRn [196]. Per tant, la reducció de FcRn s'associa amb la maduració de la barrera epitelial intestinal. La major expressió de FcRn en els animals que van rebre la dosi alta de la sobrecàrrega bacteriana en comparació amb el grup referència, suggereix que la maduració de l'intestí prim també es va veure retardada.

> ***En resum**, la intervenció amb la sobrecàrrega de S. epidermidis durant la lactància, imitant el que passa durant el procés de mastitis, va afectar al desenvolupament del sistema immunitari a curt i llarg termini. Ambdues dosis van induir petits canvis en les subpoblacions de limfòcits, van reduir la concentració d'immunoglobulines plasmàtiques i van retardar l'assoliment de l'equilibri Th1/Th2 mantenint el biaix cap a la resposta Th2 de les primeres*

etapes de vida. La dosi baixa va afectar al patró de migració intestinal dels limfòcits Tc, mentre que la dosi alta va tenir un impacte en les variables hematològiques causant leucocitosi i limfocitosi i influint en la maduració de la barrera intestinal.

Aquests resultats, són un bon punt de partida per tal de posar sobre la taula la repercussió que pot tenir una mastitis materna en l'infant que està rebent l'alletament, inclús quan aquesta es presenta de forma subclínica. Serà important aprofundir amb nous models animals i inclús a nivell clínic sobre aquest fet per tal d'aportar més evidències que permetin establir les actuacions pertinents per tal d'evitar l'impacte que suposa per l'infant en desenvolupament.

Per altra banda, els mecanismes fisiopatològics implicats en la gastroenteritis vírica, a diferència del que succeeix en una sobrecàrrega bacteriana de *S. epidermidis* en nounats, està ben caracteritzada. Per tant, l'objectiu del segon estudi (**Article 2**) va ser aprofundir en el possible efecte diferencial provocat en els dos sexes, mascles i femelles, en rates neonatals durant aquesta infecció és a dir, la influència del dimorfisme sexual.

És ben conegut que el sistema immunitari dels homes i les dones és diferent. Les dones generalment mostren respostes immunitàries humorals i cel·lulars més robustes a la infecció o l'estimulació antigènica que els homes, que poden proporcionar protecció contra els patògens, però també poden provocar una resposta inflamatòria alterada que augmenta el risc de malalties autoimmunitàries [46,55–57]. Aquestes diferències és deuen a factors genètics, epigenètics, hormonals i ambientals [45–47].

La gastroenteritis vírica s'associa amb freqüència amb aliments o aigua contaminats. Els principals patògens causants a tot el món són els RV, però també ho són altres patògens com els norovirus i, en proporcions més baixes, alguns altres com els adenovirus tipus 40 i 41, calicivirus, astrovirus, i petits virus d'estructura rodona [124]. Les infeccions solen ser lleus i autolimitades i no s'acostuma a identificar l'agent etiològic. Això provoca que sigui difícil distingir clínicament l'agent etiològic i la resposta a aquest en funció del sexe. Per tant, és necessari disposar d'un model animal controlat per estudiar les diferències associades al sexe en la resposta immunitària enfront a un patogen específic. En el cas de la infecció per RV, la seva susceptibilitat i gravetat en funció del sexe no s'ha estudiat a fons. Per aquest motiu, en aquesta tesi (**Article 2**) es va utilitzar un model de rata lactant amb gastroenteritis causada per RV. Com s'ha mencionat anteriorment, la rata lactant és un bon model per estudiar la maduració dels sistema immunitari [1]. A més, estudis previs del nostre grup de recerca

han caracteritzat la manifestació clínica i resposta immunitària en un model d'infecció per RV en rates lactants [84,133,136,197].

Per poder estudiar la influència del dimorfisme sexual en rates lactants amb gastroenteritis causada per RV, es van recopilar dades i mostres de diversos estudis previs i en curs corresponents a rates Lewis, les quals s'havien inoculat oralment amb la soca SA-11 durant la primera setmana de vida per tal d'induir la infecció. D'aquesta manera es va aconseguir una mida mostral amb suficient potència estadística com per poder trobar diferències entre sexes, si fos el cas.

Una de les principals característiques de la infecció per RV humana és la conseqüent diarrea i la pèrdua de líquids i la deshidratació associades, que poden provocar una pèrdua de pes corporal. El model de rata lactant utilitzat, com s'evidencia en estudis anteriors [84,133,143,198], va induir una diarrea moderada sense pèrdua de pes. Per tal de determinar si es podia observar algun efecte degut a l'estratificació de resultats entre mascles i femelles, els animals es van distribuir per sexe. En cap dels dos sexes es va observar un efecte de la infecció sobre el pes. Tanmateix, no es pot descartar la possibilitat que aquest efecte sobre el pes es presenti de manera diferent en mascles i femelles, ja que, per tal de confirmar-ho s'hauria d'estudiar en alguns models animals de diarrea amb soques de RV més virulentes que indueixin una pèrdua greu de líquids i afectin el pes corporal [199], ja que no hi ha dades en humans.

Pel que fa al paper del sexe sobre la incidència de la infecció, es va observar que el percentatge màxim d'animals que presentaven diarrea tendia a ser més baix en les femelles, però en general, no es van trobar diferències significatives segons el sexe després de la inoculació amb RV, en el nostre model. Malgrat aquesta tendència, la manca d'evidència està en línia amb altres treballs que mostren incidències similars d'infecció per RV en nens i nenes [200–202]. Ara bé, sí que hi ha alguns estudis que indiquen una major prevalença d'infecció per RV en els nens que en les nenes [203,204] i, en alguns casos, amb una relació d'infecció entre nens i nenes molt clara d'1,8:1 [205]. En canvi, s'ha observat una major susceptibilitat a la infecció per RV en vedells de búfal femelles en comparació amb els mascles [36].

En quant a la durada de la diarrea, es va observar una durada similar entre sexes. Segons el nostre coneixement, no hi ha estudis sobre la durada diferencial de la diarrea entre nens i nenes en humans o mascles i femelles en animals durant la infecció causada per RV. En general, encara que sense significació estadística, els resultats observats en aquest estudi reforcen la idea d'una major susceptibilitat a la infecció en els mascles que es podria relacionar amb una menor resposta immunitària cel·lular i humoral [46,55–57].

Les característiques clíniques més freqüents de la gastroenteritis causada per RV en nens són diarrea, vòmits, febre i deshidratació. Hi ha una varietat de sistemes de classificació de la gravetat com l'estat d'hidratació, la necessitat d'hospitalització o el sistema de puntuació de la gravetat de Vesikari [206]. Per tant, aquesta diversitat en l'avaluació de casos complica enormement el poder comparar la gravetat de la infecció per RV entre estudis en infants, cosa que fa que encara sigui més difícil comparar-la amb el model de rata [206]. En aquest treball, els mascles van mostrar un augment significatiu del 26% en la gravetat de la diarrea en comparació amb les femelles, mesurat en base a una escala de gravetat basada en l'aparença fecal (índex de diarrea). A més, la gravetat de la diarrea també es va mesurar per l'augment del pes fecal durant el període de diarrea, el qual també va mostrar diferències entre sexes. Així, ambdós indicadors de gravetat (índex de diarrea i pes fecal), van demostrar que els mascles tenien una diarrea més greu que les femelles. Aquests resultats estan en línia amb altres autors, que han suggerit que els nens pateixen més diarrea que les nenes; ara bé, els seus resultats no aconseguien significació estadística [207]. D'altra banda, hi ha altres autors que no van observar diferències en la gravetat de la infecció entre nens i nenes utilitzant el sistema de puntuació de la gravetat clínica de Vesikari [206]. Segons el nostre coneixement, aquest és el primer enfocament experimental que demostra diferències en la gravetat de la diarrea entre mascles i femelles en el context de la infecció per RV. En un futur, seria important registrar correctament aquest tipus d'informació a nivell clínic per poder confirmar aquests resultats preclínics.

Les dones tenen una susceptibilitat reduïda a les infeccions víriques perquè immunoreaccionen de forma més robusta que els homes. Aquest coneixement concorda amb la menor gravetat en femelles que es troba aquí. No obstant això, també es suggereix que les dones, com a conseqüència de la seva resposta immunitària activa més potent, estan més predisposades a desenvolupar alguns efectes immunopatògenics de la infecció viral i, en conseqüència, a presentar manifestacions més greus [208]. Aquest fet no encaixa amb la reducció de la gravetat de la diarrea per RV que es mostra en aquest estudi. Aquest va ser el punt de partida en l'estudi dels mecanismes implicats en el control de la malaltia, com ara l'eliminació viral i la resposta d'Ac.

Com s'ha mencionat anteriorment, en humans, no sempre s'identifica l'agent etiològic de la gastroenteritis i, si es fa, la quantificació de l'eliminació viral no és l'enfocament habitual. En el nostre model controlat de diarrea causada per RV, es van quantificar les partícules de SA-11 present a les femtes, estratificades per sexe, com a reflex de la infecció. Es va observar que els mascles tenien una eliminació fecal del virus més elevada en comparació amb les femelles el dia posterior a la infecció, un resultat que sembla estar en línia amb altres estudis [205]. Aquesta aproximació reflecteix com l'organisme és capaç de destruir i eliminar el virus en la fase inicial, quan el pic és màxim. Per tant, aquest resultat indica que les femelles van poder controlar el virus de

manera més eficient, potser activant mecanismes que redueixen l'adhesió del virus a l'hoste. Els virus bloquejats per la IgA materna no es detecten amb aquesta tècnica, però la variabilitat en aquesta càrrega proporcionada per la mare lactant no pot ser un factor de confusió, ja que cada ventrada estava formada per un nombre similar de femelles i mascles (40-60%). A més, també es va comprovar que el nivell d'Ig plasmàtiques anti-RV en mares en gestació eren similars entre les diferents mares de l'estudi, i per tant la seva possible transferència a la descendència seria també similar.

En referència als nivells d'Ig, s'ha descrit que les dones tenen una concentració més elevada d'Ig i d'Ig específiques contra el virus i per efecte de la vacunació [49]. Per aquest motiu es va voler estudiar si la variació clínica observada es devia a una resposta immunitària diferencial (és a dir, títols d'Ig i Ac anti-RV).

En referència a les Ig de forma global, en animals no infectats no es van observar diferències associades al sexe. En canvi, el patró d'Ig va canviar en els animals infectats per RV, els quals van mostrar un valor més elevat de la relació d'Ig Th1/Th2. Aquest canvi es va deure principalment a una reducció de la IgG1, una Ig associada a la resposta Th2, tant en mascles com en femelles i també a una reducció de la IgG2a, que només es va observar en les femelles. Aquest patró d'Ig diferencial entre els animals del grup control i els infectats s'ha observat prèviament en considerar tant mascles com femelles de forma conjunta [209]. S'ha de tenir en compte que la llet materna té Ig i per tant influeixen fortament en els nivells plasmàtics d'Ig de les cries durant la lactància, tal com s'ha observat en estudis anteriors [15]. Per tant, el desenvolupament del dimorfisme sexual del sistema immunitari en les primeres etapes de vida [210], com per exemple el dimorfisme puntual observat en els nivells d'IgG2a en els grups infectats, pot estar emmascarat per les Ig absorbides de la llet materna durant aquest període.

Pel que fa a la resposta específica, els nivells d'Ac anti-RV, una vegada la infecció ja s'havia resolt, van indicar que el perfil era similar entre sexes. En aquesta etapa, la resposta adaptativa anti-RV és probablement baixa, degut a que el sistema immunitari encara és immadur i està en desenvolupament [211]. El fet que les rates de la mateixa ventrada mostrin nivells similars de subtipus i subclasses d'Ig i nivells d'Ac anti-RV, i s'agrupin quan es fa una representació tipus PCA, reforça la idea que la transferència passiva de llet materna és fonamental en la resposta immunitària contra el virus. Això, encara es veu més reforçat per la correlació dels nivells d'Ac anti-RV a la llet materna i el de les cries. No obstant això, la via transplacentària també s'hauria de tenir en compte. Segons el nostre coneixement, aquest és el primer estudi que avalua la resposta immunitària associada al sexe contra la infecció causada per RV, tant en models animals com en humans i la seva influència en la immunitat passiva. Hauria estat interessant avaluar, a més dels nivells d'Ac, la seva capacitat de neutralització contra el virus, per tal d'explorar millor el paper del sexe en la resposta antiviral.

El fet que la resposta immunitària humoral no va ser diferent entre sexes, indica que haurien de ser altres mecanismes els que expliquessin la menor gravetat de la diarrea que es troba en les femelles. A part de la immunitat adaptativa, també s'ha observat que la immunitat innata està associada al sexe [212,213] i per tant, es va explorar si les estratègies locals de defensa innata com la funció de barrera intestinal (producció de mucines o nivells de proteïnes d'unió estreta) i TLR estaven implicades. Estudis anteriors del nostre grup de recerca amb aquest model havien demostrat que els animals infectats per RV augmentaven la producció de mucina [133] i l'expressió gènica intestinal d'alguns TLR [214]. En aquest estudi, l'expressió gènica d'aquestes molècules a una edat molt primerenca i durant el pic de la diarrea no estava associada al sexe. Únicament en una etapa posterior de desenvolupament i després de la resolució de la infecció, entre moltes tendències que s'haurien de confirmar, es va trobar una expressió gènica més elevada de MUC2 i TLR9. Encara quedaria per confirmar, amb noves aproximacions, si aquests mecanismes innats estan sotmesos al dimorfisme sexual i, si és així, si són, almenys en part, responsables dels resultats clínics diferencials.

En general, els mecanismes implicats en el dimorfisme sexual contra les infeccions víriques són poc coneguts. El cromosoma X té un paper important en la regulació de la funció immunitària i el cromosoma Y també conté gens de resposta reguladora [46]. Per aquest motiu, el dimorfisme observat en la resposta immunitària podria derivar dels efectes directes dels cromosomes sexuals o dels seus efectes indirectes, com ara les hormones sexuals [215]. Per aquest motiu, un examen acurat dels gens vinculats al cromosoma X també hauria estat útil per explicar els mecanismes implicats en les diferències de les manifestacions degut al RV que es troben en aquest estudi.

D'altra banda, altres autors han demostrat que la microbiota intestinal també difereix entre els sexes [50,51,53,215–219], tot i que el moment en què apareix aquest dimorfisme encara no està clar [220]. La interacció entre la microbiota intestinal i el sistema immunitari intestinal pot ser recíproca i cadascun pot influir en l'altre. Estudis anteriors en humans i en el nostre model de rata també han demostrat una disbiosi associada a la infecció i han demostrat com la modulació de la composició de la microbiota s'associa amb la millora clínica [214]. S'ha demostrat que soques bacterianes específiques i determinats prebiòtics milloren la gastroenteritis causada per RV mitjançant mecanismes directes i indirectes, com l'agregació de patògens o la immunomodulació, respectivament [124,193]. Per tant, el dimorfisme sexual de la microbiota intestinal també s'hauria d'abordar en estudis futurs.

A més, les dues vacunes orals vives atenuades contra la gastroenteritis causada per RV, RotaTeq (Merck and Co, West Point, PA, EUA) i Rotarix (GSK Biologicals, Rixensart, Bèlgica), han demostrat seguretat i eficàcia en nens, però en els estudis existents no s'han abordat adequadament les diferents respostes en nens i nenes [221–223]. Així,

aquestes dades ens porten a suggerir un interès per estudiar més aquesta resposta en el context de la vacunació i la prevenció de futures reinfeccions.

> ***En resum**, el present abordatge permet establir a nivell preclínic que tot i que el sexe no influeix en la incidència i durada de la diarrea per rotavirus, ni en alguns mecanismes defensius implicats (p.e. resposta humoral, expressió gènica intestinal), sí que s'observa un efecte significatiu del dimorfisme sexual en la gravetat de la diarrea.*

Aquests resultats demostren que la susceptibilitat i la resposta de l'hoste a les infeccions víriques són lleugerament diferents entre sexes. Molts estudis sobre infeccions víriques en humans i rosegadors utilitzen només un sexe o no informen del sexe dels seus pacients. Els resultats obtinguts sense comprovar la possible influència del sexe podrien portar a conclusions errònies o parcials. Per aquest motiu, la inclusió del sexe com a criteri d'estratificació milloraria la comprensió de les diferències específiques de sexe en la resposta a les infeccions i el desenvolupament de tractaments contra les infeccions víriques.

Amb aquests dos estudis (**Article 1** i **Article 2**) s'ha pogut determinar d'una banda l'efecte *S. epidermidis* sobre les rates neonatals i de l'altra, la influència del dimorfisme sexual en el context d'una infecció vírica, en un model àmpliament establert en el nostre grup de recerca. Ambdues alteracions podrien ser contrarestades per components alimentaris, com els moduladors microbians.

Ara bé, en aquesta tesi, el fet que en el cas de les dues dosis de sobrecàrrega bacteriana amb *S. epidermidis* no s'hagi donat lloc a tants canvis a nivell immunitari com en el cas de la gastroenteritis causada per RV, va portar a estudiar, com a mínim en primer lloc, el paper de determinats moduladors microbians Lactofidus® en un model de rata lactant sana (**Article 3**) i en un model d'infecció per RV (**Article 4**). En un futur, i utilitzant l'estratègia més efectiva, es podria avaluar l'impacte d'aquesta en el model que mimetitza la mastitis infecciosa de la mare.

En primeres etapes de vida, la llet materna és la principal font de diversos compostos relacionats amb la microbiota, tant de microorganismes amb acció probiòtica, prebiòtics com postbiòtics. Quan la lactància materna no és possible, les fórmules infantils són una bona alternativa. Per aquesta raó, en estudis previs en el nostre grup s'ha estudiat l'efecte d'alguns d'aquests components. Els dos estudis següents s'han centrat en la barreja prebiòtica formada per scGOS-lcFOS, del postbiòtic Lactofidus® i de la combinació de tots dos. El seu efecte en animals sans i infectats amb un RV, es discutiran a continuació de forma separada, en primer lloc del prebiòtic, en segon lloc del postbiòtic i en darrer terme de la combinació, amb l'objectiu de trobar un efecte

additiu o sinèrgic, tal i com es creu que succeeix entre els diferents components de la llet materna.

Tot i que la llet materna conté oligosacàrids específics, aquests no se solen afegir a les fórmules infantils, i els prebiòtics més afegits i estudiats per mimetitzar les seves funcions són els FOS, els GOS, o la barreja d'ambdós, com és el cas de la combinació scGOS-lcFOS [129,131]. Aquesta combinació de prebiòtics sembla ser la que aconsegueix, degut a les seves característiques estructurals i efectes, mimetitzar millor els presents en llet materna, per aquesta raó van ser seleccionats en aquest estudi

Concretament, per tal d'estudiar els efectes de la combinació d'aquesta barreja de prebiòtics en el desenvolupament del sistema immunitari i en el procés infecciós per RV, es van fer servir dos models experimentals diferents. Per una banda es van suplementar rates lactants sanes, des del dia 2 de vida fins al dia 16. Per l'altra banda, en el cas del model d'infecció per RV és va seguir el mateix patró de suplementació, amb l'excepció que a dia 5 de vida, les rates lactants van rebre la inoculació amb l'agent infecciós, el RV. Els resultats obtinguts en ambdues aproximacions permeten establir el paper dels scGOS-lcFOS en un context de salut o de malaltia prevalent en primeres etapes de vida.

En primer lloc es va observar que l'evolució del pes corporal i el creixement de les rates lactants no es van veure influenciats per la suplementació amb scGOS-lcFOS de forma consistent, sinó que només es va observar un augment de pes de forma puntual a dia 8 de vida i un augment en la proporció cos/cua. De fet, estudis previs del nostre grup de recerca no van observar efectes en el pes corporal [143] o només un lleuger augment al final del període de lactància [133]. A més, altres autors no han trobat canvis en el creixement ni en el pes corporal després de la suplementació amb GOS-inulina [224]. En nadons, alguns estudis mostren que la suplementació amb scGOS-lcFOS augmenta el pes corporal i la longitud del nounat [134] mentre que en altres no s'observen aquests efectes [131,225]. Per tant, el que sí que es pot establir és que la suplementació amb aquesta barreja prebiòtica no provoca un canvi indesitjable en el pes corporal, ni per pèrdua ni per excés de guany ponderal.

En canvi, en el cas de les rates amb RV, tot i que la suplementació amb scGOS-lsFOS no va influir en el seu creixement, sí va augmentar el seu pes després de resoldre la infecció per RV en comparació amb el grup referència, però no en comparació amb les rates infectades per RV. Aquest efecte, tal i com s'ha mencionat abans, va en línia amb estudis previs del nostre grup de recerca utilitzant aquest model d'intervenció nutricional on es va observar un impacte en el pes corporal de les rates suplementades al final de l'estudi [133], tot i que no sempre s'ha pogut constatar [136,143]. En

qualsevol cas, la infecció amb el RV no provoca pèrdua de pes associada, en tractar-se d'un procés diarreic lleu, i per tant l'efecte observat per la suplementació no sembla estar relacionat amb aquest.

Pel que fa a l'efecte del suplement amb scGOS-lcFOS a nivell del pes d'òrgans, tant en les rates sanes com en les rates infectades per RV es va observar un efecte tròfic en l'intestí prim i en l'intestí gros. Aquest resultat, va en línia amb estudis previs amb aquesta mateixa barreja en rates infectades per RV, així com el que s'observa amb una suplementació amb un oligosacàrid de llet materna, com és la 2-fucosilactosa (2-FL) [133]. A més, en aquests estudis previs, durant el pic de diarrea, es van observar canvis en l'arquitectura de l'intestí prim, on totes dues suplementacions presentaven vellositats amb més alçada i amb una àrea major en comparació amb el grup referència [133]. En el cas de la suplementació amb 2-FL també es van observar aquests canvis en rates sanes, on a banda dels canvis esmenats anteriorment, també es va observar un augment de la relació longitud de vellositats/criptes [209]. Tanmateix, en pròxims estudis seria interessant avaluar si la suplementació amb scGOS-lcFOS modifica l'arquitectura intestinal no només durant el pic de diarrea, sinó si aquest canvi es manté en el temps i, a més, si també succeeix a les rates lactants sanes.

Tant a les rates sanes, com a les infectades per RV, al final de les intervencions es van avaluar les variables hematològiques. La suplementació amb scGOS-lcFOS no influeix de forma clara, ja que es van observar valors similars en comparació amb el grup de referència amb l'excepció d'una lleugera disminució de l'hematòcrit en el cas de les rates sanes suplementades amb scGOS-lcFOS. En canvi, durant el pic de diarrea, el grup infectat per RV que va rebre la suplementació amb scGOS-lcFOS va mostrar un augment de la concentració d'hemoglobina i del nombre de plaquetes en comparació amb el grup RV sense intervenció, però no amb el grup referència. Aquests resultats suggereixen que aquests prebiòtics, enfront la infecció causada per RV, són capaços d'evitar la reducció de la concentració de l'hemoglobina i de les plaquetes mantenint uns nivells més similars als del grup referència, tot i que cal aprofundir en la significació biològica real d'aquests efectes puntuals.

És ben conegut que els prebiòtics scGOS-lcFOS modifiquen la consistència de les femtes, fent-les més toves i per tant, més similars als nadons que s'alimenten amb llet materna [129–131]. En el nostre estudi, les rates suplementades amb aquesta barreja de prebiòtics van mostrar unes femtes menys consistents en comparació amb el grup referència, de forma similar als resultats obtinguts en estudis previs [133,136]. Els canvis en la consistència de les femtes pot anar acompanyada d'un augment de la quantitat d'aigua de les femtes i/o d'alteracions del pH. No obstant això, en el nostre estudi, tant el pH fecal de les rates sanes com de les infectades no es va veure significativament afectat per la suplementació, tot i que durant la primera setmana de

vida es va observar una tendència a reduir-lo. D'haver-se observat una disminució clara de pH es podria haver associat a un canvi en la producció d'AGCC per part de la microbiota. En estudis previs del nostre grup de recerca utilitzant aquesta mateixa suplementació, tot i que sota un procés infecciós, es va observar una acidificació de les femtes [92]. En humans, alguns estudis també han observat que la suplementació amb scGOS-lcFOS redueixen el pH fecal [143,226,227], com era esperable degut als AGCC abans mencionats. Per tant, en el nostre disseny, no sembla que aquest sigui un efecte derivat de la suplementació.

En el cas de les rates lactants infectades per RV, l'efecte fecal intrínsec dels prebiòtics scGOS-lcFOS que indueix unes femtes més toves, dificultava l'avaluació de la gravetat de la diarrea causada per RV. Per aquest motiu, les dades d'aquestes rates van haver de normalitzar-se, en base a la seva consistència basal, per tal de poder avaluar el seu efecte durant la diarrea, tal i com s'ha fet en estudis previs del nostre grup de recerca [133,136]. Una vegada normalitzats els resultats, les rates suplementades amb scGOS-lcFOS van mostrar una menor incidència, durada i gravetat en comparació amb el grup RV sense intervenció. Aquests resultats reforcen els efectes obtinguts en estudis previs del nostre grup de recerca en relació a la suplementació amb scGOS-lcFOS [134,228], i per tant de l'interès d'addicionar-lo en fórmules infantils amb aquesta acció preventiva.

D'altra banda en les femtes d'animals infectats amb RV, a més d'observar canvis en el seu aspecte i pH, també es pot investigar la presència del virus. En aquest sentit, la càrrega viral de les femtes reflecteix les partícules virals inoculades o les produïdes a l'intestí per la multiplicació del virus. La suplementació amb aquests prebiòtics va mostrar un reducció dràstica del nombre de partícules víriques excretades a nivell fecal. De fet, es va fer un seguiment de l'eliminació viral en femtes els dies posteriors a la inoculació, observant que el pic màxim correspon al dia després a la seva inoculació. La reducció en l'eliminació fecal del virus per efecte de la suplementació podria ser degut a la capacitat dels scGOS-lcFOS d'unir-se al virus, ja que s'ha observat anteriorment com un mecanisme de protecció durant la infecció per RV [133,136]. És a dir, la unió que farien aquests oligosacàrids al virus, i que pot impedir el procés infecciós, també podria impedir que el virus pogués ser detectat mitjançant la tècnica d'ELISA que s'ha utilitzat. Per tant, aquests prebiòtics podrien parcialment bloquejar el patogen reduint l'habilitat del RV per infectar a l'hoste i, conseqüentment, reduir la gravetat de la diarrea, com s'ha observat en altres estudis [136,143]. Ara bé, serà d'utilitat en un futur, avaluar l'excreció del virus per tècniques de PCR, les quals podran confirmar la presència del virus independentment de si estan o no bloquejats pels oligosacàrids prebiòtics.

Més enllà de l'efecte en el pH fecal també es va voler explorar si la suplementació tenia un efecte en el pH d'altres compartiments digestius que no estiguessin tant relacionats amb canvis en la composició microbiana. En aquest sentit, les rates suplementades, tant les sanes com les infectades per RV, a dia 8 de vida i durant el període de diarrea, respectivament, van mostrar una reducció en el pH del contingut estomacal. Hi ha molt poca informació disponible sobre l'efecte d'aquesta suplementació en aquest compartiment tant en animals com humans. Tot i això, aquest resultat podria suggerir un efecte positiu en la prevenció de l'entrada de patògens en el tracte gastrointestinal tal com succeeix en el cas de la disminució del pH fecal [227,229], i que implica un entorn poc adequat per al creixement de patògens.

Durant les primeres setmanes de vida, les principals Ig circulants són IgG maternes, les quals, es troben en nivells més alts que les que produeixen els nounats [12]. A més, com s'ha comentat anteriorment, en el sistema immunitari neonatal predomina una resposta de tipus Th2 -més anti-inflamatòria-, i és durant el seu desenvolupament quan es potencia la resposta Th1 -més pro-inflamatòria- per tal d'obtenir un bon equilibri entre la resposta Th1/Th2 [181]. En els dos estudis presentats, aproximació en animals sans i en animals infectats, es va abordar l'efecte de la barreja prebiòtica en la resposta humoral associada a una resposta mucosal (IgA), en desenvolupament (IgM) o relacionada amb l'activitat de tipus Th1 i Th2. Els resultats obtinguts demostren que en les rates suplementades amb scGOS-lcFOS, el perfil d'Ig es va veure modificat, tant a les rates sanes com a les infectades per RV. En el cas de les rates sanes, malgrat la reducció de la proporció de les IgG, es va observar un augment en la proporció de les IgM, la qual podria indicar un efecte positiu en la maduració del sistema immunitari, ja que són aquestes les que s'estan produint pel nounat, a diferència de les IgG, que predominantment deriven de les absorbides de la llet materna. A més, la suplementació va induir un augment de l'isotip IgG2b, el qual està associat amb la resposta Th1, suggerint de nou la potenciació de la maduració del sistema immunitari.

Les rates infectades per RV i suplementades amb scGOS-lcFOS van mostrar una reducció dels nivells d'IgA mentre que la proporció Th1/Th2 era major en comparació amb el grup referència. El fet de promoure la resposta Th1 en detriment de la resposta més primerenca o Th2, va en línia amb el que es va observar en animals sans i reforça aquest efecte ja suggerit en estudis previs del nostre grup de recerca [133]. Ara bé, en comparar els canvis en les Ig del grup infectat per RV i suplementat amb el grup RV sense intervenció nutricional, no es va observar cap canvi, suggerint que l'efecte del suplement en la prevenció de la diarrea no es deu com a mecanisme principal, a una potenciació quantitativa de les resposta humoral, sinó més aviat a una redirecció del tipus de resposta, que és més efectiva en l'eliminació del virus, la resposta Th1.

D'altra banda, i més enllà de l'efecte global del scGOS-lcFOS sobre els tipus i subtipus d'Ig, també es va estudiar la resposta en Ac específica contra el virus. Es va observar que, durant el pic de diarrea no es va trobar que el títol d'Ac anti-RV augmentés en el moment de la seva avaluació. De fet, un estudi previ del nostre grup de recerca, ja va suggerir que no es pot evidenciar de forma clara una resposta específica d'Ig anti-RV en aquesta edat a causa de la immaduresa del sistema immunitari de les rates lactants [133]. Tanmateix, en aquest estudi s'ha observat un augment dels nivells plasmàtics d'IgM anti-RV al grup suplementat amb els prebiòtics en comparació amb el grup referència no infectat, suggerint doncs la potenciació de la resposta immunitària anti-RV d'aquests components. Aquesta troballa és controvertida, ja que en estudis previs, s'ha constatat tant aquest mateix efecte [143], com la seva absència [133]. En qualsevol cas, els nivells més alts d'IgM anti-RV en aquest grup podrien suggerir que la suplementació amb scGOS-lcFOS te un impacte positiu en la maduració del sistema immunitari.

Fins aquest moment doncs, es pot suggerir que la barreja d'aquests oligosacàrids té un efecte protector contra el RV, per efectes directes sobre el patogen, com és la seva capacitat de bloqueig, així com d'efectes indirectes a través de promoure una resposta immunitària més madura. Ara bé, existeixen altres possibles mecanismes que poden estar implicats en aquest paper preventiu, com poden ser la millora de la capacitat de barrera i el seu efecte prebiòtic sobre la microbiota intestinal en desenvolupament.

Per explorar el primer dels mecanismes mencionats, es va estudiar l'expressió gènica de molècules implicades en la funció de barrera, com són les mucines i les proteïnes associades a les unions estretes epitelials. Així, es va poder observar com la intervenció amb scGOS-lcFOS va induir una reducció dels nivells d'expressió de MUC2 en l'intestí de rates lactants sanes. Cal mencionar que altres autors no han observat aquest efecte ni en rates ni en ratolins suplementats amb scGOS o lcFOS [230,231]. Tot i que aquest resultat pot semblar que no estigui relacionat amb una millora de la funció de barrera, una possible explicació podria ser degut als canvis obtinguts en la microbiota intestinal. Concretament, s'ha observat que la família *Akkermansia* es troba reduïda a l'intestí prim d'aquests animals, ja que les espècies d'aquesta família són degradadores de mucina [232] i per tant, es podria hipotetitzar que aquestes rates no necessitarien substituir contínuament la capa de moc perquè en haver-hi menys *Akkermansia* utilitzant aquest moc com a font d'energia, no seria necessari.

Ara bé, aquest efecte no es va observar en el model d'infecció, però en canvi, les rates lactants infectades per RV i suplementades amb scGOS-lcFOS van mostrar un augment en l'expressió gènica intestinal de MUC3 en comparació amb el grup referència i el grup RV sense intervenció després de resoldre la infecció. L'augment de l'expressió de

MUC3 observada en aquest estudi suggereix un reforç de la funció de barrera intestinal de les rates lactants que podria explicar la millora de la diarrea causada per RV.

Pel que fa a l'efecte en les proteïnes d'unió estreta claudina (Cldn) 2, Cldn4 i ocludina (Ocln), tant a les rates sanes, com a les rates infectades per RV, el suplement no va influenciar la seva expressió gènica, i per tant va indicar que aquest no era un dels mecanismes implicats en l'efecte anti-diarreic o maduratiu de la capacitat defensiva. Altres autors han observat que la suplementació amb scGOS no modifica l'expressió gènica de les Cldn 1-4 però si augmenta l'expressió gènica d'Ocln en garrins [233]. En canvi, estudis previs del nostre grup de recerca van observar un augment puntual en l'expressió de Cldn2 en rates suplementades amb scGOS-lcFOS i infectades per RV a dia 8 de vida [133]. Aquest resultat, a dia 16 de vida, no s'ha confirmat en l'estudi realitzat en aquesta tesi.

L'expressió gènica intestinal permet detectar canvis en l'estructura de la barrera intestinal, però la millora de la diarrea observada al grup suplementat amb scGOS-lcFOS, també podria ser deguda a una millora de la funció de la barrera intestinal, la qual conferiria una major resistència a la infecció. Una manera indirecta de determinar la funció de la barrera intestinal és mitjançant la mesura dels nivells de l'alfa-1-antitripsina (A1AT) intestinal. Els nivells plasmàtics de A1AT es troben elevats durant una resposta inflamatòria i poden ser transportats cap al lumen intestinal degut a un augment de la permeabilitat de la barrera intestinal [234]. El grup infectat per RV sense intervenció va mostrar uns nivells d'A1AT que no van arribar a ser diferents dels del grup referència. Aquest resultat va en línia amb estudis previs del nostre grup de recerca [133], ja que en tots dos casos es va utilitzar la soca de RV SA-11, la qual provoca un procés diarreic lleu que sembla no alterar de forma greu la integritat de la barrera. En canvi, al grup infectat per RV i suplementat amb scGOS-FOS els nivells d'A1AT eren més baixos que al grup referència i que el grup RV. Això podria indicar una millora de la barrera intestinal que els protegiria de la infecció per RV. En aquest sentit, un estudi anterior del nostre grup de recerca també va observar una disminució dels nivells d'A1AT en lates lactant suplementades amb scGOS-lcFOS i 2-FL [133]. A més, altres autors han demostrat una millora de la barrera intestinal en adults obesos tractats amb scGOS [235].

A nivell intestinal, també es va estudiar l'expressió dels gens IgA, FcRn i el de la proteïna-1 de maduració induïda per limfòcits B (Blimp-1), els quals estan relacionats amb la maduració del sistema immunitari i la seva regulació. Tant el FcRn com el Blimp-1 són marcadors de maduració intestinal en rates lactants. Com s'ha mencionat en l'estudi anterior, durant el període de lactància, el FcRn intervé en la unió i la transferència de les IgG a través de l'intestí prim i, després d'aquest període, la seva expressió disminueix [196]. En quant al Blimp-1, sembla que podria actuar com a

repressor de la transcripció nuclear a l'intestí prim durant el període de lactància i després la seva expressió es redueix [196]. La suplementació amb scGOS-lcFOS no modifica els nivells d'expressió dels gens IgA, FcRn i Blimp-1 tant a les rates lactants sanes com a les infectades per RV. El fet que les rates sanes suplementades amb scGOS-lcFOS tinguessin una menor proporció d'IgG, probablement d'origen matern, no és degut a una menor absorció intestinal ja que l'expressió del gen FcRn no es veu modificada. En quant a les rates infectades per RV i suplementades amb scGOS-lcFOS, la reducció de la concentració d'IgA no és deguda a un canvi en la producció d'aquesta Ig, ja que la seva expressió no va canviar i tampoc es déu a un canvi en la maduració dels limfòcits B, ja que l'expressió del gen Blimp-1 no es va modificar. Per tant, els canvis observats en el perfil d'Ig es deuen a altres mecanismes. S'hauran de realitzar més estudis per tal d'aclarir els mecanismes implicats en aquests canvis.

Per determinar les interaccions entre hoste i microorganismes, es va estudiar l'expressió gènica dels TLR donat el seu paper clau en la inducció de la resposta immunitària innata i respostes inflamatòries [195]. A les rates lactants sanes suplementades amb el scGOS-lcFOS, l'expressió gènica dels TLR estudiats (TLR2, TLR 3, TLR 4, TLR 5, TLR 7, TLR 9) no es va veure modificada. En canvi, a les rates infectades per RV i suplementades amb scGOS-lcFOS l'expressió gènica del TLR3 sí que es va trobar regulada a l'alça en comparació amb les rates del grup referència. El TLR3 reconeix els ARN de doble cadena i virus [236]. Per tant, aquest resultat podria indicar que la suplementació amb scGOS-lcFOS millora el reconeixement del virus afavorint la resposta del sistema immunitari per combatre la infecció.

D'altra banda, la microbiota intestinal interacciona amb el sistema immunitari contribuint a la seva maduració i promovent la immunitat de la barrera intestinal [37]. Per tant, canvis en les poblacions microbianes poden modificar el funcionament de la microbiota i de la capacitat defensiva de l'hoste. Per analitzar la composició de la microbiota, obtinguda per seqüenciació, s'utilitzen mesures com l'alfa diversitat i la beta diversitat. L'alfa diversitat de les poblacions microbianes es mesura com la riquesa observada (nombre d'unitats taxonòmiques) o la uniformitat (abundància relativa d'aquests tàxons) i la beta biodiversitat es quantifica com la variabilitat en la composició de la comunitat (la identitat dels tàxons observats) entre mostres dins d'un hàbitat [237].

La suplementació amb scGOS-lcFOS a les rates sanes va mostrar una menor uniformitat de Pielou i un menor índex de Shannon, el que indicaria una menor biodiversitat global o una menor equitat en la distribució de la proporció comunitària. Per tant, aquesta barreja de prebiòtics modifica la microbiota intestinal de les rates lactants reduint la diversitat de microorganismes i modificant la proporció d'aquests. En canvi, les rates suplementades i infectades per RV no van mostrar cap diferència en comparació amb

les rates del grup referència ni amb les del grup RV sense intervenció. En quant a la beta biodiversitat, la suplementació amb scGOS-lcFOS no va influir a les rates sanes ni a les infectades per RV. Aquests estudis estan parcialment en línia amb estudis previs en aquest model [214].

Per aprofundir en l'estudi de la diversitat microbiana, es van avaluar les proporcions relatives de diferents taxons bacterians. Les rates lactants sanes suplementades amb aquests prebiòtics van mostrar una disminució en l'abundància de la família *Akkermansiaceae* i del gènere *Akkermansia* en comparació amb el grup referència. *Akkermansia muciniphila* pertany a la família *Akkermansiaceae* i ha estat associada amb la salut i inversament correlacionada amb diferents malalties com per exemple la colitis i la malaltia de Crohn [238] o fins i tot amb el parkinson [239]. La reducció de l'abundància d'aquest grup, tal i com s'ha mencionat anteriorment, podria estar associada a una menor expressió de MUC2 en aquest grup de rates lactants, ja que aquesta reducció podria disminuir la formació de moc, i, per tant, el bacteri tindria menys substrat per créixer. Alguns autors han demostrat l'efecte promotor del prebiòtic lcFOS en el creixement d'*Akkermansia muciniphila* [240], per tant la combinació amb scGOS i l'edat primerenca de les rates podrien ser factors influents en els resultats contraris observats en el nostre estudi.

L'abundància de la família *Peptostreptococcaceae* i *Clostridiaceae 1* van augmentar amb la intervenció de scGOS-lcFOS. Hi ha poca informació sobre aquestes famílies i sobre la seva modulació mitjançant la dieta, però en el cas de *Peptostreptococcaceae* s'ha descrit que es troba en menor proporció en persones diabètiques [241] i en un model de depressió induïda en rates [242]. Aquests fets suggereixen que aquesta família de bacteris podrien tenir efectes beneficiosos sobre l'hoste.

La suplementació amb scGOS-lcFOS, va confirmar l'efecte bifidogènic ja descrit, que també s'ha observat en estudis anteriors en cries de rata [224] i nadons [131,227,243,244]. Cal tenir en compte que l'abundància relativa de bifidobacteris en aquest model de rata lactant és molt més baixa en comparació amb els nivells de bifidobacteris observats en un nadó, per la qual cosa la resposta de la microbiota en aquesta edat tan primerenca a aquests suplements s'ha d'interpretar amb precaució, però sense dubte, permet reforçar la idea de l'impacte positiu sobre el desenvolupament de l'ecosistema intestinal del nounat.

A diferència de les rates sanes suplementades, les rates infectades per RV i suplementades amb scGOS-lcFOS, van mostrar una reducció de l'abundància de la família *Peptostreptococcaceae* i del gènere *Romboutsia* mentre que va augmentar l'abundància relativa de la família *Staphylococcaceae* i el gènere *Escherichia-Shigella* en comparació amb els grups referència i RV sense intervenció. A més, la proporció del gènere *Lactobacillus* era menor en comparació amb el grup RV sense suplementació.

Hi ha molt poca informació sobre la família *Peptostreptococcaceae* i els gèneres *Romboutsia* i *Escherichia-Shigella* sobre la seva modulació mitjançant la dieta. En quant *Escherichia-Shigella*, altres autors han observat que una disminució de la seva abundància en garrins nounats amb diarrea respecte els seus germans sans [245]. Per tant, l'augment d'aquest gènere al grup suplementat amb scGOS-lcFOS, podria indicar que l'*Escherichia-Shigella* podria promoure algun efecte positiu durant la infecció causada per RV. En quant a la família *Staphylococcaceae* i el gènere *Lactobacillus*, és àmpliament conegut que la llet materna afavoreix el predomini de bacteris com *Bifidobacterium*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* i *Lactobacillus* als intestins del nadó [32,33]. Per tant, el fet que la suplementació amb scGOS-lcFOS augmenti la proporció relativa de la família *Staphylococcaceae* fa pensar que, sempre en un cert marge i no en forma de sobrecàrrega com en l'estudi inicial d'aquesta tesi, aquest canvi podria ser beneficiós, ja que indicaria que una fórmula infantil suplementada amb scGOS-lcFOS afavoreix la formació d'una microbiota més similar a la dels nadons que reben llet materna. La suplementació amb scGOS-lcFOS modifica la composició i diversitat de la microbiota intestinal tant a les rates sanes com a les rates infectades per RV. En estudis futurs s'hauria de profunditzar sobre els canvis observats tant a nivell de la diversitat microbiana com en l'abundància dels diferents taxons de la microbiota per tal de determinar el seu possible paper, especialment enfront la infecció causada per RV.

Els canvis observats en la composició de la microbiota, poden modificar la seva funcionalitat. Els AGCC són els principals productes de la fermentació de la microbiota [34]. Són considerats mediadors anti-inflamatoris amb un paper regulador en l'homeòstasi energètica, metabolisme de la glucosa i lípids i sensibilitat a la insulina [34,246]. La suplementació amb scGOS-lcFOS, tant en rates lactants sanes, com en rates que van ser infectades per RV, van mostrar una disminució del percentatge d'àcid propiònic, isobutíric i isovalèric mentre que el percentatge d'àcid acètic va augmentar respecte els grups de referència, i en el cas de les rates suplementades i infectades per RV, també respecte el grup RV sense intervenció. En línia amb aquests resultats, s'ha descrit que la presència de scGOS-lcFOS en una fórmula infantil augmenta la proporció d'acetat i redueix la de propionat i altres AGCC [244]. A més, també en nadons, es va veure augmentada la producció intestinal d'àcid acètic quan s'alimentaven amb una fórmula infantil amb GOS fent que el perfil d'AGCC fos més semblant al que s'observa en nadons alletats per la mare [243].

En el cas de les rates sanes suplementades amb scGOS-lcFOS, tant les abundàncies relatives de la microbiota intestinal com el patró dels AGCC es van mesurar al final de l'estudi (dia 16) mentre que en les rates infectades per RV es va estudiar la microbiota durant el pic de diarrea (dia 8) i el patró d'àcids grassos es va mesurar al final de l'estudi (dia 16). Per tant, a les rates sanes s'ha pogut correlacionar la composició de la microbiota intestinal amb el patró d'AGCC en la mateixa mostra. L'àcid propiònic

estava correlacionat positivament amb les famílies *Akkermansiaceae*, *Prevotella* i *Lachnospiraceae* i negativament amb *Clostridiaceae 1*, *Bifidobacteriaceae* i *Peptostreptococcaceae*, aquests resultats estan en línia amb el coneixement que *Prevotella*, *Lachnospiraceae* i *Negativicutes class* són productors de propionat [231,247]. L'àcid acètic estava correlacionat positivament amb les famílies *Clostridiaceae 1, Peptostreptococcaceae* i *Bifidobacteriaceae* i negativament amb *Akkermansiaceae, Prevotella* i *Lachnospiraceae*. A més, l'abundància de la família *Akkermansiaceae* i *Lachnospiraceae* també es correlacionava negativament amb la producció d'àcid acètic, cosa que suggereix el seu paper com a productors de propionat [231]. Alguns membres de la família *Clostridiaceae* produeixen isovalerat i isobutirat [248,249] i les famílies *Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae* i *Erysipelotrichaceae* produeixen butirat [247,250]. Tanmateix, la proporció d'àcid isobutíric estava correlacionat positivament amb l'abundància relativa de la família *Akkermansiaceae* i els àcids isobutíric i isovalèric estaven correlacionats positivament amb les famílies *Lachnospiraceae* i *Prevotella* i negativament amb les famílies *Clostridiaceae 1* i *Peptostreptococcaceae*. No es va trobar cap correlació entre aquests bacteris i els nivells d'àcid butíric. En general, aquestes correlacions van mostrar que la suplementació amb scGOS-lcFOS va canviar l'abundància relativa de la microbiota intestinal i, en conseqüència, va modificar el patró de producció d'AGCC.

***En resum**, la suplementació amb scGOS-lcFOS en tots dos models, tant el sa com el de infecció per RV, va mostrar un efecte tròfic en els intestins. No va canviar el pH fecal, però sí l'estomacal. Va modificar el perfil d'Ig plasmàtiques. A nivell intestinal, no va modificar l'expressió gènica de les proteïnes d'unió estreta Cldn2, Cldn4 i Ocln ni de les molècules relacionades amb la maduració del sistema immunitari i la seva regulació IgA, FcRn i Blimp-1. En canvi, va influenciar en la composició de la microbiota intestinal i en la producció d'AGCC. Ara bé, la suplementació amb scGOS-lcFOS va mostrar efectes diferents en rates lactants sanes en comparació de les rates infectades per RV. En el cas de les sanes, no va influenciar en el pes corporal ni en les variables hematològiques de forma consistent. En canvi, a nivell intestinal, va regular a la baixa l'expressió de MUC2. En quant a les rates lactants infectades per RV, la suplementació amb scGOS-lsFOS va mostrar una menor incidència, durada i gravetat de la diarrea. Va reduir el nombre de partícules víriques eliminades en femtes. En quant a les variables hematològiques, va augmentar la concentració d'hemoglobina i la concentració de plaquetes en comparació amb el grup RV sense intervenció. La suplementació no va influir en les Ig plasmàtiques i el títol d'Ac anti-RV del grup infectat per RV i suplementat amb scGOS-lcFOS en comparació amb el grup RV sense intervenció nutricional. A nivell intestinal, l'expressió del*

TLR3 i de la MUC3, va ser regulada a l'alça i va reduir la permeabilitat intestinal.

Tots aquests resultats, juntament amb resultats previs, permeten suggerir a aquesta barreja prebiòtica com a component important per a ser addicionat en una fórmula infantil, ja sigui per promoure un millor desenvolupament microbià com immunitari. Així mateix, la seva presència en la fórmula consumida per l'infant por tenir un efecte preventiu important en la possible infecció per RV.

A banda dels prebiòtics, aquesta tesi s'ha centrat en un component més innovador, un postbiòtic. Així, el segon suplement que s'ha estudiat en els **Articles 3** i **4**, és una barreja de substàncies postbiòtiques generada a partir d'una fórmula infantil fermentada pels bacteris *Bifidobacterium breve* i *Streptococcus thermophilus* i inactivada per calor (Lactofidus®). En particular, el procés Lactofidus® és un procés de fermentació ben controlat en el qual les dues soques esmentades anteriorment s'utilitzen per fermentar una matriu de llet i generar en el seu procés metabòlic tota una sèrie de compostos bioactius (postbiòtics). Després del procés de fermentació, la matriu de llet s'asseca originant com a resultat final la barreja postbiòtica que s'utilitza en aquest estudi.

Per tal de determinar els efectes del Lactofidus® en el desenvolupament del sistema immunitari i en el procés infeccións per RV, es van fer servir els mateixos dissenys experimentals que en el cas de la suplementació amb els prebiòtics scGOS-lcFOS de la intervenció anterior.

En primer lloc es va observar que la suplementació amb el Lactofidus® no influeix en el pes corporal ni creixement de les rates sanes. En línia amb aquests resultats, altres autors han informat que no hi ha cap efecte en nadons [251]. Per tant, el que sí que es pot establir és que la suplementació amb Lactofidus® no provoca un canvi indesitjable en el pes corporal, ni per pèrdua ni per excés de guany ponderal. En canvi, les rates infectades per RV i suplementades amb Lactofidus® van mostrar un augment d'aquestes variables en comparació amb els grups referència i RV sense intervenció. Segons el nostre coneixement, no hi ha estudis en models animals ni en humans infectats per RV o altres microorganismes que hagin estat suplementats amb Lactofidus®. Tot i així, la infecció amb el RV, en tractar-se d'un procés diarreic lleu, no provoca pèrdua de pes associada, i, per tant l'efecte observat per la suplementació no sembla estar relacionat amb aquest. Caldrà profunditzar en la repercussió biològica d'aquests resultats.

A nivell del pes d'òrgans, la suplementació amb Lactofidus® no va induir cap canvi en les rates sanes, mentre que les rates infectades per RV i suplementades amb aquest postbiòtic van mostrar un efecte tròfic en els intestins, melsa i timus. Altres autors han observat que la llet fermentada en nadons sans augmentava la mida del timus en comparació amb els nadons alimentats amb fórmules infantils estàndards [252]. L'augment de la mida del timus, així com la de la melsa, podrien estar relacionats amb un millor desenvolupament immunitari i resposta a la infecció [253].

Pel que fa a l'efecte del Lactofidus® en les variables hematològiques, les rates sanes, al final de l'estudi, van mostrar un augment de la concentració de plaquetes en comparació amb el grup referència mentre que les rates infectades per RV i suplementades amb Lactofidus® van mostrar una lleugera disminució del volum corpuscular mitjà dels eritròcits al final de l'estudi en comparació amb el grup referència, però, en canvi, durant el pic de diarrea no es va observar cap canvi en aquestes variables. A la literatura, no hi ha dades al respecte, i, per tant calen més experiments per tal d'esbrinar els possibles efectes dels canvis puntuals observats en aquests estudis i la seva participació en el desenvolupament del nadó.

A diferència dels prebiòtics, com el scGOS-lcFOS, que redueixen la consistència de les femtes [129–131], el postbiòtic Lactofidus® no va modificar la seva aparença. D'acord amb la literatura, altres autors tampoc han observat una menor consistència en les femtes [244]. A més de la consistència de les femtes, es va mesurar el pH fecal i el pH del contingut estomacal de les rates lactants sanes i no es va observar cap canvi respecte al grup referència. En contrast amb aquests resultats, altres autors han mostrat que, en nadons sans, la fórmula infantil fermentada amb Lactofidus® indueix un augment del pH fecal [244].

En el cas de les rates infectades per RV, com el postbiòtc Lactofidus® no té cap efecte intrínsec sobre la consistència fecal com succeïa en el cas del scGOS-lcFOS, no va ser necessari normalitzar les dades per avaluar el seu efecte; i els seus resultats es van poder avaluar de forma molt més clara. Les rates infectades i suplementades amb Lactofidus® van mostrar una menor incidència i gravetat de la infecció en comparació amb el grup RV sense intervenció. En línia amb aquest resultat, altres autors van observar que nadons que van rebre una fórmula infantil fermentada mostraven una reducció en la gravetat de la diarrea [254]. Tant el pH fecal com el del contingut estomacal d'aquestes rates era menor en comparació amb els grups referència i RV sense intervenció suggerint un efecte positiu sobre la prevenció de l'entrada de patògens al tracte gastrointestinal [227,229].

A part d'això, també es va determinar la presència del virus en les femtes mesurant la càrrega viral en femtes, la qual, tal com s'ha explicat anteriorment, reflecteix les partícules virals inoculades o les produïdes a l'intestí per la multiplicació del virus. La

suplementació amb Lactofidus® no va influir en l'eliminació viral en femtes. Ara bé, *in vitro,* va demostrar la seva habilitat per bloquejar parcialment el RV, per tant podria evitar parcialment la unió del RV a les estructures cel·lulars de l'hoste i així reduir la incidència de diarrea. En un futur s'hauria d'estudiar amb més profunditat aquests resultats per tal d'aclarir el fet que l'eliminació viral no va disminuir, però, en canvi, *in vitro*, el virus era bloquejat.

També, es va abordar l'efecte del Lactofidus® en la resposta humoral associada a la transferència d'Ig maternes (IgG), una resposta mucosal (IgA), en desenvolupament (IgM) o relacionada amb l'activitat de tipus Th1 i Th2. Les rates sanes suplementades amb Lactofidus® van mostrar una reducció dels nivells d'IgG i IgA. La proporció de les IgG també era menor, però es va observar un augment en la proporció de les IgM, el qual podria indicar un efecte positiu en la maduració del sistema immunitari, ja que, com s'ha mencionat anteriorment, aquestes Ig són les que s'estan produint pel nounat, a diferència de les IgG, que predominantment deriven de les absorbides a nivell intestinal de la llet materna ingerida. A més, aquesta suplementació va induir un augment de la concentració de l'isotip IgG2c, el qual està associat amb la resposta Th1, en detriment de la resposta Th2, suggerint de nou la potenciació de la maduració del sistema immunitari.

En el cas de les rates infectades per RV i suplementades amb Lactofidus® també es va observar una reducció dels nivells d'IgG (i dels isotips IgG2b i IgG2c), IgM i del balanç Th1/Th2 en comparació amb el grup RV sense intervenció, suggerint que el mecanisme principal d'aquest suplement en la prevenció de la diarrea no es deu a la potenciació de la resposta humoral. Més enllà de l'efecte global del Lactofidus® sobre els tipus i subtipus d'Ig, la suplementació amb aquest postbiòtic no va influenciar la resposta d'Ac específica contra el virus, ni en el cas dels títols d'Ac anti-RV totals ni dels nivells d'IgM anti-RV. La manca d'efecte observat pot ser degut a que, com s'ha explicat anteriorment, sembla ser que no es pot evidenciar una resposta específica d'Ig anti-RV clara en aquestes edats a causa de la immaduresa del sistema immunitari [133].

Hi ha altres mecanismes que poden estar implicats en aquest paper preventiu com la millora de la capacitat de la barrera intestinal. Per tant, es va mesurar l'expressió gènica de diferents mucines i proteïnes associades a les unions estretes epitelials. A les rates sanes, la suplementació amb Lactofidus® no va modificar l'expressió de la MUC2, MUC3 ni de les proteïnes d'unió estreta Cldn2, Cldn4 ni Ocln. En canvi, les rates infectades per RV i suplementades amb Lactofidus® van mostrar un augment de l'expressió de la MUC2 en comparació amb les rates referència i les del grup RV sense suplementació. La regulació a l'alça de MUC2 observada en aquest model suggereix un reforç de la funció de barrera intestinal de les rates lactants que podria explicar la millora de la diarrea causada per RV. En canvi, el fet que aquesta suplementació no va

modificar l'expressió de les proteïnes d'unió estreta Cldn2, Cldn4 ni Ocln, indica que aquest no sembla ser un dels mecanismes implicats en l'efecte anti-diarreic.

Per determinar si la suplementació és capaç de millorar la funció de la barrera intestinal, es van mesurar també els nivells de l'A1AT. Tant el grup infectat per RV i suplementat amb el Lactofidus® com el grup infectat per RV sense intervenció van mostrar uns nivells d'A1AT que no van diferir als del grup referència. Per tant, la prevenció i la millora de la diarrea del postbiòtic de nou sembla que no està associada a una millora de la funció intestinal.

A nivell intestinal també es va estudiar l'expressió dels gens relacionats amb la maduració immunitària com són els gens IgA, FcRn i Blimp-1. Tant les rates sanes com les rates infectades per RV que van ser suplementades amb Lactofidus® no van mostrar canvis en l'expressió d'aquests gens. Per tant, la reducció dels nivells plasmàtics d'IgG i IgA observats anteriorment, no estan relacionats amb una menor absorció intestinal ja que l'expressió del gen FcRn no es veu modificada. La reducció de la concentració d'IgA no sembla ser deguda tampoc a un canvi en la producció d'aquesta Ig ni a un canvi en la maduració dels limfòcits B, ja que tant l'expressió d'IgA com la de Blimp-1 no es van veure modificades. Per tant, els canvis observats en el perfil d'Ig es deuen a altres mecanismes i s'hauran de realitzar més estudis per tal de poder determinar a què es deuen aquests canvis.

Pel que fa a l'efecte en les interaccions entre hoste i microorganismes, de la mateixa manera que en aproximacions anteriors, es va estudiar l'expressió gènica dels TLR. Les rates lactants sanes suplementades amb Lactofidus® van mostrar una regulació a l'alça de l'expressió gènica dels TLR2, TLR3 i TLR9. En el cas de les rates infectades per RV i suplementades amb Lactofidus® , es va veure augmentada l'expressió del TLR2 en comparació amb el grup referència i el grup RV sense suplementació i els gens de TLR3 i TLR4 també van ser regulats a l'alça respecte el grup referència. El TLR2 reconeix una gran varietat de components microbians com lipoproteïnes i lipopèptids [236] i, a més, té capacitat per reconèixer la NSP4 del RV, la qual juga un paper essencial en la infecció causada per RV [255,256]. El TLR3, com s'ha mencionat anteriorment, reconeix els ARN de doble cadena i virus [236]. En quant al TLR4, és un receptor essencial pel reconeixement de lipopolisacàrid i el TLR9 reconeix l'ADN amb motius CpG no metilats, regions en les que existeix una gran concentració de parells de citocines i guanines enllaçats per fosfats, freqüentment presents en genomes vírics i bacterians [236]. No existeixen altres estudis que abordin canvis en l'expressió d'aquests gens degut a la suplementació amb Lactofidus®, però el fet que a les rates sanes s'observi un augment de l'expressió dels TLR2, TLR3 i TLR9 i a les rates infectades per RV i suplementades amb aquest postbiòtic es reguli a l'alça els TLR2 i TLR9 suggereixen una millora en el reconeixement de virus que afavoriria la resposta

immunitària per combatre la infecció. Per tant, tots aquests canvis podrien estar relacionats amb la menor incidència i gravetat de la infecció causada per RV.

Finalment, a nivell intestinal es va estudiar la microbiota intestinal. i es van analitzar canvis en la seva diversitat i composició. Les rates sanes suplementades amb Lactofidus® van mostrar un increment de les unitats taxonòmiques observades i, per tant, una major diversitat de poblacions microbianes. En canvi, no es va observar cap canvi en l'alfa diversitat de les rates infectades per RV i suplementades amb el Lactofidus®. En quant a la beta diversitat, les rates sanes suplementades amb el postbiòtic van formar un clúster separat del grup referència. En canvi, a les rates infectades i suplementades amb Lactofidus® no es va observar cap diferència. Per tant, el Lactofidus® a dia 16 de vida, influeix en la diversitat de la microbiota intestinal de les rates sanes, però no de forma clara durant el pic de diarrea causada per RV.

Per aprofundir en els canvis observats en la microbiota intestinal, es van avaluar les proporcions relatives dels diferents taxons bacterians. Les rates sanes suplementades amb Lactofidus® van mostrar una abundància relativa menor de la família *Chitinophagaceae* i dels gèneres *Rombutsia* i *Vibrionimona* en comparació amb el grup referència. A més, la suplementació amb Lactofidus® promou la presència de les famílies *Muribaculaceae* i *Prevotellaceae* i dels gèneres *Erysipelatoclostridium*, *Lachnoclostridium*, *Lachnoclostridium* 5, *Lachnoclostridium* 9 i *Prevotellaceae UCG-001*. Hi ha poca informació disponible sobre aquestes famílies i gèneres de bacteris i la seva modulació per la dieta, però en el cas de *Prevotellaceae UCG-001*, el canvi observat podria ser beneficiós ja que aquest gènere es correlaciona negativament amb trastorns del metabolisme de la glucosa i dels lípids [257] i, a més, s'ha descrit que pacients amb nefropatia crònica tenen menys abundància de *Prevotellaceae UCG-001* que els controls sans [258]. No obstant això, en un model de rata de diabetis de tipus 2 espontània, l'abundància de *Prevotellaceae UCG-001* era superior a la de rates Wistar sanes [259]. D'altra banda, encara que la major abundància de *Muribaculaceae* es descriu que està inversament associada al pes corporal [260,261], en aquest estudi no es va trobar cap efecte. Pel que fa a *Lachnoclostridium*, algunes espècies d'aquest gènere poden protegir els ratolins contra la colitis [262] i la seva abundància és menor en la neoplàsia del tracte gastrointestinal [263], tot i que es van observar una abundància més alta d'aquest gènere a l'adenoma [264]. En quant a *Rumniclostridium 9*, també es troba present després de la intervenció amb Lactofidus®. Aquests microorganismes són productors d'AGCC [247] i semblen estar associats a la regulació del pes corporal, obesitat, inflamació i envelliment [247,250]. Seria d'interès realitzar més estudis, on es pogués aclarir encara més la rellevància biològica d'aquests canvis induïts pel postbiòtic.

Les rates infectades per RV i suplementades amb Lactofidus® , van mostrar una menor abundància relativa de *Xanthobacteraceae*, i *Chitinophagacaea* en comparació amb el grup RV sense intervenció i una major proporció d'*Enterobacteriaceae* en comparació amb el grup referència. L'abundància relativa de *Bifidobacteriaceae* era major que al grup referència i RV sense intervenció mentre que l'abundància de *Peptostreptococcaceae* era menor. Així, l'efecte bifidogènic del postbiòtic fa pensar que una fórmula infantil suplementada amb Lactofidus® afavoriria la formació d'una microbiota més similar a la dels nadons que reben llet materna.

En quant als gèneres, les rates infectades per RV i suplementades amb Lactofidus® van mostrar una major abundància relativa dels gèneres *Escherichia-Shigella* i una menor proporció de *Romboutsia* i *Enterobacter* en comparació amb els grup referència i RV sense intervenció i una menor abundància de *Bradyrhizobium* en comparació amb el grup RV sense suplementar. Tot i que hi ha poca informació disponible sobre la interacció entre els components de la dieta i aquests grups bacterians, s'ha observat una reducció de l'abundància d'*Escherichia-Shigella* en garrins neonatals diarreics respecte als seus germans sans [245]. Així, l'augment d'*Escherichia-Shigella* en el nostre disseny experimental suggereix que aquest gènere podria promoure algun efecte positiu durant la infecció causada per RV. Globalment, es pot concloure que la suplementació amb Lactofidus® modifica la composició de la microbiota intestinal tant en rates sanes com en rates infectades per RV tot i que en un futur, s'haurà de profunditzar en els canvis observats per tal d'avaluar el seu impacte.

Respecte a la funcionalitat de la microbiota avaluada en base a la seva producció d'AGCC, i malgrat els canvis observats en la microbiota intestinal, la suplementació amb Lactofidus® no sembla exercir un efecte modulador en el perfil d'AGCC, ni de les rates lactants sanes ni de les infectades per RV.

Tal com es va realitzar en la intervenció amb la barreja prebiòtica, en les rates sanes es va poder estudiar les correlacions entre microbiota i producció d'AGCC en una mateixa mostra i es van trobar diferents correlacions positives i negatives. Ara bé, en el cas de la suplementació amb Lactofidus® malgrat que va mostrar canvis en l'abundància relativa de diferents famílies bacterianes, no es va modificar el patró de producció d'AGCC.

> ***En resum**, la suplementació amb Lactofidus® en tots dos models (animal sa i enfront la infecció causada per RV), va influenciar lleugerament en les variables hematològiques. La suplementació va modificar el perfil d'Ig. A nivell intestinal, no va influenciar en l'expressió de les proteïnes d'unió estreta ni de gens relacionats amb la maduració d'immunitat intestinal, però si en l'expressió d'alguns TLR. Va modificar la composició de la microbiota, però no la proporció dels diferents AGCC. A les rates sanes, la suplementació*

amb Lactofidus® no va influir en el pes corporal, ni en el pes d'òrgans. Tampoc va modificar la consistència de les femtes, ni el seu pH ni el pH del contingut estomacal. En canvi, en les rates infectades per RV i suplementades amb Lactofidus® es va observar un efecte sobre el seu creixement i es va observar un efecte tròfic als intestins, i òrgans immunitaris. El producte va mostrar un efecte clar sobre la incidència i la gravetat de la diarrea causada per RV. El pH fecal i el del contingut estomacal eren més àcids. La càrrega viral de les femtes no va canviar tot i que sí es va observar un bloqueig parcial del RV in vitro. La suplementació no va influir en els nivells de d'Ac anti-RV total ni d'IgM anti-RV. En canvi, l'expressió gènica intestinal de la MUC2 va ser regulada a l'alça.

Després d'estudiar cada un dels productes per separats es va estudiar l'efecte de la seva combinació durant les primeres etapes de vida. L'interès d'estudiar l'efecte d'aquesta barreja radica en el fet que en la llet materna, coexisteixen tot tipus de moduladors microbians (prebiòtics, probiòtics i també postbiòtics). El paper modulador a nivell immunitari i microbià de la llet materna es deu als efectes individuals dels seus components i de les seves interaccions, ja que s'ha descrit que diferents components poden tenir el mateix efecte o oposat i mostrar efectes additius o sinèrgics.

Per aquesta raó, es va seguir la mateixa metodologia que en els casos anteriors, però en aquest cas utilitzant com a suplement la combinació de scGOS-lcFOS amb el Lactofidus®.

En primer lloc, es va estudiar l'efecte de la combinació de scGOS-lcFOS amb el Lactofidus® en l'evolució del pes corporal i el creixement de les rates lactants. La suplementació amb aquesta combinació, tant a rates sanes com a les infectades per RV, va mostrar un creixement superior que les rates del grup referència, i en el cas de les infectades, també en comparació amb el grup RV sense intervenció. En línia amb altres estudis que van avaluar l'impacte de la suplementació amb llet fermentada i amb scGOS-lcFOS en nadons sans, van observar un creixement adequat [226] i inclús un impacte en la llargada del nadó [244]. Les rates sanes suplementades amb scGOS-lcFOS o Lactofidus® no van mostrar cap efecte consistent en el creixement mentre que amb la combinació de suplements sí s'observa un augment d'aquest. La possible explicació d'aquest efecte promotor del creixement quan les rates lactants es suplementen amb scGOS-lcFOS i Lactofidus® podria ser degut a un efecte de potenciació del postbiòtic sobre la capacitat ben descrita dels oligosacàrids d'augmentar l'absorció intestinal de calci [265,266] o altres mecanismes afavoridors del desenvolupament orgànic neonatal.

Pel que fa a l'efecte de la combinació de scGOS-lcFOS i Lactofidus® en el pes d'òrgans, al final de l'estudi, les rates sanes van mostrar de forma puntual el pes relatiu del fetge major i la llargada de l'intestí gros menor que el grup referència. A més, es va observar un efecte tròfic en el pes relatiu tant de l'intestí prim com del gros, tal com es va observar a les rates sanes suplementades amb scGOS-lcFOS. Per tant, es pot concloure que la barreja de prebiòtics i postbiòtic manté alguns dels efectes promotors de creixement que s'observen quan s'administra només el prebiòtic. En quant les rates infectades per RV i suplementades amb la combinació, durant el pic de diarrea, aquestes rates van mostrar un major pes relatiu de la melsa (com les rates infectades i suplementades amb Lactofidus®) i de l'intestí prim (com les rates infectades i suplementades amb scGOS-lcFOS) en comparació amb els grups referència i RV sense intervenció. Al final de l'estudi (dia 16), les rates infectades per RV i suplementades amb la combinació van mostrar un major pes relatiu de la melsa en comparació amb el grup referència (com les rates infectades i suplementades amb Lactofidus®),i, en comparació amb els grups referència i RV sense intervenció, es va observar un efecte tròfic dels intestins (com les rates infectades i suplementades amb scGOS-lcFOS o amb Lactofidus®). A diferència dels altres suplements per separat, el pes relatiu del fetge era major. L'efecte tròfic dels intestins va en línia amb un estudi previ del nostre grup de recerca on es va suplementar a rates lactants infectades per RV amb una fórmula infantil fermentada i combinada amb scGOS-lcFOS en rates infectades per RV [165]. La suplementació amb la combinació de scGOS-lcFOS i Lactofidus® sembla mantenir e inclús potenciar els efectes de cada suplement per separat, fet que suggereix aquesta barreja de moduladors amb un interessant potencial.

Respecte a les variables hematològiques, les rates sanes i suplementades amb la combinació, fins al final de l'estudi, van mostrar una reducció puntual en el volum mitjà dels eritròcits. En canvi, a les rates infectades per RV i suplementades amb scGOS-lcFOS i Lactofidus®, durant el pic d'infecció, van mostrar un augment de la concentració dels glòbuls blancs, limfòcits, granulòcits i hemoglobina i un augment del volum cel· mitjà dels eritròcits en comparació amb els grups referència i RV sense intervenció, cosa que no es va observar a les rates infectades per RV i suplementades amb un dels dos productes (amb excepció de l'augment de la concentració d'hemoglobina observada en les rates suplementades amb scGOS-lcFOS respecte el grup RV sense intervenció). Un cop la infecció es va resoldre, la suplementació amb scGOS-lcFOS i Lactofidus® només va mostrar una lleugera disminució de l'hematòcrit i del volum corpuscular mitjà en comparació amb el grup referència. No hi ha informació disponible sobre l'efecte d'aquesta suplementació a les variables hematològiques ni en humans ni en animals, però el fet que durant el pic de diarrea els glòbuls blancs augmentin, especialment els limfòcits i granulòcits, suggereix que la mobilització d'aquestes cèl·lules per fer front a la infecció podria estar relacionada amb

la menor gravetat de la diarrea. Cal destacar que aquest efecte aparegut amb la utilització dels dos productes no s'havia observat quan s'administraven de forma aïllada, i per tant, reforça la utilitat de la barreja.

La combinació dels prebiòtics, que modificaven la consistència fecal, amb el Lactofidus® van induir unes femtes menys consistents en comparació amb el grup referència, de forma similar als resultats obtinguts amb la suplementació de scGOS-lcFOS indicant que la combinació de tots dos suplements manté aquest efecte característic del scGOS-lcFOS. En nens, altres autors van observar aquest mateix efecte en una fórmula infantil enriquida amb scGOS-lcFOS i Lactofidus® [244,267]. Per tant, l'administració del postbiòtic no impedeix conservar l'efecte positiu que la barreja prebiòtica induïa sobre les femtes. Aquest efecte fecal intrínsec dels prebiòtics scGOS-lcFOS que indueix unes femtes més toves, dificultava l'avaluació de la gravetat de la diarrea causada per RV, i per tant, les dades dels resultats clínics van haver de normalitzar-se de la mateixa manera que es va fer amb la suplementació amb el scGOS-lcFOS. D'aquesta manera, es va observar que la barreja de prebiòtics i postbiòtic continuava sent molt efectiva en la prevenció i evolució de la diarrea associada a la infecció per RV en termes d'incidència i gravetat en comparació amb el grup RV sense intervenció. Així, de nou, la barreja utilitzada sembla molt adient per aquest objectiu.

La modificació de la consistència de les femtes pot anar acompanyada d'un canvi en el pH. Tant les rates lactants sanes suplementades amb scGOS-lcFOS i Lactofidus® com les infectades per RV i suplementades amb aquesta combinació no van mostrar cap canvi en el pH fecal. A diferència dels nostres resultats, altres autors han descrit que la fórmula infantil que conté scGOS-lcFOS amb un postbiòtic redueix el pH fecal en nadons sans [226].

A més d'estudiar el seu aspecte i pH, també es va investigar la presència del virus mitjançant l'eliminació viral de les femtes. La suplementació amb scGOS-lcFOS i Lactofidus® va mostrar una reducció dràstica del nombre de partícules víriques excretades a nivell fecal tal com es va observar en el cas de la suplementació amb scGOS-lcFOS. D'altra banda, la combinació d'ambdós productes, manté la capacitat de cada suplement per separat d'unir-se al RV i bloquejar-lo. Per tant, mitjançant ambdós mecanismes es podria reduir l'habilitat del virus per infectar a l'hoste i, per tant, reduir la gravetat de la diarrea. En futures aproximacions, com s'ha mencionat anteriorment, seria important mesurar l'excreció del virus mitjançant tècniques de PCR per tal de determinar la presència del virus independentment que estiguin bloquejades o no pels suplements i així estratificar millor el mecanisme d'acció de cadascun dels components de la barreja.

A part de l'efecte en el pH fecal també es va explorar si la suplementació tenia un efecte en el pH d'altres compartiments digestius com el pH del contingut estomacal, el qual

era menor tant a dia 8, en el cas de les rates sanes (similar al que es va observar al grup suplementat amb scGOS-lcFOS), com durant el període de diarrea de les rates infectades i suplementades amb scGOS-lcFOS i Lactofidus® (similar al que es va observar amb la suplementació de cada producte per separat) en comparació amb el grup referència i en el cas de les rates infectades també en comparació amb el grup RV sense intervenció. Aquest resultat, que manté els efectes individuals, podria suggerir un efecte positiu en la prevenció de l'entrada de patògens al tracte gastrointestinal tal com succeeix en el cas de la disminució del pH fecal [227,229].

Respecte a la resposta humoral, el perfil d'Ig de les rates sanes suplementades amb scGOS-lcFOS i Lactofidus®, tal com va succeir amb la suplementació dels productes per separats, es va veure alterat. El percentatge de les IgG era menor mentre que el de les IgM era major en comparació amb el grup referència, indicant de nou un possible efecte positiu de la barreja en la maduració del sistema immunitari, ja que les IgM són Ig que produeix el nounat mentre que les IgG predominantment deriven de la llet materna.

En quant a les rates infectades per RV i suplementades amb scGOS-lcFOS i Lactofidus®, es va observar una reducció dels nivells d'IgG i IgA respecte els grups referència i RV sense intervenció, tal com es va observar al grup infectat i suplementat amb Lactofidus®. A més, la combinació d'ambdós suplements va mostrar un balanç Th1/Th2 menor que el grup RV sense intervenció, similar al balanç observat al grup infectat per RV i suplementat amb el postbiòtic. A part del perfil d'Ig, es va estudiar la resposta en Ac específics contra el virus, però, tal com s'ha explicat anteriorment, durant el pic de diarrea, no es va trobar una resposta específica d'Ig anti-RV clara degut a la immaduresa immunitària de les rates lactants. Tanmateix, la suplementació d'aquesta barreja no va potenciar els nivells plasmàtics d'IgM anti-RV, tal i com s'observava en la suplementació amb scGOS-lcFOS, indicant en aquest cas que ambdós productes contraposen els seus efectes quan es combinen.

La millora de la capacitat de la barrera intestinal podria estar implicada en el paper preventiu que mostra aquesta combinació. Per tant, es va estudiar l'expressió de molècules implicades en la funció de barrera com les mucines i proteïnes d'unió estretes. La intervenció amb la combinació de scGOS-lcFOS i Lactofidus®, tant a les rates sanes com en el cas de les rates infectades per RV, van mostrar una regulació a l'alça de l'expressió relativa de la MUC3, tal com es va observar a les rates infectades per RV i suplementades amb scGOS-lcFOS, però en canvi, a les rates sanes no es va observar aquest efecte en cap altre grup d'estudi. En el cas de les rates sanes, l'augment de l'expressió relativa de la MUC3, juntament amb la menor abundància relativa de la família *Akkermansia*, que inclou espècies que són degradadores de mucina [196], podria suggerir que hi ha una major capa de moc a nivell intestinal que podria protegir aquestes

rates en front infeccions com per exemple les infeccions causades per RV. En el cas de les rates infectades per RV i suplementades amb la combinació es continua observant l'augment de l'expressió de MUC3 en comparació amb els grups referència i RV sense intervenció i, per tant, suggereix un reforç de la funció de barrera de les rates lactants que podria estar relacionada amb la menor incidència i gravetat de la diarrea observada en aquest grup.

Pel que fa a les proteïnes d'unió estreta, tant a les rates sanes com a les infectades per RV, la combinació de tots dos suplements no va influenciar l'expressió de la Cldn2, Cldn4 i Ocln, tal com va succeir amb la suplementació de cada producte per separat, indicant que no és un dels mecanismes implicats en l'efecte maduratiu de la capacitat defensiva ni en l'efecte anti-diarreic, ni quan s'administren per separat ni de forma conjunta.

També es va mesurar indirectament la funció de la barrera intestinal mitjançant els nivells de l'A1AT. El grup infectat per RV i suplementat amb la combinació de scGOS-lcFOS i Lactofidus®, va presentar uns nivells d'A1AT més baixos que els del grup referència i RV sense intervenció. Aquest efecte es deu al scGOS-lcFOS, ja que aquesta intervenció per si sola, va mostrar aquesta reducció i, com s'ha mencionat anteriorment, podria indicar una millora de la barrera intestinal que protegiria aquestes rates enfront el RV. Així, la combinació manté l'efecte individual mostrat pels prebiòtics en l'aproximació anterior.

La suplementació amb scGOS-lcFOS i Lactofidus®, tant a les rates sanes com a les rates infectades per RV, no va modificar l'expressió dels gens relacionats amb el desenvolupament immunitari estudiats. En quant a l'expressió del gen FcRn, la suplementació amb aquesta combinació no va influenciar en l'expressió d'aquest gen a les rates sanes, mentre que les rates infectades per RV, si que es va observar un efecte clar que permetria suggerir una acceleració del procés de maduració immunitària intestinal. D'altra banda, la reducció dels nivells plasmàtics d'IgG observats en aquest grup podria estar relacionat amb una menor absorció intestinal, fet que implica a aquest receptor.

A més, es va observar en el grup que va rebre la combinació d'estudi una regulació a l'alça de l'expressió gènica de TLR2, TLR3, TLR5, TLR7 i TLR9, dels quals, a les rates suplementades amb un dels dos productes només es va observar un augment de l'expressió del TLR2, TLR3 i TLR9 que correspon a les rates suplementades amb Lactofidus®. Respecte les rates lactants infectades per RV i suplementades amb scGOS-lcFOS i Lactofidus® van mostrar la mateixa regulació a l'alça d'aquests TLR en comparació amb els grups referència i RV sense intervenció amb l'excepció del TLR5, on, l'expressió del qual no es va modificar. Ambdós resultats obtinguts en els

estudis independents reforcen l'evidència del seu efecte i la clara sinèrgia entre productes a aquest nivell.

Per tant, la combinació de tots dos productes millora el reconeixement dels microorganismes afavorint la resposta immunitària innata enfront les infeccions. Aquest fet podria explicar un dels mecanismes implicats en la reducció de la incidència i gravetat de la diarrea causada per RV observada en aquest grup.

Les rates sanes suplementades amb scGOS-lcFOS i Lactofidus® no van mostrar cap canvi en la riquesa , la uniformitat, ni en la beta biodiversitat de les mostres avaluades. En canvi, les rates infectades per RV i suplementades amb scGOS-lcFOS i Lactofidus®, van mostrar una reducció en el nombre d'unitats taxonòmiques en comparació amb el grup referència, indicant una menor biodiversitat global. Per tant, aquesta combinació de suplements modifica la microbiota intestinal de les rates lactants durant el pic de diarrea reduint la diversitat de microorganismes. Per aprofundir en l'estudi l'efecte de la combinació scGOS-lcFOS i Lactofidus® sobre la composició de la microbiota intestinal, es van estudiar les abundàncies relatives a nivell de família i de gènere. Les rates sanes suplementades amb scGOS-lcFOS i Lactofidus® van mostrar una major proporció relativa de la família *Clostridiaceae 1* en comparació amb el grup referència mentre que l'abundància de la família *Akkermansiaceae* i el gènere *Akkermansia* eren menors. Aquests resultats es deuen a l'efecte del scGOS-lcFOS, ja que les rates suplementades amb només aquests prebiòtics van mostrar aquests mateixos canvis, de la mateixa manera que en l'increment de MUC3 amb el qual es relacionava.

Les rates infectades per RV i suplementades amb scGOS-lcFOS i Lactofidus® també van mostrar una major abundància relativa de la família *Enterobacteriaceae* en comparació amb el grup referència (tal com es va observar al grup suplementat només amb Lactofidus®) i un augment de la proporció de *Bifidobacteriaceae* en comparació amb el grup referència i RV (similar al que es va observar amb la suplementació amb Lactofidus®). L'efecte bifidogènic d'aquesta combinació ja s'havia observat en la suplementació amb Lactofidus®. L'abundància relativa de la família *Peptostreptococcaceae* era menor en comparació amb el grup referència i RV sense intervenció tal com es va observar amb la suplementació de cada producte (scGOS-lcFOS i Lactofidus®) per separat. A diferència de la intervenció amb només un producte, en el cas de la combinació la proporció de la família S*taphylococcaceae* era menor en comparació amb el grup referència.

En quant al nivell de gènere, la suplementació amb scGOS-lcFOS i Lactofidus® va augmentar la abundància relativa de *Escherichia-Shigella* en comparació amb el grup referència i el grup RV sense intervenció, una reducció de la proporció d' *Enterobacter* i *Romboutsia* en comparació amb els grups referència i RV sense suplementació i una

menor abundància en *Bradyrhizobium* en comparació amb el grup RV sense intervenció. Aquests canvis també es van observar a les rates suplementades amb cada producte per separat. A més, la suplementació amb scGOS-lcFOS i Lactofidus® promou la presència de la família *Erysipelotrichaeae* i del gènere *Turicibacter*. Aquests canvis en la composició de la microbiota, difícils d'interpretar per la manca d'altres estudis relacionats, necessitaran més atenció en estudis futurs.

Respecte a la funcionalitat de la microbiota, és a dir, la producció d'AGCC, la suplementació amb scGOS-lcFOS i Lactofidus® va modificar el perfil d'AGCC tant a les rates sanes com a les infectades per RV, on la proporció d'àcid acètic va augmentar mentre que la de l'àcid propiònic va disminuir. Les rates sanes i suplementades amb scGOS-lcFOS i Lactofidus® a més, van mostrar un menor proporció de l'àcid isobutíric i isovalèric. Tots els canvis mencionats es van observar prèviament al grup suplementat amb scGOS-lcFOS, i per tant demostra que aquest efecte individual es manté en la barreja. En canvi, les rates infectades per RV i suplementades amb scGOS-lcFOS i Lactofidus®, van mostrar un augment en la proporció de l'àcid valèric que no s'havia observat en cap intervenció per separat. Amb els resultats obtinguts en aquest estudi, podem concloure que l'efecte del scGOS-lcFOS es manté al combinar-se amb el Lactofidus® i que a més, el postbiòtic podria influir en la producció dels AGCC, ja que la proporció de l'àcid valèric es va veure modificada.

> ***En resum**, la suplementació amb scGOS-lcFOS i Lactofidus® manté la majoria dels efectes observats individualment i inclús mostra alguns que no s'observaven amb la suplementació de cada producte per separat. En totes dues situacions (rates sanes i rates infectades per RV) la suplementació amb aquesta combinació va promoure el creixement de les rates i l'efecte tròfic en diversos òrgans. Va modificar la consistència de les femtes, però no el seu pH. En canvi, va reduir el pH del contingut estomacal i va modificar el perfil d'Ig. A nivell intestinal, va augmentar l'expressió gènica de la MUC3, però no de les proteïnes d'unió estreta ni de gens relacionats amb la maduració immunitària. En canvi, va incrementar l'expressió gènica dels TLR2, TLR3, TLR7 i TLR9. La composició de la microbiota es va modificar juntament amb la seva funcionalitat, on va canviar el perfil d'AGCC augmentant la proporció de l'àcid acètic i reduint la del propiònic.*
>
> *Es van observar certes diferències entre les rates sanes suplementades amb scGOS-lcFOS i Lactofidus® en comparació amb les rates infectades i suplementades amb aquesta combinació. Les rates sanes van mostrar una major expressió del TLR5 però no va variar la del gen FcRn. En quant als AGCC, a més dels canvis mencionats anteriorment, també es va modificar la proporció de l'àcid isobutíric i isovalèric, reduint la seva proporció.*

En quant a les rates infectades per RV i suplementades amb scGOS-lcFOS i Lactofidus®, la suplementació va reduir la incidència i gravetat de la diarrea causada per RV. Durant el pic de diarrea va augmentar la concentració dels leucòcits, limfòcits, granulòcits. A més va reduir el nombre de partícules víriques eliminades a nivell fecal i va ser capaç de bloquejar el virus in vitro. A nivell intestinal, va reduir la permeabilitat de la barrera i va regular a la baixa l'expressió del FcRn. A part de les modificacions del perfil d'AGCC mencionats anteriorment, aquestes rates van mostrar un augment de la proporció de l'àcid valèric.

Globalment, aquests estudis preclínics posen de manifest que els agents infecciosos en primeres etapes de vida, ja siguin d'origen matern (l'estafilococ de la llet materna) o del propi infant (rotavirus de l'entorn) modifiquen el desenvolupament de la resposta immunitària de l'infant. A més, aquesta resposta presenta un cert dimorfisme sexual. D'altra banda, la gastroenteritis vírica del lactant es pot prevenir i alleugerir parcialment amb la utilització de compostos similars al que estan presents en la llet materna, com prebiòtics i postbiòtics. Finalment, destacar que la seva utilització combinada sembla una estratègia útil per preservar els efectes individuals de cada component i així maximitzar l'efectivitat de la fórmula que els contingui.

CONCLUSIONS

Els resultats obtinguts en aquesta tesi permeten extreure les següents conclusions:

Conclusió 1. La intervenció experimental amb una sobrecàrrega de *S. epidermidis* durant la lactància, reproduint el que passa durant un procés de mastitis en la mare lactant, afecta el desenvolupament del sistema immunitari de la descendència a curt i llarg termini.

a) Tant una sobrecàrrega alta com baixa de *S. epidermidis* durant la lactància provoca una menor concentració d'Ig i un retard en la maduració de la resposta Th1 -i per tant de l'assoliment de l'equilibri Th1/Th2-, que persisteix més enllà del període d'administració.

b) Una sobrecàrrega alta de *S. epidermidis* durant la lactància, provoca, entre d'altres, una leucocitosi tant al final com més enllà del període de lactància.

Conclusió 2. La gastroenteritis associada a la infecció per RV en rates lactants presenta variables dependents del sexe de l'animal

a) El sexe de l'animal no és un factor que influeixi en la incidència i durada de la diarrea induïda per la infecció amb rotavirus ni en alguns dels mecanismes defensius implicats com la resposta humoral o l'expressió gènica intestinal.

b) S'observa un efecte significatiu del dimorfisme sexual en la gravetat de la diarrea, essent els mascles els que major gravetat, pes fecal i eliminació viral presenten .

Conclusió 3. L'administració de moduladors microbians en primeres etapes de vida, com el postbiòtic Lactofidus®, sol o en combinació amb una barreja de prebiòtics com els scGOS-lcFOS, influeixen en el desenvolupament immunitari i de la microbiota de la rata lactant i exerceixen un paper preventiu de la diarrea associada a una infecció amb rotavirus.

a) La barreja de prebiòtics **scGOS-lcFOS** modifica en rates lactants sanes la consistència fecal, indueix un efecte tròfic en l'intestí, modifica la composició i funcionalitat de la microbiota intestinal i el perfil de les Ig plasmàtiques. A més, mostra un efecte preventiu en la incidència i gravetat de la diarrea causada per RV mitjançant mecanismes directes sobre el virus i indirectes a través de la potenciació de la resposta immunitària, la millora de la funció de barrera, i canvis en la microbiota intestinal.

b) La suplementació amb **Lactofidus®** durant la lactància en rates lactants sanes, modifica el perfil d'Ig plasmàtiques, la microbiota intestinal i l'expressió gènica intestinal, incrementant l'expressió d'alguns TLRs. Aquest postbiòtic mostra una clara efectivitat enfront la diarrea associada a un infecció per RV a través de la regulació i desenvolupament de mecanismes de resposta de l'hoste enfront el virus tant de tipus microbià, de barrera o immunitaris.

c) La combinació dels prebiòtics i postbiòtic anteriors, com succeeix en la llet materna, manté els efectes positius observats per cada component de forma individual (modulació de la funció i desenvolupament de la microbiota intestinal i protecció enfront la infecció per RV) i inclús mostra alguns mecanismes addicionals que reforcen aquests efectes que no s'observen amb la suplementació de cada producte per separat.

Globalment, l'administració de Lactofidus®, sol o en combinació amb els prebiòtics scGOS-lcFOS, podria promoure una millora en la salut dels lactants. Per tant, l'addició a fórmules infantils d'aquesta combinació semblaria una bona estratègia per modular les característiques immunològiques i microbianes durant les primeres etapes de vida i millorar la capacitat defensiva enfront la infecció causada per RV.

BIBLIOGRAFIA

1. Pérez-Cano, F. J.; Franch, À.; Castellote, C.; Castell, M.; Franch, Á.; Castellote, C.; Castell, M.; Franch, À.; Castellote, C.; Castell, M. The Suckling Rat as a Model for Immunonutrition Studies in Early Life. *Clin. Dev. Immunol.* **2012**, *2012*, 537310; DOI:10.1155/2012/537310.

2. Martin, R.; Nauta, A. J.; Ben Amor, K.; Knippels, L. M. J.; Knol, J.; Garssen, J. Early Life: Gut Microbiota and Immune Development in Infancy. *Benef. Microbes* **2010**, *1* (4), 367–382; DOI:10.3920/BM2010.0027.

3. Ygberg, S.; Nilsson, A. The Developing Immune System - From Foetus to Toddler. *Acta Paediatr. Int. J. Paediatr.* **2012**, *101* (2), 120–127; DOI:10.1111/j.1651-2227.2011.02494.x.

4. Yu, J. C.; Khodadadi, H.; Malik, A.; Davidson, B.; Salles, É. da S. L.; Bhatia, J.; Hale, V. L.; Baban, B. Innate Immunity of Neonates and Infants. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 1759; DOI:10.3389/fimmu.2018.01759.

5. Basha, S.; Surendran, N.; Pichichero, M. Immune Responses in Neonates. *Expert Rev. Clin. Immunol.* **2014**, *10* (9), 1171–1184; DOI:10.1586/1744666X.2014.942288.

6. Moraes-Pinto, M. I. de; Suano-Souza, F.; Aranda, C. S. Immune System: Development and Acquisition of Immunological Competence. *J. Pediatr. (Rio. J).* **2020**, *97* (2021), S59–S66; DOI:10.1016/j.jped.2020.10.006.

7. Tsafaras, G. P.; Ntontsi, P.; Xanthou, G. Advantages and Limitations of the Neonatal Immune System. *Front. Pediatr.* **2020**, *8*, 5; DOI:10.3389/fped.2020.00005.

8. Lee, Y. C.; Lin, S. J. Natural Killer Cell in the Developing Life. *J. Perinat. Med.* **2015**, *43* (1), 11–17; DOI:10.1515/jpm-2013-0244.

9. Pérez-Cano, F. J.; Castellote, C.; González-Castro, A. M.; Pelegrí, C.; Castell, M.; Franch, À. Developmental Changes in Intraepithelial T Lymphocytes and NK Cells in the Small Intestine of Neonatal Rats. *Pediatr. Res.* **2005**, *58* (5), 885–891; DOI:10.1203/01.pdr.0000182187.88505.49.

10. Semmes, E. C.; Chen, J. L.; Goswami, R.; Burt, T. D.; Permar, S. R.; Fouda, G. G. Understanding Early-Life Adaptive Immunity to Guide Interventions for Pediatric Health. *Front. Immunol.* **2021**, *11*, 595297; DOI:10.3389/fimmu.2020.595297.

11. Yang, L.; Jin, R.; Lu, D.; Ge, Q. T Cell Tolerance in Early Life. *Front. Immunol.* **2020**, *11*, 576261; DOI:10.3389/fimmu.2020.576261.

12. Penagos Paniagua, M. J.; Berrón Pérez, D, R.; García Cruz, M. de la L.; Zaragoza Benítez, J. M. El Sistema Inmune Del Recién Nacido. *Alergia, Asma e Inmunol. Pediátricas* **2003**, *12* (2), 18–23.

13. Kalbermatter, C.; Fernandez Trigo, N.; Christensen, S.; Ganal-Vonarburg, S.

C. Maternal Microbiota, Early Life Colonization and Breast Milk Drive Immune Development in the Newborn. *Front. Immunol.* **2021**, *12*, 683022; DOI:10.3389/fimmu.2021.683022.

14. Gopalakrishna, K. P.; Hand, T. W. Influence of Maternal Milk on the Neonatal Intestinal Microbiome. *Nutrients* **2020**, *12*, 823; DOI:10.3390/nu12030823.

15. Azagra-Boronat, I.; Tres, A.; Massot-Cladera, M.; Franch, À.; Castell, M.; Guardiola, F.; Pérez-Cano, F. J.; Rodríguez-Lagunas, M. J. Associations of Breast Milk Microbiota, Immune Factors, and Fatty Acids in the Rat Mother–Offspring Pair. *Nutrients* **2020**, *12*, 319; DOI:10.3390/nu12020319.

16. Takiishi, T.; Ideli, C.; Fenero, M.; C, N. O. S. Intestinal Barrier and Gut Microbiota : Shaping Our Immune Responses throughout Life. **2017**, *5* (4), e1373208; DOI:10.1080/21688370.2017.1373208.

17. Mowat, A. M.; Agace, W. W. Regional Specialization within the Intestinal Immune System. *Nat. Rev. Immunol.* **2014**, *14* (10), 667–685; DOI:10.1038/nri3738.

18. Vancamelbeke, M.; Vermeire, S. The Intestinal Barrier: A Fundamental Role in Health and Disease. *Expert Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2017**, *11* (9), 821–834; DOI:10.1080/17474124.2017.1343143.

19. Verne, G. N.; Translational, E. N.; Health, O. HHS Public Access. **2017**, *24* (6), 503–512; DOI:10.1111/j.1365-2982.2012.01921.x.Intestinal.

20. Turner, J. R. Intestinal Mucosal Barrier Function in Health and Disease. *Nat. Rev. Immunol.* **2009**, *9* (11), 799–809; DOI:10.1038/nri2653.

21. Ramiro-Puig, E.; Pérez-Cano, F. J.; Castellote, C.; Franch, A.; Castell, M. El Intestino: Pieza Clave Del Sistema Inmunitario. *Rev. Esp. Enfermedades Dig.* **2008**, *100* (1), 29–34; DOI:10.4321/s1130-01082008000100006.

22. Abreu, M. T. Toll-like Receptor Signalling in the Intestinal Epithelium: How Bacterial Recognition Shapes Intestinal Function. *Nat. Rev. Immunol.* **2010**, *10* (2), 131–143; DOI:10.1038/nri2707.

23. Renz, H.; Brandtzaeg, P.; Hornef, M. The Impact of Perinatal Immune Development on Mucosal Homeostasis and Chronic Inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* **2012**, *12* (1), 9–23; DOI:10.1038/nri3112.

24. Turfkruyer, M.; Verhasselt, V. Breast Milk and Its Impact on Maturation of the Neonatal Immune System. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **2015**, *28* (3), 199–206; DOI:10.1097/QCO.0000000000000165.

25. Weström, B.; Arévalo Sureda, E.; Pierzynowska, K.; Pierzynowski, S. G.; Pérez-Cano, F. J. The Immature Gut Barrier and Its Importance in Establishing Immunity in Newborn Mammals. *Front. Immunol.* **2020**, *11*, 1153; DOI:10.3389/fimmu.2020.01153.

26. Torow, N.; Marsland, B. J.; Hornef, M. W.; Gollwitzer, E. S. Neonatal Mucosal Immunology. *Mucosal Immunology*. **2017**, pp 5–17; DOI:10.1038/mi.2016.81.

27. Macpherson, A. J.; De Agüero, M. G.; Ganal-Vonarburg, S. C. How Nutrition and the Maternal Microbiota Shape the Neonatal Immune System. *Nat. Rev. Immunol.* **2017**, *17* (8), 508–517; DOI:10.1038/nri.2017.58.

28. Jost, T.; Lacroix, C.; Braegger, C.; Chassard, C. Impact of Human Milk Bacteria and Oligosaccharides on Neonatal Gut Microbiota Establishment and Gut Health. *Nutr. Rev.* **2015**, *73* (7), 426–437; DOI:10.1093/nutrit/nuu016.

29. Cheng, L.; Akkerman, R.; Kong, C.; Walvoort, M. T. C.; de Vos, P. More than Sugar in the Milk: Human Milk Oligosaccharides as Essential Bioactive Molecules in Breast Milk and Current Insight in Beneficial Effects. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2021**, *61* (7), 1184–1200; DOI:10.1080/10408398.2020.1754756.

30. Pérez-Cano, F. J.; Castellote, C.; Margín-Gallén, S.; Franch, À.; Castell, M. Neonatal Immunoglobulin Secretion and Lymphocyte Phenotype in Rat Small Intestine Lamina Propria. *Pediatr. Res.* **2005**, *58* (1), 164–169; DOI:10.1203/01.PDR.0000156367.60769.36.

31. Suárez, J. E. Microbiota Autóctona, Probióticos y Prebióticos. *Nutr. Hosp.* **2015**, *31*, 3–9; DOI:10.3305/nh.2015.31.sup1.8701.

32. 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. The Composition of the Gut Microbiota throughout Life, with an Emphasis on Early Life. *Microb. Ecol. Heal. Dis.* **2015**, *26*, 26050; DOI:10.3402/mehd.v26.26050.

33. Fernández, L.; Langa, S.; Martín, V.; Maldonado, A.; Jiménez, E.; Martín, R.; Rodríguez, J. M. The Human Milk Microbiota: Origin and Potential Roles in Health and Disease. *Pharmacol. Res.* **2013**, *69*, 1–10; DOI:10.1016/j.phrs.2012.09.001.

34. Vieira, A. T.; Fukumori, C.; Ferreira, C. M. New Insights into Therapeutic Strategies for Gut Microbiota Modulation in Inflammatory Diseases. *Clin. Transl. Immunol.* **2016**, *5* (6), e87; DOI:10.1038/cti.2016.38.

35. Wopereis, H.; Oozeer, R.; Knipping, K.; Belzer, C.; Knol, J. The First Thousand Days – Intestinal Microbiology of Early Life : Establishing a Symbiosis. **2014**, *25* (13), 428–438; DOI:10.1111/pai.12232.

36. Ahmadizar, F.; Vijverberg, S. J. H.; Arets, H. G. M.; de Boer, A.; Lang, J. E.; Garssen, J.; Kraneveld, A.; Maitland-van der Zee, A. H. Early-Life Antibiotic Exposure Increases the Risk of Developing Allergic Symptoms Later in Life: A Meta-Analysis. *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.* **2018**, *73* (5), 971–986; DOI:10.1111/all.13332.

37. D'Amelio, P.; Sassi, F. Gut Microbiota, Immune System, and Bone. *Calcif. Tissue Int.* **2018**, *102* (4), 415–425; DOI:10.1007/s00223-017-0331-y.

38. Jandhyala, S. M.; Talukdar, R.; Subramanyam, C.; Vuyyuru, H.; Sasikala, M.; Reddy, D. N. Role of the Normal Gut Microbiota. *World J. Gastroenterol.* **2015**, *21* (29), 8836–8847; DOI:10.3748/wjg.v21.i29.8787.

39. Tanaka, M.; Nakayama, J. Development of the Gut Microbiota in Infancy and Its Impact on Health in Later Life. *Allergol. Int.* **2017**, *66* (4), 515–522; DOI:10.1016/j.alit.2017.07.010.

40. Kumar, S. K. M.; Bhat, B. V. Distinct Mechanisms of the Newborn Innate Immunity. *Immunol. Lett.* **2016**, *173*, 42–54; DOI:10.1016/j.imlet.2016.03.009.

41. Adak, A.; Khan, M. R. An Insight into Gut Microbiota and Its Functionalities. *Cell. Mol. Life Sci.* **2019**, *76* (3), 473–493; DOI:10.1007/s00018-018-2943-4.

42. Paone, P.; Cani, P. D. Mucus Barrier, Mucins and Gut Microbiota: The Expected Slimy Partners? *Gut* **2020**, *69* (12), 2232–2243; DOI:10.1136/gutjnl-2020-322260.

43. Tomkovich, S.; Jobin, C. Microbiota and Host Immune Responses: A Love-Hate Relationship. *Immunology* **2016**, *147*, 1–10; DOI:10.1111/imm.12538.

44. Levy, M.; Kolodziejczyk, A. A.; Thaiss, C. A.; Elinav, E. Dysbiosis and the Immune System. *Nat. Rev. Immunol.* **2017**, *17* (4), 219–232; DOI:10.1038/nri.2017.7.

45. Klein, S. L.; Flanagan, K. L. Sex Differences in Immune Responses. *Nat. Rev. Immunol.* **2016**, *16* (10), 626–638; DOI:10.1038/nri.2016.90.

46. Markle, J. G.; Fish, E. N. SeXX Matters in Immunity. *Trends Immunol.* **2014**, *35* (3), 97–104; DOI:10.1016/j.it.2013.10.006.

47. Fischer, J.; Jung, N.; Robinson, N.; Lehmann, C. Sex Differences in Immune Responses to Infectious Diseases. *Infection* **2015**, *43* (4), 399–403; DOI:10.1007/s15010-015-0791-9.

48. Posma, E.; Moes, H.; Heineman, M. J.; Faas, M. M. The Effect of Testosterone on Cytokine Production in the Specific and Non-Specific Immune Response. *Am. J. Reprod. Immunol.* **2004**, *52* (4), 237–243; DOI:10.1111/j.1600-0897.2004.00216.x.

49. Ruggierii, A.; Anticoli, S.; D'ambrosio, A.; Giordani, L.; Mora, M. The Influence of Sex and Gender on Immunity, Infection and Vaccination. *Ann. Ist. Super. Sanita* **2016**, *52* (2), 198–204; DOI:10.4415/ANN_16_02_11.

50. Elderman, M.; Hugenholtz, F.; Belzer, C.; Boekschoten, M.; van Beek, A.; de Haan, B.; Savelkoul, H.; de Vos, P.; Faas, M. Sex and Strain Dependent Differences in Mucosal Immunology and Microbiota Composition in Mice.

Biol. Sex Differ. **2018**, *9*, 26; DOI:10.1186/s13293-018-0186-6.

51. Haro, C.; Rangel-Zúñiga, O. A.; Alcalá-Díaz, J. F.; Gómez-Delgado, F.; Pérez-Martínez, P.; Delgado-Lista, J.; Quintana-Navarro, G. M.; Landa, B. B.; Navas-Cortés, J. A.; Tena-Sempere, M.; Clemente, J. C.; López-Miranda, J.; Pérez-Jiménez, F.; Camargo, A. Intestinal Microbiota Is Influenced by Gender and Body Mass Index. *PLoS One* **2016**, *11* (5), e0154090; DOI:10.1371/journal.pone.0154090.

52. Yurkovetskiy, L.; Burrows, M.; Khan, A. A.; Graham, L.; Volchkov, P.; Becker, L.; Antonopoulos, D.; Umesaki, Y.; Chervonsky, A. V. Gender Bias in Autoimmunity. *Immunity* **2013**, *39* (2), 997–1003; DOI:10.1016/j.immuni.2013.08.013.Gender.

53. Elderman, M.; de Vos, P.; Faas, M. Role of Microbiota in Sexually Dimorphic Immunity. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 1018; DOI:10.3389/fimmu.2018.01018.

54. Sadiq, A.; Bostan, N.; Yinda, K. C.; Naseem, S.; Sattar, S. Rotavirus: Genetics, Pathogenesis and Vaccine Advances. *Rev. Med. Virol.* **2018**, *28*, e2003; DOI:10.1002/rmv.2003.

55. McCombe, P.; Greer, J.; Mackay, I. Sexual Dimorphism in Autoimmune Disease. *Curr. Mol. Med.* **2009**, *9* (9), 1058–1079; DOI:10.2174/156652409789839116.

56. Giefing-Kröll, C.; Berger, P.; Lepperdinger, G.; Grubeck-Loebenstein, B. How Sex and Age Affect Immune Responses, Susceptibility to Infections, and Response to Vaccination. *Aging Cell* **2015**, *14* (3), 309–321; DOI:10.1111/acel.12326.

57. Jaillon, S.; Berthenet, K.; Garlanda, C. Sexual Dimorphism in Innate Immunity. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* **2019**, *56* (3), 308–321; DOI:10.1007/s12016-017-8648-x.

58. Abdullah, M.; Chai, P. S.; Chong, M. Y.; Tohit, E. R. M.; Ramasamy, R.; Pei, C. P.; Vidyadaran, S. Gender Effect on in Vitro Lymphocyte Subset Levels of Healthy Individuals. *Cell. Immunol.* **2012**, *272* (2), 214–219; DOI:10.1016/j.cellimm.2011.10.009.

59. Liu, C. A.; Wang, C. L.; Chuang, H.; Ou, C. Y.; Hsu, T. Y.; Yang, K. D. Prediction of Elevated Cord Blood IgE Levels by Maternal IgE Levels, and the Neonate's Gender and Gestational Age. *Chang Gung Med. J.* **2003**, *26* (8), 561–569.

60. Obiandu, C.; Okerengwo, A. A.; Dapper, D. V. Levels of Serum Immunoglobulins in Apparently Healthy Children and Adults in Port Harcourt, Nigeria. *Niger. J. Physiol. Sci.* **2012**, *28* (1), 23–27.

61. Mutic, A. D.; Jordan, S.; Edwards, S. M.; Ferranti, E. P.; Thul, T. A.; Yang, I. The Postpartum Maternal and Newborn Microbiomes. **2018**, *42* (6), 326–331;

DOI:10.1097/NMC.0000000000000374.The.

62. Braito, A. Gastroenteritis and Intractable Diarrhea. *Neonatol. A Pract. Approach to Neonatal Dis.* **2012**, 713–718; DOI:10.1007/978-88-470-1405-3_94.

63. Borghesi, A.; Marzollo, A.; Michev, A.; Fellay, J. Susceptibility to Infection in Early Life: A Growing Role for Human Genetics. *Hum. Genet.* **2020**, *139* (6–7), 733–743; DOI:10.1007/s00439-019-02109-2.

64. Spencer, J. P. Management of Mastitis in Breastfeeding Women - American Family Physician. *Am. Fam. Physician* **2008**, *78* (6), 727–732.

65. Tanguay, K. E.; McBean, M. R.; Jain, E. Nipple Candidiasis among Breastfeeding Mothers. Case-Control Study of Predisposing Factors. *Can. Fam. Physician* **1994**, *40*, 1407–1413.

66. Crawford, S. E.; Ramani, S.; Tate, J. E.; Parashar, U. D.; Svensson, L.; Hagbom, M.; Franco, M. A.; Greenberg, H. B.; O'Ryan, M.; Kang, G.; Desselberger, U.; Estes, M. K. Rotavirus Infection. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **2017**, *3*, 17083; DOI:10.1038/nrdp.2017.83.

67. Greenberg, H. B.; Estes, M. K. Rotaviruses : From Pathogenesis to Vaccination. *YGAST* **2009**, *136* (6), 1939–1951; DOI:10.1053/j.gastro.2009.02.076.

68. Lundgren, O.; Svensson, L. Pathogenesis of Rotavirus Diarrhea. *Microbes and Infection*, **2001**, *3*, 1145–1156; DOI:10.1016/S1286-4579(01)01475-7.

69. Desselberger, U. Rotaviruses. *Virus Res.* **2014**, *190*, 75–96; DOI:10.1016/j.virusres.2014.06.016.

70. Riechmann, R. *Infección Por Rotavirus*; Riechmann, E. R., Ed.; Undergraf S.L.: Madrid, **2006**.

71. Troeger, C.; Khalil, I. A.; Rao, P. C.; Cao, S.; Blacker, B. F.; Ahmed, T.; Armah, G.; Bines, J. E.; Brewer, T. G.; Colombara, D. V.; Kang, G.; Kirkpatrick, B. D.; Kirkwood, C. D.; Mwenda, J. M.; Parashar, U. D.; Petri, W. A.; Riddle, M. S.; Steele, A. D.; Thompson, R. L.; Walson, J. L.; Sanders, J. W.; Mokdad, A. H.; Murray, C. J. L.; Hay, S. I.; Reiner, R. C. Rotavirus Vaccination and the Global Burden of Rotavirus Diarrhea among Children Younger Than 5 Years. *JAMA Pediatr.* **2018**, *172* (10), 958–965; DOI:10.1001/jamapediatrics.2018.1960.

72. Vlasova, A. N.; Amimo, J. O.; Saif, L. J. Porcine Rotaviruses: Epidemiology, Immune Responses and Control Strategies. *Viruses* **2017**, *9* (3), 48; DOI:10.3390/v9030048.

73. Odimayo, M. S.; Olanrewaju, W. I.; Omilabu, S. A.; Adegboro, B. Prevalence of Rotavirus-Induced Diarrhoea among Children under 5 Years in Ilorin,

Nigeria. *J. Trop. Pediatr.* **2008**, *54* (5), 343–346; DOI:10.1093/tropej/fmn081.

74. Carneiro, N. B.; Diniz-Santos, D. R.; Fagundes, S. Q.; Neves, L. L.; Reges, R. M. B.; Lima, E. K. P.; De Oliva Quadros, V. H.; De Jesus Soares, L. E.; Silva, F. S. R.; De Gouvêa Schneiter, H.; Figueiredo, Í.; Silva, L. R. Clinical and Epidemiological Aspects of Children Hospitalized with Severe Rotavirus-Associated Gastroenteritis in Salvador, BA, Brazil. *Brazilian J. Infect. Dis.* **2005**, *9* (6), 525–528; DOI:10.1590/S1413-86702005000600013.

75. Villena, J.; Vizoso-Pinto, M. G.; Kitazawa, H. Intestinal Innate Antiviral Immunity and Immunobiotics: Beneficial Effects against Rotavirus Infection. *Front. Immunol.* **2016**, *7*, 563; DOI:10.3389/fimmu.2016.00563.

76. Jiang, B.; Gentsch, J. R.; Glass, R. I. The Role of Serum Antibodies in the Protection against Rotavirus Disease: An Overview. *Clin. Infect. Dis.* **2002**, *34* (10), 1351–1361; DOI:10.1086/340103.

77. Dennehy, P. H. Rotavirus Vaccines : An Overview. **2008**, *21* (1), 198–208; DOI:10.1128/CMR.00029-07.

78. Reynolds, D. J.; Hall, G. A.; Debney, T. G.; Parsons, K. R. Pathology of Natural Rotavirus Infection in Clinically Normal Calves. *Res. Vet. Sci.* **1985**, *38* (3), 264–269; DOI:10.1016/s0034-5288(18)31791-0.

79. Crouch, C. F.; Woode, G. N. Serial Studies of Virus Multiplication and Intestinal Damage in Gnotobiotic Piglets Infected with Rotavirus. *J. Med. Microbiol.* **1978**, *11* (3), 325–334; DOI:10.1099/00222615-11-3-325.

80. Burns, J. W.; Krishnaney, A. A.; Vo, P. T.; Rouse, R. V.; Anderson, L. J.; Greenberg, H. B. Analyses of Homologous Rotavirus Infection in the Mouse Model. *Virology* **1995**, *207* (1), 143–153; DOI:10.1006/viro.1995.1060.

81. Ciarlet, M.; Crawford, S. E.; Barone, C.; Bertolotti-Ciarlet, A.; Ramig, R. F.; Estes, M. K.; Conner, M. E. Subunit Rotavirus Vaccine Administered Parenterally to Rabbits Induces Active Protective Immunity. *J. Virol.* **1998**, *72* (11), 9233–9246; DOI:10.1128/jvi.72.11.9233-9246.1998.

82. Ciarlet, M.; Conner, M. E.; Finegold, M. J.; Estes, M. K. Group A Rotavirus Infection and Age-Dependent Diarrheal Disease in Rats: A New Animal Model To Study the Pathophysiology of Rotavirus Infection. *J. Virol.* **2002**, *76* (1), 41–57; DOI:10.1128/jvi.76.1.41-57.2002.

83. Azevedo, M. P.; Vlasova, A. N.; Saif, L. J. Human Rotavirus Virus-like Particle Vaccines Evaluated in a Neonatal Gnotobiotic Pig Model of Human Rotavirus Disease. *Expert Rev. Vaccines* **2013**, *12* (2), 169–181; DOI:10.1586/erv.13.3.

84. Pérez-Cano, F. J.; Castell, M.; Castellote, C.; Franch, À. Characterization of Clinical and Immune Response in a Rotavirus Diarrhea Model in Suckling Lewis Rats. *Pediatr. Res.* **2007**, *62* (6), 658–663;

DOI:10.1203/PDR.0b013e318159a273.

85. Tokuhara, D.; Álvarez, B.; Mejima, M.; Hiroiwa, T.; Takahashi, Y.; Kurokawa, S.; Kuroda, M.; Oyama, M.; Kozuka-Hata, H.; Nochi, T.; Sagara, H.; Aladin, F.; Marcotte, H.; Frenken, L. G. J.; Iturriza-Gómara, M.; Kiyono, H.; Hammarström, L.; Yuki, Y. Rice-Based Oral Antibody Fragment Prophylaxis and Therapy against Rotavirus Infection. *J. Clin. Invest.* **2013**, *123* (9), 3829–3838; DOI:10.1172/JCI70266.

86. Lopatin, U.; Blutt, S. E.; Conner, M. E.; Kelsall, B. L. Lymphotoxin Alpha-Deficient Mice Clear Persistent Rotavirus Infection after Local Generation of Mucosal IgA. *J. Virol.* **2013**, *87* (1), 524–530; DOI:10.1128/jvi.01801-12.

87. Fromantin, C.; Piroth, L.; Petitpas, I.; Pothier, P.; Kohli, E. Oral Delivery of Homologous and Heterologous Strains of Rotavirus to BALB/c Mice Induces the Same Profile of Cytokine Production by Spleen Cells. *Virology* **1998**, *244*, 252–260; DOI:10.1006/viro.1998.9149.

88. VanCott, J. L.; Franco, M. A.; Greenberg, H. B.; Sabbaj, S.; Tang, B.; Murray, R.; McGhee, J. R. Protective Immunity to Rotavirus Shedding in the Absence of Interleukin-6: Th1 Cells and Immunoglobulin A Develop Normally. *J. Virol.* **2000**, *74* (11), 5250–5256; DOI:10.1128/jvi.74.11.5250-5256.2000.

89. VanCott, J. L.; Prada, A. E.; McNeal, M. M.; Stone, S. C.; Basu, M.; Huffer, B.; Smiley, K. L.; Shao, M.; Bean, J. A.; Clements, J. D.; Choi, A. H.-C.; Ward, R. L. Mice Develop Effective but Delayed Protective Immune Responses When Immunized as Neonates Either Intranasally with Nonliving VP6/LT(R192G) or Orally with Live Rhesus Rotavirus Vaccine Candidates. *J. Virol.* **2006**, *80* (10), 4949–4961; DOI:10.1128/jvi.80.10.4949-4961.2006.

90. Guerin-Danan, C.; Meslin, J. C.; Lambre, F.; Charpilienne, a; Serezat, M.; Bouley, C.; Cohen, J.; Andrieux, C. Development of a Heterologous Model in Germfree Suckling Rats for Studies of Rotavirus Diarrhea. *J. Virol.* **1998**, *72* (11), 9298–9302.

91. Crawford, S. E.; Patel, D. G.; Cheng, E.; Berkova, Z.; Hyser, J. M.; Ciarlet, M.; Finegold, M. J.; Conner, M. E.; Estes, M. K. Rotavirus Viremia and Extraintestinal Viral Infection in the Neonatal Rat Model. *J. Virol.* **2006**, *80* (10), 4820–4832; DOI:10.1128/jvi.80.10.4820-4832.2006.

92. Rigo-Adrover, M. del M.; van Limpt, K.; Knipping, K.; Garssen, J.; Knol, J.; Costabile, A.; Franch, À.; Castell, M.; Pérez-Cano, F. J. Preventive Effect of a Synbiotic Combination of Galacto- and Fructooligosaccharides Mixture with Bifidobacterium Breve M-16V in a Model of Multiple Rotavirus Infections. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 1318; DOI:10.3389/fimmu.2018.01318.

93. Knipping, K.; Mcneal, M. M.; Crienen, A.; Amerongen, G. Van; Garssen, J.; Land, B. Van. A Gastrointestinal Rotavirus Infection Mouse Model for Immune Modulation Studies. *Virol. J.* **2011**, *8* (1), 109; DOI:10.1186/1743-

422X-8-109.

94. Organización Mundial de la Salud. Mastitis: Causas y Manejo. *Salud y Desarro. del niño y del Adolesc.* **2000**, 1–49.

95. Angelopoulou, A.; Field, D.; Ryan, C. A.; Stanton, C.; Hill, C.; Ross, R. P. The Microbiology and Treatment of Human Mastitis. *Med. Microbiol. Immunol.* **2018**, *207* (2), 83–94; DOI:10.1007/s00430-017-0532-z.

96. Beltrán Vaquero, D. A.; Crespo Garzón, A. E.; Rodriguez Bravo, T. C.; Iglesias, Á. G. Mastitis Infecciosa: Nueva Solución Para Un Viejo Problema. *Nutr. Hosp.* **2015**, *31*, 89–95; DOI:10.3305/nh.2015.31.sup1.8714.

97. Jiménez, E.; Delgado, S.; Arroyo, R.; Fernández, L.; Rodríguez, J. M. Mastitis Infecciosas Durante La Lactancia: Un Problema Infravalorado (y II). *Acta Pediatr. Esp.* **2009**, *67* (3), 125–132.

98. Contreras, G. A.; Rodríguez, J. M. Mastitis: Comparative Etiology and Epidemiology. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* **2011**, *16* (4), 339–356; DOI:10.1007/s10911-011-9234-0.

99. Delgado, S.; Arroyo, R.; Jiménez, E.; Fernández, L.; Rodríguez, J. M. Mastitis Infecciosas Durante La Lactancia: Un Problema Infravalorado (I). *Acta Pediatr. Esp.* **2009**, *67* (2), 77–84.

100. Mediano, P.; Fernández, L.; Rodríguez, J. M.; Marín, M. Case-Control Study of Risk Factors for Infectious Mastitis in Spanish Breastfeeding Women. *BMC Pregnancy Childbirth* **2014**, *14* (1), 13–15; DOI:10.1186/1471-2393-14-195.

101. Wilson, E.; Woodd, S. L.; Benova, L. Incidence of and Risk Factors for Lactational Mastitis: A Systematic Review. *J. Hum. Lact.* **2020**, *36* (4), 673–686; DOI:10.1177/0890334420907898.

102. Moazzez, A.; Kelso, R. L.; Towfigh, S.; Sohn, H.; Berne, T. V.; Mason, R. J. Breast Abscess Bacteriologic Features in the Era of Community-Acquired Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus Epidemics. *Arch. Surg.* **2007**, *142* (9), 881–884; DOI:10.1001/archsurg.142.9.881.

103. Lee, E.; Anjum, F. Staphylococcus Epidermidis. *StatPearls [Internet]* **2021**.

104. Brown, M. M.; Horswill, A. R. Staphylococcus Epidermidis-Skin Friend or Foe? *PLoS Pathog.* **2020**, *16* (11); DOI:10.1371/JOURNAL.PPAT.1009026.

105. Draper, L. A.; Cotter, P. D.; Hill, C.; Ross, R. P. Lantibiotic Resistance. **2015**, *79* (2), 171–191; DOI:10.1128/MMBR.00051-14.

106. Otto, M. Staphylococcus Epidermidis – the "Accidental" Pathogen. *Nat Rev Microbiol* **2009**, *7* (8), 555–567; DOI:doi:10.1038/nrmicro2182.

107. Natsis, N. E.; Cohen, P. R. Coagulase-Negative Staphylococcus Skin and Soft Tissue Infections. *Am. J. Clin. Dermatol.* **2018**, *19* (5), 671–677;

DOI:10.1007/s40257-018-0362-9.

108. Piette, A.; Verschraegen, G. Role of Coagulase-Negative Staphylococci in Human Disease. *Vet. Microbiol.* **2009**, *134* (1–2), 45–54; DOI:10.1016/j.vetmic.2008.09.009.

109. Fey, P. D.; Olson, M. E. Current Concepts in Biofilm Formation of Staphylococcus Epidermidis. *Future Microbiol.* **2010**, *5* (6), 917–933; DOI:10.2217/fmb.10.56.

110. Büttner, H.; Mack, D.; Rohde, H. Structural Basis of Staphylococcus Epidermidis Biofilm Formation: Mechanisms and Molecular Interactions. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2015**, *5*, 14; DOI:10.3389/fcimb.2015.00014.

111. Vasileiou, N. G. C.; Chatzopoulos, D. C.; Sarrou, S.; Fragkou, I. A.; Katsafadou, A. I.; Mavrogianni, V. S.; Petinaki, E.; Fthenakis, G. C. Role of Staphylococci in Mastitis in Sheep. *J. Dairy Res.* **2019**, *86* (3), 254–266; DOI:10.1017/S0022029919000591.

112. Khan, M. Z.; Khan, A. Basic Facts of Mastitis in Dairy Animals: A Review. *Pakistan Vet* **2006**, *26* (4), 204–208.

113. Turk, R.; Koledić, M.; Maćešić, N.; Benić, M.; Dobranić, V.; Đuričić, D.; Cvetnić, L.; Samardžija, M. The Role of Oxidative Stress and Inflammatory Response in the Pathogenesis of Mastitis in Dairy Cows. *Mljekarstvo* **2017**, *67* (2), 91–101; DOI:10.15567/mljekarstvo.2017.0201.

114. Arroyo, R.; Martín, V.; Maldonado, A.; Jiménez, E.; Fernández, L.; Rodríguez, J. M. Treatment of Infectious Mastitis during Lactation: Antibiotics versus Oral Administration of Lactobacilli Isolated from Breast Milk. *Clin. Infect. Dis.* **2010**, *50* (12), 1551–1558; DOI:10.1086/652763.

115. Notebaert, S.; Meyer, E. Mouse Models to Study the Pathogenesis and Control of Bovine Mastitis. A Review. *Vet. Q.* **2006**, *28* (1), 2–13; DOI:10.1080/01652176.2006.9695201.

116. Eea, J. L.; Aapeb, M. J. P.; Haoa, X. Z. Original Article Recombinant Bovine Soluble CD14 Reduces Severity of Experimental Escherichia Coli Mastitis in Mice. **2003**, *34*, 307–316; DOI:10.1051/vetres.

117. Wang, J. J.; Wei, Z. K.; Zhang, X.; Wang, Y. N.; Fu, Y. H.; Yang, Z. T. Butyrate Protects against Disruption of the Blood-Milk Barrier and Moderates Inflammatory Responses in a Model of Mastitis Induced by Lipopolysaccharide. *Br. J. Pharmacol.* **2017**, *174* (21), 3811–3822; DOI:10.1111/bph.13976.

118. Gu, B.; Miao, J.; Zhu, Y.; Deng, Y.; Zou, S. Protective Effect of Retinoid against Endotoxin-Induced Mastitis in Rats. **2009**, *58*, 81–88; DOI:10.1007/s00011-009-8057-6.

119. Miao, J.; Zhu, Y.; Gu, B. Evaluation of the Changes of Immune Cells during Lipopolysaccharide-Induced Mastitis in Rats. **2007**, *40*, 135–143; DOI:10.1016/j.cyto.2007.08.012.

120. Corzo, N.; Alonso, J. L.; Azpiroz, F.; Calvo, M. A.; Cirici, M.; Leis, R.; Lombó, F.; Mateos-Aparicio, I.; Plou, F. J.; Ruas-Madiedo, P.; Rúperez, P.; Redondo-Cuenca, A.; Sanz, M. L.; Clemente, A. Prebióticos; Concepto, Propiedades y Efectos Beneficiosos. *Nutr. Hosp.* **2015**, *31*, 99–118; DOI:10.3305/nh.2015.31.sup1.8715.

121. Gibson, G. R.; Hutkins, R.; Sanders, M. E.; Prescott, S. L.; Reimer, R. A.; Salminen, S. J.; Scott, K.; Stanton, C.; Swanson, K. S.; Cani, P. D.; Verbeke, K.; Reid, G. Expert Consensus Document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) Consensus Statement on the Definition and Scope of Prebiotics. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2017**, *14* (8), 491–502; DOI:10.1038/nrgastro.2017.75.

122. Shoaib, M.; Shehzad, A.; Omar, M.; Rakha, A.; Raza, H.; Sharif, H. R.; Shakeel, A.; Ansari, A.; Niazi, S. Inulin: Properties, Health Benefits and Food Applications. *Carbohydr. Polym.* **2016**, *147*, 444–454; DOI:10.1016/j.carbpol.2016.04.020.

123. Panesar, P. S.; Kumari, S. Lactulose: Production, Purification and Potential Applications. *Biotechnol. Adv.* **2011**, *29* (6), 940–948; DOI:10.1016/j.biotechadv.2011.08.008.

124. Azagra-Boronat, I.; Rodríguez-Lagunas, M. J.; Castell, M.; Pérez-Cano, F. J. Prebiotics for Gastrointestinal Infections and Acute Diarrhea. In *Dietary Interventions in Gastrointestinal Diseases: Foods, Nutrients, and Dietary Supplements*; **2019**; pp 179–191; DOI:10.1016/B978-0-12-814468-8.00014-4.

125. Cerdó, T.; García-Santos, J. A.; Bermúdez, M. G.; Campoy, C. The Role of Probiotics and Prebiotics in the Prevention and Treatment of Obesity. *Nutrients* **2019**, *11*, 635; DOI:10.3390/nu11030635.

126. Fong, W.; Li, Q.; Yu, J. Gut Microbiota Modulation: A Novel Strategy for Prevention and Treatment of Colorectal Cancer. *Oncogene* **2020**, *39* (26), 4925–4943; DOI:10.1038/s41388-020-1341-1.

127. Rolim, P. M. Development of Prebiotic Food Products and Health Benefits. *Food Sci. Technol.* **2015**, *35* (1), 3–10; DOI:10.1590/1678-457X.6546.

128. Gowrishankar, S.; Kamaladevi, A.; Karutha Pandian, S. Prebiotics Mechanism of Action: An Over View. In *Advances in Probiotics*; Elsevier Inc., 2021; pp 137–148; DOI:10.1016/b978-0-12-822909-5.00009-5.

129. Marques, T. M.; Wall, R.; Ross, R. P.; Fitzgerald, G. F.; Ryan, C. A.; Stanton, C. Programming Infant Gut Microbiota: Influence of Dietary and Environmental Factors. *Current Opinion in Biotechnology*. **2010**, pp 149–156; DOI:10.1016/j.copbio.2010.03.020.

130. Veereman-Wauters, G.; Staelens, S.; Van De Broek, H.; Plaskie, K.; Wesling, F.; Roger, L. C.; McCartney, A. L.; Assam, P. Physiological and Bifidogenic Effects of Prebiotic Supplements in Infant Formulae. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **2011**, *52* (6), 763–771; DOI:10.1097/MPG.0b013e3182139f39.

131. Moro, G.; Minoli, I.; Mosca, M.; Fanaro, S.; Jelinek, J.; Stahl, B.; Boehm, G. Dosage-Related Bifidogenic Effects of Galacto- and Fructooligosaccharides in Formula-Fed Term Infants. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **2002**, *34* (3), 291–295; DOI:10.1097/00005176-200203000-00014.

132. Arslanoglu, S.; Moro, G. E.; Boehm, G. Early Supplementation of Prebiotic Oligosaccharides Protects Formula-Fed Infants against Infections during the First Six Months of Life. *J. Nutr.* **2008**, *138* (8), 1520–1520; DOI:10.1093/jn/138.8.1520.

133. Azagra-Boronat, I.; Massot-Cladera, M.; Knipping, K.; van't Land, B.; Stahl, B.; Garssen, J.; Rodríguez-Lagunas, M. J.; Franch, À.; Castell, M.; Pérez-Cano, F. J. Supplementation With 2′-FL and ScGOS/LcFOS Ameliorates Rotavirus-Induced Diarrhea in Suckling Rats. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2018**, *8*, 372; DOI:10.3389/fcimb.2018.00372.

134. Bruzzese, E.; Volpicelli, M.; Squeglia, V.; Bruzzese, D.; Salvini, F.; Bisceglia, M.; Lionetti, P.; Cinquetti, M.; Iacono, G.; Amarri, S.; Guarino, A. A Formula Containing Galacto- and Fructo-Oligosaccharides Prevents Intestinal and Extra-Intestinal Infections: An Observational Study. *Clin. Nutr.* **2009**, *28* (2), 156–161; DOI:10.1016/j.clnu.2009.01.008.

135. Osborn, D.; Sinn, J. Prebiotics in Infants for Prevention of Allergic Disease and Food Allergy. *Cochrane Libr.* **2013**, No. 3, CD006474; DOI:10.1002/14651858.CD006474.pub3.www.cochranelibrary.com.

136. Rigo-Adrover, M.; Pérez-Berezo, T.; Ramos-Romero, S.; van Limpt, K.; Knipping, K.; Garssen, J.; Knol, J.; Franch, À.; Castell, M.; Pérez-Cano, F. J. A Fermented Milk Concentrate and a Combination of Short-Chain Galacto-Oligosaccharides/Long-Chain Fructo-Oligosaccharides/Pectin-Derived Acidic Oligosaccharides Protect Suckling Rats from Rotavirus Gastroenteritis. *Br. J. Nutr.* **2017**, *117* (02), 209–217; DOI:10.1017/S0007114516004566.

137. Wegh, C. A. M.; Geerlings, S. Y.; Knol, J.; Roeselers, G.; Belzer, C. Postbiotics and Their Potential Applications in Early Life Nutrition and Beyond. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 4673; DOI:10.3390/ijms20194673.

138. Soccol, C. R.; Vandenberghe, L. P. de S.; Spier, M. R.; Medeiros, A. B. P.; Yamaguishi, C. T.; De Dea Lindner, J.; Pandey, A.; Thomaz-Soccol, V. The Potential of Probiotics: A Review. *Food Technol. Biotechnol.* **2010**, *48* (4), 413–434.

139. Sanders, M. E.; Akkermans, L. M. A.; Haller, D.; Hammerman, C.; Heimbach, J.; Hörmannsperger, G.; Huys, G.; Levy, D. D.; Lutgendorff, F.; Mack, D.;

Phothirath, P.; Solano-Aguilar, G.; Vaughan, E. Safety Assessment of Probiotics for Human Use. *Gut Microbes* **2010**, *1* (3), 164–185; DOI:10.4161/gmic.1.3.12127.

140. Stavropoulou, E.; Bezirtzoglou, E. Probiotics in Medicine: A Long Debate. *Front. Immunol.* **2020**, *11*, 2192; DOI:10.3389/fimmu.2020.02192.

141. Dimidi, E.; Christodoulides, S.; Scott, S. M.; Whelan, K. Mechanisms of Action of Probiotics and the Gastrointestinal Microbiota on Gut Motility and Constipation. *Adv. Nutr.* **2017**, *8* (3), 484–494; DOI:10.3945/an.116.014407.

142. Díaz Martín, J. J.; Jiménez, D. G. Aplicaciones En Gastroenterología. *Nutr. Hosp.* **2015**, *31*, 21–25; DOI:10.3305/nh.2015.31.sup1.8703.

143. Rigo-Adrover, M.; Saldaña-Ruíz, S.; van Limpt, K.; Knipping, K.; Garssen, J.; Knol, J.; Franch, A.; Castell, M.; Pérez-Cano, F. J. A Combination of ScGOS/LcFOS with Bifidobacterium Breve M-16V Protects Suckling Rats from Rotavirus Gastroenteritis. *Eur. J. Nutr.* **2017**, *56* (4), 1657–1670; DOI:10.1007/s00394-016-1213-1.

144. Salvini, F. M.; Bettiga, C. Preventing and Treating Colic. In *Probiotics and Child Gastrointestinal Health*; **2019**; Vol. 10, pp 44–56.

145. Savino, F.; Cordisco, L.; Tarasco, V.; Palumeri, E.; Calabrese, R.; Oggero, R.; Roos, S.; Matteuzzi, D. Lactobacillus Reuteri DSM 17938 in Infantile Colic: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Pediatrics* **2010**, *126* (3), e526–e533; DOI:10.1542/peds.2010-0433.

146. Chen, K.; Liu, C.; Li, H.; Lei, Y.; Zeng, C.; Xu, S.; Li, J.; Savino, F. Infantile Colic Treated With Bifidobacterium Longum CECT7894 and Pediococcus Pentosaceus CECT8330: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Front. Pediatr.* **2021**, *9*, 635176; DOI:10.3389/fped.2021.635176.

147. Malagón-rojas, J. N.; Mantziari, A.; Salminen, S.; Szajewska, H. Postbiotics for Preventing and Treating Common Infectious Diseases in Children: A Systematic Review. *Nutrients* **2020**, *12* (2); DOI:10.3390/nu12020389.

148. Salminen, S.; Collado, M. C.; Endo, A.; Hill, C.; Lebeer, S.; Quigley, E. M. M.; Sanders, M. E.; Shamir, R.; Swann, J. R.; Szajewska, H.; Vinderola, G. The International Scientific Association of Probiotics and Prebiotics (ISAPP) Consensus Statement on the Definition and Scope of Postbiotics. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2021**, *18* (9), 649–667; DOI:10.1038/s41575-021-00440-6.

149. de Almada, C. N.; Almada, C. N.; Martinez, R. C. R.; Sant'Ana, A. S. Paraprobiotics: Evidences on Their Ability to Modify Biological Responses, Inactivation Methods and Perspectives on Their Application in Foods. *Trends Food Sci. Technol.* **2016**, *58*, 96–114; DOI:10.1016/j.tifs.2016.09.011.

150. Zółkiewicz, J.; Marzec, A.; Ruszczynski, M.; Feleszko, W. Postbiotics—A

Step Beyond Pre- and Probiotics. *Nutrients* **2020**, *12*, 2189.

151. Nataraj, B. H.; Ali, S. A.; Behare, P. V.; Yadav, H. Postbiotics-Parabiotics: The New Horizons in Microbial Biotherapy and Functional Foods. *Microb. Cell Fact.* **2020**, *19*, 168; DOI:10.1186/s12934-020-01426-w.

152. Hernández-Granados, M. J.; Franco-Robles, E. Postbiotics in Human Health: Possible New Functional Ingredients? *Food Res. Int.* **2020**, *137* (October 2019); DOI:10.1016/j.foodres.2020.109660.

153. Khodaii, Z.; Ghaderian, S. M. H.; Natanzi, M. M. Probiotic Bacteria and Their Supernatants Protect Enterocyte Cell Lines from Enteroinvasive Escherichia Coli (EIEC) Invasion. *Int. J. Mol. Cell. Med.* **2017**, *6* (3), 183–189; DOI:10.22088/acadpub.BUMS.6.3.183.

154. De Marco, S.; Sichetti, M.; Muradyan, D.; Piccioni, M.; Traina, G.; Pagiotti, R.; Pietrella, D. Probiotic Cell-Free Supernatants Exhibited Anti-Inflammatory and Antioxidant Activity on Human Gut Epithelial Cells and Macrophages Stimulated with LPS. *Evidence-based Complement. Altern. Med.* **2018**, *2018*; DOI:10.1155/2018/1756308.

155. Agostoni, C.; Goulet, O.; Kolacek, S.; Koletzko, B.; Moreno, L.; Puntis, J.; Rigo, J.; Shamir, R.; Szajewska, H.; Turck, D. Fermented Infant Formulae without Live Bacteria. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **2007**, *44* (3), 392–397; DOI:10.1097/01.mpg.0000258887.93866.69.

156. Fabiano, V.; Indrio, F.; Verduci, E.; Calcaterra, V.; Pop, T. L.; Mari, A.; Zuccotti, G. V.; Cokugras, F. C.; Pettoello-Mantovani, M.; Goulet, O. Term Infant Formulas Influencing Gut Microbiota: An Overview. *Nutrients* **2021**, *13*, 4200; DOI:10.3390/nu13124200.

157. Malagón-rojas, J. N.; Mantziari, A.; Salminen, S.; Szajewska, H. Postbiotics for Preventing and Treating Common Infectious Diseases in Children: A Systematic Review. *Nutrients* **2020**, *12*, 389; DOI:10.3390/nu12020389.

158. Vallejo-Cordoba, B.; Castro-López, C.; García, H. S.; González-Córdova, A. F.; Hernández-Mendoza, A. Postbiotics and Paraprobiotics: A Review of Current Evidence and Emerging Trends. In *Advances in Food and Nutrition Research*; Elsevier Inc., **2020**; Vol. 94, pp 1–34; DOI:10.1016/bs.afnr.2020.06.001.

159. Mariam, S.; Zegeye, N.; Tariku, T. Potential of Cell-Free Supernatants from Cultures of Selected Lactic Acid Bacteria and Yeast Obtained from Local Fermented Foods as Inhibitors of Listeria. *Bmc* **2014**, *7*, 606.

160. Bayoumi, M. A.; Griffiths, M. W. In Vitro Inhibition of Expression of Virulence Genes Responsible for Colonization and Systemic Spread of Enteric Pathogens Using Bifidobacterium Bifidum Secreted Molecules. *Int. J. Food Microbiol.* **2012**, *156* (3), 255–263; DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2012.03.034.

161. Gao, J.; Li, Y.; Wan, Y.; Hu, T.; Liu, L.; Yang, S.; Gong, Z.; Zeng, Q.; Wei, Y.; Yang, W.; Zeng, Z.; He, X.; Huang, S. H.; Cao, H. A Novel Postbiotic from Lactobacillus Rhamnosus GG with a Beneficial Effect on Intestinal Barrier Function. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 477; DOI:10.3389/fmicb.2019.00477.

162. Dunand, E.; Burns, P.; Binetti, A.; Bergamini, C.; Peralta, G. H.; Forzani, L.; Reinheimer, J.; Vinderola, G. Postbiotics Produced at Laboratory and Industrial Level as Potential Functional Food Ingredients with the Capacity to Protect Mice against Salmonella Infection. *J. Appl. Microbiol.* **2019**, *127* (1), 219–229; DOI:10.1111/jam.14276.

163. Mantziari, A.; Salminen, S.; Szajewska, H.; Malagón-Rojas, J. N. Postbiotics against Pathogens Commonly Involved in Pediatric Infectious Diseases. *Microorganisms* **2020**, *8*, 1510; DOI:10.3390/microorganisms8101510.

164. Good, M.; Sodhi, C. P.; Ozolek, J. A.; Buck, R. H.; Goehring, K. C.; Thomas, D. L.; Vikram, A.; Bibby, K.; Morowitz, M. J.; Firek, B.; Lu, P.; Hackam, D. J. Lactobacillus Rhamnosus HN001 Decreases the Severity of Necrotizing Enterocolitis in Neonatal Mice and Preterm Piglets: Evidence in Mice for a Role of TLR9. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* **2014**, *306* (11), G1021–G1032; DOI:10.1152/ajpgi.00452.2013.

165. Rigo-Adrover, M. D. M.; Knipping, K.; Garssen, J.; van Limpt, K.; Knol, J.; Franch, À.; Castell, M.; Rodríguez-Lagunas, M. J.; Pérez-Cano, F. J. Prevention of Rotavirus Diarrhea in Suckling Rats by a Specific Fermented Milk Concentrate with Prebiotic Mixture. *Nutrients* **2019**, *11*, 189; DOI:10.3390/nu11010189.

166. Salazar-Lindo, E.; Figueroa-Quintanilla, D.; Caciano, M. I.; Reto-Valiente, V.; Chauviere, G.; Colin, P. Effectiveness and Safety of Lactobacillus LB in the Treatment of Mild Acute Diarrhea in Children. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **2007**, *44* (5), 571–576; DOI:10.1097/MPG.0b013e3180375594.

167. Zhang, J.; Guo, S.; Li, C.; Jiang, X. Therapeutic Effects of Inhaled Inactivated Mycobacterium Phlei in Adult Patients with Moderate Persistent Asthma. *Immunotherapy* **2012**, *12* (10), 9173–9187; DOI:10.2217/imt.12.25.

168. Kambe, J.; Watcharin, S.; Makioka-Itaya, Y.; Inoue, R.; Watanabe, G.; Yamaguchi, H.; Nagaoka, K. Heat-Killed Enterococcus Fecalis (EC-12) Supplement Alters the Expression of Neurotransmitter Receptor Genes in the Prefrontal Cortex and Alleviates Anxiety-like Behavior in Mice. *Neurosci. Lett.* **2020**, *720*, 134753; DOI:10.1016/j.neulet.2020.134753.

169. Nishida, K.; Sawada, D.; Kuwano, Y.; Tanaka, H.; Rokutan, K. Health Benefits of Lactobacillus Gasseri Cp2305 Tablets in Young Adults Exposed to Chronic Stress: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study. *Nutrients* **2019**, *11*, 1859; DOI:10.3390/nu11081859.

170. Cavallari, J. F.; Fullerton, M. D.; Duggan, B. M.; Foley, K. P.; Denou, E.; Smith, B. K.; Desjardins, E. M.; Henriksbo, B. D.; Kim, K. J.; Tuinema, B. R.; Stearns, J. C.; Prescott, D.; Rosenstiel, P.; Coombes, B. K.; Steinberg, G. R.; Schertzer, J. D. Muramyl Dipeptide-Based Postbiotics Mitigate Obesity-Induced Insulin Resistance via IRF4. *Cell Metab.* **2017**, *25* (5), 1063-1074.e3; DOI:10.1016/j.cmet.2017.03.021.

171. Chuah, L.; Foo, H. L.; Loh, T. C.; Banu, N.; Alitheen, M.; Yeap, S. K.; Elina, N.; Mutalib, A.; Rahim, R. A.; Yusoff, K. Postbiotic Metabolites Produced by Lactobacillus Plantarum Strains Exert Selective Cytotoxicity Effects on Cancer Cells. *BMC Complement. Altern. Med.* **2019**, *19*, 114.

172. Escamilla, J.; Lane, M. A.; Maitin, V. Cell-Free Supernatants from Probiotic Lactobacillus Casei and Lactobacillus Rhamnosus GG Decrease Colon Cancer Cell Invasion in Vitro. *Nutr. Cancer* **2012**, *64* (6), 871–878; DOI:10.1080/01635581.2012.700758.

173. Griffiths, K. J.; Ridler, A. L.; Compton, C. W. R.; Corner-Thomas, R. A.; Kenyon, P. R. Associations between Lamb Growth to Weaning and Dam Udder and Teat Scores. *N. Z. Vet. J.* **2019**, *67* (4), 172–179; DOI:10.1080/00480169.2019.1596524.

174. Mank, V.; Brown, K. Leukocytosis https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK560882/ (accessed Aug 12, 2021).

175. Murray, M. T. 11 - Erythrocyte Sedimentation Rate. In *Textbook of Natural Medicine*; Elsevier Inc., **2020**; pp 121-124.e1; DOI:10.1016/B978-0-323-43044-9.00011-X.

176. Indino, P.; Lemarchand, P.; Bady, P.; de Torrenté, A.; Genné, L.; Genné, D. Prospective Study on Procalcitonin and Other Systemic Infection Markers in Patients with Leukocytosis. *Int. J. Infect. Dis.* **2008**, *12* (3), 319–324; DOI:10.1016/j.ijid.2007.09.007.

177. Chabot-Richards, D. S.; George, T. I. Leukocytosis. *Int. J. Lab. Hematol.* **2014**, *36* (3), 279–288; DOI:10.1111/ijlh.12212.

178. Hamad, H.; Mangla, A. Lymphocytosis. *StatPearls Publ. LLC.* **2021**.

179. Esposito, A.; Leite, D.; Elisabete, S. The Role of Respiratory Virus Infection in Suspected Pertussis : A Prospective Study. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* **2021**, *54* (3), 379–384; DOI:10.1016/j.jmii.2019.06.009.

180. Tai, Y.; Chi, H.; Chiu, N.; Lin, C.; Huang, D. T.; Huang, C.; Huang, F. ScienceDirect Clinical Features of Neonatal Listeriosis in Taiwan : A Hospital-Based Study. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* **2020**, *53* (6), 866–874; DOI:10.1016/j.jmii.2019.08.001.

181. Restori, K. H.; Srinivasa, B. T.; Ward, B. J.; Fixman, E. D. Neonatal Immunity, Respiratory Virus Infections, and the Development of Asthma.

Front. Immunol. **2018**, *9*, 1249; DOI:10.3389/fimmu.2018.01249.

182. Cahenzli, J.; Köller, Y.; Wyss, M.; Geuking, M. B.; McCoy, K. D. Intestinal Microbial Diversity during Early-Life Colonization Shapes Long-Term IgE Levels. *Cell Host Microbe* **2013**, *14* (5), 559–570; DOI:10.1016/j.chom.2013.10.004.

183. Pastor-Villaescusa, B.; Hurtado, J. A.; Gil-Campos, M.; Uberos, J.; Maldonado-Lobón, J. A.; Díaz-Ropero, M. P.; Bañuelos, O.; Fonollá, J.; Olivares, M.; Leante, J. L.; Affumicato, L.; Couce, M. L.; Rite, S.; Luna, S.; Díaz-Faura, M. C.; Ventura, M. P.; Serrano-López, L.; Narbona, E.; Fuentes-Gutiérrez, C.; Iglesias-Deus, A.; Rodilla, E. N.; Valero, A. D.; Rodríguez, C.; Sañudo, A. Effects of Lactobacillus Fermentum CECT5716 Lc40 on Infant Growth and Health: A Randomised Clinical Trial in Nursing Women. *Benef. Microbes* **2020**, *11* (3), 235–244; DOI:10.3920/BM2019.0180.

184. Bochniarz, M.; Zdzisińska, B.; Wawron, W.; Szczubiał, M.; Dąbrowski, R. Milk and Serum IL-4, IL-6, IL-10, and Amyloid A Concentrations in Cows with Subclinical Mastitis Caused by Coagulase-Negative Staphylococci. *J. Dairy Sci.* **2017**, *100* (12), 9674–9680; DOI:10.3168/jds.2017-13552.

185. Akhtar, M.; Guo, S.; Guo, Y. fang; Zahoor, A.; Shaukat, A.; Chen, Y.; Umar, T.; Deng, P. G.; Guo, M. Upregulated-Gene Expression of pro-Inflammatory Cytokines (TNF-α, IL-1β and IL-6) via TLRs Following NF-KB and MAPKs in Bovine Mastitis. *Acta Trop.* **2020**, *207*, 105458; DOI:10.1016/j.actatropica.2020.105458.

186. Pérez-Cano, F. J.; Castellote, C.; Marín-Gallén, S.; González-Castro, A.; Franch, À.; Castell, M. Phenotypic and Functional Characteristics of Rat Spleen Lymphocytes during Suckling. *Dev. Comp. Immunol.* **2007**, *31* (12), 1264–1277; DOI:10.1016/j.dci.2007.03.004.

187. Reddy, M.; Eirikis, E.; Davis, C.; Davis, H. M.; Prabhakar, U. Comparative Analysis of Lymphocyte Activation Marker Expression and Cytokine Secretion Profile in Stimulated Human Peripheral Blood Mononuclear Cell Cultures: An in Vitro Model to Monitor Cellular Immune Function. *J. Immunol. Methods* **2004**, *293* (1–2), 127–142; DOI:10.1016/j.jim.2004.07.006.

188. Topham, D. J.; Reilly, E. C. Tissue-Resident Memory CD8+ T Cells: From Phenotype to Function. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 515; DOI:10.3389/fimmu.2018.00515.

189. Ivetic, A.; Green, H. L. H.; Hart, S. J. L-Selectin: A Major Regulator of Leukocyte Adhesion, Migration and Signaling. *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 1068; DOI:10.3389/fimmu.2019.01068.

190. Schlub, T. E.; Badovinac, V. P.; Sabel, J. T.; Harty, J. T.; Davenpor, M. P. Predicting CD62L Expression during the CD8+ T Cell Response in Vivo. *Immunol Cell Biol* **2010**, *88* (2), 157–164;

DOI:10.1038/icb.2009.80.Predicting.

191. Diez-Fraile, A.; Meyer, E.; Duchateau, L.; Burvenich, C. L-Selectin and B2-Integrin Expression on Circulating Bovine Polymorphonuclear Leukocytes during Endotoxin Mastitis. *J. Dairy Sci.* **2003**, *86* (7), 2334–2342; DOI:10.3168/jds.S0022-0302(03)73826-0.

192. Soltys, J.; Quinn, M. T. Selective Recruitment of T-Cell Subsets to the Udder during Staphylococcal and Streptococcal Mastitis: Analysis of Lymphocyte Subsets and Adhesion Molecule Expression. *Infect. Immun.* **1999**, *67* (12), 6293–6302; DOI:10.1128/iai.67.12.6293-6302.1999.

193. Azagra-Boronat, I.; Massot-Cladera, M.; Knipping, K.; Garssen, J.; Ben Amor, K.; Knol, J.; Franch, À.; Castell, M.; Rodríguez-Lagunas, M. J.; Pérez-Cano, F. J. Strain-Specific Probiotic Properties of Bifidobacteria and Lactobacilli for the Prevention of Diarrhea Caused by Rotavirus in a Preclinical Model. *Nutrients* **2020**, *12*, 498; DOI:10.3390/nu12020498.

194. Baccala, R.; Gonzalez-Quintial, R.; Lawson, B. R.; Stern, M. E.; Kono, D. H.; Beutler, B.; Theofilopoulos, A. N. Sensors of the Innate Immune System: Their Mode of Action. *Nat. Rev. Rheumatol.* **2009**, *5* (8), 448–456; DOI:10.1038/nrrheum.2009.136.

195. Fitzgerald, K. A.; Kagan, J. C. Toll-like Receptors and the Control of Immunity. *Cell* **2020**, *180* (6), 1044–1066; DOI:10.1016/j.cell.2020.02.041.

196. Arévalo Sureda, E.; Weström, B.; Pierzynowski, S. G.; Prykhodko, O. Maturation of the Intestinal Epithelial Barrier in Neonatal Rats Coincides with Decreased FcRn Expression, Replacement of Vacuolated Enterocytes and Changed Blimp-1 Expression (PLoS ONE (2016) 11:10 (E0164775) DOI: 10.1371/Journal.Pone.0164775. *PLoS One* **2017**, *12* (1), 1–18; DOI:10.1371/journal.pone.0169724.

197. Pérez-Cano, F. J.; Marín-Gallén, S.; Castell, M.; Rodríguez-Palmero, M.; Rivero, M.; Castellote, C.; Franch, A. Supplementing Suckling Rats with Whey Protein Concentrate Modulates the Immune Response and Ameliorates Rat Rotavirus-Induced Diarrhea. *J. Nutr.* **2008**, 2392–2398; DOI:10.3945/jn.108.093856.

198. Rigo-Adrover, M. D. M.; Knipping, K.; Garssen, J.; Saldaña-Ruíz, S.; Franch, À.; Castell, M.; Pérez-Cano, F. J. Rotavirus Double Infection Model to Study Preventive Dietary Interventions. *Nutrients* **2019**, *11* (1), 9–11; DOI:10.3390/nu11010131.

199. Jacobi, S. K.; Moeser, A. J.; Blikslager, A. T.; Rhoads, J. M.; Corl, B. A.; Harrell, R. J.; Odle, J. Acute Effects of Rotavirus and Malnutrition on Intestinal Barrier Function in Neonatal Piglets. *World J. Gastroenterol.* **2013**, *19* (31), 5094–5102; DOI:10.3748/wjg.v19.i31.5094.

200. Sabbaj, D. L.; DePetre, E. E.; Gómez, J. A.; Sordo, M. E. Rotavirus En La Diarrea Aguda. *Arch.argent.pediatr* **2001**, *99* (6), 486–490.

201. Staat, M. A.; Azimi, P. H.; Berke, T.; Roberts, N.; Bernstein, D. I.; Ward, R. L.; Pickering, L. K.; Matson, D. O. Clinical Presentations of Rotavirus Infection among Hospitalized Children. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **2002**, *21* (3), 221–227; DOI:10.1097/00006454-200203000-00012.

202. Iturriza-Gómara, M.; Dallman, T.; Bányai, K.; Böttiger, B.; Buesa, J.; Diedrich, S.; Fiore, L.; Johansen, K.; Korsun, N.; Kroneman, A.; Lappalainen, M.; László, B.; Maunula, L.; Matthinjnssens, J.; Midgley, S.; Mladenova, Z.; Poljsak-Prijatelj, M.; Pothier, P.; Ruggeri, F. M.; Sanchez-Fauquier, A.; Schreier, E.; Steyer, A.; Sidaraviciute, I.; Tran, A. N.; Usonis, V.; Van Ranst, M.; de Rougemont, A.; Gray, J. Rotavirus Surveillance in Europe, 2005–2008: Web-Enabled Reporting and Real-Time Analysis of Genotyping and Epidemiological Data. *J. Infect. Dis.* **2009**, *52* (1), S215–S221; DOI:10.1086/605049.

203. Hussein, A. M.; Hassan, M. K. Rotavirus Infection among Hospitalized Children with Acute Watery Diarrhea in Basrah - Iraq. *Bahrain Med. Bull.* **2000**, *22* (4), 170–173.

204. Rytlewska, M.; Bako, W.; Ratajczak, B.; Marek, A.; Gwizdek, A.; Czarnecka-Rudnik, D.; Swiatkowska, H.; Tyl, J.; Korzon, M. Epidemiological and Clinical Characteristics of Rotaviral Diarrhoea in Children from Gdansk, Gdynia and Sopot. *Med. Sci. Monit.* **2000**, *6* (1), 117–122.

205. Junaid, S. A.; Umeh, C.; Olabode, A. O.; Banda, J. M. Incidence of Rotavirus Infection in Children with Gastroenteritis Attending Jos University Teaching Hospital, Nigeria. *Virol. J.* **2011**, *8*, 233; DOI:10.1186/1743-422X-8-233.

206. Muendo, C.; Laving, A.; Kumar, R.; Osano, B.; Egondi, T.; Njuguna, P. Prevalence of Rotavirus Infection among Children with Acute Diarrhoea after Rotavirus Vaccine Introduction in Kenya, a Hospital Cross-Sectional Study. *BMC Pediatr.* **2018**, *18*, 323; DOI:10.1186/s12887-018-1291-8.

207. Ahmed, S.; Kabir, A. R. M. R. M. L.; Rahman, A.; Hussain, M.; Khatoon, S.; Hannan, A. Severity of Rotavirus Diarrhea in Children: One Year Experience in a Children Hospital of Bangladesh. *Iran. J. Pediatr.* **2009**, *19* (2), 108–116.

208. Klein, S. L. The Effects of Hormones on Sex Differences in Infection: From Genes to Behavior. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **2000**, *24* (6), 627–638; DOI:10.1016/S0149-7634(00)00027-0.

209. Azagra-Boronat, I.; Massot-Cladera, M.; Mayneris-Perxachs, J.; Knipping, K.; Van't Land, B.; Tims, S.; Stahl, B.; Garssen, J.; Franch, À.; Castell, M.; Rodríguez-Lagunas, M. J.; Pérez-Cano, F. J. Immunomodulatory and Prebiotic Effects of 2'-Fucosyllactose in Suckling Rats. *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 1773; DOI:10.3389/fimmu.2019.01773.

210. Christoforidou, Z.; Mora Ortiz, M.; Poveda, C.; Abbas, M.; Walton, G.; Bailey, M.; Lewis, M. C. Sexual Dimorphism in Immune Development and in Response to Nutritional Intervention in Neonatal Piglets. *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 2705; DOI:10.3389/fimmu.2019.02705.

211. Simon, A. K.; Hollander, G. A.; McMichael, A. Evolution of the Immune System in Humans from Infancy to Old Age. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **2015**, *282*, 20143085; DOI:10.1098/rspb.2014.3085.

212. Hewagama, A.; Patel, D.; Yarlagadda, S.; Strickland, F.; Richardson, B. Stronger Inflammatory/Cytotoxic T Cell Response in Women Identified by Microarray Analysis. *Genes Immun.* **2009**, *10* (5), 509–516; DOI:10.1038/gene.2009.12.

213. Oertelt-Prigione, S. The Influence of Sex and Gender on the Immune Response. *Autoimmun. Rev.* **2012**, *11*, A479–A485; DOI:10.1016/j.autrev.2011.11.022.

214. Azagra-Boronat, I.; Massot-Cladera, M.; Knipping, K.; Van't Land, B.; Tims, S.; Stahl, B.; Knol, J.; Garssen, J.; Franch, À.; Castell, M.; Pérez-Cano, F. J.; Rodríguez-Lagunas, M. J. Oligosaccharides Modulate Rotavirus-Associated Dysbiosis and TLR Gene Expression in Neonatal Rats. *Cells* **2019**, *8* (8), 876; DOI:10.3390/cells8080876.

215. Bouman, A.; Jan Heineman, M.; Faas, M. M. Sex Hormones and the Immune Response in Humans. *Hum. Reprod. Update* **2005**, *11* (4), 411–423; DOI:10.1093/humupd/dmi008.

216. Cross, T. W. L.; Kasahara, K.; Rey, F. E. Sexual Dimorphism of Cardiometabolic Dysfunction: Gut Microbiome in the Play? *Mol. Metab.* **2018**, *15*, 70–81; DOI:10.1016/j.molmet.2018.05.016.

217. Cui, M.; Xiao, H.; Li, Y.; Zhang, S.; Dong, J.; Wang, B.; Zhu, C.; Jiang, M.; Zhu, T.; He, J.; Wang, H.; Fan, S. Sexual Dimorphism of Gut Microbiota Dictates Therapeutics Efficacy of Radiation Injuries. *Adv. Sci.* **2019**, *6*, 1901048; DOI:10.1002/advs.201901048.

218. Dominianni, C.; Sinha, R.; Goedert, J. J.; Pei, Z.; Yang, L.; Hayes, R. B.; Ahn, J. Sex, Body Mass Index, and Dietary Fiber Intake Influence the Human Gut Microbiome. *PLoS One* **2015**, *10* (4); DOI:10.1371/journal.pone.0124599.

219. Martin, R.; Makino, H.; Yavuz, A. C.; Ben-Amor, K.; Roelofs, M.; Ishikawa, E.; Kubota, H.; Swinkels, S.; Sakai, T.; Oishi, K.; Kushiro, A.; Knol, J. Early-Life Events, Including Mode of Delivery and Type of Feeding, Siblings and Gender, Shape the Developing Gut Microbiota. *PLoS One* **2016**, *11* (6), 1–30; DOI:10.1371/journal.pone.0158498.

220. Jašarević, E.; Morrison, K. E.; Bale, T. L. Sex Differences in the Gut Microbiome - Brain Axis across the Lifespan. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol.*

Sci. **2016**, *371*, 12–17; DOI:10.1098/rstb.2015.0122.

221. Bines, J. E.; Kirkwood, C. D. Conquering Rotavirus: From Discovery to Global Vaccine Implementation. *Journal of Paediatrics and Child Health*. 2015, pp 34–39; DOI:10.1111/jpc.12815.

222. Clarke, E.; Desselberger, U. Correlates of Protection against Human Rotavirus Disease and the Factors Influencing Protection in Low-Income Settings. *Mucosal Immunol.* **2015**, *8* (1), 1–17; DOI:10.1038/mi.2014.114.

223. Mrozek-Budzyn, D.; Kieltyka, A.; Majewska, R.; Augustyniak, M. The Effectiveness of Rotavirus Vaccine in Preventing Acute Gastroenteritis during Rotavirus Seasons among Polish Children. *Arch. Med. Sci.* **2016**, *12* (3), 614–620; DOI:10.5114/aoms.2016.59935.

224. Morel, F. B.; Oozeer, R.; Piloquet, H.; Moyon, T.; Pagniez, A.; Knol, J.; Darmaun, D.; Michel, C. Preweaning Modulation of Intestinal Microbiota by Oligosaccharides or Amoxicillin Can Contribute to Programming of Adult Microbiota in Rats. *Nutrition* **2015**, *31* (3), 515–522; DOI:10.1016/j.nut.2014.09.011.

225. Vandenplas, Y.; de Halleux, V.; Arciszewska, M.; Lach, P.; Pokhylko, V.; Klymenko, V.; Schoen, S.; Abrahamse-Berkeveld, M.; Mulder, K. A.; Rubio, R. P. A Partly Fermented Infant Formula with Postbiotics Including 3′-GL, Specific Oligosaccharides, 2′-FL, and Milk Fat Supports Adequate Growth, Is Safe and Well-Tolerated in Healthy Term Infants: A Double-Blind, Randomised, Controlled, Multi-Country Trial. *Nutrients* **2020**, *12*, 3560; DOI:10.3390/nu12113560.

226. Béghin, L.; Tims, S.; Roelofs, M.; Rougé, C.; Oozeer, R.; Rakza, T.; Chirico, G.; Roeselers, G.; Knol, J.; Rozé, J. C.; Turck, D. Fermented Infant Formula (with Bifidobacterium Breve C50 and Streptococcus Thermophilus O65) with Prebiotic Oligosaccharides Is Safe and Modulates the Gut Microbiota towards a Microbiota Closer to That of Breastfed Infants. *Clin. Nutr.* **2020**, *40* (3), 778–787; DOI:10.1016/j.clnu.2020.07.024.

227. Rao, S.; Srinivasjois, R.; Patole, S. Prebiotic Supplementation in Full-Term Neonates. *Arch. Pediatr. Adolesc. Med.* **2009**, *163* (8), 755–764; DOI:10.1001/archpediatrics.2009.94.

228. Chuah, L. O.; Foo, H. L.; Loh, T. C.; Mohammed Alitheen, N. B.; Yeap, S. K.; Abdul Mutalib, N. E.; Abdul Rahim, R.; Yusoff, K. Postbiotic Metabolites Produced by Lactobacillus Plantarum Strains Exert Selective Cytotoxicity Effects on Cancer Cells. *BMC Complement. Altern. Med.* **2019**, *19*, 114; DOI:10.1186/s12906-019-2528-2.

229. Beasley, D. E.; Koltz, A. M.; Lambert, J. E.; Fierer, N.; Dunn, R. R. The Evolution of Stomach Acidity and Its Relevance to the Human Microbiome. *PLoS One* **2015**, *10* (7), 1–12; DOI:10.1371/journal.pone.0134116.

230. Leforestier, G.; Blais, A.; Blachier, F.; Marsset-Baglieri, A.; Davila-Gay, A. M.; Perrin, E.; Tomé, D. Effects of Galacto-Oligosaccharide Ingestion on the Mucosa-Associated Mucins and Sucrase Activity in the Small Intestine of Mice. *Eur. J. Nutr.* **2009**, *48* (8), 457–464; DOI:10.1007/s00394-009-0036-8.

231. Okazaki, Y.; Katayama, T. Consumption of Non-Digestible Oligosaccharides Elevates Colonic Alkaline Phosphatase Activity by up-Regulating the Expression of IAP-I, with Increased Mucins and Microbial Fermentation in Rats Fed a High-Fat Diet. *Br. J. Nutr.* **2019**, *121* (2), 146–154; DOI:10.1017/S0007114518003082.

232. Van Herreweghen, F.; De Paepe, K.; Roume, H.; Kerckhof, F. M.; Van de Wiele, T. Mucin Degradation Niche as a Driver of Microbiome Composition and Akkermansia Muciniphila Abundance in a Dynamic Gut Model Is Donor Independent. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2018**, *94*, fiy186; DOI:10.1093/femsec/fiy186.

233. Alizadeh, A.; Akbari, P.; Difilippo, E.; Schols, H. A.; Ulfman, L. H.; Schoterman, M. H. C.; Garssen, J.; Fink-Gremmels, J.; Braber, S. The Piglet as a Model for Studying Dietary Components in Infant Diets: Effects of Galacto-Oligosaccharides on Intestinal Functions. *Br. J. Nutr.* **2016**, *115* (4), 605–618; DOI:10.1017/S0007114515004997.

234. Yang, X.; Twitchell, E.; Li, G.; Wen, K.; Weiss, M.; Kocher, J.; Lei, S.; Ramesh, A.; Ryan, E. P.; Yuan, L. High Protective Efficacy of Rice Bran against Human Rotavirus Diarrhea via Enhancing Probiotic Growth, Gut Barrier Function, and Innate Immunity. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 15004; DOI:10.1038/srep15004.

235. Krumbeck, J. A.; Rasmussen, H. E.; Hutkins, R. W.; Clarke, J.; Shawron, K.; Keshavarzian, A.; Walter, J. Probiotic Bifidobacterium Strains and Galactooligosaccharides Improve Intestinal Barrier Function in Obese Adults but Show No Synergism When Used Together as Synbiotics. *Microbiome* **2018**, *6*, 121; DOI:10.1186/s40168-018-0494-4.

236. Takeda, K.; Akira, S. Toll-like Receptors in Innate Immunity. *Int. Immunol.* **2005**, *17* (1), 1–14; DOI:10.1093/intimm/dxh186.

237. Walters, K. E.; Martiny, J. B. H. Alpha-, Beta-, and Gamma-Diversity of Bacteria Varies across Habitats. *PLoS One* **2020**, *15*, 1–17; DOI:10.1371/journal.pone.0233872.

238. Geerlings, S.; Kostopoulos, I.; de Vos, W.; Belzer, C. Akkermansia Muciniphila in the Human Gastrointestinal Tract: When, Where, and How? *Microorganisms* **2018**, *6*, 75; DOI:10.3390/microorganisms6030075.

239. Nishiwaki, H.; Ito, M.; Ishida, T.; Hamaguchi, T.; Maeda, T.; Kashihara, K.; Tsuboi, Y.; Ueyama, J.; Shimamura, T.; Mori, H.; Kurokawa, K.; Katsuno, M.; Hirayama, M.; Ohno, K. Meta-Analysis of Gut Dysbiosis in Parkinson's

Disease. *Mov. Disord.* **2020**, *35* (9), 1626–1635; DOI:10.1002/mds.28119.

240. Zhou, K. Strategies to Promote Abundance of Akkermansia Muciniphila, an Emerging Probiotics in the Gut, Evidence from Dietary Intervention Studies. *J. Funct. Foods* **2017**, *33*, 194–201; DOI:10.1016/j.jff.2017.03.045.

241. Doumatey, A. P.; Adeyemo, A.; Zhou, J.; Lei, L.; Adebamowo, S. N.; Adebamowo, C.; Rotimi, C. N. Gut Microbiome Profiles Are Associated With Type 2 Diabetes in Urban Africans. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2020**, *10*, 63; DOI:10.3389/fcimb.2020.00063.

242. Yu, M.; Jia, H.; Zhou, C.; Yang, Y.; Zhao, Y.; Yang, M.; Zou, Z. Variations in Gut Microbiota and Fecal Metabolic Phenotype Associated with Depression by 16S RRNA Gene Sequencing and LC/MS-Based Metabolomics. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2017**, *138*, 231–239; DOI:10.1016/j.jpba.2017.02.008.

243. Ben, X. M.; Li, J.; Feng, Z. T.; Shi, S. Y.; Lu, Y. D.; Chen, R.; Zhou, X. Y. Low Level of Galacto-Oligosaccharide in Infant Formula Stimulates Growth of Intestinal Bifidobacteria and Lactobacilli. *World J. Gastroenterol.* **2008**, *14* (42), 6564–6568; DOI:10.3748/wjg.14.6564.

244. Huet, F.; Abrahamse-Berkeveld, M.; Tims, S.; Simeoni, U.; Beley, G.; Savagner, C.; Vandenplas, Y.; Hourihane, J. O. B. Partly Fermented Infant Formulae With Specific Oligosaccharides Support Adequate Infant Growth and Are Well-Tolerated. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **2016**, *63* (4), e43–e53; DOI:10.1097/MPG.0000000000001360.

245. Han, C.; Dai, Y.; Liu, B.; Wang, L.; Wang, J.; Zhang, J. Diversity Analysis of Intestinal Microflora between Healthy and Diarrheal Neonatal Piglets from the Same Litter in Different Regions. *Anaerobe* **2019**, *55*, 136–141; DOI:10.1016/j.anaerobe.2018.12.001.

246. Aguilar-Toalá, J. E.; Garcia-Varela, R.; Garcia, H. S.; Mata-Haro, V.; González-Córdova, A. F.; Vallejo-Cordoba, B.; Hernández-Mendoza, A. Postbiotics: An Evolving Term within the Functional Foods Field. *Trends Food Sci. Technol.* **2018**, *75*, 105–114; DOI:10.1016/j.tifs.2018.03.009.

247. Li, N.; Huang, S.; Jiang, L.; Dai, Z.; Li, T.; Han, D.; Wang, J. Characterization of the Early Life Microbiota Development and Predominant Lactobacillus Species at Distinct Gut Segments of Low- And Normal-Birth-Weight Piglets. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 797; DOI:10.3389/fmicb.2019.00797.

248. Liu, L.; He, Y.; Wang, K.; Miao, J.; Zheng, Z. Metagenomics Approach to the Intestinal Microbiome Structure and Function in High Fat Diet-Induced Obesity in Mice Fed with Conjugated Linoleic Acid (CLA). *Food Funct.* **2020**, *11* (11), 9729–9739; DOI:10.1039/d0fo02112a.

249. Cheng, M.; Zhang, X.; Miao, Y.; Cao, J.; Wu, Z.; Weng, P. The Modulatory Effect of (-)-Epigallocatechin 3-O-(3-O-Methyl) Gallate (EGCG3″Me) on Intestinal Microbiota of High Fat Diet-Induced Obesity Mice Model. *Food*

Res. Int. **2017**, *92*, 9–16; DOI:10.1016/j.foodres.2016.12.008.

250. Zhang, Y.; Chen, L.; Hu, M.; Kim, J. J.; Lin, R.; Xu, J.; Fan, L.; Qi, Y.; Wang, L.; Liu, W.; Deng, Y.; Si, J.; Chen, S. Dietary Type 2 Resistant Starch Improves Systemic Inflammation and Intestinal Permeability by Modulating Microbiota and Metabolites in Aged Mice on High-Fat Diet. *Aging (Albany. NY).* **2020**, *12* (10), 9173–9187; DOI:10.18632/aging.103187.

251. Szajewska, H.; Skórka, A.; Pieścik-Lech, M. Fermented Infant Formulas without Live Bacteria: A Systematic Review. *Eur. J. Pediatr.* **2015**, *174* (11), 1413–1420; DOI:10.1007/s00431-015-2629-y.

252. Indrio, F.; Ladisa, G.; Mautone, A.; Montagna, O. Effect of a Fermented Formula on Thymus Size and Stool PH in Healthy Term Infants. *Pediatr. Res.* **2007**, *62* (1), 98–100; DOI:10.1203/pdr.0b013e31806772d3.

253. Bowman, E. P.; Kuklin, N. A.; Youngman, K. R.; Lazarus, N. H.; Kunkel, E. J.; Pan, J.; Greenberg, H. B.; Butcher, E. C. The Intestinal Chemokine Thymus-Expressed Chemokine (CCL25) Attracts IgA Antibody-Secreting Cells. *J. Exp. Med.* **2002**, *195* (2), 269–275; DOI:10.1084/jem.20010670.

254. Thibault, H.; Aubert-Jacquin, C.; Goulet, O. Effects of Long-Term Consumption of a Fermented Infant Formula (with Bifidobacterium Breve C50 and Streptococcus Thermophilus 065) on Acute Diarrhea in Healthy Infants. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **2004**, *39* (2), 147–152; DOI:10.1097/00005176-200408000-00004.

255. Patel, M. C.; Shirey, K. A.; Pletneva, L. M.; Boukhvalova, M. S.; Garzino-Demo, A.; Vogel, S. N.; Blanco, J. C. G. Novel Drugs Targeting Toll-like Receptors for Antiviral Therapy. *Future Virol.* **2014**, *9* (9), 811–829; DOI:10.2217/fvl.14.70.

256. Ge, Y.; Mansell, A.; Ussher, J. E.; Brooks, A. E. S.; Manning, K.; Wang, C. J. H.; Taylor, J. A. Rotavirus NSP4 Triggers Secretion of Proinflammatory Cytokines from Macrophages via Toll-Like Receptor 2. *J. Virol.* **2013**, *87* (20), 11160–11167; DOI:10.1128/jvi.03099-12.

257. Song, X.; Zhong, L.; Lyu, N.; Liu, F.; Li, B.; Hao, Y.; Xue, Y.; Li, J.; Feng, Y.; Ma, Y.; Hu, Y.; Zhu, B. Inulin Can Alleviate Metabolism Disorders in Ob/Ob Mice by Partially Restoring Leptin-Related Pathways Mediated by Gut Microbiota. *Genomics, Proteomics Bioinforma.* **2019**, *17* (1), 64–75; DOI:10.1016/j.gpb.2019.03.001.

258. Hu, X.; Ouyang, S.; Xie, Y.; Gong, Z.; Du, J. Characterizing the Gut Microbiota in Patients with Chronic Kidney Disease. *Postgrad. Med.* **2020**, *132* (6), 495–505; DOI:10.1080/00325481.2020.1744335.

259. Kang, X.; Zhan, L.; Lu, X.; Song, J.; Zhong, Y.; Wang, Y.; Yang, Y.; Fan, Z.; Jiang, X.; Sun, R. Characteristics of Gastric Microbiota in Gk Rats with

Spontaneous Diabetes: A Comparative Study. *Diabetes, Metab. Syndr. Obes. Targets Ther.* **2020**, *13*, 1435–1447; DOI:10.2147/DMSO.S242698.

260. Hua, Y.; Fan, R.; Zhao, L.; Tong, C.; Qian, X.; Zhang, M.; Xiao, R.; Ma, W. Trans Fatty Acids Alter the Gut Microbiota in High-Fat-Diet-Induced Obese Rats. *Br. J. Nutr.* **2020**, *124* (12), 1251–1263; DOI:10.1017/S0007114520001841.

261. Cao, W.; Chin, Y.; Chen, X.; Mi, Y.; Xue, C.; Wang, Y.; Tang, Q. The Role of Gut Microbiota in the Resistance to Obesity in Mice Fed a High Fat Diet. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **2020**, *71* (4), 453–463; DOI:10.1080/09637486.2019.1686608.

262. Haange, S. B.; Jehmlich, N.; Hoffmann, M.; Weber, K.; Lehmann, J.; Von Bergen, M.; Slanina, U. Disease Development Is Accompanied by Changes in Bacterial Protein Abundance and Functions in a Refined Model of Dextran Sulfate Sodium (DSS)-Induced Colitis. *J. Proteome Res.* **2019**, *18* (4), 1774–1786; DOI:10.1021/acs.jproteome.8b00974.

263. Youssef, O.; Lahti, L.; Kokkola, A.; Karla, T.; Tikkanen, M.; Ehsan, H.; Carpelan-Holmström, M.; Koskensalo, S.; Böhling, T.; Rautelin, H.; Puolakkainen, P.; Knuutila, S.; Sarhadi, V. Stool Microbiota Composition Differs in Patients with Stomach, Colon, and Rectal Neoplasms. *Dig. Dis. Sci.* **2018**, *63* (11), 2950–2958; DOI:10.1007/s10620-018-5190-5.

264. Liang, J. Q.; Li, T.; Nakatsu, G.; Chen, Y. X.; Yau, T. O.; Chu, E.; Wong, S.; Szeto, C. H.; Ng, S. C.; Chan, F. K. L.; Fang, J. Y.; Sung, J. J. Y.; Yu, J. A Novel Faecal Lachnoclostridium Marker for the Non-Invasive Diagnosis of Colorectal Adenoma and Cancer. *Gut* **2020**, *69* (7), 1248–1257; DOI:10.1136/gutjnl-2019-318532.

265. Abrams, S. A.; Griffin, I. J.; Hawthorne, K. M.; Liang, L.; Gunn, S. K.; Darlington, G.; Ellis, K. J. A Combination of Prebiotic Short- and Long-Chain Inulin-Type Fructans Enhances Calcium Absorption and Bone Mineralization in Young Adolescents. *Am. J. Clin. Nutr.* **2005**, *82* (2), 471–476; DOI:10.1093/ajcn.82.2.471.

266. Bryk, G.; Coronel, M. Z.; Lugones, C.; Mandalunis, P.; Rio, M. E.; Gualtieri, A. F.; de Portela, M. L. P. M.; Zeni, S. N. Effect of a Mixture of GOS/FOS® on Calcium Absorption and Retention during Recovery from Protein Malnutrition: Experimental Model in Growing Rats. *Eur. J. Nutr.* **2016**, *55* (8), 2445–2458; DOI:10.1007/s00394-015-1052-5.

267. Rodriguez-herrera, A.; Mulder, K.; Bouritius, H.; Rubio, R.; Muñoz, A.; Agosti, M.; Lista, G.; Corvaglia, L.; Ludwig, T.; Abrahamse-berkeveld, M.; Perez-Navero, J. L. Gastrointestinal Tolerance, Growth and Safety of a Partly Fermented Formula with Specific Prebiotics in Healthy Infants: A Double-Blind, Randomized, Controlled Trial. *Nutrients* **2019**, *11*, 1530.