



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Estudio del impacto de intervenciones nutricionales personalizadas en la microbiota intestinal humana y la relación con la obesidad

Radu Ghemis Malcic

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE FARMÀCIA I CIÈNCIES DE L'ALIMENTACIÓ

PROGRAMA DE DOCTORAT DE BIOTECNOLOGIA

(Radu Ghemis Malcic)

**Estudio del impacto de intervenciones
nutricionales personalizadas en la microbiota
intestinal humana y la relación con la obesidad**

Radu Ghemis Malcic | 2023



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Facultat de Farmàcia
i Ciències de l'Alimentació

UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE FARMÀCIA I CIÈNCIES DE L'ALIMENTACIÓ

PROGRAMA DE DOCTORADO DE BIOTECNOLOGÍA



LEITAT TECHNOLOGICAL CENTER

Estudio del impacto de intervenciones nutricionales personalizadas en la microbiota intestinal humana y la relación con la obesidad

Memoria presentada por Radu Ghemis Malcic para optar al título de doctor por la
Universitat de Barcelona

Codirectora

Codirector

Tutora

Autor

Dra. Montse Bosch

Dr. Salvador Lladó

Dra. Maria de las
Mercedes Berlanga

Radu Ghemis

Radu Ghemis Malcic | 2023

Per al Gabriel, l'Arnau i la Noa

AGRADECIMIENTOS

En primer lloc m'agradaria donar les gràcies als meus dos directors de tesi, en Salva i la Montse per l'esforç que ha suposat per vosaltres dedicar part de les vostres hores laborals (i no laborals) a la meva direcció i correcció de la tesi. M'heu ajudat i m'heu fet créixer com a científic durant aquesta etapa i us estic molt agraït. En particular vull agrair a en Salva per tot i no formar part ja de LEITAT, haver volgut continuar estant lligat i involucrat a aquesta tesi quan no hi tenia cap obligació. També a la Montse per ser-hi cada dia, per aportar-me sempre un punt de vista diferent i per la confiança que sempre m'has transmès. Puc dir amb tota sinceritat que he tingut molta sort de compartir aquest viatge del doctorat amb vosaltres.

També volia agrair a la Universitat de Barcelona i a la tutora de la universitat, la Mercè, per haver-me donat la oportunitat de fer aquesta tesi associada a la UB ja que no ha sigut una tesi convencional al haver-se realitzar a un entorn fora de la universitat.

Gràcies també a tots els companys del grup de Applied Microbiology and Biotechnologies de LEITAT, a tots els que hi sou encara, i a tots els que ja han marxat. Gràcies Pablo, Belen, Helena per ajudar-me amb tota la feinada de les extraccions de ADN i per les estones de riures ja sigui a l'esmorzar o a l'hora de dinar. No em vull deixar totes les persones que han passat durant aquests anys de tesi i amb les que hem compartit moltes coses, tant al laboratori com fora. Eli, Nuria, Adrià, Aïna, Unai, Albert, Ana i segurament més gent que em deixo, gràcies per tot.

Una menció especial als que més que companys de feina, s'han acabat convertint en molt bons amics que durant els moments més complicats d'aquesta tesi, quan tot es veu més complicat m'han tret un somriure. Hem compartit moltes més coses que feina: partides de pàdel, sortides, jocs de taula, un comiat i una boda entre d'altres. Guillem, Sergi i Xavi, la etapa de LEITAT amb vosaltres la recordo com una de les millors i us trobo a faltar ara que no hi sou.

També vull agrair a tota la gent de LEITAT Biomed del parc científic. M'heu acollit com un més tot i no pertànyer al vostre grup i m'he sentit sempre molt a gust treballant amb vosaltres. Amb tota la gent que he interactuat al PCB durant aquesta tesi: Ramon, Marc, Jorge, Jose Luis, Noemi, Alba, Laura, Pedro, Toni, Silvia, Laia, Jessica, Anna, Sarai, M^a Àngels, gràcies per tot. Menció especial per en Sergi, que sense ell hagués sigut impossible fer aquesta tesi. Per la implicació i tot el coneixement dels models animals, per les hores de dedicació i les discussions conjuntes sobre quina era la millor estratègia per aconseguir els nostres objectius, moltes gràcies per tot Sergi!!

Ja fora de la feina, gràcies als meus dos amics, Uri i Roc per ser-hi també, degut al ritme de vida que he portat durant els anys d'aquesta tesi ens hem vist molt menys del que m'hagués agradat, tot i així, sempre hi sou quan és necessari. Un cop acabi aquesta etapa espero poder-vos veure molt més sovint.

També agrair als meus pares per la formació que m'han donat gràcies a la qual estic aquí, a punt de ser el primer doctor de la família.

Finalment, més que un agraïment, és un disculpa als meus 2 fills, Gabriel i Arnau. La dedicació del meu temps per poder escriure aquesta tesi ha implicat tenir molt menys temps per compartir amb vosaltres i és el que ha sigut més complicat de gestionar per mi. Us estimo i sou la meva gran motivació per ser una millor persona cada dia. I a tu Noa, que encara estàs a la panxa de la mama, espero que quan neixis tinguis un papa doctor.

Per acabar, m'he deixat al final la persona més important i sense la qual hagués sigut impossible defensar aquesta tesi, la doctora Elisenda, la meva parella, la mare dels meus fills i el recolzament més gran que he tingut i tinc a dia d'avui. Dubto molt que cap altre persona hagués pogut entendre el que implica fer una tesi doctoral, fora de l'àmbit

estrictament acadèmic, amb moltes altres responsabilitats, amb 2 fills petits i un altre en camí. M'has recolzat sempre i animat a tirar endavant quan a vegades no veia clar que pogués amb tot. Has posat molt més de la teva part per intentar arribar a tot durant aquests mesos finals de redacció. Ens hem espavilat com hem pogut, sols, sense cap ajuda com sempre hem fet amb la criança del nostres fills, i això hagués sigut impossible sense la teva ajuda, comprensió i amor infinit. Moltes gràcies amor meu.

ABSTRACT

La microbiota intestinal humana, compuesta por una gran diversidad de microorganismos, juega un papel clave en la salud y la homeostasis del huésped. Cambios en la microbiota pueden afectar el metabolismo, la inflamación y el equilibrio hormonal. Estudios recientes han demostrado que existe una correlación entre la composición y función de la microbiota intestinal y la obesidad, una epidemia global que tiene graves consecuencias para la salud.

Las intervenciones nutricionales personalizadas han surgido como una estrategia prometedora para combatir la obesidad y otras patologías metabólicas. El diseño de estas intervenciones se puede basar en datos relacionados con el estado metabólico de los individuos, con la predisposición genética o con los hábitos de consumo entre otros. El diseño de dietas personalizadas puede ser fundamental para abordar eficaz y seguramente el desequilibrio en la composición y función de la microbiota intestinal entre otros, permitiendo la prevención y el tratamiento de la obesidad y mejorando la salud humana en general. Sin embargo, actualmente existe poco conocimiento del efecto de estas intervenciones en la microbiota intestinal en individuos con obesidad.

Para avanzar en la comprensión de la interacción entre la microbiota y el huésped en la obesidad y en las intervenciones nutricionales, es esencial desarrollar nuevos modelos preclínicos *in vivo*, que permitan investigar la implicación de la microbiota intestinal en la etiopatogenia de la obesidad y otras patologías relacionadas. Un enfoque prometedor de modelo murino *in vivo* es la utilización de trasplantes de microbiota fecal (FMT) para humanizar la microbiota intestinal de los ratones. Estudios realizados con este tipo de modelos pueden proporcionar una base sólida para el diseño de intervenciones terapéuticas dirigidas a la modulación de la microbiota.

Para ir más allá del estado del arte, los objetivos de la presente tesis doctoral han sido: i) Estudiar la modulación de la microbiota intestinal, en 3 pilotos de intervención (en 3 países distintos) con dietas personalizadas para mejorar el estado metabólico de los participantes y revertir la obesidad en los voluntarios obesos, ii) Poner a punto un modelo animal *pseudo germ free* con FMT de muestras humanas, iii) Usar el modelo *pseudo germ free* para observar si los cambios en la microbiota intestinal de los voluntarios a lo largo de las intervenciones nutricionales tienen un impacto directo en la obesidad y el sobrepeso, en comparación a dietas convencionales.

La principal conclusión de esta tesis doctoral es que los cambios potencialmente beneficiosos observados en la microbiota intestinal, tras un periodo de dieta, como el incremento de alfa diversidad de las comunidades bacterianas o la mayor abundancia de géneros bacterianos previamente correlacionados con estados saludables, son más prevalentes en personas con sobrepeso y obesidad, en comparación a personas normopeso. Sin embargo, las intervenciones nutricionales personalizadas no inducen cambios significativos en la composición general de la microbiota en comparación a las intervenciones nutricionales clásicas. Por otro lado, los cambios más beneficiosos como el incremento en la alfa diversidad o la mayor abundancia de géneros bacterianos potencialmente saludables son más prevalentes en personas con sobrepeso y obesidad en comparación a personas normopeso.

En cuanto a los experimentos de puesta a punto modelos animales con FMT se ha concluido que la transferencia de microbiota humana al modelo animal de ratón es exitosa, no obstante, son necesarias varias re-inoculaciones para obtener un mayor grado de “humanización” de la microbiota del modelo animal. Esto confirma el potencial de estos modelos para estudiar la implicación de la microbiota humana en distintos estados patológicos.

Finalmente, durante el experimento de FMT a partir de las muestras de voluntarios que participaron en las intervenciones nutricionales se pudo concluir que las comunidades microbianas provenientes de los voluntarios pre y post intervención no inducen cambios significativos en el peso, histopatología o bioquímica de los animales. No obstante, si se observaron cambios significativos en el metaboloma entre los animales que recibieron FMT de muestras pertenecientes antes y después de la intervención dietética en humanos. Del mismo modo que las intervenciones nutricionales en humanos, no se observan cambios significativos entre las intervenciones personalizadas y las estándar en el modelo animal.

En resumen, durante esta tesis se ha profundizado en la investigación de la relación entre la microbiota intestinal y la obesidad, explorando el impacto de las intervenciones nutricionales personalizadas en la biodiversidad bacteriana de los individuos participantes, y se han desarrollado y aplicado modelos preclínicos *in vivo* con FMT a partir de muestras humanas.

ABSTRACT

The human gut microbiota, consisting of a vast diversity of microorganisms, plays a crucial role in host health and homeostasis. Changes in the microbiota can affect metabolism, inflammation, and hormonal balance. Recent studies have demonstrated a correlation between the composition and function of the gut microbiota and obesity, a global epidemic with severe health consequences.

Personalized nutritional interventions have emerged as a promising strategy to combat obesity and other metabolic pathologies. The design of these interventions can be based on data related to individuals' metabolic status, genetic predisposition, or consumption habits, among others. Personalized diets may be essential for effectively and safely addressing imbalances in gut microbiota composition and function, allowing for the prevention and treatment of obesity and improving overall human health. However, there is currently limited knowledge of the effect of these interventions on the gut microbiota in individuals with obesity.

To advance the understanding of the interaction between the microbiota and the host in obesity and nutritional interventions, it is essential to develop new *in vivo* preclinical models that allow for the investigation of the involvement of the gut microbiota in the etiopathogenesis of obesity and other related pathologies. A promising *in vivo* murine model approach is the use of fecal microbiota transplantation (FMT) to humanize the intestinal microbiota of mice. Studies conducted with this type of model can provide a solid foundation for designing therapeutic interventions aimed at modulating the microbiota.

To go beyond the state of the art, the objectives of the present doctoral thesis were: i) To study the modulation of the gut microbiota in three pilot interventions (in three different countries) with personalized diets to improve participants' metabolic status and reverse obesity in obese volunteers, ii) To optimize a pseudo germ-free animal model with FMT of human samples, iii) To use the pseudo germ-free model to observe whether changes in the gut microbiota of volunteers throughout nutritional interventions have a direct impact on obesity and overweight, compared to conventional diets.

The main conclusion of this doctoral thesis is that potentially beneficial changes observed in the gut microbiota, after a period of diet, such as increased alpha diversity of bacterial communities or greater abundance of bacterial genera previously correlated with healthy states, are more prevalent in overweight and obese individuals compared to those of

normal weight. However, personalized nutritional interventions do not induce significant changes in the overall composition of the microbiota compared to classical nutritional interventions. On the other hand, the most beneficial changes, such as an increase in alpha diversity or a higher abundance of potentially healthy bacterial genera, are more prevalent in overweight and obese individuals compared to those of normal weight.

Regarding the experiments for setting up animal models with FMT, it was concluded that the transfer of human microbiota to the mouse model is successful; however, several re-inoculations are needed to achieve a higher degree of "humanization" of the animal model's microbiota. This confirms the potential of these models for studying the involvement of human microbiota in various pathological states.

Finally, during the FMT experiment using samples from volunteers who participated in the nutritional interventions, it was concluded that microbial communities from pre and post-intervention volunteers do not induce significant changes in the weight, histopathology, or biochemistry of the animals. However, significant changes in the metabolome were observed between animals receiving FMT from samples taken before and after the dietary intervention in humans. Similar to the nutritional interventions in humans, no significant differences were observed between personalized and standard interventions in the animal model.

In summary, this thesis has deepened the investigation of the relationship between gut microbiota and obesity, exploring the impact of personalized nutritional interventions on the bacterial biodiversity of participating individuals, and developed and applied in vivo preclinical models with FMT from human samples.

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN GENERAL:	1
1.1 Microbiota intestinal y salud	5
1.2 Sobrepeso, obesidad y el papel de la microbiota intestinal	7
1.3 Modelos preclínicos para el estudio del microbioma	10
1.3.1 Modelos <i>in vitro</i>	11
1.3.2 Modelos <i>in vivo</i>	12
1.4 Trasplantes de microbiota fecal	15
1.5 Modelos <i>in vivo</i> con trasplante de microbiota fecal	18
2. OBJETIVOS	25
2.1. Hipótesis y primer objetivo	25
2.2. Hipótesis y segundo objetivo	25
2.3. Hipótesis y tercer objetivo	25
3. MATERIALES Y MÉTODOS	27
3.1. Estrategias nutricionales personalizadas (El proyecto PREVENTOMICS)	27
3.2. Estudios de intervención en humanos	28
3.2.1. Metaboloma de los voluntarios y los “global scores”	29
3.2.2. Recolección de las muestras fecales	30
3.2.3. Extracción de ADN y secuenciación Illumina	31
3.2.4. Análisis bioinformático y estadístico	32
3.2.5. Análisis metabolómico	33
3.3. Modelo animal <i>in vivo</i> ; puesta a punto	34
3.3.1. Diseño experimental	34
3.3.2. Recuento y viabilidad de las bacterias	35
3.3.3. Ratones	35
3.3.4. Tratamiento con antibiótico	36
3.3.5. Extracción de ADN	36
3.3.6. Determinación de carga bacteriana mediante qPCR	36
3.3.7. Preparación de las librerías 16S y secuenciación	37
3.3.8. Análisis de datos y estadística	37
3.4. Modelo animal humanizado	38
3.4.1. Animales y diseño experimental	38
3.4.2. Registro del peso corporal y órganos	40
3.4.3. Colección de las muestras fecales	40
3.4.4. Parámetros bioquímicos en plasma	40
3.4.5. Trasplante de microbiota fecal	41
3.4.6. Cuantificación del 16S rRNA mediante qPCR	41
3.4.7. Cultivo de bacterias anaerobias totales	41
3.4.8. Metabolómica	41
3.4.9. Análisis estadístico	44
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	48
4.1. Caracterización de la microbiota intestinal en tres estudios de intervención de dieta personalizada en relación a obesidad	49
4.1.1. Biomarcadores asociados a la obesidad	50
4.1.2. Correlación del metaboloma con la microbiota intestinal	61
4.1.3. Comparativa de biodiversidad bacteriana en los tres estudios de intervención	68
4.1.4. Efecto del tipo de dieta en la microbiota intestinal humana en el estudio de intervención en España	77

4.2.	Puesta a punto modelo animal PGF con trasplante de microbiota fecal	107
4.2.1.	Viabilidad en las muestras de heces humanas	107
4.2.2.	Parámetros del animal durante el proceso de FMT	108
4.2.3.	Depleción de la microbiota propia de los ratones previa al trasplante de microbiota fecal	112
4.2.4.	Análisis de la microbiota a lo largo de la puesta a punto del modelo animal pseudo-germ free con trasplante de microbiota fecal	112
4.3.	Estudio del efecto de la microbiota intestinal humana tras una intervención nutricional en un modelo animal <i>pseudo-germ-free</i>	132
4.3.1.	Inducción de la obesidad en ratones C57BL/6	132
4.3.2.	Tratamiento con antibiótico para disminuir su microbiota intestinal	134
4.3.3.	Pérdida de peso asociada a los FMT	135
4.3.4.	Análisis bioquímico tras el FMT de muestras humanas	138
4.3.5.	Análisis histológico	139
4.3.6.	Caracterización de la microbiota en el modelo animal <i>pseudo-germ-free</i>	141
4.3.7.	Análisis metabolómico en plasma	158
4.3.8.	Impacto de las dietas personalizadas en el metaboloma del ratón	159
	162
4.3.9.	Impacto del FMT en el metaboloma del ratón	167
5.	CONCLUSIONES	175
6.	BIBLIOGRAFÍA	179
7.	ANEXOS	197
7.1.	Resultados intervención metaboloma	197
7.2.	Protocolo estudio de intervención UK	200
7.3.	Protocolo estudio de intervención SP	214
7.4.	Protocolo estudio de intervención PL	259

LISTA DE TABLAS

Tabla 1 Modelos de co-cultivo de interacción microbiota – epitelio.	12
Tabla 2 Distribución de los voluntarios reclutados en base a la categoría del IMC y el género.	29
Tabla 3 Clasificación de los biomarcadores metabólicos. La lista completa de los biomarcadores en relación al cluster metabólico asignado. Resaltado en amarillo, los biomarcadores “gold standard”.	30
Tabla 4 Listado de las variables con mayor impacto en la diferenciación del modelo multivariante PLS-DA ordenados en base a los VIP scores. En rojo, los géneros bacterianos con mayor asociación positiva al índice de masa corporal, en azul, los géneros bacterianos con asociaciones negativas al índice de masa corporal. El ID corresponde con la Figura 14	55
Tabla 5 Valores obtenidos tras aplicar la función Adonis2 en las muestras V1 y V2 por separado.	75
Tabla 6 Características basales de los participantes del piloto de España por grupo de intervención. Los datos se expresan como media \pm desviación estándar, o n (porcentajes). IMC: índice de masa corporal; PAS: presión arterial sistólica; PAD: presión arterial diastólica; MEDAS: Mediterranean Diet Adherence Screener. P de ANOVA o chi-cuadrado.	77
Tabla 7 Valores p de función Adonis2 tras comparar los valores de beta diversidad Bray Curtis entre las diferentes intervenciones dietéticas para cada uno de los tiempos por separado.	80
Tabla 8 Características basales de los participantes del piloto de Polonia por grupo de intervención. IMC: Índice de masa corporal. P de ANOVA o chi-cuadrado.	88
Tabla 9 Valores p de función Adonis2 tras comparar los valores de beta diversidad Bray Curtis entre las diferentes intervenciones dietéticas para cada uno de los tiempos por separado.	93
Tabla 10 Características basales de los participantes del piloto UK por grupo de intervención.	98
Tabla 11 Valores de recuentos viables para cada voluntario.	107
Tabla 12 Experimento 1, p-valores ajustados con False Discovery Rate del test MANOVA con 999 permutaciones utilizando las métricas de betadiversidad Bray Curtis (Figura 46) con comparaciones pareadas entre los grupos experimentales CNT, CNT_ABX, FMT y Donante_Humano.	120
Tabla 13 Experimento 2, p-valores ajustados con False Discovery Rate del test MANOVA con 999 permutaciones utilizando las métricas de betadiversidad Bray Curtis (Figura 46) con comparaciones pareadas entre los grupos experimentales CNT, CNT_ABX, FMT y Donante_Humano.	120
Tabla 14 Experimento 1, valores p ajustados con FDR tras aplicar el test de análisis diferencial Random Forest comparando las abundancias relativas de los géneros bacterianos para los grupos muestras humanas y FMT. Los primeros géneros de cada tabla son los que tienen una abundancia relativa mayor en las muestras humanas en comparación al punto de partida de la microbiota del ratón (día 1).	126
Tabla 15 Experimento 2, valores p ajustados con FDR tras aplicar el test de análisis diferencial Random Forest comparando las abundancias relativas de los géneros bacterianos para los grupos muestras humanas y FMT. Los primeros géneros de cada tabla son los que tienen una abundancia relativa mayor en las muestras humanas en comparación al punto de partida de la microbiota del ratón (día 1).	127
Tabla 16 Valores bioquímicos de los biomarcadores asociados a obesidad. Los valores se expresan como media \pm desviación estándar. N = 9 animales por grupo. El t-test de Student no pareado ha sido utilizado para determinar las diferencias significativas entre los grupos. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$.	134
Tabla 17 Parámetros bioquímicos de los grupos experimentales a final del estudio. Los datos se representan como media \pm SD. N = 7-9 grupo. Las comparaciones pareadas entre cada grupo V1 vs V2 se ha realizado utilizando el test de Student no pareado. * = $p < 0,05$.	138
Tabla 18 Valores p ajustados tras aplicar la función adonis2 en las métricas de betadiversidad Bray Curtis y Unweighted Unifrac para cada grupo por separado; CT, PN y PP. Las diferentes variables categóricas han sido probadas mediante la función (Grupo, Voluntario, Tipo de muestra y Animal)	150
Tabla 19 Valor p ajustados mediante FDR tras aplicar la función adonis2 comparando los distintos tiempos de estudio para las métricas de beta diversidad Bray Curtis (bray) y Unweighted Unifrac (unW). (* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$)	150
Tabla 20 Resumen de los global score obtenidos para cada piloto comparando la visita 1 con la visita 2. Un t-test pareado ha sido utilizado para determinar las diferencias significativas de los global scores entre el tiempo inicial (V1) y el tiempo final (V2). Un test ANOVA ha sido utilizado para determinar las diferencias significativas entre el diferencial V2-V1.	199

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura 1 A) Diferencias en la composición del microbioma según el lugar anatómico. Figura adaptada de Cho et al. [7] B) Gradientes espaciales ecológicamente relevantes en el tracto gastrointestinal. Factores, como el nivel de oxígeno, el pH, el grosor del moco, la producción de antimicrobianos, la carga bacteriana y el tiempo de tránsito, influyen en la estructura y la función de la comunidad microbiana regional. Figura adaptada de Kennedy et al. [6]</i>	2
<i>Figura 2 Evolución de las referencias bibliográficas citando en PubMed el término “microbiota y salud” desde 2002 hasta 2023.</i>	5
<i>Figura 3 Mecanismo molecular de la inflamación y la resistencia a la insulina inducida por LPS. La rotura de la función de la unión estanca conduce a la translocación de LPS, que puede ser un factor temprano en el desarrollo de la inflamación y la resistencia a la insulina en humanos [42].</i>	8
<i>Figura 4 La composición de la microbiota de los modelos animales más utilizados en la investigación de la microbiota intestinal. Su composición comparada a los humanos. [71]</i>	13
<i>Figura 5 A) Solapamiento de los taxones compartidos entre los metagenomas de ratón y humano. B) [78]</i>	15
<i>Figura 6 Representación de la estabulación de los animales PGF y GF. Los ratones GF se mantienen en condiciones estrictamente estériles donde no hay contacto con las bacterias exteriores mientras que los ratones PGF se crían en condiciones normales y su microbiota se intenta eliminar mediante el uso de antibióticos de amplio espectro.</i>	18
<i>Figura 7 Diseño experimental de las intervenciones dietéticas llevadas a cabo durante el proyecto PREVENTOMICS.</i>	27
<i>Figura 8 Diseño experimental de la puesta a punto del modelo animal PGF con FMT.</i>	34
<i>Figura 9 Diseño experimental llevado a cabo en el estudio del modelo animal durante el proyecto PREVENTOMICS</i>	39
<i>Figura 10 Índices de alfa rarefacción de las muestras de los pilotos para A) las muestras V1 y B) las muestras V2. Los índices de alfa diversidad utilizados son ACE, Chao1 y Observed diversity.</i>	49
<i>Figura 11 A) Mapa de calor representando las correlaciones de Spearman existentes entre géneros bacterianos presentes en la microbiota intestinal de XXX y las variables YYY. Los valores en rojo indican una correlación positiva, mientras que el color azul, una correlación negativa. (V1: antes de la intervención, V2: finalización de la intervención dietética; (* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$)) B) Clustering no supervisado separado por piloto de intervención para las 3 variables antropométricas asociadas a la obesidad: Peso, IMC y cintura. (* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$) A la izquierda, se encuentran las 3 variables del piloto Reino Unido, en medio las variables del piloto polaco y a la derecha las variables del piloto de España.</i>	51
<i>Figura 12 Representación de los resultados del modelo multivariante predictivo PLS-DA asociando el IMC con la abundancia relativa de los 50 géneros bacterianos más prevalentes en la cohorte analizada. A) Distribución de los géneros bacterianos en el conjunto de datos para la abundancia de los ceros en la totalidad de las muestras. B) Histograma de la distribución de los géneros bacterianos para la frecuencia de ceros. La línea roja discontinua delimita las variables incluidas en el modelo multivariante. C) Distribución del modelo PLS-DA incluyendo todas las muestras. El IMC se representa mediante la escala de colores. D) Representación gráfica de los valores de IMC predichos por el modelo PLS-DA en base a la composición de la microbiota intestinal. En el eje de las X se presentan los valores reales de IMC mientras que en el eje de las Y se presentan los valores predichos. La línea verde representa una hipotética correlación perfecta entre las muestras reales y las predichas ($r = 1$) mientras que la línea roja representa la correlación lineal entre las muestras predichas y las muestras reales.</i>	53
<i>Figura 13 Representación gráfica de dispersión para el vector de regresión IMC del modelo PLS-DA en el eje de las X y los VIP scores del modelo en el eje de las Y. En los extremos superiores del eje de las X se muestran las variables con mayor peso en la diferenciación del modelo en base al IMC. En el extremo izquierdo, las variables más predominantes en índices IMC bajos, en el extremo derecho, las variables más prevalentes en las muestras con índices IMC altos.</i>	55
<i>Figura 14 Mapa de calor de la correlación de Pearson y los valores p ajustados por FDR entre los “global scores” de cada individuo (calculados a partir de la cuantificación de X metabolitos en muestras de Y) y la abundancia total relativa de los géneros bacterianos. (* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$)</i>	62

Figura 15 Gráfico de dispersión correlacionando los géneros bacterianos con las asociaciones más significativas con los global scores. La r obtenida se adjuntó en cada gráfico.	63
Figura 16 Análisis RDA de la combinación de los valores de beta diversidad Bray Curtis con los “global scores” metabolómicos de los voluntarios y la abundancia relativa de los géneros bacterianos.	66
Figura 17 Gráfico de barras taxonómico representando la abundancia relativa media, de las 13 familias bacterianas más abundantes ($abundance > x$) para cada piloto y visita.	68
Figura 18 Diagrama de cajas de los 20 géneros bacterianos más abundantes separado por tiempo de intervención y piloto.	70
Figura 19 Diagrama de cajas de los valores de alfa diversidad Observe, Chao1 y Shannon para cada piloto de intervención separado por tiempo. Los valores p se añadieron tras aplicar el test de Wilcoxon.	71
Figura 20 PCoA del índice de betadiversidad Bray Curtis. Se muestran las combinaciones de las 3 coordinadas principales. Las OTUs fueron incluidas para determinar el impacto en la diferenciación de las comunidades microbianas en base a la abundancia de las OTUs.	73
Figura 21 Diagrama de cajas de los valores de alfa diversidad Observe, Chao1 y Shannon para; A) todas las muestras del piloto de España separadas por tiempo de intervención, B) las muestras V1 y C) las muestras V2 separadas por grupo de intervención. Los valores p se añadieron tras aplicar el test de Wilcoxon.	79
Figura 22 Representación de las 2 coordinadas principales de del análisis de beta diversidad Bray Curtis para el piloto español, comparando las intervenciones nutricionales entre sí, separando las muestras por tiempo de intervención. Se muestran las 2 coordenadas con las mayores diferencias y los elipsoides de confianza normales para los conjuntos de muestras.	80
Figura 23 Representación de las 2 coordinadas principales de del análisis de beta diversidad Bray Curtis para el piloto español, comparando los dos tiempos de intervención, utilizando todas las muestras conjuntamente y para cada intervención por separado. Los p valores de la permutación Adonis2 ha sido incluida en cada gráfico. Se incluyen los elipsoides de confianza normales para los conjuntos de muestras.	82
Figura 24 Representación gráfica mediante mapa de calor del “Core Microbiome” mediante la prevalencia para cada fracción de abundancia relativa en escala exponencial. En el eje de las Y se representan los géneros bacterianos, en el eje de la X se representan las abundancias relativas en combinación con la prevalencia de cada género bacteriano. A) Muestras pertenecientes al tiempo inicial (V1) B) Muestras pertenecientes al tiempo final (V2).	83
Figura 25 Diagrama de cajas de los 20 géneros bacterianos más abundantes separado por tiempo de intervención.	84
Figura 26 Análisis linear discriminante (LDA) entre todas las asignaciones taxonómicas para el piloto español. Se muestran los resultados de las asignaciones significativas tras la doble validación donde las abundancias de cada taxón se representan en forma de diagrama de cajas y los valores de los scores LDA en Log10 se muestran a la derecha de cada taxón. Los scores del LDA indican la diferenciación entre la condición a comparar, cuanto mayor sea la diferenciación, más significativa es la abundancia de esa taxonomía entre las dos condiciones. El p valor de corte utilizado para la primera comparación y para el ajuste fue 0,01	85
Figura 27 Diagrama de cajas de los valores de alfa diversidad Observe, Chao1 y Shannon para; A) todas las muestras del piloto de Polonia separadas por tiempo de intervención, B) las muestras V1 y C) las muestras V2 separadas por grupo de intervención. Los valores p se añadieron tras aplicar el test de Wilcoxon.	90
Figura 28 Representación de las 2 coordinadas principales de del análisis de beta diversidad Bray Curtis para el piloto polaco, comparando los dos tiempos de intervención, utilizando todas las muestras conjuntamente y para cada intervención por separado. Los p valores de la permutación Adonis2 ha sido incluida en cada gráfico.	92
Figura 29 Representación de las 2 coordinadas principales de del análisis de beta diversidad Bray Curtis para el piloto polaco, comparando las intervenciones nutricionales entre sí, separando las muestras por tiempo de intervención.	93
Figura 30 Representación gráfica mediante mapa de calor del “Core Microbiome” mediante la prevalencia para cada fracción de abundancia relativa en escala exponencial. En el eje de las Y se representan los géneros bacterianos, en el eje de la X se representan las abundancias relativas en combinación con la prevalencia de cada género bacteriano. A) Muestras pertenecientes al tiempo inicial (V1) B) Muestras pertenecientes al tiempo final (V2).	94

Figura 31 Diagrama de cajas de los 20 géneros bacterianos más abundantes separado por tiempo de intervención.	95
Figura 32 Análisis lineal discriminante (LDA) entre todas las asignaciones taxonómicas para el piloto polaco, comparando los dos tiempos de intervención, utilizando todas las muestras conjuntamente y para cada intervención por separado. El p valor de corte utilizado para la primera comparación y para el ajuste fue 0,01.	97
Figura 33 Diagrama de cajas de los valores de alfa diversidad Observe, Chao1 y Shannon para las muestras V1 y V2. Los valores p se añadieron tras aplicar el test de Wilcoxon.	100
Figura 34 PCoA del índice de betadiversidad Bray Curtis utilizando las dos coordenadas principales. A) Todas las muestras de estudio fueron utilizadas en la representación gráfica separando las muestras por tiempo de intervención; verde: V1, naranja: V2. B) Representación gráfica de las muestras V1 separadas por grupo de intervención; verde: Control, naranja: PN, azul: PP. C) Representación gráfica de las muestras V2 separadas por grupo de intervención; verde: Control, naranja: PN, azul: PP. Se incluyen los p valores tras aplicar el test Adonis2 en la comparación entre grupos de intervención y el tiempo de intervención.	101
Figura 35 Representación gráfica mediante mapa de calor del "Core Microbiome" mediante la prevalencia para cada fracción de abundancia relativa en escala exponencial. En el eje de las Y se representan los géneros bacterianos, en el eje de la X se representan las abundancias relativas en combinación con la prevalencia de cada género bacteriano. A) Muestras pertenecientes al tiempo inicial (V1) B) Muestras pertenecientes al tiempo final (V2).	102
Figura 36 Diagrama de cajas de los 20 géneros bacterianos más abundantes separado por tiempo de intervención.	103
Figura 37 Análisis lineal discriminante (LDA) aplicado a las abundancias relativas de las diferentes asignaciones taxonómicas. A) Diagrama de cajas de las abundancias relativas y los LDA scores en Log10 de las taxonomías más significativas. El p valor de corte utilizado para la primera comparación y para el ajuste fue 0,01. B) Árbol filogenético resaltando las taxonomías diferenciales entre las dos condiciones.	104
Figura 38 Imágenes obtenidas mediante microscopia de fluorescencia de cada una de las muestras de los voluntarios, aumento 100X. En verde, las bacterias viables, en rojo, las bacterias no viables. La identificación de cada imagen con el código de una letra y un número corresponde al código anonimizado de los voluntarios.	108
Figura 39 Evolución del peso (gramos) de los animales por sexo y grupo, durante ambas fases del estudio. Los datos representan el promedio \pm SD. Para la diferenciación estadística se ha utilizado un ANOVA con comparación post hoc mediante la prueba de Tuckey. Los valores p obtenidos se representan de la siguiente forma: * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$.	108
Figura 40 Gráfico de barras de los animales macho con los pesos de los órganos de A) Bazo experimento 1, B) Hígado experimento 1, C) Bazo experimento 2 y D) Hígado experimento 2. Se representa la media \pm la desviación estándar. Se ha aplicado un test ANOVA de 1 factor con comparaciones múltiples de Tuckey para determinar las diferencias estadísticas entre los grupos.	111
Figura 41 Gráfico de barras de los animales hembra con los pesos de los órganos de A) Bazo experimento 1, B) Hígado experimento 1, C) Bazo experimento 2 y D) Hígado experimento 2. Se representa la media \pm la desviación estándar. Se ha aplicado un test ANOVA de 1 factor con comparaciones múltiples de Tuckey para determinar las diferencias estadísticas entre los grupos.	111
Figura 42 Gráfico de barras en escala logarítmica de las copias del gen 16S rRNA por gramo de heces al acabar el tratamiento con antibiótico (día 13) para A) Experimento 1 y B) Experimento 2. Las barras representan la media de los grupos y la barra de error la desviación estándar. Las diferencias estadística entre grupos se han calculado aplicando un test ANOVA con comparación múltiple de Tuckey (95,00% CI).	112
Figura 43 Gráfico de barras taxonómico a nivel de familia al inicio y finalización del tratamiento con antibiótico para la fase 1 y la fase 2 (CNT = Control, CNT_ABX = Control antibiótico, FMT = Fecal Microbiome transplantation), HUMAN = Muestras humanas)	113
Figura 44 Gráfico de barras taxonómico a nivel de familia tras 2 días y 7 días post trasplante fecal para la fase 1 y la fase 2 (CNT = Control, CNT_ABX = Control antibiótico, FMT = Fecal Microbiome transplantation), HUMAN = Muestras humanas)	114
Figura 45 Box plot del índice de alfa diversidad Shannon Para determinar las diferencias estadística entre grupos se han utilizado un test ANOVA con comparaciones pareadas. Las letras a, b, c y d denotan las diferencias estadísticas entre grupos. (CNT = Control, CNT_ABX = Control antibiótico, FMT = Fecal Microbiome transplantation), Donante_Humano = Muestras humanas)	116

Figura 46 Análisis de beta diversidad Bray Curtis (Experimento 1) separado por tiempos de estudio A) día 1, B) día 17, C) día 21, D) día 28, E) día 35, F) día 42. En verde () grupo CNT, naranja () grupo CNT_ABX, azul () grupo FMT y rosa () grupo Donante_Humano. _____	118
Figura 47 Análisis de beta diversidad Bray Curtis (Experimento 2) separado por tiempos de estudio A) día 1, B) día 17, C) día 21, D) día 28, E) día 35, F) día 42. En verde () grupo CNT, naranja () grupo CNT_ABX, azul () grupo FMT y rosa () grupo Donante_Humano. _____	119
Figura 48 Heatmap de los 40 géneros más abundantes a día 17. (CNT = Control, CNT_ABX = Control antibiótico, FMT = Fecal Microbiome transplantation), HUMAN = Muestras humanas) _____	123
Figura 49 Evolución de las OTUs compartidas entre el grupo Donante_Humano y FMT a lo largo del tiempo. _____	124
Figura 50 Resultados del modelo Random Forest para la predicción de las muestras en base al grupo de estudio. A) Matriz de confusión y la estadística asociada de las muestras predichas respecto a las muestras referencia. B) Gráfico de Área bajo la curva (AUC) de los valores obtenidos tras aplicar el modelo Random Forest. _____	128
Figura 51 A) Porcentaje de cambio de peso corporal de los ratones C57BL/6 durante los 77 días de inducción de sobrepeso/obesidad (n=9 grupo de dieta CT, n=90 grupo HFD) B) Ingesta de alimentos en g/día (n=9 grupo de dieta CT, n=90 grupo HFD). C) Imagen comparativa de dos ratones, dieta control frente a dieta alta en grasas a día 77. Las comparaciones estadísticas entre los grupos dieta control y dieta High Fat se llevaron a cabo mediante two-way ANOVA seguido de la prueba de Tukey para comparaciones pareadas. * p<0,05, * * * p<0,001. _____	133
Figura 52 A) Los valores obtenidos de los recuentos en placa agar en medio Columbia Blood agar en condiciones anaeróbicas tras 72 horas de incubación. Control N = 18, Tratado con antibiótico N = 18. B) Copias del gen 16S rRNA detectado mediante SYBRGREEN qPCR. Control N = 18, Tratado con antibiótico N = 63. **** p<0,0001 para el test de t de Student no pareado. _____	135
Figura 53 A) Porcentaje de cambio de peso corporal tras el FMT en los tres grupos Control y Obesidad V1 y V2 de HFD CT (A), PP (B) y PN (C). D) Ingesta de alimentos en g/día/ratón para cada grupo. Las estadísticas se realizaron mediante ANOVA de una vía seguido de la prueba de Tukey. * p<0,05, * * p<0,01, * * * p<0,001, * * * p<0,0001 (n=7-9 por grupo). _____	137
Figura 54 Imágenes representativas de Oil Red (OR) A) score 1 B) score 2 C) score 3 D) score 4 _____	140
Figura 55 Gráfico de barras representando los valores de los scores histopatológicos para A) Hematoxilina/eosina (HE) y B) Oil Red (OR). Los datos se presentan como media ± SD para cada grupo experimental. N = 7-9 / grupo. _____	141
Figura 56 Análisis de la microbiota de los ratones para el grupo CT A) Taxa barplot de la abundancia relativa de las 12 familias bacterianas más prevalentes. B) Análisis diferencial mediante Random Forest ajustado a nivel de género de los tiempos t89, t96 y t103. C) Representación gráfica de las dos primeras coordenadas del análisis de beta diversidad Bray Curtis, separado por tiempo y grupo. D) Representación gráfica de las dos primeras coordenadas del análisis de beta diversidad Unweighted Unifrac, separado por tiempo y grupo E) Diagrama de cajas de los valores Shannon de alfa diversidad. Las diferencias entre los tiempos han sido calculadas mediante ANOVA de comparaciones múltiples. _____	145
Figura 57 Análisis de la microbiota de los ratones para el grupo PN A) Taxa barplot de la abundancia relativa de las 12 familias bacterianas más prevalentes. B) Análisis diferencial mediante Random Forest ajustado a nivel de género de los tiempos t89, t96 y t103. C) Representación gráfica de las dos primeras coordenadas del análisis de beta diversidad Bray Curtis, separado por tiempo y grupo. D) Representación gráfica de las dos primeras coordenadas del análisis de beta diversidad Unweighted Unifrac, separado por tiempo y grupo E) Diagrama de cajas de los valores Shannon de alfa diversidad. Las diferencias entre los tiempos han sido calculadas mediante ANOVA de comparaciones múltiples. _____	147
Figura 58 Análisis de la microbiota de los ratones para el grupo PP A) Taxa barplot de la abundancia relativa de las 12 familias bacterianas más prevalentes. B) Análisis diferencial mediante Random Forest ajustado a nivel de género de los tiempos t89, t96 y t103. C) Representación gráfica de las dos primeras coordenadas del análisis de beta diversidad Bray Curtis, separado por tiempo y grupo. D) Representación gráfica de las dos primeras coordenadas del análisis de beta diversidad Unweighted Unifrac, separado por tiempo y grupo E) Diagrama de cajas de los valores Shannon de alfa diversidad. Las diferencias entre los tiempos han sido calculadas mediante ANOVA de comparaciones múltiples. _____	148
Figura 59 Evolución de las OTUs compartidas entre las muestras humanas y los ratones trasplantados con las mismas muestras humanas. Humano (muestras humanas de los grupos CTV1, CTV2, PNV1, PNV2, PPV1, PPV2). Humano-Ratón (ratones de los grupos CTV1, CTV2, PNV1, PNV2, PPV1, PPV2). _____	152
Figura 60 Diagrama de cajas de la abundancia relativa a nivel de familia para las muestras humanas utilizadas en el trasplante fecal _____	154

- Figura 61 Análisis UPLC-MS no dirigido. A) Hotelling T2 frente a los residuales Q para la identificación de posibles valores atípicos; B) gráficos de puntuación PCA del análisis de datos LC-MS. Puntuaciones PC1 vs PC2; C) Puntuaciones PC1 y PC2 (D) en función del orden de inyección. _____ 159
- Figura 62 Análisis UPLC-MS no dirigido. A) Gráfico de puntuaciones PLS-DA de un modelo construido para discriminar entre las muestras recogidas después de la FMT en V1 y V2; B) Clases predichas por validación cruzada PLS-DA; C) Valores de la puntuación VIP y del vector de regresión en el modelo PLS-DA; D) Boxplots que muestran la distribución de los valores de 2 metabolitos anotados seleccionados con altos valores VIP en el modelo PLS-DA. _____ 160
- Figura 63 Análisis metabolómico usando todos los datos disponibles ESI+/- y aminoácidos comparando V1 vs V2 en el grupo control A) Diagrama de volcán usando \log_2 (mediana V1 / mediana V2) prueba t p-valor (varianzas desiguales). B) Análisis funcional utilizando mummichog. El modo analítico es mixto p-value cutoff: 0.05 library: KEGG. C) PCA X-block: autoescalado Azul: V1, Rojo: V2. D, E) PLS-DA Validación cruzada doble, CV repetido al azar (n=5) 6 veces. Preprocesamiento del bloque X: autoescala. Preprocesamiento del bloque Y: centro medio Evaluación de la significación estadística de las cifras de mérito de 2CV: Prueba de permutación (100 permutaciones) Azul: V1, Rojo: V2. _____ 162
- Figura 64 Análisis metabolómico usando todos los datos disponibles ESI+/- y aminoácidos comparando V1 vs V2 en el grupo PN A) Diagrama de volcán usando \log_2 (mediana V1 / mediana V2) prueba t p-valor (varianzas desiguales). B) Análisis funcional utilizando mummichog.. El modo analítico es mixto p-value cutoff: 0.05 library: KEGG. C) PCA X-block: autoescalado Azul: V1, Rojo: V2. D, E) PLS-DA Validación cruzada doble, CV repetido al azar (n=5) 6 veces. Preprocesamiento del bloque X: autoescala. Preprocesamiento del bloque Y: centro medio Evaluación de la significación estadística de las cifras de mérito de 2CV: Prueba de permutación (100 permutaciones) Azul: V1, Rojo: V2. _____ 164
- Figura 65 Análisis metabolómico usando todos los datos disponibles ESI+/- y aminoácidos comparando V1 vs V2 en el grupo PP A) Diagrama de volcán usando \log_2 (mediana V1 / mediana V2) prueba t p-valor (varianzas desiguales). B) Análisis funcional utilizando mummichog.. El modo analítico es mixto p-value cutoff: 0.05 library: KEGG. C) PCA X-block: autoescalado Azul: V1, Rojo: V2. D, E) PLS-DA Validación cruzada doble, CV repetido al azar (n=5) 6 veces. Preprocesamiento del bloque X: autoescala. Preprocesamiento del bloque Y: centro medio Evaluación de la significación estadística de las cifras de mérito de 2CV: Prueba de permutación (100 permutaciones) Azul: V1, Rojo: V2. _____ 165
- Figura 66 Análisis metabolómico usando todos los datos disponibles ESI+/- y aminoácidos comparando las muestras que han recibido FMT con las muestras que no han recibido FMT A) Diagrama de volcán usando \log_2 (mediana FMT / mediana no FMT) prueba t p-valor (varianzas desiguales). B) Análisis funcional utilizando mummichog. El modo analítico es mixto p-value cutoff: 0.05 library: KEGG. C, D) PLS-DA Validación cruzada doble, CV repetido al azar (n=5) 6 veces. Preprocesamiento del bloque X: autoescala. Preprocesamiento del bloque Y: centro medio Evaluación de la significación estadística de las cifras de mérito de 2CV: Prueba de permutación (100 permutaciones) _____ 169
- Figura 67 Gráfico PCA de la combinación de los 3 primeros PC para las muestras sin FMT (esfera azul) y las muestras que han recibido FMT (triángulo rojo). _____ 169
- Figura 68 B) Valores de la puntuación VIP y del vector de regresión en el modelo PLS-DA; A, C) Boxplots que muestran la distribución de los valores de los metabolitos anotados seleccionados con mayores valores VIP en el modelo PLS-DA. A) Mayor abundancia en las muestras que no recibieron FMT C) Mayor abundancia en las muestras que recibieron FMT. _____ 173
- Figura 69 Histograma de los global score por tiempo de intervención. A) Polonia, B) España, C) UK. En azul V1 (visita 1) en Rojo V2 (visita 2) tras los 90 días de intervención. En rojo oscuro los valores sobrepuestos entre V1 y V2. _____ 197

ABREVIATURAS

- ADN – Ácido desoxirribonucleico
- AGCC – Ácidos grasos de cadena corta
- ANOVA – Análisis de la varianza
- ARN – Ácido ribonucleico
- ASVs – Variantes de amplicones de secuencias
- BCAA – Aminoácidos ramificados
- CDI – Infección por *Clostridium difficile*
- CD14 -antígeno CD14
- CFU – Unidades formadoras de colonia
- CT – Dieta control
- EIC – Eje intestino cerebro
- EII – Enfermedad inflamatoria intestinal
- FDR – Tasa de descubrimiento falsa
- GC-MS – Cromatografía de gases/masas
- GF- Ratones libres de gérmenes.
- GI – Tracto gastrointestinal
- GLP-1- Péptido similar al glucagón-1
- HFD – Dieta alta en grasas
- HPLC – Cromatografía líquida
- IBS – Enfermedad inflamatoria intestinal.
- ICIs - Punto de control inmunitario
- IMC- Índice de masa corporal
- KEGG- Enciclopedia de genes y genomas de Kyoto
- LPS – Lipopolisacárido
- MAGs- genomas ensamblados con metagenomas
- MBRA – Mini Bioreactor Array
- MGBC - el Catálogo de Bacterias Gastrointestinales del Ratón
- NGS – Secuenciación de nueva generación masiva.
- OTUs – Unidad taxonómica operativa
- PCR – Reacción en cadena de la polimerasa
- PDAC - Adenocarcinoma pancreático
- PGF – Animales *pseudo germ-free*

PLS-DA – Análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales

PMH – Proyecto Microbioma Humano

PN – Dieta personalizada

PP – Plan personalizado

QIIME2 - Quantitative Insights Into Microbial Ecology 2

qPCR – Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

SCFAs – Ácidos grasos de cadena corta

SHIME – Simulador del Sistema intestinal microbiano humano

TOF – Tiempo de vuelo

TLR4 – Receptor de tipo toll 4

SIBO - Sobrecrecimiento bacteriano en el intestino delgado

UC – Colitis ulcerosa

UHGG - Genoma gastrointestinal humano unificado

VIP – Variables de importancia en la proyección.

ZO-1 - Zonula occludens-1

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN GENERAL:

Los microorganismos fueron la primera forma de vida que evolucionó en la Tierra. Hicieron su aparición hace aproximadamente 3.000 millones de años en las aguas de los primeros océanos [1]. Su evolución permitió enriquecer la atmósfera con oxígeno gracias a la aparición de las *Cianobacterias* y con ello se dio paso a la expansión de la vida en el planeta hace aproximadamente 2.000 millones de años [2]. Desde entonces, y hasta el día de hoy los microorganismos procariotas, han seguido evolucionando y colonizando prácticamente cualquier superficie conocida en la tierra, incluyendo el cuerpo humano [3]. Estas comunidades microbianas se denominan **microbioma humano**.

Aunque "microbioma" y "microbiota" son términos que a menudo se intercambian, existen ciertas diferencias entre ambos. La microbiota describe el conjunto de microorganismos vivos que se encuentran en un entorno definido, como, por ejemplo, la microbiota intestinal. El microbioma se refiere no sólo a los microorganismos sino también a sus genomas, a su información genética y a la interacción entre este genoma molecular y el de los humanos [4].

La microbiota humana es también conocida como "el órgano oculto", ya que el conjunto de microorganismos que conviven con nosotros puede aportar hasta 150 veces más información genética que todo el genoma humano [5]. Los microorganismos mayoritarios que conforman la microbiota humana son las **bacterias**, aunque también se pueden encontrar arqueas, hongos, fagos y virus [6].

El cuerpo humano posee un elevado número de nichos ecológicos colonizados por un diverso número de microorganismos, como el tracto gastrointestinal, la vagina, la piel y las cavidades oral y nasal (Figura 1A). La gran adaptabilidad de los microorganismos procariotas y la coevolución entre los humanos y los microorganismos ha permitido la colonización de prácticamente cualquier superficie u órgano que esté en contacto con el exterior.

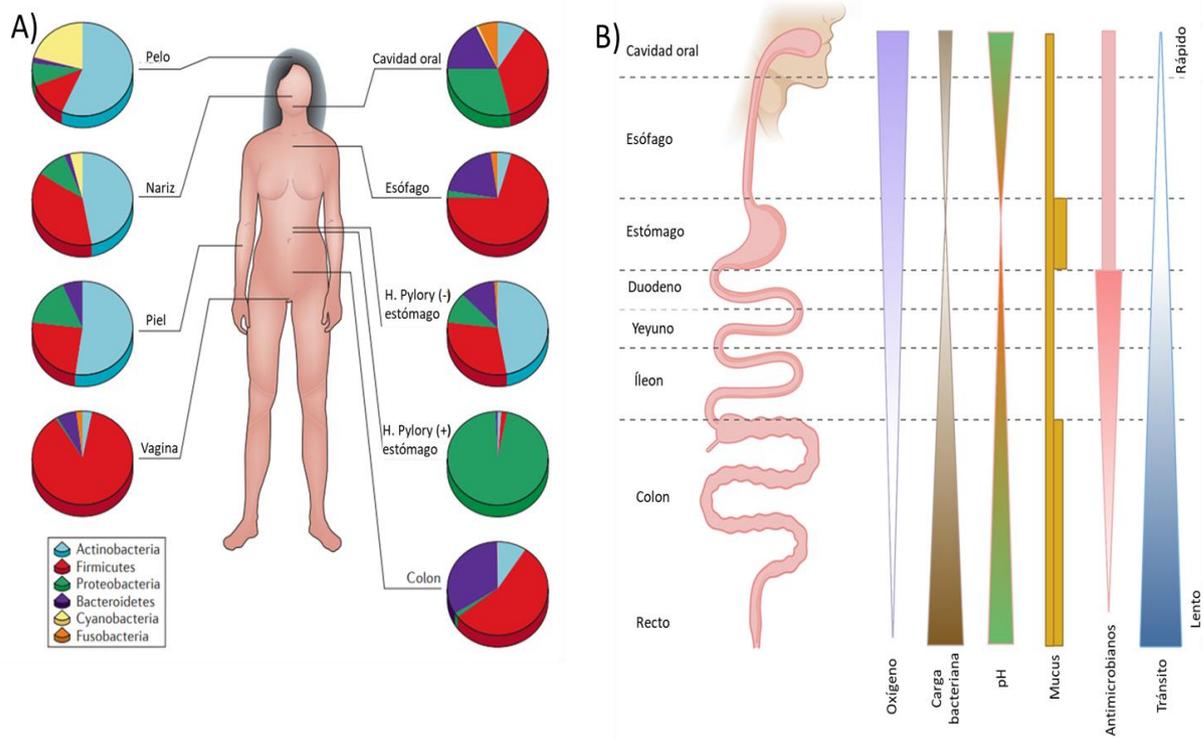


Figura 1 A) Diferencias en la composición del microbioma según el lugar anatómico. Figura adaptada de Cho et al. [7] B) Gradientes espaciales ecológicamente relevantes en el tracto gastrointestinal. Factores, como el nivel de oxígeno, el pH, el grosor del moco, la producción de antimicrobianos, la carga bacteriana y el tiempo de tránsito, influyen en la estructura y la función de la comunidad microbiana regional. Figura adaptada de Kennedy et al. [6]

Esta colonización comienza al nacer, etapa que se caracteriza por presentar una reducida diversidad y una alta inestabilidad microbiológica. La primera colonización del tracto gastrointestinal del recién nacido juega un papel fundamental en el desarrollo de su sistema inmune. Diversos estudios han concluido que los recién nacidos por cesárea tienen una diversidad menor en los primeros meses de vida [8], lo que les hace tener más predisposición a ciertas infecciones en el futuro [9], incluso se ha demostrado que pueden llegar a ser más propensos a otras patologías en edad adulta como la obesidad [10] [11]. Algunos de estos efectos se han visto reducidos en niños que han sido alimentados con leche materna [12] en comparación a niños alimentados con leche de fórmula.

En la edad adulta, la microbiota de los individuos es relativamente estable, sin embargo, algunos cambios pueden producirse debido al estilo de vida, el tipo de dieta, las influencias ambientales, el lugar de residencia y el uso de antibióticos.

La microbiota intestinal tiene un papel relevante en distintas funciones biológicas. Algunas de las funciones llevadas a cabo por parte de la microbiota intestinal son la maduración y educación continua de la respuesta inmunitaria del huésped [13]; la protección contra el crecimiento excesivo de patógenos [14]; la regulación de las funciones endocrinas intestinales, la señalización neurológica [15] y la densidad ósea

[16]; la proporción de fuentes de energética [17], aproximadamente el 10% de las necesidades energéticas diarias del huésped; bio-sinterización de vitaminas [18], neurotransmisores [19], metabolización de las sales biliares [20]; reacción o modificación de fármacos específicos; y eliminación de toxinas exógenas [21] . Las modificaciones que se puedan dar en las comunidades microbianas por distintos factores, tanto intrínsecos como extrínsecos, pueden llegar a alterar el correcto desempeño de las funciones citadas previamente, **desencadenando o predisponiendo al huésped a diversas patologías.**

Hasta hace poco, la visión de la microbiología humana y su asociación a diversas patologías se basaba en gran medida en estudios que habían utilizado cultivos microbianos puros (bacterias, arqueas, hongos y virus), frecuentemente aislados de pacientes con infecciones agudas o enfermedades crónicas. Sin embargo, los ecologistas microbianos plantearon que la diversidad de los microorganismos superaba con creces la de los organismos recuperados con el enfoque de los métodos tradicionales y que esa complejidad no se podía ver reflejada utilizando técnicas de microbiología clásica. La irrupción de las tecnologías de secuenciación masiva de nueva generación (NGS) y su precio cada vez más asequible, ha permitido expandir el uso de estas tecnologías para estudiar el conjunto de la comunidad microbiana y no sólo la proporción cultivable.

La irrupción de estas nuevas técnicas de análisis junto a la creciente evidencia de la importancia de la microbiota en la salud humana ha generado mucho interés en la comunidad científica. Esto se ha traducido en la aparición de multitud de proyectos científicos cuyo objetivo ha sido entender la complejidad de las comunidades microbianas humanas, su funcionalidad y la relación con el estado de salud y bienestar.

Para generar este nuevo conocimiento, se pusieron en marcha grandes proyectos de investigación a nivel mundial. Uno de los pioneros y de mayor impacto fue el proyecto Microbioma Humano (PMH), iniciativa del instituto nacional de salud de Estados Unidos, cuyo objetivo fue la identificación y caracterización de los microorganismos que se encuentran asociados a humanos.

Las caracterización de estas comunidades microbianas ha generado nuevo conocimiento en el campo del microbioma y también ha permitido demostrar que el órgano con una mayor abundancia y diversidad microbiana es el tracto gastrointestinal (Figura 1B) [22]. Otro de los estudios más relevantes en este campo fue el proyecto MetaHIT, iniciado en 2008. El objetivo central del proyecto fue caracterizar y encontrar asociaciones entre los genes de la microbiota intestinal humana y la salud humana, especialmente en lo que respecta a la enfermedad inflamatoria intestinal (EII) y la obesidad, trastornos de creciente

importancia en Europa. El consorcio MetaHIT descubrió entre 1000 y 1150 especies bacterianas prevalentes y no redundantes en la microbiota intestinal a través de la secuenciación de metagenomas. También se encontraron grandes diferencias interindividuales, con al menos 160 taxones diferentes para cada individuo [23], demostrando que la composición de la microbiota intestinal es muy variable.

Los resultados de estos primeros grandes proyectos han reforzado la hipótesis del papel fundamental que juega el microbioma en la salud humana. No obstante, a su vez también han generado diferentes preguntas para las cuales todavía no se podía dar respuesta, como por ejemplo, si existe una composición microbiana “ideal” que se pueda definir como un microbioma humano sano.

Por esta razón, es necesaria cada vez más investigación en este campo, por un lado, para entender la implicación y la asociación de ciertos patrones microbiológicos a patologías o estados homeostáticos, y por otro lado, son necesarios modelos que permitan estudiar la causa – efecto entre las modificaciones en la microbiota y el desarrollo de estados patológicos.

1.1 Microbiota intestinal y salud

El interés por la microbiota intestinal y la regulación de la salud humana ha aumentando drásticamente. Durante las últimas dos décadas, las publicaciones científicas en revistas indexadas citando los términos microbiota y salud se han multiplicado por más de 400, alcanzando más de 9000 publicaciones durante el año 2022.

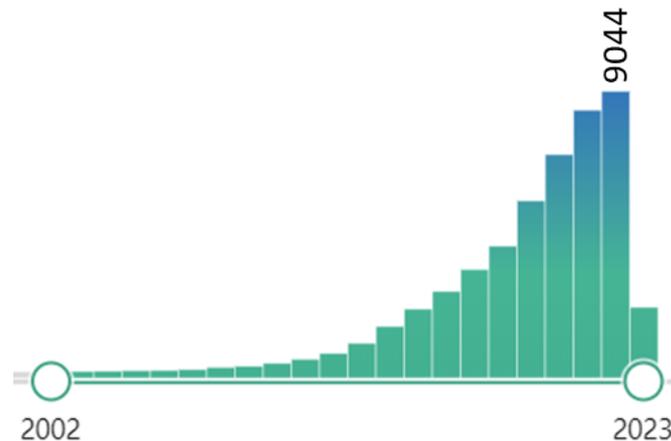


Figura 2 Evolución de las referencias bibliográficas citando en PubMed el término "microbiota y salud" desde 2002 hasta 2023.

Muchas de estas publicaciones han estudiado en profundidad la relación que existe entre los cambios en la microbiota y distintas patologías. Las primeras patologías en las cuales se descubrieron estos cambios fueron las enfermedades del tracto gastrointestinal. Algunas de las más destacables son la **enfermedad de Crohn**, con reducciones significativas generalizadas en la alfa diversidad y cambios en la abundancia relativa de ciertos taxones como: *Fusobacterium*, *Escherichia*, *Faecalibacterium*, *Roseburia*, *Ruminococcaceae*, *Peptostreptococcaceae*, *Christensenellaceae*, y *Collinsella* [24]. Otra de las enfermedades gastrointestinales con cambios en la microbiota es la **colitis ulcerosa** (UC). Estudios multiómicos en cohortes independientes han demostrado la correlación que existe entre *Bacteroides vulgatus* y el desarrollo de la enfermedad a través del mecanismo de producción de proteasas pro-inflamatorias [25]. Otra patología de gran relevancia con cambios en la microbiota intestinal es el **cáncer de colon**, donde algunos géneros bacterianos ven incrementada su abundancia en las regiones cancerosas del intestino como *Fusobacterium*, *Selenomonas* o *Peptostreptococcus* [26].

No obstante, los cambios en la microbiota no se observan exclusivamente en patologías del tracto gastrointestinal. Cada vez existe más evidencia de la asociación entre los cambios observados en la microbiota intestinal y enfermedades metabólicas e incluso

neurológicas. Algunas de las más destacables son: i) la **diabetes** de tipo 1 [27] y tipo 2 donde los pacientes con diabetes presentan una disminución de las bacterias productoras de butirato, como *Roseburia intestinalis* y *Faecalibacterium prausnitzii*, y un aumento de *Lactobacillus gasseri*, *Streptococcus mutans* y algunos microorganismos del género *Clostridium*, ii) la **hipertensión** con pérdidas de la diversidad bacteriana reportada y la reducción de géneros productores de ácidos grasos de cadena corta (AGCCs) [17] y iii) La **arterioesclerosis**, con abundancia relativa de *Roseburia* y *Eubacterium* menores en pacientes versus controles sanos, y un aumento en *Collinsella* en los pacientes con aterosclerosis en comparación con los controles sanos. Además, se descubrió que *Akkermansia muciniphila* mejora las funciones de la barrera intestinal y ejerce efectos protectores contra la aterosclerosis [28].

También ha llamado la atención los cambios descritos en condiciones neurológicas como el **autismo**. Algunos estudios demuestran que los sujetos autistas poseen una microbiota intestinal con una alteración de la permeabilidad intestinal (denominada "intestino permeable") que da lugar a la producción y propagación de una potente endotoxina proinflamatoria, concretamente el lipopolisacárido (LPS) [29]. También en el **Parkinson** se encontraron alteradas vías metabólicas de la microbiota intestinal como la degradación de β -glucuronato y triptófano. Las moléculas bioactivas con potencial neuroprotector, como los ácidos grasos de cadena corta, las ubiquinonas y el salicilato también se ven afectados en esta enfermedad [30]. Los cambios observados en estas patologías abren un nuevo paradigma dentro de la investigación de la microbiota intestinal, ya que los cambios observados en la composición y el metaboloma de la microbiota no tiene tan solo un efecto local en los órganos gastrointestinales, si no que existe una comunicación bidireccional entre el sistema nervioso central y las funciones intestinales denominado eje intestino – cerebro (EIC) donde la microbiota intestinal juega un papel regulador mediante la síntesis de metabolitos que pueden actuar como neurotransmisores [31].

A día de hoy, la mayoría de los esfuerzos en el estudio del microbioma humano se focalizan en comprender las características naturales del microbioma en los seres humanos en el contexto de la salud, al tiempo que se mejoran los conocimientos sobre las interacciones moleculares entre el microbioma y el huésped. En última instancia, estos esfuerzos tienen como objetivo desarrollar enfoques eficaces para restaurar los ecosistemas microbianos humanos perturbados como un medio para restablecer la salud o prevenir la enfermedad. La microbiota humana tiene un gran potencial para ser utilizada como biomarcador de diferentes estados patológicos, para estratificar pacientes o

entender la evolución de distintos tratamientos [32][33]. No obstante, la gran cantidad de datos disponibles y las características multifactoriales de algunas patologías complica la implantación de estas nuevas estrategias. Una de estas patologías multifactoriales donde la microbiota puede ser utilizada desde las diferentes estrategias descritas es la obesidad.

1.2 Sobrepeso, obesidad y el papel de la microbiota intestinal

La **obesidad** es una de las principales preocupaciones en las sociedades modernas, especialmente en los países desarrollados, ya que su prevalencia se ha triplicado en todo el mundo desde 1975 [34]. La Organización Mundial de la Salud informa de que, en 2016, el 39% de los mayores de edad tenían sobrepeso y el 13% eran obesos [35].

La obesidad suele definirse como el exceso de peso corporal en comparación a la estatura, basado en el índice de masa corporal (IMC). Sin embargo, esta definición simplista esconde una enfermedad multifactorial etiológicamente compleja que puede estar relacionada con otros trastornos como la diabetes de tipo 2 [36], las enfermedades cardiovasculares [37] y algunos cánceres [26].

Aunque en la actualidad se utilizan varios métodos para tratar el aumento de peso excesivo, la obesidad sigue siendo un importante problema de salud pública que exige nuevas soluciones nutricionales y/o médicas.

Más allá de estos factores, algunas evidencias sugieren que la composición de la microbiota intestinal también puede tener una gran influencia en el desarrollo de la obesidad. Muchos estudios han identificado cambios significativos en la pérdida de diversidad bacteriana en personas con sobrepeso u obesidad [38]. La pérdida de diversidad también está estrechamente relacionada con la inflamación de los tejidos y la resistencia a la insulina [39]. Se hipotetiza que el mayor inductor de la inflamación en la obesidad es el LPS. El LPS es una endotoxina que se encuentra en la pared celular de las bacterias Gram negativas. Normalmente se encuentra en sangre en concentraciones bajas en individuos normo-peso y altas en individuos obesos [40]. Las altas concentraciones de LPS en plasma se asocian con el aumento de CD14, receptor del LPS que se encuentra en la superficie de los monocitos y los macrófagos, e IL-6, marcador de inflamación. Los estudios sugieren que la ingesta de una dieta alta en grasas (HFD) altera la composición de la microbiota intestinal, aumentando así los niveles de LPS bacterianos. El LPS en contacto con el receptor Toll-like 4 (TLR4) receptor del LPS

desencadena vías de señalización inflamatorias, así como la secreción de citoquinas proinflamatorias. Este estado inflamatorio puede inducir posteriormente deficiencias en la secreción y expresión de los genes que codifican las proteínas de la unión estrecha intestinal como la Zonula occludens-1 (ZO-1) y la ocludina. Estos cambios favorecen la permeabilidad del epitelio intestinal, permitiendo así el paso de componentes bacterianos, como el LPS, del lumen intestinal al tejido adiposo y la circulación, donde puede promover inflamación sistémica, hiperglucemia, resistencia a la insulina y la adipogénesis; factores que favorecen el desarrollo del sobrepeso y la obesidad. Una de las posibles inductoras del incremento de LPS en plasma son las bacterias de la familia *Prevotellaceae*, bacterias Gram negativas presentes en mayor abundancia en las personas obesas en comparación a personas normo-peso [41].

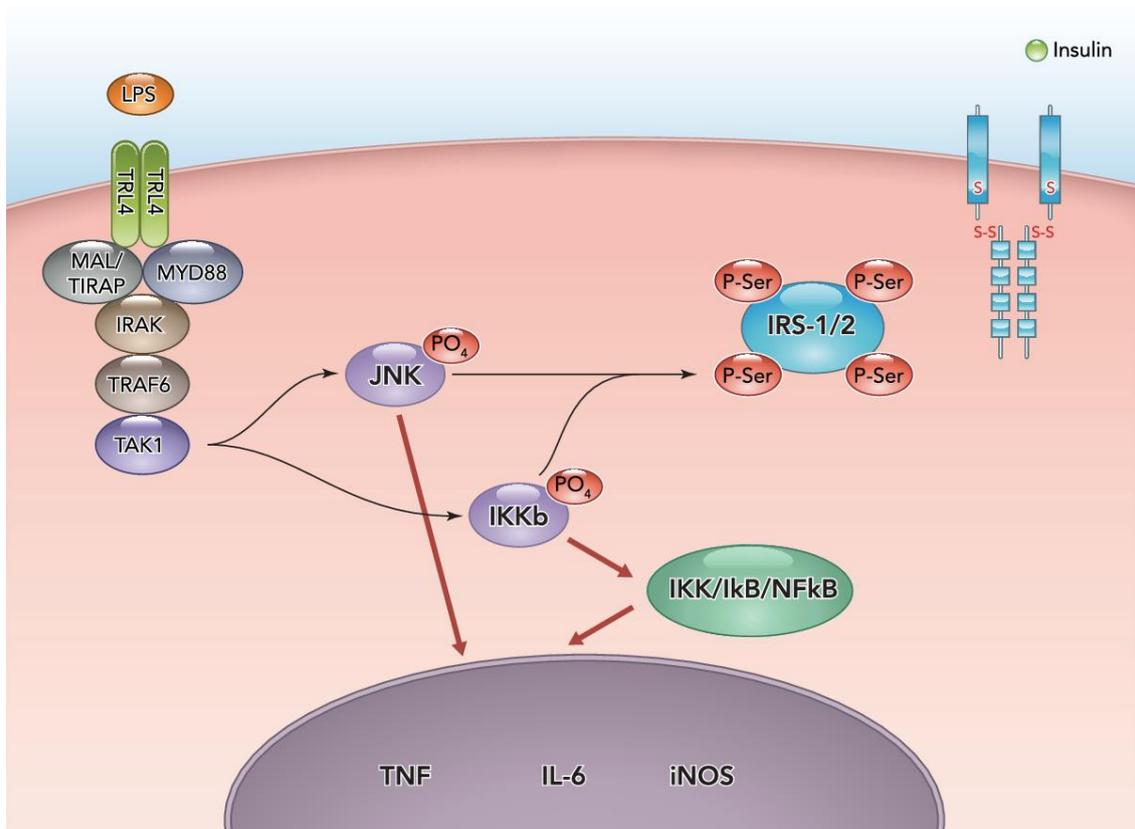


Figura 3 Mecanismo molecular de la inflamación y la resistencia a la insulina inducida por LPS. La rotura de la función de la unión estanca conduce a la translocación de LPS, que puede ser un factor temprano en el desarrollo de la inflamación y la resistencia a la insulina en humanos [42].

También se está demostrando la gran influencia que pueden llegar a tener los metabolitos generados por la microbiota intestinal como los AGCCs, principalmente el butirato, el propionato y el acetato. En concreto, el butirato mejora la sensibilidad a la insulina [43], e igual que el propionato, también aumenta la expresión del gen leptina, regulando así la ingesta de alimentos [44]. También están implicados en la regulación de la expresión

génica de las uniones estrechas intestinales, aumentando así la función de la barrera intestinal [45]. Además, el propionato es capaz de reducir la síntesis de colesterol [46]. Aunque el acetato sirva como sustrato para la síntesis de colesterol y juega un papel fundamental en la síntesis de lípidos en el hígado [47], se ha demostrado que el ácido acético también tiene la capacidad de inhibir el aumento de peso [48].

Otro mecanismo de acción por el cual la microbiota puede desempeñar un papel en el desarrollo de la obesidad es el aumento de la captación de energía de la dieta [49] y el almacenamiento de grasa [50]. El incremento de la captación de calorías se produce debido tanto a la mejora de la capacidad de la microbiota para digerir una mayor diversidad de polisacáridos de la dieta como por la modulación de los genes del huésped que afectan al depósito de energía en los adipocitos. Esto conduce directamente a un aumento de la producción hepática *de novo* de triglicéridos y a la estimulación de la posterior incorporación de estos nuevos triglicéridos en los tejidos adiposos periféricos. Estos aumentos del almacenamiento de grasa estimulados por la microbiota se unen a una disminución de la oxidación de los ácidos grasos para provocar un aumento aún mayor de la adiposidad.

Al examinar de cerca la composición de la microbiota del intestino humano, se ha observado que diferentes familias y géneros bacterianos tienen una correlación positiva o negativa con la obesidad. Algunas de las familias bacterianas que vieron incrementada su abundancia sistemáticamente en las personas obesas fueron *Enterobacteriaceae* [38] y las anteriormente descritas *Prevotellaceae* [41]. Por el contrario, los miembros de la familia bacteriana *Christensenellaceae* fueron sistemáticamente más abundantes en sujetos con un bajo IMC [51]. Algunos de los géneros bacterianos específicos asociados a una correlación negativa entre el IMC y su abundancia relativa son *Roseburia* [52], *Alistipes* [53], *Erwinia* y *Oscillospira* [52].

Frente a todos estos factores citados, se hipotetiza que la composición y los metabolitos producidos por la microbiota intestinal ejercen una influencia en la obesidad y las enfermedades metabólicas, aunque muchos de los mecanismos no se comprendan del todo aún y se necesite más investigación. Por esta razón, la microbiota intestinal se considera cada vez más una diana crucial para nuevas y más eficaces terapias contra la obesidad. La modulación de esta nueva diana, a partir de intervenciones nutricionales específicas podría ayudar tanto a la prevención como a la lucha contra la obesidad. En este sentido, se están llevando a cabo estudios que pretenden validar la eficacia de estas estrategias personalizadas. Una de estas iniciativas es el proyecto PREVENTOMICS, en

el que se enmarcan los trabajos incluidos en esta tesis doctoral. Los detalles de este proyecto se pueden consultar en el apartado 3.2. Para intentar dar respuesta a las preguntas relevantes en el campo del estudio del microbioma humano relacionado con la nutrición personalizada y la obesidad es cada vez más necesario el uso y la puesta a punto de nuevos modelos preclínicos.

1.3 Modelos preclínicos para el estudio del microbioma

Los modelos preclínicos son esenciales en el estudio de la microbiota en las intervenciones nutricionales personalizadas [54]. En primer lugar, permiten controlar rigurosamente las condiciones experimentales, como la dieta, el ambiente y la genética, lo que facilita la evaluación precisa del efecto de las intervenciones nutricionales en la microbiota intestinal.

Además, estos modelos posibilitan la investigación de los mecanismos moleculares, bioquímicos y fisiológicos subyacentes en la interacción entre las intervenciones nutricionales y la microbiota [55], lo cual es crucial para comprender cómo ciertos nutrientes o compuestos dietéticos influyen en la composición y función de la microbiota y en la salud del huésped.

Los modelos preclínicos también son fundamentales para evaluar la seguridad y eficacia de las intervenciones nutricionales antes de aplicarlas en humanos [56]. Al identificar posibles efectos adversos o interacciones negativas entre los componentes dietéticos y la microbiota, se contribuye a minimizar los riesgos en estudios clínicos posteriores.

En este contexto, la investigación en modelos preclínicos facilita la selección de intervenciones nutricionales con mayor potencial de éxito en humanos. Al probar múltiples candidatos en modelos experimentales, es posible identificar aquellos que generan cambios beneficiosos en la microbiota y en la salud del huésped, optimizando así el proceso de desarrollo de estrategias nutricionales personalizadas.

Por otra parte, estos modelos son útiles para determinar las dosis óptimas y la duración de las intervenciones nutricionales, explorando diferentes dosis y duraciones para establecer un rango seguro y eficaz de administración en futuros estudios en humanos.

Por esta razón, el uso de modelos preclínicos, tanto *in vitro* como *in vivo* es cada vez más extenso para el estudio de la microbiota y el desarrollo y puesta a punto de estos tipos de modelos es muy necesario.

1.3.1 Modelos *in vitro*

Los modelos *in vitro* son una herramienta muy eficaz para dar respuesta a diferentes hipótesis. Una de las ventajas más importantes de los modelos *in vitro* es la posibilidad de mantener y controlar las condiciones experimentales bajo parámetros reproducibles. Por otro lado, las restricciones legales y éticas son menores comparado con la investigación *in vivo*. Sin embargo, existe una compleja interacción entre la microbiota, las células epiteliales y el sistema inmune que no siempre es posible reproducir con los modelos *in vitro*.

Durante los últimos años, se han utilizado diferentes modelos *in vitro* de tracto gastrointestinal. A continuación, se citan algunos de los modelos disponibles actualmente para simular el tracto gastrointestinal. Estos modelos se pueden dividir en 3 grandes grupos:

1. **Modelos de epitelio intestinal y mucosa:** Estos modelos están formados por cultivos celulares epiteliales como Caco-2, HT-29, T-84 o DLD-1. Mediante estos tipos de modelos se pueden estudiar parámetros como la integridad y resistencia de la membrana epitelial y la perfusión de diferentes compuestos de interés. El gran inconveniente de este tipo de modelos es la ausencia de la microbiota.
2. **Modelos para estudiar la microbiota intestinal:** Estos modelos están formados por una serie de fermentadores conectados en línea que simulan las diferentes regiones del tracto gastrointestinal. Suelen usarse muestras de heces humanas como inóculo de estos sistemas. Se pueden controlar diferentes parámetros como el pH, la temperatura o la peristalsis. Los modelos más citados en la literatura son el TIM-2 [57], el SHIME [57] o MBRA [58]. Los parámetros que se pueden estudiar en estos modelos son la caracterización de la microbiota, el estudio de patrones de fermentación, la generación de ácidos grasos de cadena corta y otros metabolitos, etc. Estos modelos pueden ser muy útiles para dar respuesta a preguntas específicas, como por el ejemplo el efecto sobre la microbiota de la suplementación con ingredientes tipo probióticos y prebióticos, sin embargo, la ausencia de células epiteliales intestinales no permite estudiar la interacción microbiota-epitelio.
3. **Modelos de interacción microbiota-epitelio:** Este tipo de modelos son la combinación de los dos anteriores ya que intentan simular las condiciones de co-cultivo para estudiar la interacción de los microorganismos con las células intestinales.

Según la literatura científica consultada, los principales modelos desarrollados que tienen en cuenta la interacción microbiota-epitelio se recogen en la siguiente tabla. Junto a sus características principales.

Tabla 1 Modelos de co-cultivo de interacción microbiota – epitelio.

	Transwell apical anaerobic model [59]	Host-microbiota interaction [60]	HoxBan Co-culture system [61]	Human gut-on-a-chip [62]	HuMix [63]
Cultivos celulares utilizados	Caco-2	Caco-2	Caco-2, DLD-1	Caco-2	Caco-2
Tiempo de co-cultivo	Hasta 8h	Hasta 48h	Hasta 36h	7 días	24h
Microorganismos utilizados	<i>F. prausnitzii</i>	Desconocido	<i>F. prausnitzii</i>	<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. rhamnosus</i> <i>B. caccae</i>
Modelos de enfermedad	No descrito	No descrito	Inducción de inflamación	Inducción de inflamación y SIBO	No descrito
Intervenciones	No descrito	Fermentación de <i>S. cerevisiae</i>	Prebióticos, vitaminas	Prebióticos	Prebióticos

Este tipo de modelos son muy útiles para investigaciones básicas y de *screening* donde se pueden utilizar muchas réplicas y experimentos independientes. Sin embargo, este tipo de modelos tienen una limitación importante debido a la imposibilidad de estudiar la interacción de la microbiota con el huésped ya que la interacción de la microbiota y los metabolitos generados no entran en contacto con órganos complejos o sistemas de señalización como el eje intestino-cerebro. También es complicado abarcar la gran complejidad que existe en la microbiota intestinal utilizando co-cultivos de pocas cepas bacterianas. Por esta razón, para intentar dar respuesta a hipótesis más complejas los modelos *in vitro* son limitantes y es necesaria la utilización de modelos *in vivo*.

1.3.2 Modelos *in vivo*

La utilización de animales como modelos para estudiar la interacción entre microbiota y huésped se está investigando en profundidad [64]. Dada la complejidad práctica y ética

de realizar procedimientos de muestreo invasivos en sujetos humanos, la elevada variación interindividual en las dietas y en los microbiomas intestinales de los seres humanos, se han desarrollado diferentes tipos de modelos animales que se utilizan con frecuencia para investigar las múltiples dinámicas de las interacciones entre el huésped y el microbioma.

Para poder utilizar los modelos animales hace falta justificar su utilización ya que comporta dilemas éticos y es necesaria la aprobación de un comité biomédico. Una vez las solicitudes son aprobadas, los modelos *in vivo* pueden ser utilizados para intentar dar respuesta a preguntas que no se pueden responder mediante la utilización de modelos *in vitro* o que no se pueden llevar a cabo en humanos.

Los animales más utilizados en la investigación del campo de la microbiota son: la sepiolida [65] , la mosca de la fruta [66], el pez cebrá [67] y el ratón [68] (Figura 4). También pueden utilizarse modelos más complejos como los modelos porcinos [69] o los primates no humanos [70], pero el uso de estos animales conlleva aún más restricciones éticas y el número de animales a utilizar en un experimento es muy limitado. Por esta razón, este tipo de modelos *in vivo* más complejos no son muy frecuentes para el estudio de la microbiota y se opta por modelos animales más versátiles.

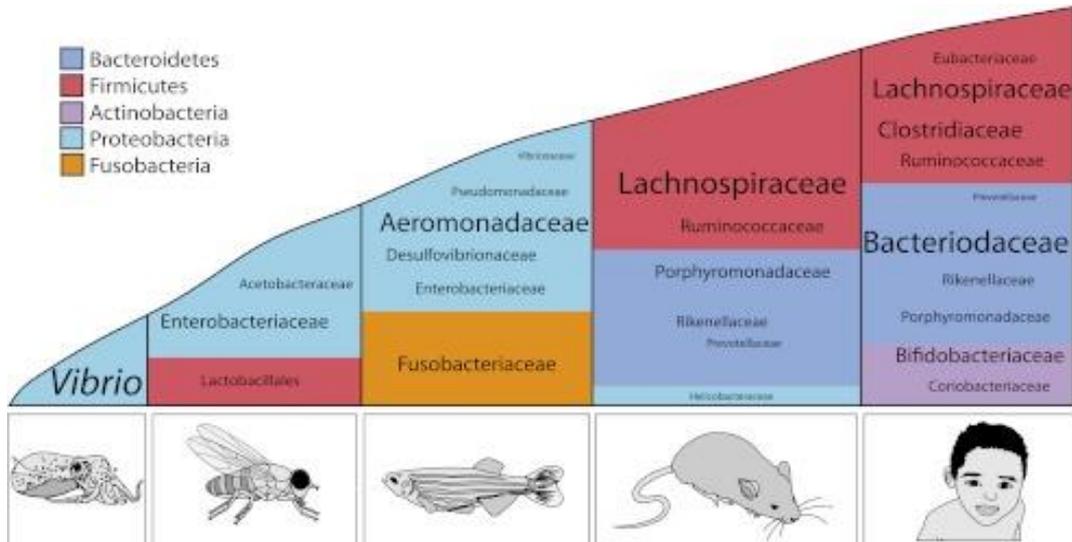


Figura 4 La composición de la microbiota de los modelos animales más utilizados en la investigación de la microbiota intestinal. Su composición comparada a los humanos. [71]

La complejidad de cada modelo (y su ecosistema microbiano) es diferente. La selección de un modelo u otro se realiza en función de la necesidad de cada estudio. El modelo que presenta más similitudes en cuanto a la composición de la microbiota con los humanos de los modelos descritos anteriormente (exceptuando los modelos complejos de primates

no humanos) es el **modelo de ratón**, ampliamente utilizado en diferentes campos de investigación básica y aplicada, más allá de la microbiota. Su uso ha permitido establecer la correlación que existe entre la microbiota y la angiogénesis [72], la densidad ósea [73], la obesidad y malnutrición [74], la función hepática [75] o la respuesta inmune adaptativa [76].

Sin embargo, la comprensión e interpretación de la información obtenida a partir de estos modelos *in vivo* y su extrapolación a la especie humana requiere un conocimiento más profundo. Esto es especialmente importante dadas las diferencias que existen en diversos ámbitos como la genética, la anatomía intestinal, la fisiología del intestino, la respuesta inmune, el metabolismo o el comportamiento alimentario, entre otros, lo que puede determinar también diferencias en el microbioma.

En cuanto a la comparación de la microbiota entre los humanos y los ratones, a primera vista, la microbiota de los ratones y la de los seres humanos parecen bastante similares: en ambos casos, la microbiota intestinal está dominada por los mismos dos filos, *Firmicutes* y *Bacteroidetes*. Sin embargo, cuando se profundiza en las bacterias específicas, a pesar de la similitud del 89% en los géneros bacterianos generales entre los ratones de laboratorio y los seres humanos, una serie de géneros específicos de los seres humanos están completamente ausentes en los ratones, incluidos los relacionados con la salud intestinal en los seres humanos, lo que hace que las comparaciones directas de la microbiota de los ratones de laboratorio sean cuestionables para modelar la salud y la enfermedad intestinal humana [77]. Algunos de los primeros estudios comparativos demostraron la existencia de géneros exclusivos encontrados en humanos y no en ratones como *Faecalibacterium*, *Mitsuokella*, *Megasphaera*, *Dialister*, *Asteroleplasma*, *Succinivibrio*, *Sutterella*, *Paraprevotella* y *Phascolarctobacterium*.

Mucho más reciente, en 2022 Beresford-Jones et al. [78] han publicado el Catálogo de Bacterias Gastrointestinales del Ratón (MGBC). Esta compilación de los microbiomas de ratón analizado a través de la secuenciación de genomas ensamblados con metagenomas (MAGs) ha permitido comparar los microbiomas humanos y de ratón de manera exhaustiva. El MGBC incluye 26.640 genomas bacterianos no redundantes y de alta calidad que representan a 1.094 especies incluyendo 62 especies no cultivadas previamente. Tras la comparación del MMGC con la base de datos Genoma gastrointestinal humano unificado (UHGG) se ha podido demostrar que sólo el 2,65% de las especies bacterianas son compartidas entre el ratón y el ser humano (Figura 5A).

Sin embargo, aunque las diferencias a nivel taxonómico son muy grandes, tras analizar el grado de solapamiento taxonómico correspondiente al solapamiento funcional entre estas poblaciones a través de la comparación de las rutas metabólicas predichas utilizando la enciclopedia de genes y genomas de Kyoto (KEGG), se ha podido demostrar que más del 80% de las rutas metabólicas son compartidas entre ratón y humano Figura 5B.

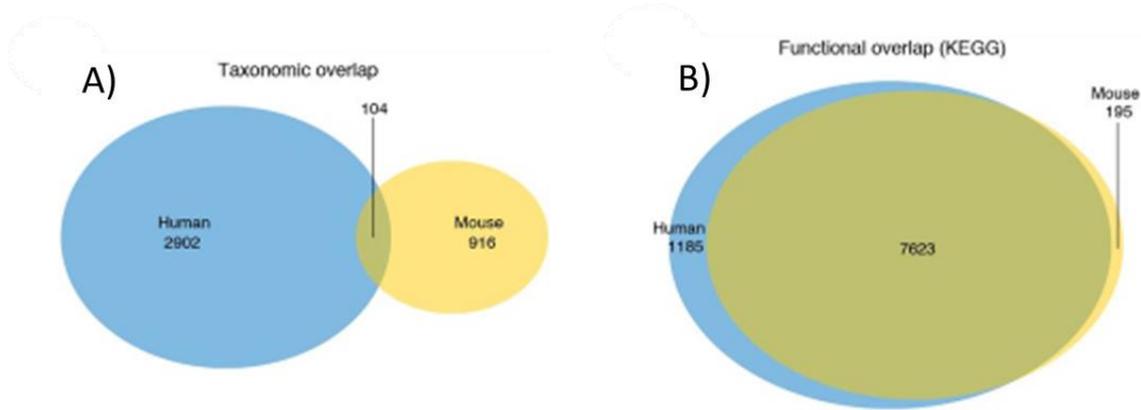


Figura 5 A) Solapamiento de los taxones compartidos entre los metagenomas de ratón y humano. B) [78]

En conjunto, estos análisis demuestran que las microbiotas del ratón y del ser humano son taxonómicamente muy distintas a nivel de especie; sin embargo, las funciones metabólicas generales realizadas por los microorganismos intestinales se conservan en gran medida entre el ratón y el ser humano.

Aunque muchos estudios en el campo del microbioma se pueden llevar a cabo en modelos *in vivo* con la microbiota animal autóctona, debido a las diferencias descritas entre humanos y ratón, se necesita profundizar más en nuevas posibilidades mediante las cuales se puedan transferir microbiotas humanas a modelos animales. En este sentido, los trasplantes de microbiota fecal se han consolidado como una de las opciones más válidas.

1.4 Trasplantes de microbiota fecal

Un trasplante de microbiota fecal (FMT) es el proceso mediante el cual se trasplanta materia fecal de un individuo al intestino de un receptor con el objetivo modificar la composición de la microbiota del receptor a una composición similar a la del donante para obtener un beneficio terapéutico. Esta práctica no es nueva ya que fue documentada en la antigua China hace 1700 años para tratar la diarrea [79]. Sin embargo, los FMTs ganaron mucha relevancia a partir del año 2013, cuando la Administración de Alimentos

y Medicamentos de Estados Unidos aprobó el FMT para el tratamiento de la infección recurrente por *Clostridium difficile* (CDI).

CDI es la causa más común de diarrea infecciosa asociada a la asistencia sanitaria en el mundo desarrollado. La incidencia y la gravedad de las infecciones por *C. difficile* han aumentado en los últimos años con un impacto considerable en términos de morbilidad, mortalidad y coste económico [80]. La terapia con antibióticos sigue siendo el tratamiento principal para la CDI recurrente, siendo la vancomicina, el metronidazol y la fidaxomicina los más utilizados. Sin embargo, la terapia con antibióticos de amplio espectro puede provocar cambios drásticos en la microbiota intestinal y esto hace que los pacientes sean más susceptibles a las infecciones recurrentes. La probabilidad de tener una recurrencia de la infección por *C. difficile* tras un ciclo de antibióticos oscila entre el 10% y el 40% y este porcentaje puede ir aumentando hasta un 65% si se realizan más ciclos de antibióticos [81]. Por esta razón, son muy necesarios nuevos tratamientos para tratar este tipo de infecciones no basados en antibióticos. En este sentido, el trasplante de microbiota ha emergido como uno de los posibles nuevos tratamientos.

Los primeros ensayos clínicos regulados para tratar CDI a través de FMT demostraron una tasa de éxito muy superior de hasta un 91% comparando los tratamientos con antibióticos convencionales (31%) [82] [83] y reduciendo la probabilidad de tener una infección recurrente. El mecanismo de acción por el cual el FMT puede curar al paciente que tiene una CDI no está del todo definido. Algunas de las hipótesis más aceptadas apuntan a que las bacterias vivas transferidas al paciente compiten por los nutrientes con *C. difficile* y acaba desplazando al patógeno de su nicho ecológico mediante la producción de metabolitos que inhiben su crecimiento. Otra de las hipótesis es que estos microorganismos incrementan la concentración de sales biliares secundarias lo que ayuda a la inhibición de crecimiento de *C. difficile*. No obstante, a pesar de la evidencia científica demostrada, el tratamiento con antibióticos sigue siendo la principal terapia administrada para CDI y el FMT es aprobado tan sólo para casos muy particulares. A pesar de esto, el FMT ha llamado la atención de muchos investigadores como posible método de acción contra patologías donde se cree que la microbiota puede jugar un papel principal.

Otras patologías humanas donde el FMT se ha explorado a través de ensayos clínicos son las enfermedades inflamatorias intestinales (EII), en concreto la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa (UC). Sin embargo, la evidencia disponible y la efectividad de los FMT en estas enfermedades no es tan evidente. Una de las razones es el número de ensayos

llevados a cabo, muy inferior comparado con los ensayos clínicos de CDI. Otra de las razones es el tipo de enfermedad, siendo estas más complejas comparadas con la CDI, donde la enfermedad es causada por un único agente infeccioso. No obstante, algunos ensayos clínicos han reportado resultados prometedores para las IBS. En el caso de la enfermedad de Crohn, en un estudio clínico el 58% de los pacientes (11/19) notaron mejoras en sus síntomas hasta 12 semanas después del FMT [84] y en el mismo sentido, otro estudio ha demostrado que el 77% de pacientes de un total de 30 tuvieron una remisión de la enfermedad 1 mes después del FMT [85]. En el caso de UC, un estudio clínico aleatorizado encontró diferencias significativas entre el grupo FMT y el placebo (24% vs 5%) en una N de 38 pacientes por grupo [86]. También hay que destacar que otros estudios no llegaron a ver diferencias significativas en las remisiones de este tipo de enfermedades [87]. El mecanismo de acción por el cual la microbiota puede llegar a realizar un efecto terapéutico en las IBS todavía es desconocido, sin embargo, se ha observado que los pacientes cuyos índices de remisión mejoran, acaban teniendo una diversidad bacteriana significativamente mayor en comparación con los pacientes en los que el FMT no mejora sus síntomas o padecen más remisiones. Debido a estos resultados, es posible que el donante y la calidad de la muestra sea vital para que el trasplante funcione y que la microbiota se pueda implantar de forma adecuada.

Hasta día de hoy, se han llevado a cabo más de 200 ensayos clínicos que incluyen FMT en humanos, no obstante, sólo uno de ellos ha publicado resultados específicos sobre la obesidad [88]. En este ensayo aleatorizado, triple ciego y controlado con placebo se utilizó una dosis de inducción de FMT mediante cápsulas, seguida de cápsulas orales mensuales o una cápsula de placebo para el mantenimiento. Las cápsulas de FMT no provocaron ningún acontecimiento adverso y produjeron cambios significativos en el microbioma intestinal; los perfiles de ácidos biliares de los participantes cambiaron hasta asemejarse a los del donante delgado. Sin embargo, el FMT no redujo el IMC en pacientes obesos. Aunque los estudios preliminares apuntan hacia un potencial favorable del uso de FMT como una herramienta útil para el tratamiento de diferentes patologías multifactoriales como la obesidad, aún se necesitan más estudios clínicos, con protocolos diferentes, para respaldar el uso del FMT. Algunos de estos estudios clínicos centrados en el tratamiento de la obesidad a través de FMT están en marcha en la actualidad y no finalizan hasta 2026. En este sentido, los modelos preclínicos animales brindan una oportunidad para profundizar en el conocimiento de los FMTs y la microbiota a través

del estudio detallado de la interacción entre la microbiota trasplantada y la correlación con patologías como la obesidad.

1.5 Modelos *in vivo* con trasplante de microbiota fecal

Tal y como se ha descrito anteriormente, es difícil establecer relación directa entre los microorganismos específicamente de la microbiota humana y los modelos *in vivo* clásicos. La idea de poder transferir la microbiota característica humana a un modelo murino ha generado mucho interés por la potencialidad de las posibles aplicaciones de un modelo de estas características. En este sentido, algunos estudios han explorado la vía del FMT, de humano a ratón, como el camino a seguir para transferir la microbiota específica humana a un animal. Hay dos estrategias que suelen utilizarse: los **modelos *germ-free*** (GF) y los **modelos tratados con antibióticos** o también llamado *pseudo germ-free* (PGF).

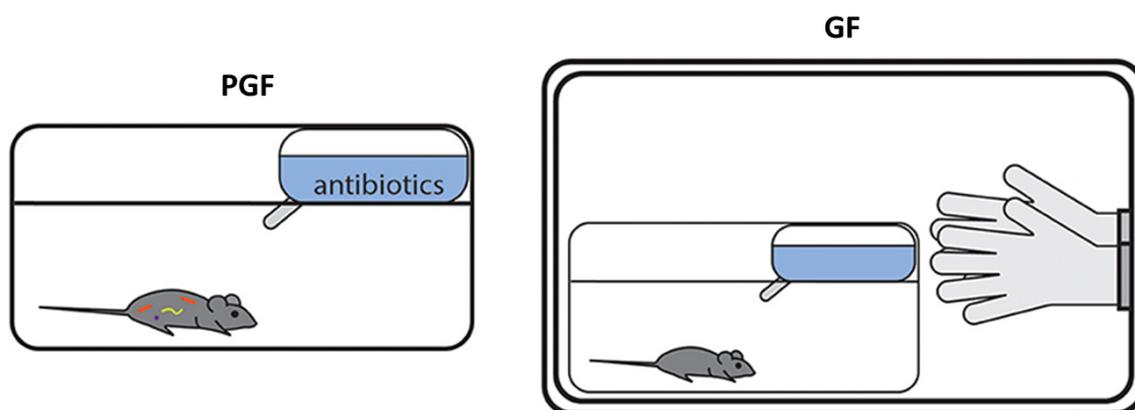


Figura 6 Representación de la estabulación de los animales PGF y GF. Los ratones GF se mantienen en condiciones estrictamente estériles donde no hay contacto con las bacterias exteriores mientras que los ratones PGF se crían en condiciones normales y su microbiota se intenta eliminar mediante el uso de antibióticos de amplio espectro.

Los ratones GF se crían en aisladores que bloquean totalmente la exposición a los microorganismos, con la intención de mantenerlos libres de bacterias, virus y microbios eucariotas detectables. Los ratones GF permiten estudiar la ausencia total de microorganismos o generar animales gnotobióticos colonizados exclusivamente por microorganismos conocidos. Sin embargo, la generación y el mantenimiento de estos ratones requiere instalaciones especializadas, y el coste, la mano de obra y los conocimientos necesarios para mantenerlos son muy elevados. Los ratones libres de gérmenes deben ser controlados regularmente para detectar la contaminación mediante

una combinación de técnicas de cultivo, microscopía, serología, morfología macroscópica y secuenciación.

Pero hay que tener en cuenta que estos ratones tienen un fenotipo característico, mostrando varias diferencias de desarrollo y fisiológicas con respecto a los ratones criados convencionalmente.

A nivel gastrointestinal, muestran alteraciones en la morfología intestinal, la motilidad, la absorción, la secreción y la función inmunitaria. El ciego de los ratones GF está agrandado entre 4 y 8 veces debido a la acumulación de moco y fibras no digeridas, y el intestino delgado está menos desarrollado [89] con un menor recambio de células epiteliales y microvellosidades irregulares junto con una menor motilidad intestinal. A pesar de la ausencia de ácidos grasos de cadena corta producidos por la microbiota, también se demostró que los ratones GF tenían mayores niveles de péptido similar al glucagón-1 (GLP-1), derivado del colon y circulante, que no mejoraba la respuesta de la insulina, sino que ralentizaba el tránsito del intestino delgado, potencialmente como respuesta adaptativa, promoviendo la absorción de nutrientes ante una disponibilidad energética insuficiente [90].

También, los ratones *GF* son significativamente más susceptibles a las infecciones patógenas y al desarrollo de enfermedades derivadas de las mismas [91]. Los estudios demuestran que, en comparación con los ratones normales, los ratones GF presentan una serie de diferencias fisiológicas y funcionales significativas en su tracto gastrointestinal [92]. Por ejemplo, tienden a tener menos placas de Peyer, ganglios linfáticos mesentéricos más pequeños y contienen menos células plasmáticas, menos células T epiteliales intestinales CD8+, menor expresión de moléculas MHC de clase II dentro de las células epiteliales intestinales y menor producción de IgA secretora por parte de las células B [89]. La alteración de todos los factores citados anteriormente tiene una estrecha conexión con la respuesta del sistema inmune. Por lo tanto, es importante tener en cuenta estas diferencias cuando se trabaja con estos modelos y se determina la importancia traslacional de cualquier resultado, ya que la conexión entre la microbiota y la respuesta inmune y los cambios fisiológicos se ven muy alterados. A pesar de las citadas limitaciones, los ratones GF constituyen una herramienta experimental útil para comprender las interacciones microbiota-huésped y descifrar los mecanismos moleculares de las mismas.

Como método alternativo a este tipo de modelos GF, los **animales PGF** evitan algunas de estas desventajas. En estos modelos, se utilizan tratamientos con antibióticos de amplio espectro para reducir drásticamente la microbiota intestinal de los ratones, pudiéndose

aplicar fácilmente a cualquier genotipo o condición de ratón. A diferencia de las condiciones de los ratones GF, en las que se mantiene una esterilidad completa durante toda la vida. Una de las mayores ventajas de este modelo en comparación a los GF es que la maduración y la educación inmunitaria temprana se desarrolla de forma correcta y no se observan cambios drásticos a nivel de morfología anatómica. Por otro lado, los costes de mantenimiento son inferiores en comparación a los ratones GF y las condiciones de trabajo no son tan estrictas. Tampoco se necesitan formaciones de personal específicas para llevar a cabo experimentos en modelos PGF en comparación a los GF.

Sin embargo, el uso de este tipo de modelos animales también tiene algunos inconvenientes. Es muy complicado llegar a eliminar del todo los microorganismos que habitan el tracto gastrointestinal del ratón. Por esta razón se utilizan combinaciones de antibióticos de amplio espectro con diferentes mecanismos de acción para llegar a disminuir la microbiota autóctona hasta niveles muy bajos. Por ejemplo, el metronidazol y la clindamicina se dirigen a los anaerobios, la vancomicina solo es eficaz contra las bacterias grampositivas y la polimixina B se dirige específicamente a las bacterias Gram negativas [93]. En cuanto a las dosis, regímenes de administración o duración de los tratamientos, existe muchas combinaciones posibles descritas en literatura, en este caso, no existe un protocolo definido aún. En cuanto a la administración, 2 métodos se utilizan ampliamente. Con el primer método, los antibióticos se diluyen en el agua de bebida y los ratones pueden beber *ad libitum* durante el curso del tratamiento; por lo tanto, las dosis reales administradas a cada ratón pueden variar. En muchos estudios se añaden edulcorantes como azúcar, para enmascarar cualquier amargor y asegurarse de que los ratones beban el agua que contiene antibióticos. Sin embargo, hay estudios en los que se ha observado que los ratones evitan el agua y se deshidratan cuando se les suministran antibióticos a través del agua de bebida [94]. El segundo método es la administración por sonda oral diaria. En este caso, las concentraciones de antibiótico que recibe cada animal son iguales, sin embargo, se necesita invertir más tiempo en la ejecución de los experimentos ya que una persona tiene que preparar y administrar a diario la dosis de antibiótico y los animales pueden padecer un estrés extra durante la manipulación y la administración diaria del antibiótico mediante sonda oral.

Hay que destacar que la mayoría de los estudios en modelos animales con FMT se han realizado en ratones GF, ya que fueron los primeros en utilizarse en este tipo de estudios y los protocolos de uso están más consolidados. Sin embargo, debido a algunos de los inconvenientes descritos anteriormente, los modelos PGF son cada vez más

habituales, no obstante, el número de estudios disponibles es menor en comparación a los ratones GF y, en consecuencia, no están tan bien establecidos. Por esta razón, se necesitan unos protocolos coherentes tanto para la administración de los antibióticos, como para la realización de los FMT y su mantenimiento en el huésped el mayor tiempo posible. En este caso, en la literatura consultada, la frecuencia y la duración de la administración del FMT varía desde una única administración [95], hasta una vez al día durante 3 días [96], pasando por tres dosis semanales durante 3 semanas [97], o una o dos veces por semana durante 4 semanas y hasta dos veces al día durante 12 semanas [98]. Además, no todos los estudios analizan la composición microbiana tras la finalización de las administraciones de FMT para garantizar que el trasplante de la microbiota humana es estable y los métodos mediante los cuales se analiza la depleción de la microbiota son diferentes.

Algunos de los estudios más destacados llevados a cabo que incluyen FMT de humano a ratón en modelos GF se han realizado en ratones colonizados con microbiota fecal de pacientes tras una pérdida de peso inducida quirúrgicamente, observando una menor deposición de grasa en comparación con los animales asociados a la microbiota de humanos obesos [99]. Otros estudios han indagado en la causalidad de la obesidad con la microbiota a través de FMT de humano a ratón en modelos GF [100]. En este estudio, los autores colonizaron un grupo de ratones GF con microbiota de un paciente obeso, mientras que el otro grupo recibió una inoculación adicional de *Christensenella minuta*, una bacteria asociada a un IMC bajo [51]. Los ratones tratados con *Christensenella minuta* mostraron una reducción de la adiposidad asociada a cambios en la composición del microbioma, indicando la influencia del microbioma en el metabolismo del huésped [100]. En otro estudio parecido, se colonizaron ratones GF con microbiota derivada de gemelos dicigóticos discordantes para la obesidad. Los ratones receptores de la microbiota obesa desarrollaron un aumento de la masa grasa acompañada de una disminución de los SCFAs intestinales. Los autores concluyeron que un fenotipo obeso es transmisible de humanos a ratones con todas sus comorbilidades [101].

En cuanto al uso de FMT en modelos PGF, uno de los primeros estudios comparó los FMT realizados a partir del mismo donante a ratones GF y PGF. En este caso, no encontraron diferencias significativas entre los dos tipos de modelos, indicaron que el $59,3 \pm 3,0\%$ de las comunidades bacterianas fecales de los ratones tratados eran atribuibles a la fuente donante [102]. En otro de los estudios realizados de humano a ratón en modelos PGF, se analizaron los metabolitos cecales por HPLC para determinar los

efectos de la microbiota trasplantada en el metaboloma. Los perfiles de metabolitos cecales de los ratones tratados sólo con antibióticos (sin transferencia fecal) y de los ratones de control eran diferentes entre sí y de los ratones humanizados. Los perfiles de metabolitos de los ratones humanizados a partir de diferentes muestras de donantes se agruparon cerca unos de otros, pero eran lo suficientemente distintos como para que se vieran grupos separados para cada donante [103]. En el mismo sentido, otro estudio demostró un desempeño similar de los resultados obtenidos entre ratones GF y PGF induciendo el mismo fenotipo de mejora a la respuesta antitumoral de los inhibidores del punto de control inmunitario (ICIs) dirigidos al eje PD-1/PD-L1 en ratones recibiendo FMT de pacientes de cáncer que respondieron al tratamiento de ICIs en comparación a pacientes que no respondieron [104]. Uno de los estudios más destacables en ratones PGF modularon diferencialmente el microbioma tumoral y el crecimiento del tumor en base a si los FMTs se realizaron de pacientes con adenocarcinoma pancreático (PDAC) de baja o de la alta supervivencia, demostrando que la composición del microbioma del PDAC, que se relaciona con el microbioma intestinal, influye en la respuesta inmunitaria del huésped y en la evolución de la enfermedad [105]. Otro caso de éxito en el traspaso de un fenotipo patológico a modelos PGF fue un estudio basado en la Preeclampsia (PE). En el caso de los ratones receptores, el microbioma intestinal de los pacientes con PE desencadenó un aumento drástico de la presión arterial pregestacional. Además, el grupo trasplantado con PE mostró una mayor proteinuria, reabsorción embrionaria y menor peso fetal y placentario. En la placenta de las pacientes con EP y de los ratones con EP-FMT, los niveles de bacterias totales, *Fusobacterium* y citoquinas inflamatorias aumentaron significativamente [106].

Por consiguiente, los modelos *in vivos* con FMT pueden ser muy útiles para intentar transmutar las observaciones epidemiológicas de correlación a causalidad en el campo del microbioma humano. Sin embargo, hay que tener en cuenta también las limitaciones bien conocidas y citadas anteriormente. También es importante destacar que hay que profundizar más en el desarrollo de estos modelos, entender en profundidad los cambios que se llevan a cabo en el ratón cuando se realiza un trasplante fecal, y ser realista y crítico con los resultados obtenidos mediante este tipo de modelos. Profundizando en esta dirección, en una revisión sistemática [107], descubrieron que el 95% de los estudios publicados (36/38) hasta 2020, sobre modelos animales receptores de FMT (muestras humanas y animales) informaron de una transferencia de fenotipos patológicos a los animales receptores, y muchos extrapolaron los hallazgos para hacer inferencias causales

a las enfermedades humanas que estaban estudiando. La prevalencia de resultados positivos en este tipo de estudios científicos puede ser atribuida a varios factores. Uno de estos factores es el sesgo de publicación, donde los estudios que reportan resultados positivos tienen una mayor probabilidad de ser publicados en comparación con aquellos con resultados negativos o no significativos.

Otro factor es la falta de estandarización en los protocolos de trasplante fecal y en la selección de modelos animales. Esto puede contribuir a la prevalencia de resultados positivos. La estandarización de métodos, protocolos y criterios de selección de modelos animales es crucial para garantizar la solidez y reproducibilidad de los hallazgos en este campo de investigación.

En resumen, es importante reconocer y abordar las limitaciones y posibles sesgos en la investigación del microbioma humano cuando se utilizan modelos animales de trasplante fecal con muestras humanas provenientes de diferentes patologías. Al enfrentar estos desafíos y mejorar la rigurosidad científica, se puede avanzar hacia una comprensión más precisa, reproducible y efectiva de los estudios de microbioma humano en modelos preclínicos.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Hipótesis y primer objetivo

La hipótesis del primer objetivo consiste en que las dietas personalizadas diseñadas y aplicadas en tres estudios de intervención modificarán la microbiota intestinal y los perfiles metabolómicos de los voluntarios participantes en los estudios de intervención hacia un estado más saludable con un impacto directo en el sobrepeso y la obesidad.

El **primer objetivo** consiste en determinar el efecto de dietas personalizadas en la modulación de la microbiota de los voluntarios, así como posibles impactos en la obesidad, en comparación a las intervenciones dietéticas clásicas, en tres estudios de intervención en distintos países Europeos.

2.2. Hipótesis y segundo objetivo

La principal hipótesis del segundo objetivo consiste en que va a ser posible transferir microbiota humana a un modelo animal PGF y que esa transferencia será dependiente de voluntario.

El **segundo objetivo** consiste en desarrollar y optimizar un modelo de ratón PGF humanizado mediante FMT utilizando 10 muestras humanas, evaluando la composición inicial de la microbiota, la efectividad de la depleción de la microbiota autóctona, la eficiencia de transferencia bacteriana y la evolución temporal de la microbiota humanizada.

2.3. Hipótesis y tercer objetivo

La hipótesis del tercer objetivo consiste en que los cambios observados en la modificación de la microbiota de los voluntarios tras finalizar las intervenciones nutricionales (primer objetivo), con dietas saludables, van a tener un efecto protector frente al fenotipo obeso del modelo murino, a través de la modificación del metaboloma y el microbioma de los ratones obesos trasplantados con muestras de los voluntarios humanos.

El **tercer objetivo** consiste en determinar el impacto de los cambios en la microbiota intestinal de los voluntarios, producidos por las intervenciones nutricionales, en la obesidad y el sobrepeso, también en comparación con dietas convencionales saludables, mediante el uso del modelo de ratón PGF humanizado mediante FMT.

MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Estrategias nutricionales personalizadas (El proyecto PREVENTOMICS)

El proyecto PREVENTOMICS (Empowering consumers to PREVENT diet-related diseases through OMICS-based personalized nutrition) tiene como principal objetivo incidir en la mejora y el bienestar de los individuos a través de la modificación de los hábitos alimentarios y los cambios de comportamiento mediante nuevos métodos dirigidos a la **personalización** basándose en datos metabolómicos y genéticos.

Para ello, se ha utilizado un enfoque multiómico con técnicas como la metabolómica o la proteómica, con el fin de detectar puntos de disfunción o de alteración de la homeostasis a fin de restaurarlos mediante **intervenciones nutricionales personalizadas**. Así, paralelamente al creciente conocimiento sobre el metabolismo humano, el uso de estas tecnologías ha permitido mapear elementos de diferentes vías metabólicas que se alteran en las enfermedades humanas. Ejemplos de ello se encuentran en enfermedades muy prevalentes, como la resistencia a la insulina, una de las enfermedades más frecuentes relacionadas con la obesidad.

Las nuevas dietas personalizadas fueron implementadas en estudio clínicos dividiendo los participantes en 3 grupos de intervención distintos, Dieta control (CT), dieta personalizada (PN) y plan personalizado (PP) (sección 3.2) (Figura 7):

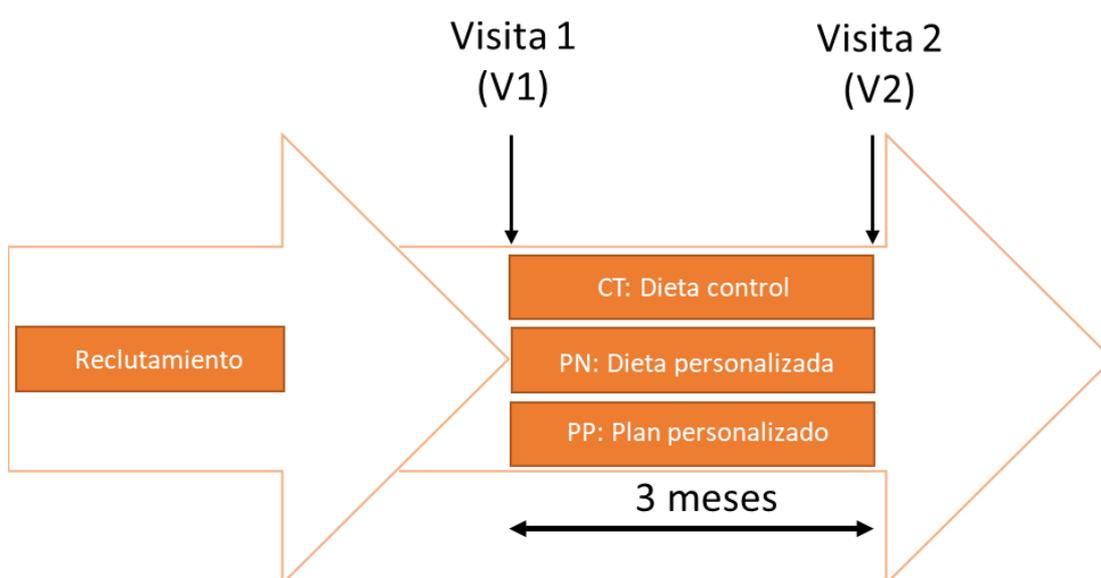


Figura 7 Diseño experimental de las intervenciones dietéticas llevadas a cabo durante el proyecto PREVENTOMICS.

Una de las variables analizadas fueron los cambios en la microbiota después de la intervención (V2) dietética en comparación con la línea de basal del estudio (V1).

3.2. Estudios de intervención en humanos

Se han llevado a cabo en 3 estudios piloto en diferentes localizaciones geográficas de Europa (España, Polonia, Reino Unido). En cada uno de estos estos 3 estudios de intervención se analizaron el metaboloma de los individuos mediante técnicas como la metabolómica o la proteómica, con el fin de detectar puntos de disfunción o de alteración de la homeostasis que pudieran ser restaurados mediante **intervenciones nutricionales personalizadas**. En base a la composición del metaboloma y los datos genéticos, los voluntarios fueron asignados a 5 clusters distintos; **lípidos, carbohidratos, estrés oxidativo, inflamación y microbiota**. Para cada cluster de intervención fueron diseñadas dietas específicas para incidir en las alteraciones detectadas y los voluntarios fueron distribuidos en 3 grupos de intervención distintos, Dieta control (CT), dieta personalizada (PN) y plan personalizado (PP).

En base a la asignación del cluster alterado en las muestras V1, para los grupos PN y PP fueron diseñadas dietas personalizadas con el objetivo de revertir el estado alterado, mientras que a los voluntarios del grupo CT se les asignaron dietas genéricas basada en las recomendaciones de dietistas y nutricionistas certificados. Al mismo tiempo, los voluntarios del grupo PP fueron sometidos a cuestionarios donde se registraban los cambios en el comportamiento y se les animaba a introducir cambios en su estilo de vida, no solo a través de la dieta.

Durante el proyecto PREVENTOMICS en las intervenciones nutricionales fueron reclutados un total de 600 voluntarios. La distribución poblacional de los voluntarios no es equitativa entre los 3 pilotos. En el caso del piloto España se priorizó la inclusión de personas normopeso mayoritariamente mientras que en los otros dos pilotos se priorizó la inclusión de personas con obesidad abdominal. Los detalles de los criterios de inclusión de cada uno de los pilotos se pueden consultar en la sección 7 (ANEXOS). La proporción de mujeres fue superior a la de los hombres (70,2% vs 29,8%). También la proporción de voluntarios con sobrepeso u obesidad es mayor en comparación a las personas normo peso reclutadas (84,2% vs 15,8%). Los detalles del reclutamiento en base a género y peso se puede consultar en la Tabla 2.

Tabla 2 Distribución de los voluntarios reclutados en base a la categoría del IMC y el género.

Categoría IMC	Género		Todos
	Hombres	Mujeres	
Normo peso	33	62	95 (15.8 %)
Sobrepeso	47	153	200 (33.3%)
Obesidad	99	206	305 (50.8 %)
Todos	179 (29.8 %)	421 (70.2 %)	600

En cada visita (V1 y V2) se recogieron muestras biológicas de plasma, urina, saliva y heces. A partir de estas muestras biológicas ha sido posible analizar el estado metabólico, el patrón genético basado en SNPs, los biomarcadores de ingesta y **la microbiota intestinal**.

En esta tesis, el análisis principal se centra en la caracterización de la microbiota intestinal y el impacto de las dietas personalizadas en su modificación, trabajo que ha sido realizado por el doctorando. No obstante, también se han podido realizar algunos análisis de asociación entre las diferentes ómicas previamente citadas, especialmente con el perfil metabólico de los voluntarios utilizados para la caracterización de los clusters de afectación y las variables antropométricas.

3.2.1. Metaboloma de los voluntarios y los “global scores”

Utilizando el conocimiento previo y la literatura científica, EURECAT, el socio coordinador del proyecto, seleccionó una serie de metabolitos y asignaron un valor asociado a la importancia y peso de cada metabolito para cada uno de los 5 clusters de afectación (sección 3.2), denominado *global score*. De esta forma, para cada *cluster* de afectación se seleccionaron una serie de metabolitos dando más peso a los denominados “*gold standard biomarkers*”.

Tras analizar todos los metabolitos de la Tabla 3, se calcularon los *global scores* numéricos de afectación para cada cluster. En base a los valores obtenidos, cada voluntario fue asignado a un cluster en función del cluster más afectado en base a los valores obtenidos. Cuanto mayor fuera el valor obtenido, más afectado estaba ese cluster en concreto, por consiguiente, las dietas personalizadas fueron diseñadas para intentar revertir la afectación de cada cluster en particular. Tras calcular los valores de afectación, 227 voluntarios fueron asignados al cluster carbohidratos, 197 al cluster inflamación, 109 al cluster estrés oxidativo, 43 al cluster lípidos y 24 al cluster microbiota.

Tabla 3 Clasificación de los biomarcadores metabólicos. La lista completa de los biomarcadores en relación al cluster metabólico asignado. Resaltado en amarillo, los biomarcadores “gold standard”.

Carbohidrato (227)		Lípidos (43)		Inflamación (197)		Estrés oxidativo (109)		Microbiota (24)	
1	Glucosa	1	LDL	1	CRP	1	8-iso-PGF2 α	1	TMA
1	HOMA-IR	2	Colesterol total	1	N-acetilglicoproteínas	2	LDLox	2	Betaina
1	Glutamato	3	PUFAs (total)	1	MCP-1	2	Ácido Úrico	2	Cholina
1	Ácido úrico ‡	4	HDL	2	TNF α	3	Alantoína	3	DMA
2	Leptina	5	Ácidos grasos saturados (SFAs)	3	IL-6	4	Betaina	4	Dimetilglicina
2	Adiponectina	6	Triglicéridos	4	IL-10	5	Pseudouridina	5	LBP
2	Insulina	7	MUFAs (total)	5	Ácidos grasos saturados (SFAs)	6	Dimetilglicina	6	Succinato
2	Tirosina	8	LPCs (total)	6	Soluble ICAM1	6	Metionina	6	Lactato
3	Propionilcarnitina	9	Ácido linoleico	7	LPCs (total)	7	Glicina	7	Acetato
3	Lactato	10	Ácido Docosahexaenoico	7	LBP				
3	Valina	10	Ácido Oleico	8	Ácido Docosahexaenoico				
3	Leucina	10	Colina	8	CD14 Soluble				
3	Isoleucina	11	3-hydroxibutirato	9	Ácido linoleico				
3	Fenilalanina	11	Propionilcarnitina	10	PUFAs (total)				
4	Glutamina	12	Adiponectina						
		12	Leptina						

3.2.2. Recolección de las muestras fecales

A cada participante se le ofreció la opción de donar voluntariamente una muestra fecal para el análisis de la microbiota intestinal y para el FMT del modelo animal.

En total, 264 voluntarios del estudio piloto en Polonia donaron una muestra fecal en la visita 1 (V1) y 167 voluntarios en la visita 2 (V2), 97 voluntarios abandonaron el estudio. Para el piloto español, 173 voluntarios entregaron muestras para la V1 y 132 para la V2, con un abandono de 41 voluntarios. En el caso de Reino Unido, 36 voluntarios entregaron una muestra a V1 y 21 a V2, con un abandono de 15 voluntarios.

Cada voluntario recibió dos tubos de recogida, uno para la secuenciación y otro para el trasplante fecal. El tubo utilizado para la secuenciación contenía DNA/RNA Shield (R1101 ZymoResearch) para estabilizar el ADN hasta el momento del análisis. El

segundo tubo contenía un tampón PBS con 20% de glicerol preparado en condiciones anaeróbicas y burbujeado con gas Argón. Las muestras conservadas en PBS con 20% de glicerol se congelaron inmediatamente a -20°C y se transportaron a las instalaciones del hospital en 24 horas bajo refrigeración. En el hospital, las muestras se congelaron a -80°C y se enviaron en hielo seco al laboratorio.

3.2.3. Extracción de ADN y secuenciación Illumina

El ADN genómico total de la muestra fecal se extrajo utilizando el kit ZymoBIOMICS DNA Miniprep (ZymoResearch) siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración de ADN se calculó con Qubit 4.0 utilizando el Qubit dsDNA HS (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA). El ADN se almacenó a -80 °C y se envió en hielo seco a un servicio externo de secuenciación hasta la secuenciación del amplicón del gen 16S rRNA.

La región objetivo para la secuenciación fue la región V3-V4 del gen 16SrRNA bacteriano. Los amplicones se amplificaron por PCR utilizando un conjunto de cebadores degenerados:

337FP1 GACTCCTACGGGAGGCWGCAG
337FP2 NGACTCCTACGGGAGGCWGCAG
337FP3 NNGACTCCTACGGGAGGCWGCAG
337FP4 NNGACTCCTACGGGAGGCWGCAG

805RP1 GACTACHVGGGTATCTAATCC
805RP2 NGACTACHVGGGTATCTAATCC
805RP3 NNGACTACHVGGGTATCTAATCC
805RP4 NNGACTACHVGGGTATCTAATCC

Se comprobó la longitud y la calidad de los amplicones utilizando el kit Agilent DNA 1000 Analysis (Agilent Technologies) en el sistema Agilent 2100 Bioanalyzer. Las bibliotecas generadas se cuantificaron con Qubit 4.0 utilizando el kit Qubit dsDNA HS (High Sensitivity) según las instrucciones del fabricante (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA). Las bibliotecas generadas se normalizaron a la misma concentración equimolar y posteriormente se secuenciaron utilizando una plataforma Illumina Miseq con una configuración de 2x300 pares de bases.

3.2.4. Análisis bioinformático y estadístico

El análisis bioinformático y bioestadístico se realizó utilizando la plataforma QIIME 2 [108] en combinación con el entorno de programación R versión 3.6.1 (<https://www.r-project.org/>). La versión de QIIME2 utilizada fue qiime2 2019.10. Las secuencias se desmultiplexaron utilizando q2-demux. Las secuencias se filtraron y se eliminaron las quimeras usando Dada2 [109]. Se obtuvieron las Variantes de Secuencia de Amplicones (ASV) con Dada2. Las ASV se alinearon y se utilizaron para crear los árboles filogenéticos utilizando maafft fastree [110] qiime phylogeny align-to-tree-mafft-fasttree. Se calcularon las métricas de betadiversidad Weighted Unifrac [111] y BrayCurtis utilizando q2-core-metrics-diversity. Los valores p se ajustaron para las pruebas de multi-hipótesis utilizando la tasa de descubrimiento falso de Benjamin Hochberg (FDR). La asignación taxonómica de las secuencias se realizó utilizando q2-feature-classifier classify-consensus-vsearch en contra de la base de datos de ARNr Silva [112].

Las secuencias filtradas y clasificadas taxonómicamente se importaron en Rstudio utilizando el paquete qiime2R (<https://github.com/jbisanz/qiime2R>).

La mayoría de los análisis realizados en Rstudio se llevaron a cabo utilizando el paquete microeco [113] combinado con otros paquetes como phyloseq [114] o vegan [115].

Los ASVs obtenidos fueron agrupados a nivel de OTUs con una similitud del 99,9% utilizando VSEARCH [116].

Las representaciones gráficas de las abundancias relativas y los mapas de calor se generaron a partir de las funciones trans_abund. Los gráficos de Venn se generaron utilizando las funciones trans_ven. Los análisis de diversidad alfa y beta se generaron utilizando las funciones trans_alpha y trans_beta, respectivamente. Para los análisis diferenciales se utilizó random forest [117] y pruebas no paramétricas.

Materiales y métodos

Para la búsqueda de biomarcadores de la microbiota intestinal, asociados a la obesidad, se realizó un análisis de proyección a la estructura latente discriminante (PLS-DA), para predecir el IMC en función de la composición de la microbiota intestinal utilizando el paquete mixOmics en el entorno de programación R. El PLS-DA es un método de análisis multivariante que permite identificar relaciones entre variables X (composición de la microbiota) e Y (IMC). Se realizó una validación cruzada para evaluar la precisión y la capacidad predictiva del modelo PLS-DA. Se calcularon las variables de importancia en la proyección (VIP) para identificar las bacterias más relevantes para predecir el IMC.

3.2.5. Análisis metabólico

La determinación de SCFAs (es decir, ácido acético, ácido propiónico, ácido butírico, ácido valérico, ácido caproico, ácido heptanoico, ácido isobutírico, ácido 2-metilbutírico y ácido isovalérico) y BCAAs (es decir, valina, leucina e isoleucina) se llevó a cabo por GC-MS. Se añadieron 1000 μL de NaOH acuoso 5 mM que contenía IS (5 $\mu\text{L mL}^{-1}$ de ácido caproico-D3) a 100 mg de heces húmedas, luego se homogeneizó la muestra durante 10 min y se centrifugó (13200 x g durante 20 min a 4 °C). Se transfirieron 500 μl de sobrenadante fecal a un tubo falcon y se añadieron 300 μl de agua. Las muestras se derivatizaron utilizando propanol:piridina y propilcloroformato en un baño de ultrasonidos, seguido de una extracción en dos pasos en n-hexano. El análisis por GC-MS se realizó con un sistema GC Agilent 7890B acoplado a un detector cuadrupolar de espectrometría de masas Agilent 5977A (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE.UU.) que funcionaba en modo de monitorización de iones seleccionados (SIM) (ácido acético m/z 61, ácido propiónico m/z 75, ácido butírico m/z 89, ácido valérico m/z 103, ácido caproico m/z 117, ácido heptanoico m/z 131, ácido isobutírico m/z 89, ácido 2-metilbutírico m/z 103, y ácido isovalérico m/z 85, valina m/z 158, leucina m/z 172, e isoleucina m/z 172). Las separaciones se realizaron utilizando una columna capilar HP-5 MS recubierta con 5% de fenil-95% de metilpolisiloxano (30 m x 250 μm i.d., 0,25 μm de espesor de película, Agilent J & W Scientific, Folsom, CA, USA), utilizando inyección en modo split (10:1). La cuantificación se basó en curvas de calibración externas obtenidas a partir del análisis de diluciones seriadas de una solución de trabajo de los metabolitos. Una muestra de control de calidad (QC) preparada mediante la mezcla de muestras derivatizadas se analizó periódicamente en el lote analítico aleatorio para supervisar el rendimiento del instrumento. Las concentraciones de SCFAs y BCAAs fecales se normalizaron al peso de la muestra.

3.3. Modelo animal in vivo; puesta a punto

3.3.1. Diseño experimental

Los animales fueron divididos en 3 grupos de estudio; Control sin antibiótico ni trasplante fecal (CNT), Control tratado con antibiótico sin trasplante fecal (CNT_ABX) y ratones que recibieron antibiótico más trasplante fecal de voluntarios humanos (FMT). Los voluntarios humanos fueron anonimizados y se le entregaron un código a cada uno de ellos, (1P, 1R, 1S, 1T, 1W, 1Z, 1dd, 1N, 1Ndif y 1O). En total, 10 voluntarios, 5 hombres y 5 mujeres que fueron divididos en 6 voluntarios para el experimento 1 y 4 voluntarios para el experimento 2.

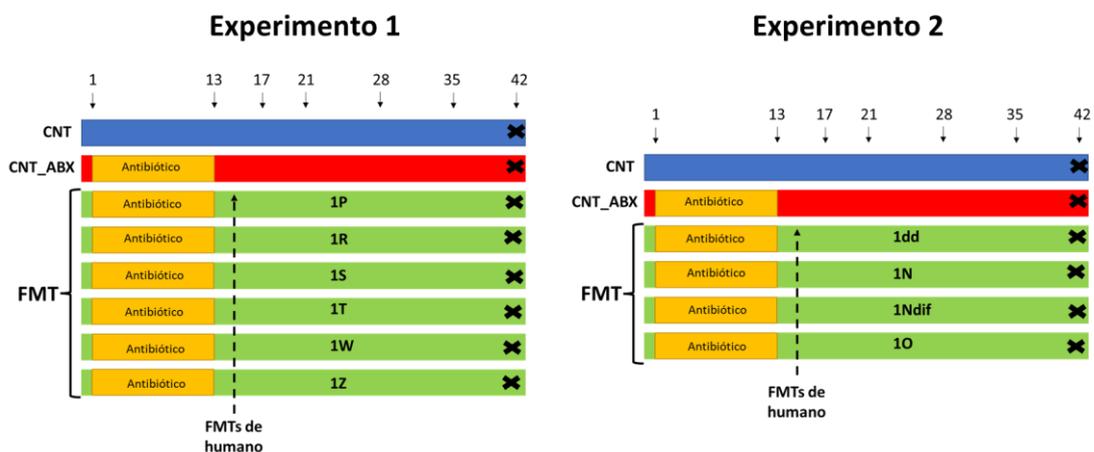


Figura 8 Diseño experimental de la puesta a punto del modelo animal PGF con FMT.

Para el experimento 1 se utilizaron 5 animales por grupo y para el experimento 2 fueron utilizados 4 animales por grupo. Las muestras de las mujeres fueron trasplantadas a animales hembra y las muestras de los hombres fueron trasplantadas a animales macho debido a que algunos estudios demuestran que existen diferencias en la composición de la microbiota entre hombres, mujeres y los metabolitos generados en función del sexo [118] [119]. En este caso se optó por realizar trasplante individualizados y no *pools* de muestras, ya que uno de los objetivos era conocer cómo se implantaba la microbiota humana en el ratón y si esa implantación era dependiente de voluntario. La administración del FMT se realizó por sonda oral mediante una única administración.

Para ambos experimentos se recogieron muestras fecales en 7 puntos temporales distintos, (día 1, 13, 17, 21, 28, 35 y 42). Tal y como se detalla en la Figura 7. A día 42, a los animales se les aplicó la eutanasia por inhalación de CO.

3.3.2. Recuento y viabilidad de las bacterias

Las muestras humanas fueron facilitadas por la empresa Microviable SL. Microviable tiene un sistema de recolección patentado llamado GutAlive® que genera una atmósfera anaerobia garantizando la viabilidad de las especies bacterianas sensibles al oxígeno incluyendo las bacterias anaerobias estrictas.

Los recuentos de bacterias totales/ ml se realizó utilizando una cámara Petroff-Neubauer. De los 9 compartimentos de la cámara se hicieron recuentos en 5 de ellas utilizando las diagonales de la cámara y el resultado de cuantificación fue la media de los 5 recuentos para cada muestra individual.

Para determinar el porcentaje de viabilidad de cada una de las muestras se utilizó el kit de tinción específico LIVE/DEAD™ (L7012, Invitrogen™) con sondas fluorescentes. Se escogieron 5 campos aleatorios de cada muestra repartidos homogéneamente por la totalidad de la muestra y se realizó un recuento de bacterias marcadas con la sonda verde versus bacterias marcadas con la sonda roja. La media de los recuentos de los campos fue utilizada para determinar el porcentaje de viabilidad de cada muestra.

Los valores de recuentos Petroff-Neubauer y la tinción Live/Dead se combinaron para obtener los valores de concentración de bacterias viables / ml de muestra.

3.3.3. Ratones

En el estudio se utilizaron ratones C57BL/6 de 8 semanas de edad.

Los ratones han sido estabulados con ventilación independiente y en condiciones de bioaislamiento hasta el final del ensayo; todo el material, alimento (dieta estándar D12450B, 10 kcal% fat; Research Diets, Inc.) y agua de bebida con el que entraron en contacto los animales se esterilizó previamente.

Este ensayo se ha llevado a cabo íntegramente siguiendo las normas del procedimiento “*Estudio de la microbiota humana en ratones*”, aprobado el año 2018 por la Generalitat de Catalunya, Departament de Territori i Sostenibilitat, Direcció General de Polítiques Ambientals i Medi Natural con el número 9201.

Puesto que algunos estudios habían reportado pérdidas de peso importantes durante la administración de antibióticos en ratones [120], se monitorizó el peso de los animales durante los experimentos y al finalizar los experimentos se obtuvieron los pesos de los siguientes órganos: hígado, bazo e intestino. En este caso, era importante conocer si los procesos de administración de cóctel de antibióticos y el trasplante fecal no provocaban

mortalidad, estrés o cambios en la morfología de los animales. Los resultados se analizaron por separado para hembras y machos ya que el peso del cual partían era diferente. Los animales se monitorizaron periódica e individualmente para evaluar la implantación y estabilidad de microbioma humano. El peso de los animales fue anotado a lo largo del experimento. A día 41 se tomaron y preservaron muestras de sangre por punción cardíaca, de las cuales se obtuvo plasma; a punto final (día 41) se eutanasió a los animales y se registró el peso de hígado, intestino y bazo.

3.3.4. Tratamiento con antibiótico

El cóctel de antibióticos para este pretratamiento se compuso por: vancomicina (50 mg/l), metronidazol (100 mg/l), neomicina (100 mg/l), estreptomina/penicilina (50 mg/l; 100 U/ml), gentamicina (170 mg/l), ciprofloxacino (125 mg/l), ceftazidima (100 mg/l) y bacitracina (1 g/l). Este coctel fue administrado en el agua de bebida de los animales. Finalizado este tratamiento (día 15), se recogieron muestras de heces de cada animal con las que se certificó mediante qPCR que la carga microbiana total se había reducido eficazmente. En caso contrario, el tratamiento se prolongó hasta un máximo de 14 días adicionales. De no alcanzar los valores deseados en este periodo, los animales fueron excluidos de estudio.

3.3.5. Extracción de ADN

Todas las muestras de heces generadas se recogieron y se preservaron en buffer DNA/RNA shield (R1100, ZymoBIOMICS). Para la extracción de ADN se utilizó aproximadamente 100mg de heces previamente recogidas. La extracción se realizó mediante el kit ZymoBIOMICS DNA Miniprep Kit (D4300) siguiendo las instrucciones del fabricante. La calidad de estas muestras y el contenido de ADN se cuantificó utilizando el kit Qubit® dsDNA HS Assay (LifeTechnologies) en un fluorímetro Qubit 3.0.

En total, se extrajeron 597 muestras (n=307 fase 1; n=290 fase 2).

3.3.6. Determinación de carga bacteriana mediante qPCR

La carga total bacteriana se determinó mediante qPCR (Roche LightCycler 480) utilizando primers universales para el gen 16S rRNA; Forward –

AAACTCAAAGKAATTGACGG y Reverse – CTCACRRCACGAGCTGAC. Las condiciones de amplificación para cada muestra fueron: 5 µl SYBR Green I Mastermix Takara Bio, 4 µl de DNA extraído ,0.5 µl Forward 300 µM primer ,0.5 µl Reverse 300 µM primer

Para la determinación total de las copias del 16S rRNA se utilizó una recta patrón generada a partir de un cultivo puro de *Escherichia coli* previamente cuantificada.

3.3.7. Preparación de las librerías 16S y secuenciación

Las muestras de ADN extraídas fueron secuenciadas en el centro Génome Quebec (<https://www.genomequebec.com/>).

La diana del amplicón escogido fue la región V3-V4 de las regiones hipervariables de gen 16SrRNA. Los amplicones de esta región fueron amplificados mediante PCR. La longitud y calidad de los amplicones fue verificada utilizando Agilent DNA 1000 Analysis kit (Agilent Technologies) en el Agilent 2100 Bioanalyzer system. Las librerías generadas fueron cuantificadas en el Qubit 4.0 utilizando el kit Qubit dsDNA HS (High Sensitivity) según las instrucciones de fabricante (Thermo Fisher Scientific). Las librerías fueron normalizadas a la misma concentración equimolar y posteriormente secuenciadas mediante la plataforma Miseq de Illumina con una configuración *pair-end* 2x300 pares de bases.

3.3.8. Análisis de datos y estadística

El análisis bioinformático y bioestadístico se realizó utilizando la plataforma QIIME 2 [108] en combinación con el entorno de programación R versión 3.6.1 (<https://www.r-project.org/>).

La versión de QIIME2 utilizada fue qiime2 2019.10. Las secuencias fueron demultiplexadas utilizando q2-demux y filtradas utilizando Dada2 [109]. Las secuencias que cumplían con los criterios de filtrado fueron alineadas y utilizadas para crear los árboles filogenéticos mediante maafft fastree [110]qiime phylogeny align-to-tree-mafft-fasttree. Las métricas de betadiversidad Weighted Unifrac [111] y BrayCurtis fueron estimadas mediante q2-core-metrics-diversity. Los valores p fueron ajustados para los test multi hipótesis mediante Benjamin Hochberg false Discovery rate (FDR). La asignación

taxonómica de las secuencias se realizó utilizando q2-feature-classifier classify-consensus-vsearch contra la base de datos Silva rRNA [112].

Las secuencias filtradas y clasificadas taxonómicamente fueron importadas a Rstudio utilizando el paquete qiime2R (<https://github.com/jbisanz/qiime2R>).

La mayor parte de los análisis realizado en Rstudio fue utilizando el paquete microeco [113] en combinación con otros paquetes como phyloseq [114] o vegan [115].

Las representaciones gráficas de abundancias relativas y heatmaps fueron generadas a partir de las funciones trans_abund. Los diagramas de ven se generaron mediante las funciones trans_ven. Los análisis de alfa y beta diversidad se generaron mediante las funciones trans_alpha y trans_beta respectivamente. Para los análisis diferenciales se ha utilizada random forest [117] y tests no paramétricos.

3.4. Modelo animal humanizado

3.4.1. Animales y diseño experimental

Un total de 81 ratones C57BL/6 de 40 semanas de edad fueron divididos en 9 grupos distintos. Los tres primeros grupos se consideraron grupos control en los que no se realizó ningún FMT. El primer grupo fue NO FMT Dieta CT, que siguió una dieta control durante todo el experimento. Los otros dos grupos control, NO FMT HFD y NO FMT HFD ABX fueron expuestos a una inducción de sobrepeso mediante una dieta alta en grasas (HFD), la única diferencia entre ellos fue la administración de antibióticos en el grupo NO FMT HFD ABX.

Los siguientes seis grupos V1 (HFD Cnt, HFD PN, HFD PP) y V2 (HFD Cnt, HFD PN, HFD PP) tras la inducción de sobrepeso y la depleción de la microbiota intestinal, recibieron FMT de los voluntarios que participaron en los estudios de intervención. Para evitar el sesgo geográfico y de género, fueron seleccionadas muestras del mismo piloto y sexo, en este caso, mujeres del piloto de Polonia, ya que al incluir voluntarios con sobrepeso y obesidad, encajaba mejor con la estrategia diseñada para el diseño experimental.

En este estudio, se descartó la estrategia de agrupación-“pooling” para el FMT. Se utilizaron muestras individuales de cada voluntario para el FMT. Cada muestra seleccionada se trasplantó a 3 animales individuales, utilizando 3 voluntarios diferentes para cada grupo (N = 9).

Se realizaron comparaciones pareadas para cada grupo V2 frente al grupo V1 y con los grupos de control. Los ratones se asignaron aleatoriamente a cada grupo después de la inducción del sobrepeso, excepto los del grupo NO FMT Dieta CT. Los detalles del diseño del estudio se muestran en la Figura 9.

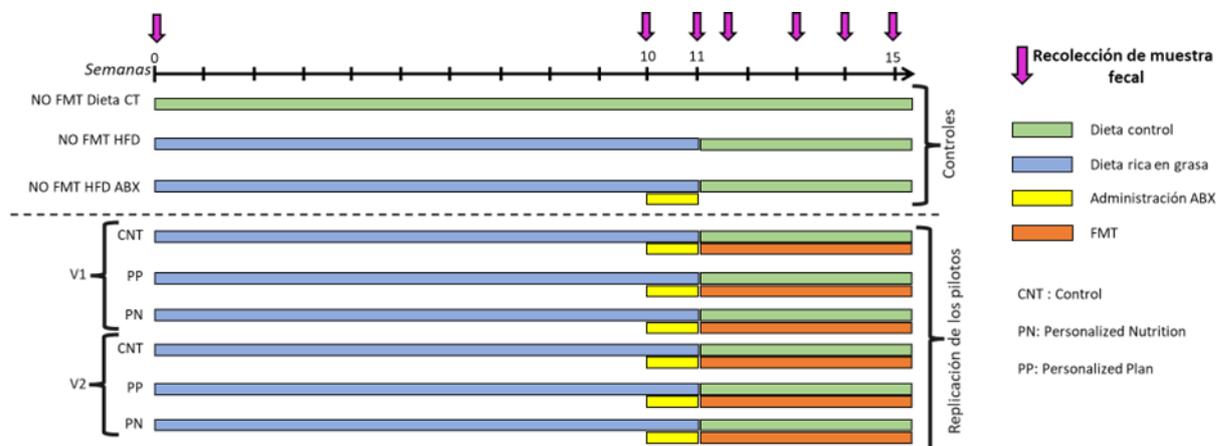


Figura 9 Diseño experimental llevado a cabo en el estudio del modelo animal durante el proyecto PREVENTOMICS

Los animales se aclimataron durante varias semanas antes del estudio. Se alojaron a una temperatura ambiente constante (20-24°C) y una humedad relativa (45-65%) bajo un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas (las luces se encendían a las 8:00 A.M.). La comida y el agua estaban disponibles ad libitum. Todos los procedimientos fueron revisados por el Comité Ético de Experimentación Animal del Parc Científic de Barcelona (PCB) y aprobados por la Generalitat de Catalunya (9201-P1).

A las 20 semanas de edad, los ratones que tenían que seguir la inducción de la obesidad fueron alimentados con una dieta alta en grasas (HFD, Western diet, D12079B, Research Diets, Lyngø, Denmark). Contenía más grasa (40% en comparación con el 10% en kcal), sacarosa (29,1% en comparación con el 0% en kcal) y colesterol [0,15% en comparación con el 0% (peso/peso)] en comparación con la dieta de control (D14020502, Research Diets). 9 ratones fueron alimentados con la dieta de control. Ambas dietas se suministraron durante 10 semanas.

Después (a las 30 semanas de edad), a los grupos experimentales a los que se les realizó un trasplante de microbiota fecal (FMT) y también a un grupo de control que no recibió FMT, se les administró por vía oral una combinación de cuatro antibióticos: ampicilina (VWR), neomicina (Sigma-Aldrich), metronidazol (Sigma-Aldrich) y vancomicina (Sigma-Aldrich) por vía oral durante 7 días (10 mg de cada antibiótico por ratón y día)

[121]. Durante la administración de los antibióticos, se suministraron las dietas control y HFD a los respectivos grupos.

A las 35 semanas de edad, los ratones fueron eutanasiados por inhalación de dióxido de carbono y se recogieron muestras de sangre por punción cardíaca para obtener plasma, y muestras de los siguientes órganos: hígado, bazo, intestino delgado e intestino grueso.

Hubo 3 ratones que no terminaron el estudio, los cuales fueron sacrificados por razones éticas o se les encontró muertos antes de terminar el estudio.

3.4.2. Registro del peso corporal y órganos

Para cada ratón, se registró el peso corporal semanalmente.

El consumo de alimentos por grupo se registró semanalmente, para supervisar su comportamiento alimentario a lo largo del periodo experimental.

Se pesaron las muestras de hígado y bazo. Además, el hígado se dividió en tres partes: una se congeló (para la extracción de ARN), otra se congeló y se incrustó en OCT (para la tinción con rojo de aceite) y otra se fijó con formalina (24 horas) y se procesó para obtener bloques de tejido incrustados en parafina (para la tinción con H&E). Se midió la longitud del intestino delgado y se congelaron muestras de tejido del intestino delgado y grueso (para la extracción de ARN).

3.4.3. Colección de las muestras fecales

Las muestras fecales se recogieron siempre en el mismo horario, por la mañana entre las 8:00 y las 9:00 horas. Unos 100 mg de heces de cada ratón se almacenaron en 0,5 DNA/RNA Shield R1100-250 (ZymoResearch) a -80 °C.

3.4.4. Parámetros bioquímicos en plasma

Se estudiaron los siguientes parámetros en las muestras de plasma del grupo con dieta control y del grupo control con dieta HFD (sin antibióticos) tras la inducción de la obesidad: Triglicéridos, colesterol total, colesterol LDL, colesterol HDL y glucosa. Los ratones estuvieron en ayuno durante 5 horas antes de la extracción de sangre de la vena facial. Además, se analizaron los parámetros bioquímicos en todos los grupos al final del estudio. En este caso, los ratones no estaban en ayunas y la sangre se extrajo de la punción cardíaca. Así, en este caso, se midió la hemoglobina glicosilada en lugar de la glucosa. Las muestras se analizaron con el SpinLab100 (Spinreact™).

3.4.5. Transplante de microbiota fecal

La administración de FMT se realizó por sonda oral utilizando 250 µl de las muestras humanas de microbiota. En total, se realizaron 5 FMT: inicialmente cada 2-3 días (3 FMT en total), y la cuarta y quinta FMT semanalmente. Tras el primer FMT, a todos los animales se les administró la dieta control, que se mantuvo hasta el final del estudio.

3.4.6. Cuantificación del 16S rRNA mediante qPCR

Se hicieron diluciones seriadas en tampón PBS a partir de 176 ng/µL de ADN genómico puro de *E. coli* (equivalente a de 10⁹ a 10 bacterias/mL tras el recuento con cámara de Petroff-Neubauer) para obtener la ecuación de la curva estándar para las copias del gen 16S ARNr con los cebadores universales de 16S ARNr utilizados. Las muestras se ejecutaron por triplicado en la misma placa. La detección del producto de la PCR se llevó a cabo con el LightCycler 480 (Roche) utilizando el colorante de unión al ADN SYBR Green I (TB Green Premix Ex Taq II (Tli RNase H Plus)). Las condiciones estándar de los ciclos de la qPCR en dos pasos fueron las siguientes: predesnaturalización a 95 °C durante 5 minutos, 40 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 15 s y un paso de recocido/extensión a 60 °C durante 1 minuto.

3.4.7. Cultivo de bacterias anaerobias totales

Los pellets fecales se analizaron antes y después del tratamiento con antibióticos para comprobar la reducción de la carga bacteriana debido al tratamiento con antibióticos. Las heces se diluyeron en PBS mediante diluciones seriadas desde la inicial hasta 10⁻⁷ y se sembraron en medio Columbia Agar (CA) (Sigma Aldrich) en condiciones anaeróbicas. El CA es un medio enriquecido no selectivo. Se complementa con vitamina K1 y hemina para facilitar la recuperación de las bacterias anaerobias problemáticas. Las placas se incubaron durante 96 horas en atmósfera anaeróbica. Los recuentos finales se realizaron a la dilución que permitía contar entre 10-150 colonias, los resultados se presentan en UFC/g.

3.4.8. Metabolómica

Para el análisis metabolómico se seleccionaron un total de 114 muestras de plasma de ratón. Fueron seleccionados 3 puntos; el primer punto a día 0 (n = 18), el día en el que los

animales llegaron al estabulario, antes de iniciar cualquier administración. El segundo punto a día 78 (n = 18), cuando se finalizó la inducción de la obesidad, y el tercer punto a día 103, a final del experimento (n = 78).

Las muestras fueron analizadas por métodos complementarios no dirigidos y dirigidos con el objetivo de mejorar al máximo la cobertura metabólica.

Las muestras se analizaron utilizando métodos analíticos tanto específicos como no específicos. El análisis metabólico dirigido se centró en las rutas del triptófano, la fenilalanina y los aminoácidos. El análisis de aminoácidos se llevó a cabo mediante UPLC-MS/MS después de un paso de derivatización (AccQTag Ultra Derivatization, Waters). El método permitió la cuantificación de Arginina, Anserina, Metilhistidina, Histidina, Asparagina, Carnosina, Hidroxiprolina, Fosfoetanolamina, Serina, Taurina, Aspártico, Citrulina, Etanolamina, Ácido Glutámico, Glicina, Sarcosina, β -Alanina, treonina, hidroxilisina, glutamina, ácido γ -aminobutírico, alanina, lisina, aminoadípico, ácido β -aminobutírico, prolina, cistina, cistationina, metionina, ornitina, tirosina, ácido α -aminobutírico, valina, leucina, fenilalanina y triptófano. Se utilizó el kit de derivatización AccQTag Ultra (Waters) de acuerdo con el protocolo del fabricante, como se describe a continuación. Las muestras se descongelaron en hielo, se homogeneizaron en vórtex durante 10 s y se centrifugaron a 10.000 g (4 °C, 10 min). A continuación, se añadieron 70 μ L de agua (LC-MS Optima, Fisher Scientific) a 5 μ L de muestra y se agitaron en vórtex durante 10 s. Se mezclaron 10 μ L de sobrenadante con 70 μ L de tampón de borato AccQTag Ultra y 10 μ L de mezcla de solución IS 1 μ M. A continuación, se añadieron 20 μ L de reactivo AccQ-Tag (6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidilcarbamato en acetonitrilo) y se dejó que la reacción se desarrollara durante 10 min a 55 °C. Finalmente, las muestras se transfirieron a una placa de 96 pocillos y se analizaron por UPLC-MS/MS. El análisis cuantitativo de los aminoácidos se realizó empleando un sistema UPLC 1290 Infinity de Agilent equipado con una columna UPLC CORTECS C18 (150 \times 2,1 mm, 1,6 μ m) de Waters acoplada a un sistema MS de triple cuadrupolo Agilent 6460 que funcionaba en modo ESI+. El caudal se ajustó a 500 μ L min⁻¹ ejecutando un gradiente binario con 0,1% v/v de HCOOH en H₂O y 0,1% de HCOOH en CH₃CN. Las temperaturas de la columna y del automuestreador se seleccionaron a 55 y 4 °C respectivamente, y el volumen de inyección fue de 3 μ L. Las condiciones de ionización por electrospray fueron capilar 4000 V, temperatura del gas 300 °C, flujo de gas 10 L/min, nebulizador 45 psi, temperatura del gas de la vaina 300 °C, flujo del gas de la vaina 12 L/min y voltaje de la boquilla 500 V.

Un segundo análisis centrado en los metabolitos incluidos en las vías del triptófano y la fenilalanina se llevó a cabo mediante UPLC-MS/MS, y consistió en la cuantificación de aminofenol, ácido antranílico, ácido 3-hidroxi-antránico, triptamina, indol-3-acetamida, fenilalanina, serotonina, ácido cinúrico, Triptófano, ácido xanturénico, cinurenina, 5-hidroxi-L-triptófano, hidroxiquinurenina, N'-formilquinurenina, ácido indolelático, p-tirosina, fenilacetilglutamina (PAGN), guanina, guanosina, 8-hidroxi-deoxiguanosina (8-OHdG), S-adenosilhomocisteína (SAHC), S-adenosilmetionina (SAM) e hipoxantina. El análisis UPLC-MS se llevó a cabo como se describe en este estudio [122] con pequeñas modificaciones. La solución estándar interna incluía hidroxitriptófano-D4, L-quinurenina-D4, indol-D5-3-acetamida, 4-cloro-quinurenina-13C2, 15N, 6-hidroxi-melatonina-D4, ácido cinúrico-D5, PAGN-D5, fenilalanina-D5, serotonina-D4, triptamina-D4, triptófano-D5, ácido xanturénico-D4 y fenilalanina-D5 (1000 nM cada uno) en CH₃CN: H₂O (2:98) (0.1% v/v HCOOH). Las muestras se analizaron con una columna Acquity HSS T3 C18 (100 x 2,1 mm, 1,8 μm). Las fases móviles fueron H₂O (0,1% v/v HCOOH) (A) y (0,1% v/v HCOOH) CH₃CN (B). El gradiente de elución fue la fase B mantenida al 2% de 0 a 0,5 min; luego se incrementó linealmente al 45% durante los siguientes 5 min. A continuación, la fase B se incrementó hasta el 90% en 0,2 min, seguido de un rápido retorno a las condiciones iniciales entre 5,7 y 6 min, que se mantuvieron durante 1,5 min para el reequilibrio de la columna. El volumen de inyección, el caudal y la temperatura de la columna se fijaron en 3 μL, 550 μL/min y 55 °C, respectivamente. La temperatura del automuestreador fue de 6 °C. Las condiciones de ionización por electrospray fueron capilar de 2,9 kV, cono de 25 V, temperatura de la fuente de 120 °C, y temperatura de desolvatación de 395 °C; los caudales de gas de cono de N₂ y de desolvatación fueron de 150 y 800 L/h, respectivamente.

El análisis no dirigido de las muestras se llevó a cabo mediante UPLC en fase inversa utilizando la columna Acquity BEH C18 (100 x 2,1 mm, 1,7 μm, Waters, Elstree, Reino Unido) en un cromatógrafo Agilent 1290 Infinity UPLC (Agilent). Las temperaturas del automuestreador y de la columna se ajustaron a 4 °C y 55 °C, respectivamente, y el volumen de inyección utilizado fue de 4 μL. La elución en gradiente se realizó a un caudal de 400 μL min⁻¹ de la siguiente manera: condiciones iniciales del 98% de la fase móvil A (H₂O, 0,1% v/v de HCOOH) seguidas de un gradiente lineal del 2 al 20% de la fase móvil B (CH₃CN, 0,1% v/v de HCOOH) en 3,5 min y del 20 al 95% de B en 4 min. La elución del 95% de la fase B se mantuvo durante 1 min y luego se utilizó un gradiente de 0,1 min para volver a las condiciones iniciales, que se mantuvieron durante 2,4 min adicionales.

Se realizó un lavado estándar de la aguja entre las inyecciones utilizando H₂O:CH₃CN (1:1) para reducir el arrastre del automuestreador entre las inyecciones. Los datos de MS de barrido completo de 50 a 1700 m/z se recogieron en un espectrómetro de tiempo de vuelo (TOF) cuadrupolar iFunnel Agilent 6550 (Agilent). Se seleccionaron los siguientes parámetros de ionización por electrospray positivo: temperatura del gas, 200 °C; gas de secado, 14 lmin⁻¹; nebulizador, 37 psig; temperatura del gas de cubierta, 350 °C; flujo del gas de cubierta, 11 l min⁻¹. La calibración automática de los espectros de MS durante el análisis se llevó a cabo utilizando como referencias los 149,02332,121,050873 y 922,009798 m/z, introduciendo un estándar de referencia en la fuente a través de una válvula de pulverización de referencia. Los datos obtenidos durante el acondicionamiento inicial de la columna se excluyeron del análisis de datos. El flujo de trabajo analítico para el análisis no dirigido de las muestras tuvo en cuenta toda la información necesaria para la GC/CC, incluyendo: pruebas iniciales de idoneidad del sistema, identificación de características de fondo/contaminantes y de arrastre, evaluación del acondicionamiento del sistema, adquisición de MSMS para la anotación de metabolitos, y detección y/o eliminación de efectos dentro del lote que afectan a la intensidad de la MS y/o al rendimiento cromatográfico. Se generaron tablas de picos utilizando XCMS/CAMERA para cada lote analizado. Los indicadores del rendimiento cromatográfico, como el tiempo de retención, la contaminación cruzada y la precisión de m/z, se extrajeron de los conjuntos de datos generados por XCMS. La información de RT y MSMS de cada lote se utilizó para la anotación de metabolitos. El preprocesamiento y análisis de los datos se llevó a cabo utilizando XCMS/CAMERA en R y scripts de MATLAB desarrollados internamente.

3.4.9. Análisis estadístico

Para los resultados de la variación del peso corporal, la ingesta de alimentos y los parámetros bioquímicos, los datos se presentan como la media \pm SEM (n=7-9). Los resultados se evaluaron mediante ANOVA de una o dos vías seguido de la prueba de Tukey, o la prueba t de Student no apareada (referenciada en las leyendas de las figuras) utilizando Graphpad Prism 9. Las diferencias con valores p <0,05 se consideraron estadísticamente significativas.

Para el preprocesamiento de los datos UPLC-MS y UPLC-MSMS no dirigidos, los cromatogramas centroides en bruto se convirtieron al formato mzXML empleando

ProteoWizard (<http://proteowizard.sourceforge.net/>). La selección de los parámetros para la extracción de la tabla de picos y la alineación se basó en las distribuciones y desplazamientos observados de los tiempos de retención y los valores m/z de los SI y en resultados anteriores [123]. Se empleó el software XCMS (<http://metlin.scripps.edu/xcms/>) y CAMERA en R 3.6.1 para la generación de la tabla de picos utilizando los siguientes parámetros de entrada: método centWave para la detección de picos: rango m/z 70-1250, tolerancia de ppm = 15, ancho de pico=(5-20), snthr=6, diferencia mínima en m/z=0,01 Da. Los límites de los picos de la UPLC utilizados para la integración se hallaron mediante el descenso de los datos filtrados por el sombrero mexicano. La agrupación de los picos se realizó mediante el método de "densidad" utilizando mzwid=0,015 y bw=5. La corrección del tiempo de retención se realizó con el método "obiwarp". Tras la agrupación de los picos, se aplicó el método "fillPeaks" con los parámetros por defecto para rellenar los datos de los picos que faltaban. La integración automática mediante XCMS se evaluó en comparación con la integración manual mediante señales IS. El procesamiento posterior de los datos y el análisis estadístico se llevaron a cabo en MATLAB 2017b (Mathworks Inc., Natick, MA, EE. UU.) utilizando scripts escritos internamente (disponibles a través de los autores) y la PLS Toolbox 8.7 (Eigenvector Research Inc., Manson, WA, EE. UU.). Se eliminaron las características con un valor medio de área de pico en los QCs inferior a 3 veces el valor máximo observado en los blancos. La corrección del efecto dentro del lote se llevó a cabo utilizando el algoritmo de regresión de vectores de apoyo de control de calidad [124] y la biblioteca LIBSVM con los siguientes parámetros: rango $\epsilon=2:5\%$; rango gamma $10^0:5$; C = valor medio del 90% en QCs, tipo de validación cruzada para la optimización del modelo: LOOCV. La anotación de metabolitos se llevó a cabo como se describe [125] utilizando un enfoque DDA iterado. El PLS-DA se llevó a cabo en MATLAB utilizando datos autoescalados y LOOCV para la selección del número de variables latentes, y el número de muestras mal clasificadas como función objetivo. No se incluyó ninguna selección de características en el algoritmo para evitar sobrevalorar los resultados cuando no se dispone de un conjunto de validación [126] [127]. Para el análisis estadístico de la microbiota se utilizó QIIME2 [128] y R. La alfa y la betadiversidad, el PERMANOVA y el MANOVA se calcularon con el paquete microeco [113] de R. Para el análisis de la DAA, los recuentos de géneros se normalizaron con la transformación Centered-Log Ratio para tener en cuenta la composición de los datos. Para las comparaciones por pares: se utilizó la prueba t, con una significación no ajustada del 5% y para las comparaciones

múltiples: ANOVA, significación no ajustada 5% Los géneros significativos en V1 se eliminaron del análisis de V2. Para el estudio piloto de Polonia, filtramos los géneros a una abundancia mínima del 0,1% para eliminar el ruido de fondo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El apartado de resultados y discusión se divide en tres secciones. Cada una de ellas aborda uno de los tres objetivos principales expuestos en el apartado hipótesis y objetivos. En la sección 4.1, se presentan los resultados de la caracterización de la microbiota intestinal de los voluntarios normopeso, con sobrepeso y obesos de tres localizaciones geográficas distintas: España, Polonia y Reino Unido que fueron sometidos a distintas intervenciones dietéticas con el fin de mejorar su estado de salud. En la sección 4.2, se exponen los resultados de puesta a punto del modelo animal PGF con FMT utilizando muestras humanas de voluntarios sanos anonimizados en dos experimentos independientes. Finalmente, en la sección 4.3, se explican los resultados obtenidos del estudio realizado en el modelo animal PGF con FMT, con el objetivo de estudiar si la microbiota de los voluntarios que han seguido intervenciones dietéticas, es capaz de inducir cambios en el fenotipo obeso del modelo PGF.

4.1. Caracterización de la microbiota intestinal en tres estudios de intervención de dieta personalizada en relación a obesidad

La caracterización de la microbiota de los voluntarios, correspondientes a los 3 países con estudios de intervención, se realizó según los métodos descritos en el apartado 3.2.3. Se obtuvieron un total de 22 millones de secuencias, correspondientes a 758 muestras, con una media de 9000 secuencias por cada muestra. En total, se obtuvieron 20556 variantes de secuencia de amplicón (ASV) tras la agrupación utilizando DADA2 [109].

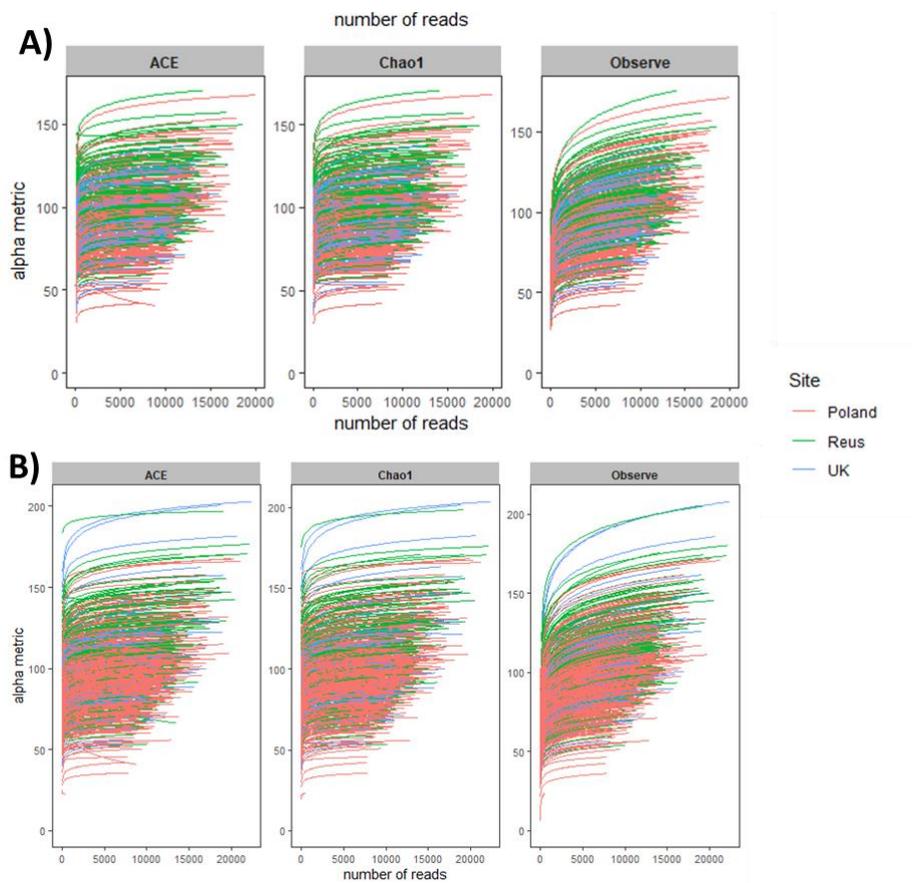


Figura 10 Índices de alfa rarefacción de las muestras de los pilotos para A) las muestras V1 y B) las muestras V2. Los índices de alfa diversidad utilizados son ACE, Chao1 y Observed diversity.

Los índices de alfa rarefacción permiten obtener una imagen global del desempeño de la secuenciación. En la Figura 10 se puede observar como a partir de 2000 secuencias por muestra, la alfa diversidad alcanza la curva de Plateau para prácticamente la totalidad de las muestras. En el caso de los análisis llevados a cabo para la caracterización de la microbiota intestinal, la rarefacción de las muestras se realizó a 6000 secuencias. Tal y como se puede observar en la Figura 10, a esa profundidad de secuencia, la rarefacción no influye en la pérdida de la alfa diversidad de las muestras.

4.1.1. Biomarcadores asociados a la obesidad

La inclusión, en los estudios de intervención, de personas con sobrepeso/obesidad y normo peso ha permitido obtener un rango amplio de la distribución del índice de masa corporal entre todos los voluntarios analizados. Las variables antropométricas asociadas a la obesidad como el IMC, el peso o la circunferencia de la cintura han sido incluidas en un análisis de correlación con los géneros bacterianos con el objetivo de determinar posibles biomarcadores en la microbiota asociados a la obesidad.

Los resultados obtenidos en los análisis de correlación entre los géneros bacterianos presentes en la microbiota de las 758 muestras muestran que 26 de los 321 géneros bacterianos presentes en el análisis presentan valores significativos de correlación con al menos una de las cuatro variables (IMC, peso, cintura y edad). Los 26 géneros con valores p más significativos se detallan en la Figura 11.

En este caso, se puede observar que, de las 26 correlaciones más significativas representadas, 20 de ellas mantienen la significación entre las muestras V1 y V2. Los otros 6 géneros conservan la misma tendencia, no obstante, pierden la significación estadística. Estos resultados parecen indicar una cierta robustez en cuanto al mantenimiento de las asociaciones entre parámetros asociados a la obesidad y las intervenciones nutricionales.

En la misma figura se incluyen las correlaciones de los géneros bacterianos con una variable no asociada a la obesidad, como la edad. Ningún género bacteriano se correlaciona significativamente con dicha variable.

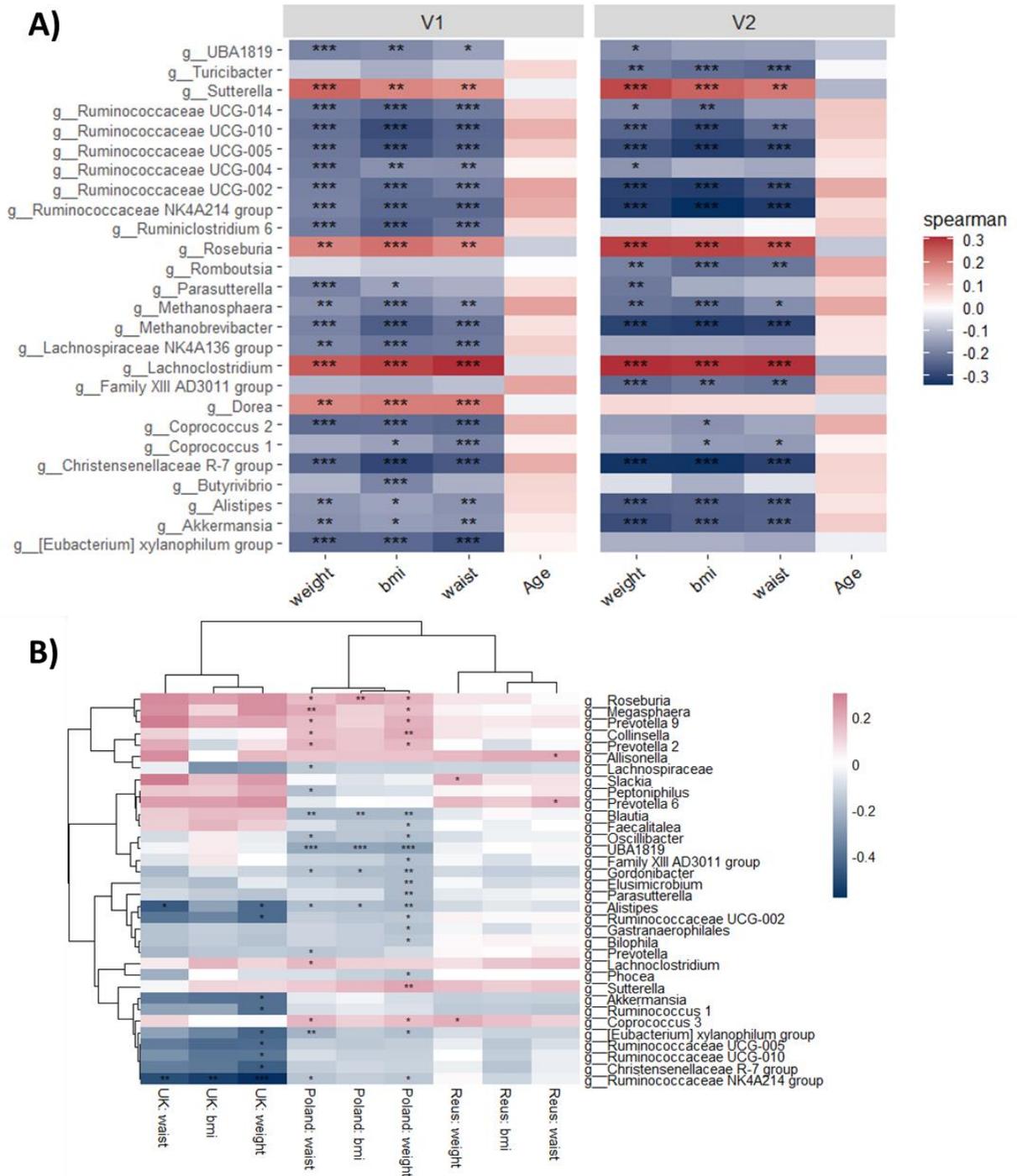


Figura 11 A) Mapa de calor representando las correlaciones de Spearman existentes entre géneros bacterianos presentes en la microbiota intestinal de XXX y las variables YYY. Los valores en rojo indican una correlación positiva, mientras que el color azul, una correlación negativa. (V1: antes de la intervención, V2: finalización de la intervención dietética; (* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$)) B) Clustering no supervisado separado por piloto de intervención para las 3 variables antropométricas asociadas a la obesidad: Peso, IMC y cintura. (* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$) A la izquierda, se encuentran las 3 variables del piloto Reino Unido, en medio las variables del piloto polaco y a la derecha las variables del piloto de España.

En la agrupación de la Figura 11B se puede observar un *clustering* diferencial entre las correlaciones de los géneros bacterianos y las variables asociadas a la obesidad. Las correlaciones entre los géneros bacterianos y las variables IMC, peso y cintura presentan

patrones geográficos. El mayor número de correlaciones se puede observar en el piloto Polonia, con un total de 19 correlaciones significativas. Una de las posibilidades de este mayor número de asociaciones de estos géneros sea la mayor prevalencia de la obesidad en este piloto. En el caso del piloto España, se detectan tan sólo 4 correlaciones significativas, muchas menos en comparación al piloto Polonia, posiblemente debido a la menor presencia de personas con obesidad en comparación al piloto polaco (14,1% vs 65%). La tendencia del piloto Reino Unido es similar al piloto Polonia, posiblemente debido a la similitud en cuanto a los criterios de inclusión para las personas obesas, no obstante, se observan menos diferencias significativas en cuanto a las correlaciones de los géneros bacterianos con las variables asociadas a la obesidad, probablemente debido al menor número de voluntarios reclutados.

Para profundizar en las correlaciones observadas entre el IMC y los géneros bacterianos todas las muestras de los 3 pilotos fueron incluidas en un modelo multivariante de predicción PLS-DA donde la composición de la microbiota intestinal fue utilizada para intentar predecir el IMC de los voluntarios. Los resultados más significativos se muestran en la Figura 12, Figura 13 y Tabla 4.

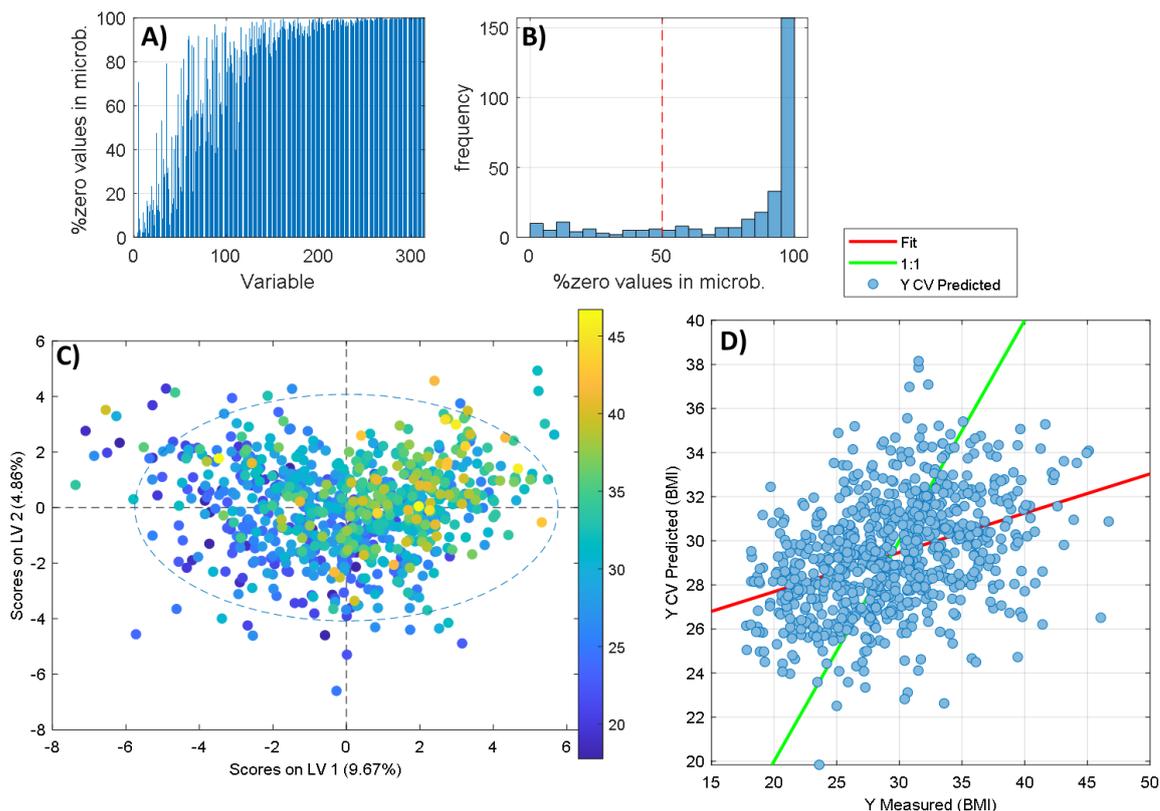


Figura 12 Representación de los resultados del modelo multivariante predictivo PLS-DA asociando el IMC con la abundancia relativa de los 50 géneros bacterianos más prevalentes en la cohorte analizada. A) Distribución de los géneros bacterianos en el conjunto de datos para la abundancia de los ceros en la totalidad de las muestras. B) Histograma de la distribución de los géneros bacterianos para la frecuencia de ceros. La línea roja discontinua delimita las variables incluidas en el modelo multivariante. C) Distribución del modelo PLS-DA incluyendo todas las muestras. El IMC se representa mediante la escala de colores. D) Representación gráfica de los valores de IMC predichos por el modelo PLS-DA en base a la composición de la microbiota intestinal. En el eje de las X se presentan los valores reales de IMC mientras que en el eje de las Y se presentan los valores predichos. La línea verde representa una hipotética correlación perfecta entre las muestras reales y las predichas ($r = 1$) mientras que la línea roja representa la correlación lineal entre las muestras predichas y las muestras reales.

La separación en base al IMC se puede observar en la Figura 12C. Las muestras con IMCs inferiores (azul oscuro) se agrupan en la parte izquierda del gráfico, mientras que los individuos con IMCs altos (amarillo) se agrupan en la zona derecha del PCA. En la Figura 12D se representan los resultados de validación cruzada entre los valores del IMC reales frente a los valores de IMC predichos por el modelo en base a las variables de microbiota. Si la microbiota tiene una correlación con el IMC, los valores predichos del modelo tienen que correlacionarse con los valores reales. En caso de que el modelo no fuera predictivo, esa correlación sería 0.

Para testar la significancia del modelo, se ha comparado la probabilidad de que las asociaciones observadas se generasen al azar con los valores predichos. El test de Wilcoxon aplicado ha devuelto un valor $p = 0,0001$, demostrando así que las

correlaciones observadas entre el IMC y la microbiota en nuestro set de datos son significativas en el modelo PLS-DA y no son causa del azar.

También se ha podido calcular la precisión de este modelo. Los resultados obtenidos indican que el modelo es capaz de predecir el IMC de un voluntario de nuestro set de datos en base a su microbiota con un error de 4,92 puntos de IMC. Los resultados de este modelo ponen de manifiesto que, en nuestro set de datos, existe una clara correlación entre la abundancia relativa de los 50 géneros bacterianos más prevalentes en la microbiota intestinal de los voluntarios y su IMC, sin embargo, la capacidad predictiva puede llegar a ser limitada teniendo en cuenta el error de 4,92 puntos ya que teniendo en cuenta el error máximo una muestra perteneciente a una persona con sobrepeso podría ser categorizada como obesos o a la inversa. Resultados similares fueron reportados por un estudio en el que analizaron la microbiota de más de 1.000 individuos y utilizaron algoritmos de aprendizaje automático para predecir características del huésped, incluido el IMC. Los autores encontraron que la predicción del IMC basada en la composición de la microbiota intestinal era posible, aunque con un nivel de precisión limitado. Este estudio destaca la necesidad de combinar la información de la microbiota intestinal con otros factores, como la genética y el estilo de vida, para mejorar la predicción del IMC [129].

A continuación, se muestran los resultados para los géneros bacterianos con un mayor potencial diferenciador en el modelo PLS-DA entre IMCs altos y bajos. Estas variables son las principales candidatas a posibles biomarcadores ya que son las que segregan mejor los grupos poblacionales entre personas normo peso y obesos. En la Tabla 4 se representan los géneros ordenados en base a los VIP scores. En rojo, los géneros con mayor índice para el grupo obesos y en azul los géneros con mayor índice en el grupo normo peso.

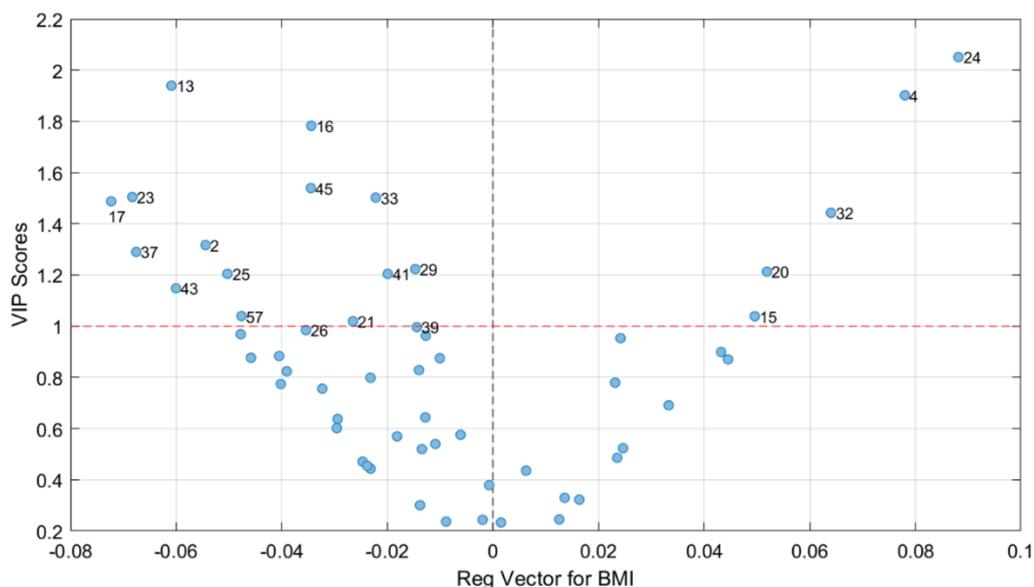


Figura 13 Representación gráfica de dispersión para el vector de regresión IMC del modelo PLS-DA en el eje de las X y los VIP scores del modelo en el eje de las Y. En los extremos superiores del eje de las X se muestran las variables con mayor peso en la diferenciación del modelo en base al IMC. En el extremo izquierdo, las variables más predominantes en índices IMC bajos, en el extremo derecho, las variables más prevalentes en las muestras con índices IMC altos.

Tabla 4 Listado de las variables con mayor impacto en la diferenciación del modelo multivariante PLS-DA ordenados en base a los VIP scores. En rojo, los géneros bacterianos con mayor asociación positiva al índice de masa corporal, en azul, los géneros bacterianos con asociaciones negativas al índice de masa corporal. El ID corresponde con la Figura 14

ID	VIP	Taxonomía
24	2,051	p__Firmicutes c__Clostridia o__Clostridiales f__Lachnospiraceae g__Lachnoclostridium
4	1,902	p__Firmicutes c__Clostridia o__Clostridiales f__Lachnospiraceae g__Roseburia
32	1,443	p__Proteobacteria c__Gammaproteobacteria o__Betaproteobacteriales f__Burkholderiaceae g__Sutterella
20	1,213	p__Firmicutes c__Clostridia o__Clostridiales f__Lachnospiraceae g__Lachnospira
15	1,038	p__Firmicutes c__Clostridia o__Clostridiales f__Lachnospiraceae g__Dorea
13	1,939	p__Firmicutes c__Clostridia o__Clostridiales f__Christensenellaceae g__Christensenellaceae R-7 group
16	1,783	p__Firmicutes c__Clostridia o__Clostridiales f__Ruminococcaceae g__Ruminococcaceae UCG-002
45	1,539	p__Firmicutes c__Clostridia o__Clostridiales f__Ruminococcaceae g__Ruminococcaceae NK4A214 group
23	1,504	p__Firmicutes c__Clostridia o__Clostridiales f__Lachnospiraceae g__Coprococcus 2
33	1,502	p__Firmicutes c__Clostridia o__Clostridiales f__Ruminococcaceae g__Ruminococcaceae UCG-005
17	1,488	p__Firmicutes c__Clostridia o__Clostridiales f__Lachnospiraceae g__Lachnospiraceae NK4A136 group
2	1,317	p__Firmicutes c__Clostridia o__Clostridiales f__Lachnospiraceae g__Blautia
37	1,290	p__Firmicutes c__Clostridia o__Clostridiales f__Ruminococcaceae g__Ruminococcaceae UCG-013
29	1,223	p__Firmicutes c__Clostridia o__Clostridiales f__Ruminococcaceae g__[Eubacterium] coprostanoligenes group
25	1,204	p__Firmicutes c__Clostridia o__Clostridiales f__Peptostreptococcaceae g__Romboutsia
41	1,204	p__Firmicutes c__Clostridia o__Clostridiales f__Ruminococcaceae g__Ruminococcaceae UCG-014
43	1,148	p__Firmicutes c__Clostridia o__Clostridiales f__Ruminococcaceae g__Butyricoccus
57	1,039	p__Bacteroidetes c__Bacteroidia o__Bacteroidales f__Marinifilaceae g__Odoribacter
21	1,020	p__Bacteroidetes c__Bacteroidia o__Bacteroidales f__Rikenellaceae g__Alistipes

El género con una VIP score mayor en el grupo de IMC bajos es *Christensenellaceae R-7 group* (VIP 1,939). Este género bacteriano pertenece a la familia *Christensenellaceae* del filo *Firmicutes*. Esta familia ha sido descubierta recientemente tras su aislamiento a partir de las heces de individuos sanos en Japón. La abundancia relativa de *Christensenellaceae* en el intestino humano está inversamente relacionada con el IMC del huésped en diferentes poblaciones y múltiples estudios, lo que convierte su relación con el IMC en el vínculo más sólido y reproducible entre la ecología microbiana del intestino humano y las enfermedades metabólicas como la obesidad [51]. Un meta-análisis muy reciente incluyendo 4282 muestras de microbiota intestinal humana de localizaciones muy distintas como: Estados Unidos, México, India, China y Colombia fueron utilizadas para determinar posibles biomarcadores en la microbiota asociados a la obesidad [130]. La mayoría parte de las asociaciones encontradas en este meta-análisis son negativas (23 géneros bacterianos), mientras que las asociaciones positivas fueron 2 géneros bacterianos. El género bacteriano con un mayor potencial diferenciador entre las personas obesas y las no obesas fue *Christensenellaceae R-7 group*, con una abundancia mayor en las personas normo peso. Este resultado va en la misma línea con el observado en nuestro estudio utilizando las 3 localizaciones de los pilotos del proyecto PREVENTOMICS. Nuestros resultados aportan más evidencia científica al hecho de que el género *Christensenellaceae R-7 group* juega un papel importante en enfermedades metabólicas como la obesidad. No obstante, los mecanismos de acción a partir de los cuales este género pueda influir en esta patología se desconocen, aunque se están estudiando.

Uno de estos recientes estudios ha intentado comprobar el papel causal de *Christensenellaceae* en las enfermedades metabólicas, controlando la variable dieta. Goodrich et al. seleccionaron un donante humano obeso basándose en niveles casi indetectables de *Christensenellaceae* en su microbiota intestinal. A continuación, realizaron FMT a ratones GF que fueron alimentados con comida rica en fibra, pero que, por lo demás, sólo se diferenciaban por el hecho de que el inóculo del microbioma humano obeso fue suplementado o no con *Christensenellaceae*. Estos experimentos mostraron que el incremento del inóculo con *Christensenellaceae* redujo el aumento de la adiposidad de los ratones en comparación con los que recibieron FMT sin *Christensenellaceae* [131]. El mecanismo subyacente al efecto protector de *Christensenellaceae* contra el aumento excesivo de la adiposidad aún no se ha dilucidado, pero podría jugar un papel importante en la remodelación de la comunidad microbiana,

ya que se observó un cambio en la diversidad cuando se añadieron las bacterias con el potencial protector contra la obesidad. Estos experimentos demostraron que la actividad de *Christensenellaceae* en el microbioma intestinal puede afectar a la composición corporal del huésped incluso cuando se controla la dieta, posiblemente a través de interacciones con otros miembros de la microbiota. De hecho, el papel ecológico de los miembros de las *Christensenellaceae* y su función en el intestino en general sigue sin entenderse, pero este tipo de estudios demuestra el rol causal de esta familia con la protección frente a la obesidad.

En el sentido contrario, en el mismo meta-análisis citado previamente, los resultados obtenidos para el género bacteriano con una asociación más positiva frente a la obesidad es de nuevo el mismo que en nuestro estudio. Se trata del género *Lachnospirillum* (VIP = 2,051). En este caso, la evidencia científica que correlaciona la obesidad con la abundancia de *Lachnospirillum* no es tan robusta como con *Christensenellaceae*, no obstante, otros estudios encuentran correlaciones similares entre la abundancia de este género bacteriano y enfermedades metabólicas. Por ejemplo, en un estudio realizado por Ana Nogal et al. [132], el aumento de los niveles de la bacteria *Lachnospirillum* condujo a niveles más bajos de acetato circulante, lo que finalmente condujo a un aumento de la grasa visceral. Otros estudios correlacionan la abundancia relativa de esta bacteria con patologías asociadas a la inflamación y estadios previos al cáncer de colon en forma de adenomas y una correlación aún mayor cuando se desarrolla el CRC [133]. La asociación más recurrente de este género en la literatura es con el CRC, no obstante, otros estudios también citan mayores abundancias de este género en otros tipos de cáncer como cáncer de páncreas [134], o cáncer de esófago [135].

Cada vez existe más evidencia de la asociación entre la obesidad y el cáncer. A nivel mundial, la carga de cáncer imputable a la obesidad, expresada como fracción atribuible a la población, es del 11,9% en los hombres y del 13,1% en las mujeres [136]. Existen pruebas convincentes de que el exceso de peso corporal se asocia a un mayor riesgo de padecer cáncer en al menos 13 localizaciones anatómicas, entre las que se encuentran los adenocarcinomas descritos previamente como esófago, páncreas y cáncer colorrectal. Por esta razón, las asociaciones descubiertas entre el IMC y el género *Lachnospirillum* demuestran que este género puede tener una implicación no tan solo en la obesidad, si no en otras patologías con mayor impacto en las personas obesas como algunos adenocarcinomas.

También destaca en la Tabla 4 los géneros pertenecientes a la familia *Ruminococcaceae* prevalentes en los índices IMC bajos, hasta 7 en total. La abundancia de estos géneros parece tener un claro impacto en la obesidad en la cohorte analizada en este estudio. Los géneros *Ruminococcaceae* UCG, tienen una afinidad por las dietas ricas en fibras vegetales. Utilizando como substrato estas fibras vegetales, producen AGCCs como el butirato, propionato o acetato. El incremento de estos metabolitos está directamente correlacionado con la mejora de los síntomas de diversas enfermedades inflamatorias gastrointestinales [137][138][139][45]. Algunos estudios en humanos apuntan en la misma dirección de los resultados expuestos. Por ejemplo, el incremento de este género bacteriano se ha asociado a una disminución del riesgo de enfermedades cardiovasculares en población obesa [140]. También, *Ruminococcaceae* UCG-10 ha sido encontrada en abundancias relativas superiores en grupos control en comparación a personas con hipertensión, otro de los factores de riesgo con mayor abundancia en las personas obesas [141]. En base a esto, nuestros resultados ayudan a incrementar la evidencia científica de la importancia de la familia *Ruminococcaceae* en la obesidad.

De toda la lista expuesta, también destaca la presencia de *Coprococcus*. En un estudio similar, donde la microbiota intestinal de 599 voluntarios norteamericanos fue analizada, el género *Coprococcus* se encontró en menor medida en las personas obesas en comparación a los voluntarios normo peso [142]. Sin embargo, en un estudio más reducido, en 190 niños de México, los resultados del género *Coprococcus* van en una dirección contraria, siendo más abundantes en los niños obesos [143].

A parte del anteriormente citado *Lachnospirillum*, hay otros 3 géneros que destacan en nuestra cohorte por ser más abundantes en la población con índices de IMC altos: *Sutterella*, *Dorea* y *Roseburia*.

El papel de *Sutterella* spp. como parte de la microbiota humana está en gran medida inexplorado y los informes publicados son controvertidos. Esta falta de conocimiento es bastante sorprendente, ya que se ha informado de que *Sutterella* es muy prevalente y abundante en la mucosa intestinal de los seres humanos. Como parte de resultados controvertidos se puede citar un estudio en adolescentes, en China, donde *Sutterella* es significativamente más abundante en adolescentes con obesidad [144], observando la misma tendencia que en nuestros resultados. No obstante, otros estudios han descrito una correlación contraria [145].

Roseburia es otro género con una clara asociación positiva al IMC en nuestros datos. El género *Roseburia* forma parte de las bacterias comensales que producen ácidos grasos de

cadena corta, especialmente butirato, que afectan a la motilidad del colon, al mantenimiento de la inmunidad y a las propiedades antiinflamatorias. La modificación de la representación de *Roseburia spp.* puede afectar a varias vías metabólicas y está asociada a varias enfermedades como el síndrome del intestino irritable, la obesidad o la diabetes de tipo 2 [33]. Los resultados de las asociaciones de este género con la obesidad son controvertidos. Por un lado, hay estudios que reportan una asociación negativa de este género con la obesidad [146] [147] [148], en dirección opuesta a los resultados presentados en esta tesis. Sin embargo, otros dos estudios han reportado asociaciones positivas de *Roseburia* con la obesidad [149] [150]. Las divergencias en cuanto a la abundancia de este género en diferentes estudios ponen de manifiesto la necesidad de investigar más en profundidad los mecanismos de acción a partir de cuales estas bacterias pueden tener una implicación en la obesidad, ya sea de forma positiva o negativa.

Finalmente, el último género a discutir con una correlación positiva asociada al IMC es *Dorea*. Estas bacterias se encuentran de forma muy consistente en las heces humanas con un rango de entre un 1 y 5% de abundancia total relativa. Los resultados de la asociación positiva de este género van en consonancia con 4 estudios distintos donde *Dorea* es más abundante en personas obesas [151] [152] [153] [154]. Asociaciones contrarias se han encontrado en estudios en niños de 7 a 18 años [155].

Entender los diferentes mecanismos de acción a partir de los cuales la obesidad se pueda tratar es complicado debido a su característica multifactorial. Cada vez hay más pruebas que demuestran que la obesidad y las alteraciones metabólicas están estrechamente relacionadas con las variaciones en la función y la composición de la microbiota intestinal. No obstante, muchas de las variaciones reportadas en distintos estudios contienen resultados contradictorios en cuanto a la abundancia relativa de géneros bacterianos clave. Por esta razón, los resultados presentados en esta tesis pueden ayudar a aportar más evidencia científica acerca de los géneros bacterianos con asociaciones positivas y negativas con el sobrepeso y la obesidad.

La localización geográfica, la variabilidad interindividual o los estilos de vida son algunos de los factores que pueden dificultar la obtención de asociaciones robustas entre la microbiota y la obesidad. En este sentido, la inclusión en este análisis de muestras de distintas localizaciones y perfiles metabólicos dispares permite abarcar una mayor variabilidad poblacional, no obstante, también influye en la obtención de coeficientes de correlación menores.

Por otro lado, las distribuciones de la abundancia de los géneros bacterianos no siguen en muchas ocasiones distribuciones lineales, lo que dificulta la búsqueda de asociaciones directas. Aunque las asociaciones sean muy significativas, en muchos casos con valores $p < 0,0001$ es complicado realizar afirmaciones rotundas a partir de las correlaciones observadas en nuestro estudio debido a la gran variabilidad de datos biológicos analizados.

También, la asociación directa de la microbiota con el IMC permite explicar una parte de las correlaciones de la microbiota intestinal con la obesidad, por esta razón, en un contexto de una enfermedad multifactorial como la obesidad, los análisis multi-ómicos pueden ofrecer una herramienta muy eficaz para intentar dar respuesta a parte de la variabilidad que no se puede explicar mediante el estudio de asociaciones directas en las enfermedades multifactoriales.

4.1.2. Correlación del metaboloma con la microbiota intestinal

El panorama completo de las interacciones entre bacterias y metabolitos, tanto microbianos como eucariotas, sigue sin estar bien definido. Esta laguna se debe a la elevada complejidad de las interacciones microbioma-metaboloma [156].

Por ello, varios estudios recientes han recurrido al análisis conjunto de los datos del microbioma y del metaboloma, con el objetivo de evaluar sistemáticamente los vínculos entre las bacterias y los metabolitos humanos [157][151][158][159]. Estos estudios han generado perfiles metagenómicos y metabolómicos emparejados a partir de muestras fecales de una cohorte de interés, y luego han aplicado una variedad de herramientas estadísticas o métodos computacionales avanzados para identificar posibles asociaciones y patrones en los datos. Sin embargo, es importante destacar que los resultados de un solo estudio a menudo no se trasladan a otros estudios o cohortes [160], y pueden desestimar asociaciones biológicamente significativas. La capacidad de validar las asociaciones microbioma-metaboloma identificadas en múltiples cohortes es clave para distinguir la señal del ruido y demostrar la homogeneidad de los resultados obtenidos. En este sentido, los datos metabolómicos generados durante el proyecto PREVENTOMICS han sido utilizados, en la presente tesis, para estudiar su correlación con la composición de la microbiota intestinal de los voluntarios, proporcionando así nueva evidencia científica capaz de ayudar a generalizar los resultados de correlación entre la microbiota intestinal y el metaboloma del huésped.

Los resultados del análisis de asociaciones, entre los *global scores* y los géneros bacterianos presentes en los voluntarios de los tres pilotos (Figura 14), nos muestra una elevada variabilidad del número de géneros bacterianos con correlaciones significativas con los valores metabolómicos, dependiendo del *cluster* observado. En concreto, la gran mayoría de las asociaciones se concentran en 2 de los *clusters*; carbohidratos (28 géneros) e inflamación (12 géneros). Dentro del *cluster* carbohidratos, los dos géneros con asociaciones más significativas son *Lachnoclostridium* y *Christensenellaceae R-7 group*. Las asociaciones de estos dos géneros son inversas, *Lachnoclostridium* incrementa su abundancia relativa cuanto mayor son los valores de afectación del *cluster* carbohidratos mientras que *Christensenellaceae R-7 group* incrementa su abundancia en la microbiota intestinal cuando los valores disminuyen (Figura 15). Estas asociaciones no se observan

en ninguno de los otros *clusters*. La implicación de estos dos géneros en la obesidad ha sido ampliamente descrita en la sección 4.1.1.

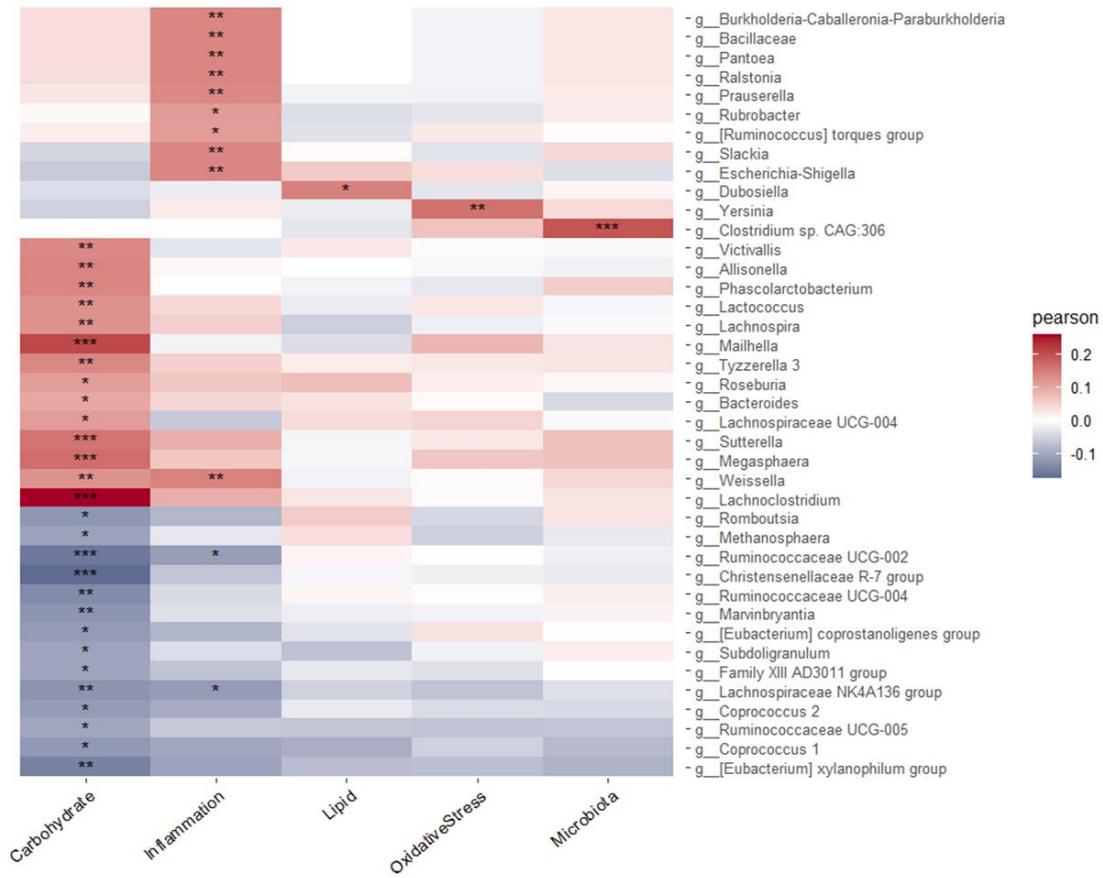


Figura 14 Mapa de calor de la correlación de Pearson y los valores *p* ajustados por FDR entre los “global scores” de cada individuo (calculados a partir de la cuantificación de los metabolitos descritos en el apartado 3.2.1 para todas las muestras del estudio) y la abundancia total relativa de los géneros bacterianos de todas las muestras disponibles de las 3 intervenciones nutricionales (* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$)

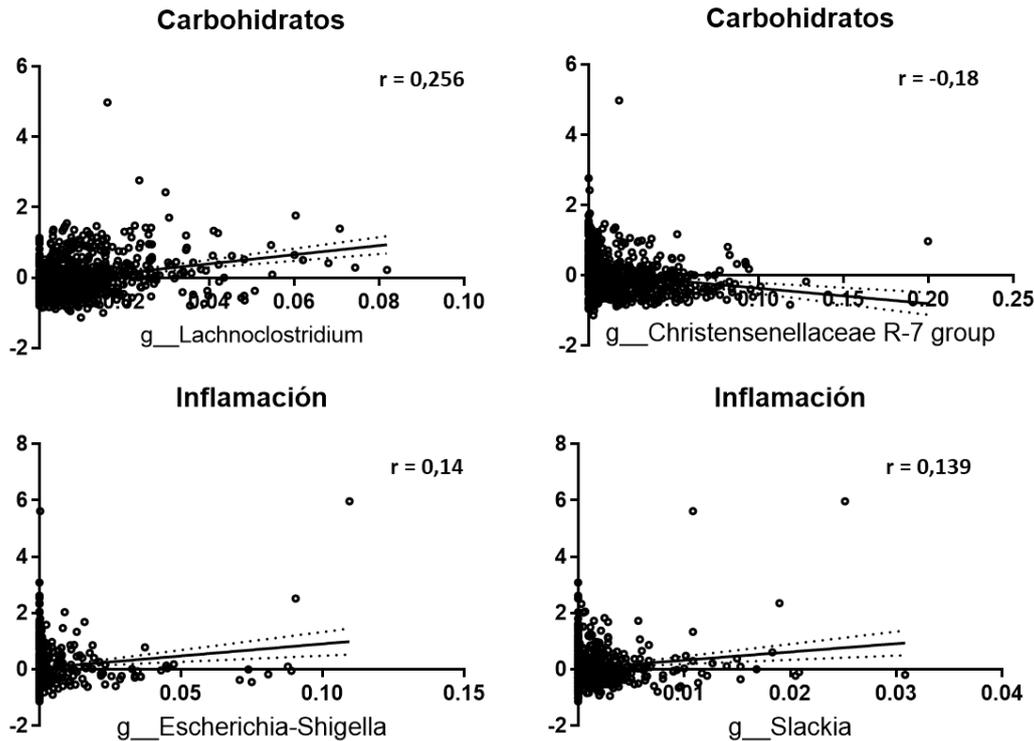


Figura 15 Gráfico de dispersión correlacionando los géneros bacterianos con las asociaciones más significativas con los global scores a partir de los análisis de correlación presentados en la Figura 14. La r obtenida se adjunta en cada representación gráfica.

Los resultados de la asociación entre los *global scores* y estos dos géneros bacterianos demuestra que biomarcadores claves de la microbiota intestinal no solo se correlacionan a estados patológicos como la obesidad, sino que también pueden tener un rol importante en la modulación de diferentes rutas metabólicas de huésped, como los metabolitos asociados a los carbohidratos, aunque son necesarios más estudios para determinar esta correlación entre abundancias diferenciales y funcionalidad metabólica.

El siguiente *cluster* con mayor número de asociaciones es inflamación. En general, la prevalencia de la mayoría de los géneros bacterianos con asociaciones positivas es muy inferior a las observadas en el *cluster* carbohidratos. No obstante, entre este subgrupo de géneros bacterianos hay dos que tienen prevalencias mayores en la microbiota intestinal. Estos dos géneros son *Escherichia-Shigella* y *Slackia*. Su correlación con los valores de *global scores* asociados a la inflamación se puede observar en la Figura 15.

Escherichia-Shigella, son dos géneros bacterianos del filo *Proteobacteria*, potencialmente patógenos. Diversos estudios han demostrado que abundancias relativas superiores de estos géneros está asociada a mayor inflamación, tanto en enfermedades inflamatorias intestinales [161], como obesidad [155], o hasta envejecimiento [162].

Otro de los géneros con una mayor asociación positiva al estado metabólico inflamatorio es *Slackia*. Esta bacteria es un género cuya abundancia es menor en comparación a *Escherichia-Shigella*, no obstante, la correlación con los marcadores asociados a inflamación es significativa ($p < 0,01^{**}$). Recientes estudios han detectado la presencia de este género bacteriano en bacteremias [163], e infecciones de heridas en ambientes hospitalarios [164], provocando episodios de inflamación en el huésped. Aunque la información acerca de este género bacteriano es limitada, su presencia en abundancias superiores en la microbiota intestinal puede inducir un estado de inflamación a través de la activación de la señalización de las vías metabólicas de TNF- α .

Del mismo modo que en el apartado 4.1.1, aunque las correlaciones encontradas son significativas, los valores r no son altos ($r < \pm 0,3$). No obstante, las correlaciones detectadas junto a la bibliografía descrita apoyan la hipótesis de que estos géneros bacterianos pueden estar correlacionados con el trastorno en el metabolismo de la obesidad, especialmente en el caso de los metabolitos del *cluster* carbohidratos e inflamación. Estos resultados aportan más robustez a la hipótesis de que los géneros *Lachnoclostridium*, *Christinelaceae_R7* y *Escherichia-Shigella* puedan ser posibles candidatos a biomarcadores asociados a alteraciones metabólicas.

Profundizando en los estudios de correlación entre las diferentes ómicas, en la Figura 16 se muestra el resultado de un análisis RDA para el conjunto de datos del proyecto PREVENTOMICS. En esta figura, los dos componentes principales son capaces de explicar el 79,1% de la variación del modelo.

En primer lugar, se puede observar una clara diferenciación geográfica a nivel de beta diversidad entre las muestras de Polonia (verde) y las muestras de España (naranja). Independientemente del piloto, hay un subconjunto de muestras con una distribución diferente (zona inferior derecha). Combinando los 3 sets de datos podemos observar que esta diferenciación viene marcada por un género en particular, *Prevotella 9*. Este género tiene una gran dispersión en la población general, con una gran variabilidad, siendo inferior al 5% en la mayoría de los voluntarios, pero en un subconjunto de la población, estas proporciones se incrementan hasta el 30 o 40% de la abundancia total relativa. Este subconjunto de muestras con una clara diferenciación en el modelo RDA pertenecen a los voluntarios cuya abundancia de *Prevotella 9* es muy superior. Los valores positivos del *cluster* metabolómico microbiota sigue la misma tendencia que la distribución que este subconjunto de muestras en el modelo RDA. Esta tendencia indica una cierta correlación entre la beta diversidad de las muestras donde *Prevotella 9* es un género dominante y los valores *global score* del *cluster* microbiota, indicando que cuanto más abundante es *Prevotella 9*, los metabolitos pertenecientes al *cluster* microbiota (sección 3.2.1) se ven más alterados. Aunque no se observaron diferencias significativas entre la asociación de *Prevotella 9* y los valores metabolómicos, la composición de la comunidad bacteriana de aquellas muestras donde *Prevotella 9* es un género dominante, englobada en los valores de beta diversidad, si tiene una clara correlación con el *cluster* microbiota (Figura 16).

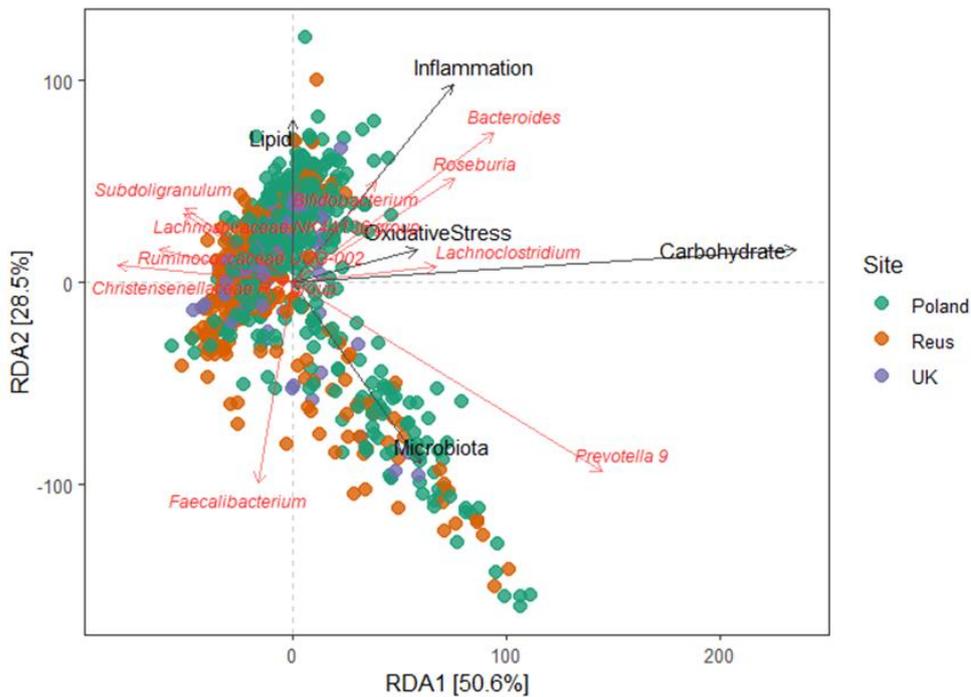


Figura 16 Análisis RDA de la combinación de los valores de beta diversidad Bray Curtis con los “global scores” metabólicos de los voluntarios y la abundancia realtiva de los géneros bacterianos. utilizando todas las muestras disponibles en las 3 intervenciones nutricionales. La longitud y dirección de las flechas reflejan la magnitud y el sentido de la relación entre las variables incluidas en el análisis y las especies presentes en las muestras. Flechas más largas indican una mayor correlación con la composición de especies. La proyección ortogonal de los puntos sobre las flechas proporciona una estimación de la influencia de cada variable en la composición de cada localidad.

Además, el modelo RDA muestra otras asociaciones de interés. Por ejemplo, los valores positivos de la variable del *cluster* carbohidratos tiene la misma tendencia que el género *Lachnoclostridium*. Ya se mencionó anteriormente la correlación de este género con los *global scores* de los metabolitos del *cluster* carbohidratos y el mayor VIP score en el modelo predictivo PLS-DA. También, *Lachnoclostridium* parece ser una de las variables que separa mejor los dos pilotos mayoritarios, España y Polonia. Estos resultados son congruentes ya que en el piloto polaco la prevalencia de la obesidad es mayor que la del piloto español, donde la mayoría de los voluntarios no tienen obesidad. En sentido contrario a la distribución de la variable *Lachnoclostridium* y carbohidratos, encontramos una serie de géneros bacterianos apuntando en la dirección de las muestras de piloto español. Estos géneros son: *Christensenellaceae R-7*, *Ruminococcus-UCG002*, *Lachnospiraceae NKB4* y *Subdoligranulum*. Tal y como se discutió en el apartado anterior 4.1.1, algunos de estos géneros han demostrado correlacionarse con bajos índices de peso corporal y valores negativos de *global scores* metabólicos.

Finalmente, otra variable que parece tener una dispersión similar a la beta diversidad de las muestras del piloto polaco es el *cluster* inflamación. Igual que en los anteriores *clusters*, hay una serie de género bacterianos que alinean su dispersión con la tendencia

de los valores positivos de esta variable. Estos géneros son *Bacteroides*, *Roseburia* y *Bifidobacterium*. Curiosamente, ninguno de estos géneros tiene una correlación positiva directa entre el *global score* del *cluster* inflamación y la abundancia relativa en las correlaciones de Pearson expuestas previamente. *Bacteroides* y *Roseburia* son dos géneros que en ocasiones han sido descritos como más abundantes en personas obesas en comparación a personal control [165]. No obstante, destaca la presencia de *Bifidobacterium* en este grupo, ya que este género en particular es considerado generalmente beneficioso y es uno de los géneros con más características probióticas asociadas a salud [166]. Incluso, algunos estudios *in vitro* apuntan al potencial anti inflamatorio de algunas cepas de *Bifidobacterium* [167][168]. Aun así, la longitud del vector del modelo RDA perteneciente a este género es muy inferior en comparación a los otros dos géneros, indicando un menor impacto de la correlación de los valores del *cluster* inflamación con este género en particular.

En dirección opuesta a la variable inflamación, destaca la presencia del género *Faecalibacterium*. Diferentes investigaciones demostraron que la reducción de *Faecalibacterium* en el intestino aumenta la disminución de la capacidad de autodefensa contra las interacciones inflamatorias [169] [170]. Este sistema de protección incluye las citoquinas proinflamatorias y juega un rol importante en la estimulación de la secreción de citoquinas antiinflamatorias a través de moléculas activas [171]. *Faecalibacterium* es considerado también como uno de los principales productores de AGCCs, produciendo mayoritariamente butirato a utilizando como substrato acetato y sintetizando moléculas antiinflamatorias bioactivas como el ácido salicílico [172]. En la cohorte analizada del proyecto PREVENTOMICS el género *Faecalibacterium* parece ser más abundante en un subconjunto de las muestras con una distribución de la beta diversidad ligeramente diferente. Esta distribución de la composición de la microbiota intestinal, predominada por el género *Faecalibacterium* parece proporcionar un efecto protector frente a los metabolitos asociados a la inflamación.

En sistemas biológicos complejos es difícil encontrar correlaciones entre variables con valores de “r” cercanos a 1 o -1. En nuestro caso, aunque los valores p ajustados sean muy significativos, las correlaciones observadas no son elevadas ($r < \pm 0,2$). Con estos valores de “r” resulta complicado poder extraer conclusiones firmes a partir de los datos, sin embargo, la tendencia observada permite señalar la interconexión que existe en la señalización de distintas vías metabólicas y las comunidades bacterianas del huésped. Entender las dinámicas que se llevan a cabo entre las vías metabólicas y las bacterias

intestinales es uno de los retos más ambiciosos de los próximos años en el campo de la investigación de la microbiota intestinal biomédica.

Una vez expuestos los resultados de las asociaciones entre la microbiota intestinal con el metaboloma y las variables antropométricas, el siguiente paso consiste en analizar cada piloto de forma individual, para determinar si las intervenciones dietéticas han tenido un efecto modulador en la microbiota y si la personalización de la dieta juega un papel diferenciador en dicha modulación.

4.1.3. Comparativa de biodiversidad bacteriana en los tres estudios de intervención

La composición general de las comunidades bacterianas o microbiota, a nivel taxonómico de familia, es similar entre los 3 pilotos, siendo ligeramente diferente la composición de la microbiota del estudio de intervención de España, debido a una menor abundancia total relativa de la familia *Lachnospiraceae* (Figura 17). Estas diferencias se encuentran a tiempo inicial (V1) y se mantienen al final de las intervenciones (V2)..

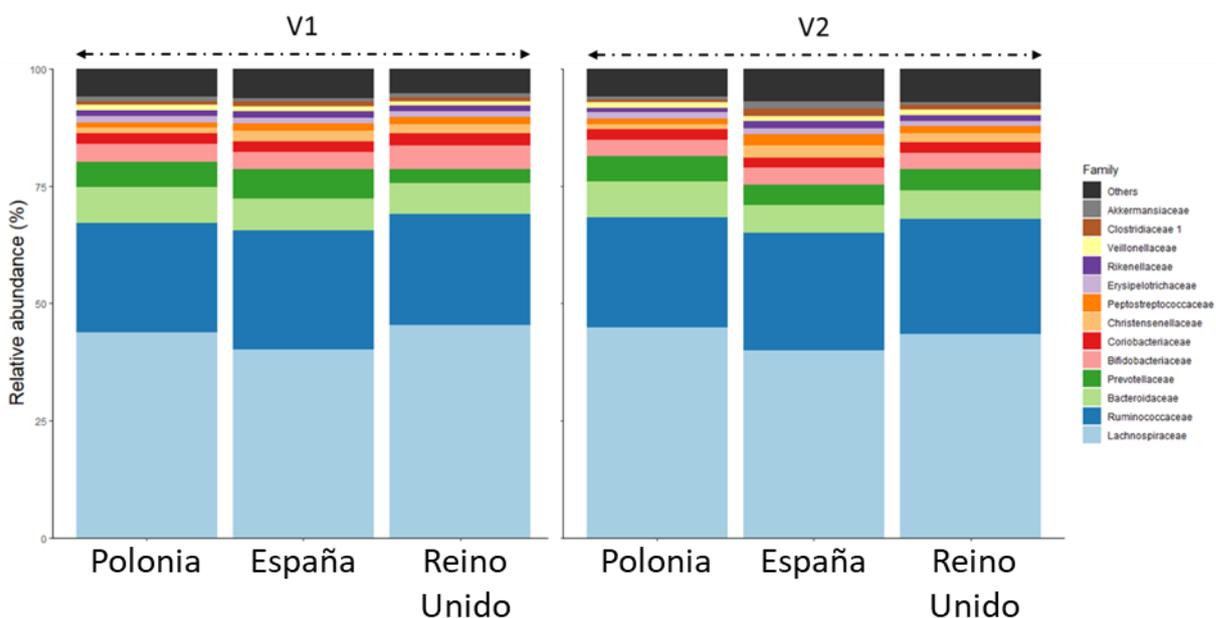


Figura 17 Gráfico de barras taxonómico representando la abundancia relativa media, de las 13 familias bacterianas más abundantes (abundance > x) para cada piloto y visita.

En la Figura 18 se profundiza en la distribución de los 20 géneros bacterianos más abundantes para cada estudio de intervención. Los géneros más abundantes en cada uno de los tres estudios de intervención son *Faecalibacterium*, *Blautia*, *Bacteroides* y

Roseburia. Todos estos géneros son ampliamente descritos en la literatura científica como géneros característicos de la microbiota intestinal humana. *Faecalibacterium* es un género bacteriano cuya mayor abundancia se ha correlacionado con mejoras en distintas patologías intestinales como la enfermedad de Crohn [24] o la colitis ulcerosa [173]. *Blautia* también es un género con potencial probiótico cuyo metabolismo es importante para llevar a cabo mejoras en el estado metabólico del huésped [174]. *Bacteroides* es descrito como uno de los géneros más abundantes en la microbiota intestinal de los mamíferos, en el intestino del huésped juegan un papel importante en el procesamiento de las moléculas complejas en otras más simples, principalmente utilizando polisacáridos de origen vegetal [175]. Finalmente, *Roseburia* es un género que fermenta carbohidratos indigeribles produciendo ácidos grasos de cadena corta (acetato, propionato y butirato) que tienen una acción importante en la función intestinal y es utilizado como biomarcador de la disbiosis intestinal, ya que abundancias relativas bajas de este género se asocian a patologías del tracto gastrointestinal [176]. En la misma Figura 18, destaca el género *Prevotella* con abundancias relativas muy dispares entre los voluntarios. La distribución de la abundancia relativa de este género no es igual de homogénea en comparación al resto de los 20 géneros bacterianos más abundantes. La mayoría de los voluntarios presentan abundancias relativas inferiores al 5%, no obstante, una serie de voluntarios supera con creces esta concentración, llegando a porcentajes relativos del 30 o hasta el 40%. Existe mucha controversia en diversos estudios científicos acerca de este género en particular. En un estudio pionero, se demostró que niños de África, que consumen una dieta rica en fibra y vegetales, tenían mayor abundancia de *Prevotella* en comparación a niños europeos criados en un entorno industrializado [177]. En la misma línea, otros estudios demuestran la afinidad de este género por la fermentación de fibras prebióticas [178]. No obstante, otros estudios han observado un incremento notorio de este género en población adulta asociado a patologías como la síndrome metabólica, la obesidad, la enfermedad inflamatoria intestinal u otras enfermedades inflamatorias [179]. Los mecanismos de acción por los cuales este género se asocia a estas patologías no son conocidos, por esta razón, es necesaria más investigación aplicada para entender la asociación de este género a la salud y el impacto de la dieta en la abundancia de *Prevotella*.

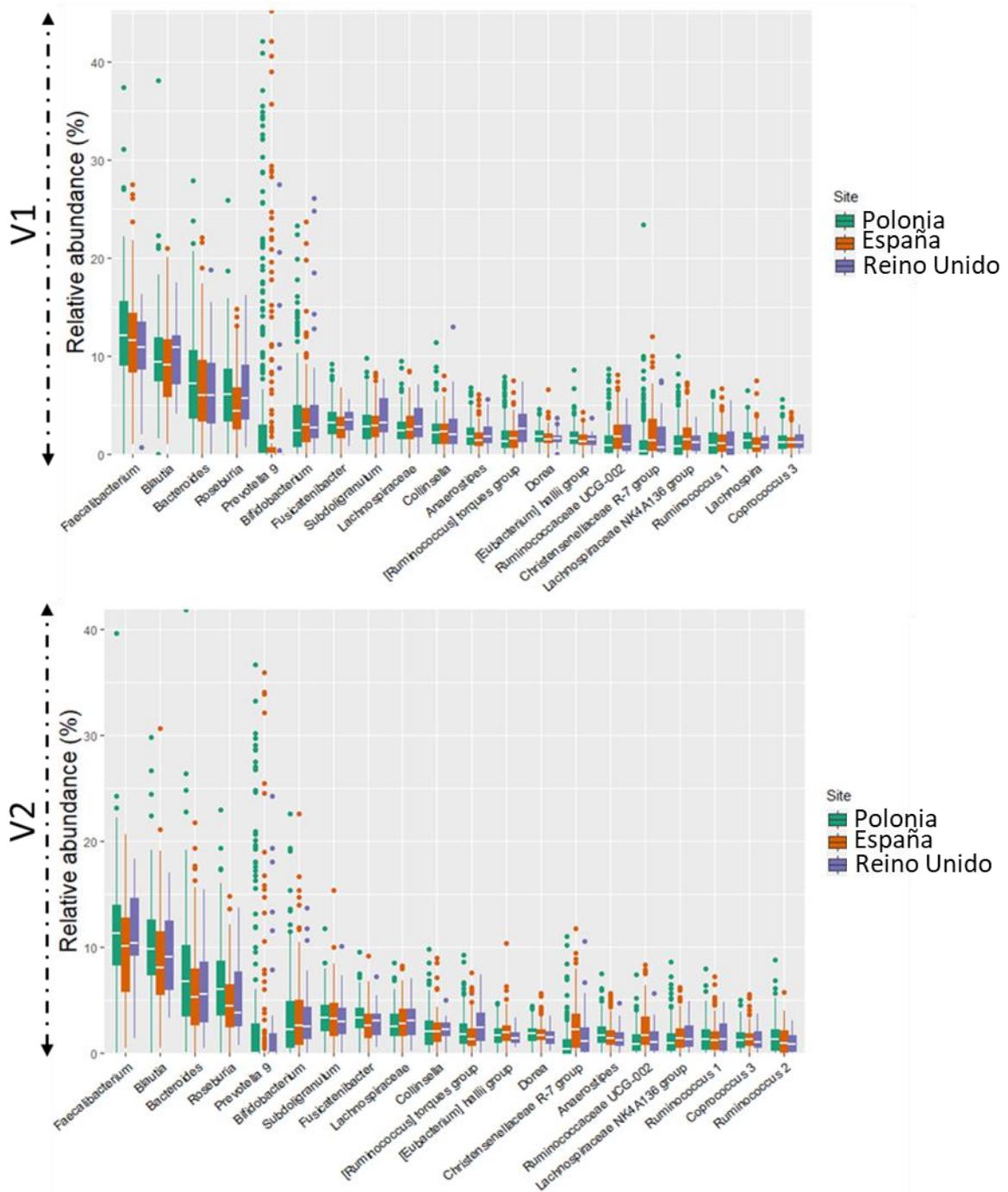


Figura 18 Gráfico de caja (box plot) que representa la abundancia relativa de los 20 géneros bacterianos más prevalentes en tres localizaciones geográficas distintas (Polonia, España y Reino Unido). Cada caja muestra la mediana (línea horizontal dentro de la caja), el primer y tercer cuartil (bordes inferior y superior de la caja, respectivamente), y los valores atípicos. Este gráfico permite comparar la distribución y variabilidad de la abundancia de cada género bacteriano entre las diferentes localizaciones geográficas, y evidencia las diferencias en la composición de la microbiota entre las áreas estudiadas.

Para estudiar la diversidad alfa de las comunidades bacterianas de los voluntarios a V1 y V2, hemos seleccionado los índices de *Observed diversity*, *Chao1* y *Shannon* (Figura 11). La diversidad de la microbiota intestinal es uno de los parámetros que se asocia en mayor

medida a un estado saludable del huésped. La diversidad bacteriana es uno de los principales factores que se ven afectados en el desarrollo de patologías como la obesidad, síndrome metabólico, enfermedades inflamatorias intestinales [180] [181] [161]. También se ha descrito una mayor pérdida de la diversidad en procesos asociados al envejecimiento natural de las personas [182].

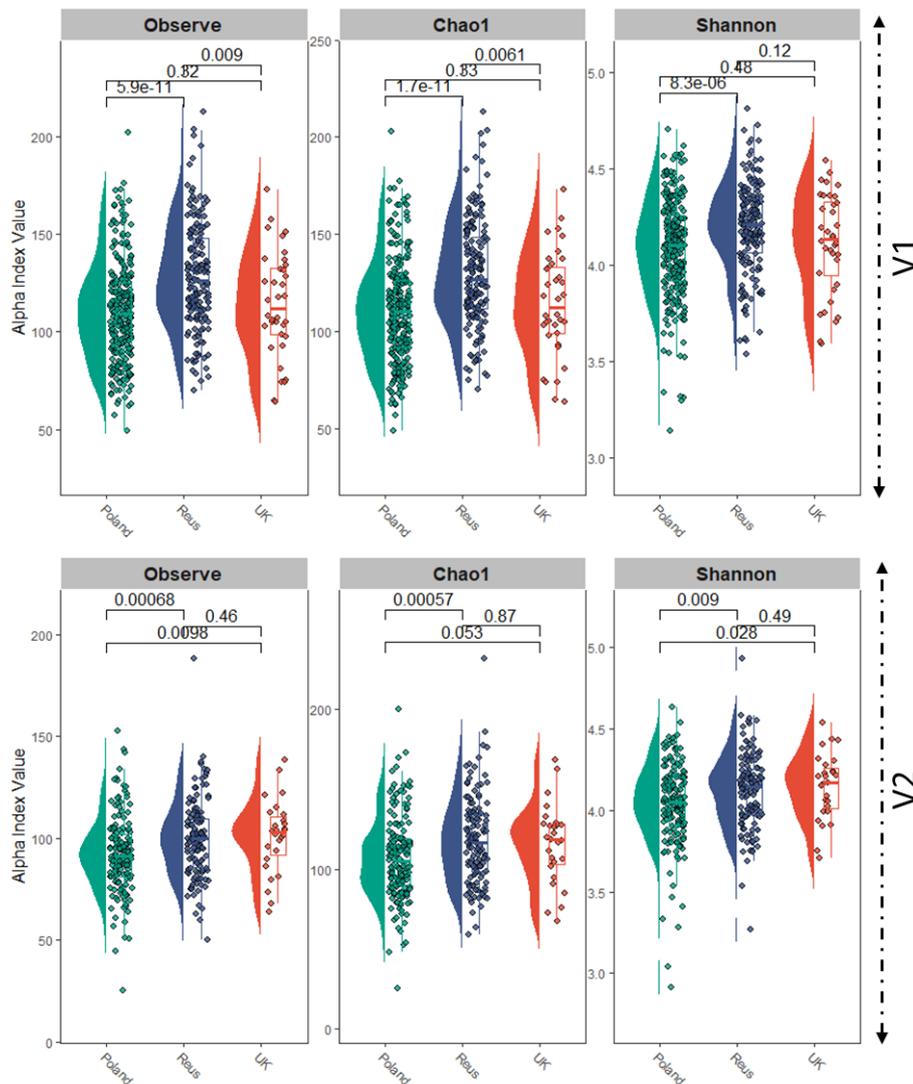


Figura 19 Diagrama de cajas de los valores de alfa diversidad Observe, Chao1 y Shannon para cada piloto de intervención separado por tiempo. Los valores p se añadieron tras aplicar el test de Wilcoxon.

Antes de iniciar las intervenciones dietéticas (V1), la microbiota de los voluntarios del piloto de España es significativamente más diversa que la de los voluntarios del piloto de Polonia y del Reino Unido. Resultados similares se han reportado en diversos estudios donde las personas con peso normal (normopeso) tienden a tener una mayor alfa diversidad en su microbiota intestinal en comparación con las personas con sobrepeso y obesidad [183]. Una razón detrás de esta diferencia podría ser que las dietas altas en

grasas y bajas en fibra, comunes en personas con sobrepeso y obesidad, pueden disminuir la diversidad de la microbiota intestinal [184]. La fibra es un componente esencial en la dieta que promueve el crecimiento de bacterias beneficiosas y la producción AGCCs, que tienen efectos positivos en la salud del huésped [185].

Además, la inflamación crónica de bajo grado, comúnmente asociada con la obesidad, también puede afectar negativamente la diversidad de la microbiota intestinal. La inflamación puede alterar el equilibrio entre las bacterias comensales y patógenas, favoreciendo el crecimiento de microorganismos potencialmente perjudiciales [186].

Por otro lado, la reducción en la alfa diversidad también puede contribuir al desarrollo de la obesidad y otras enfermedades metabólicas. La menor diversidad de la microbiota intestinal puede disminuir la capacidad de resistencia frente a factores ambientales y patógenos, lo que puede aumentar la susceptibilidad a trastornos metabólicos [154].

En nuestro caso, las mayores diferencias se obtienen entre Polonia y España, ($p = 5,9 \times 10^{-11}$, $p = 1,7 \times 10^{-11}$, $p = 8,3 \times 10^{-6}$), para cada uno de los índices analizados. Estas diferencias significativas se ven ligeramente reducidas al finalizar la intervención dietética; ($p = 6,8 \times 10^{-5}$, $5,7 \times 10^{-4}$, $p = 0,009$). No obstante, las diferencias entre los dos pilotos siguen siendo estadísticamente significativas. La comparación entre el piloto de España y el de Reino Unido tiene una tendencia similar a la anterior comparación entre España y Polonia para las muestras del estado basal, sin embargo, las diferencias de los valores p son inferiores; ($p = 0,009$, $p = 0,0061$, $p = 0,12$). Las diferencias son significativas para los índices *Observed* y *Chao1*, no así para el índice de *Shannon*, siendo inferior también en el piloto del Reino Unido. Tras la finalización de la intervención, los valores de alfa diversidad para las muestras pertenecientes al piloto Reino Unido incrementan significativamente (sección **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**). En concreto, las diferencias observadas respecto al piloto de España desaparecen; ($p = 0,46$, $p = 0,87$, $p = 0,49$). Este incremento hace equiparables los valores de alfa diversidad de los voluntarios que finalizaron la intervención dietética con el grupo de voluntarios del piloto español, donde la abundancia de personas normo peso era más prevalente. Esta tendencia también se observa al comparar el desempeño de los valores de alfa diversidad entre los pilotos Reino Unido y Polonia. Al inicio de la intervención, no existen diferencias significativas entre los dos pilotos; ($p = 0,32$, $p = 0,33$, $p = 0,48$). No obstante, las diferencias son estadísticamente significativas al finalizar las intervenciones dietéticas. En este caso, los valores p obtenidos para cada índice son; ($p = 0,0098$, $p = 0,053$, $p = 0,028$).

Las intervenciones dietéticas en el piloto de Reino Unido parecen haber tenido un impacto mayor en el aumento de la diversidad de la microbiota intestinal de sus voluntarios. Tras el análisis de la alfa diversidad, los análisis de beta diversidad fueron utilizados para estudiar la similitud y las diferencias en la composición de la microbiota entre los distintos pilotos. En este caso, se ha utilizado el índice Bray Curtis y los resultados de las 3 coordenadas principales se muestran en la Figura 20.

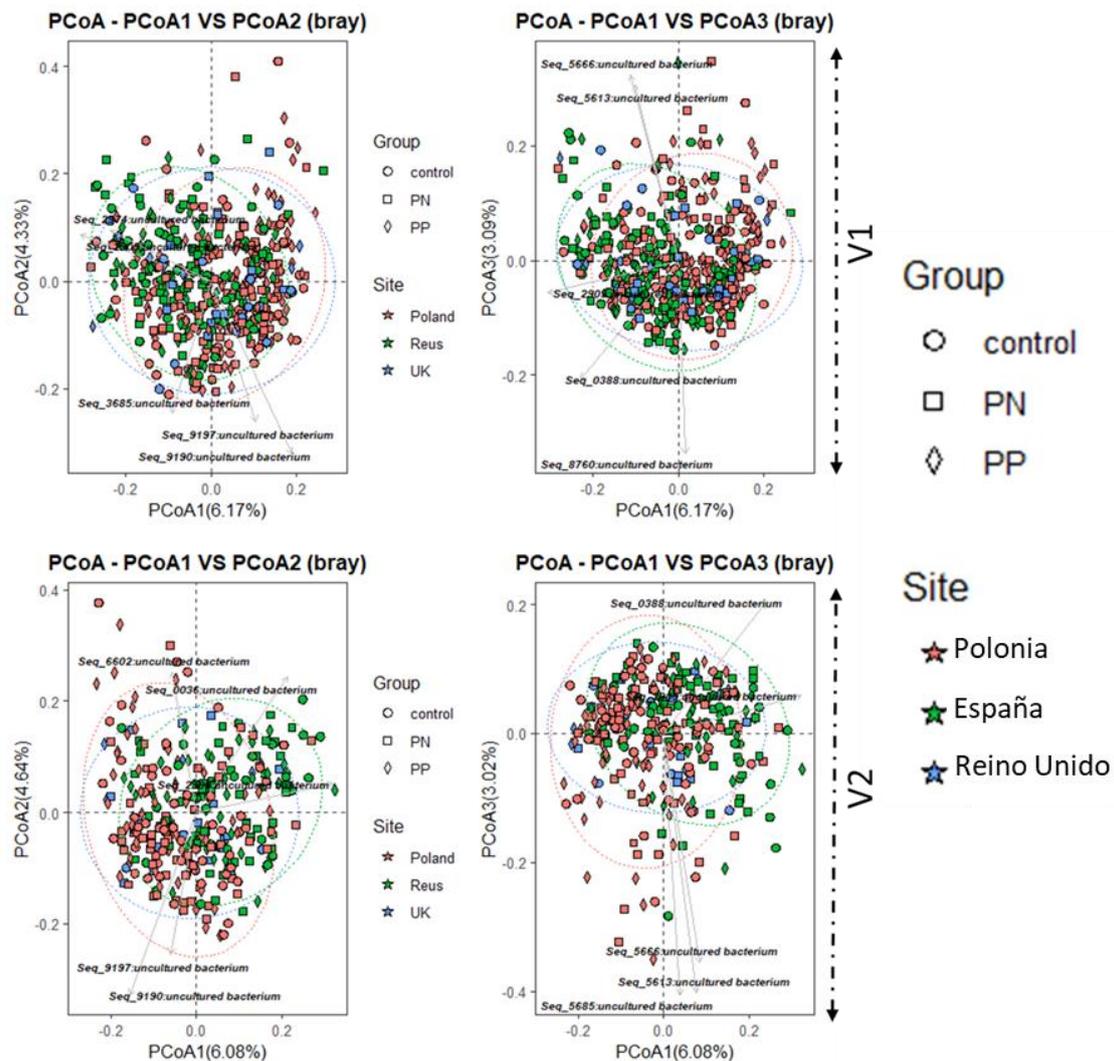


Figura 20 Análisis de coordenadas principales (PCoA) basado en la distancia de Bray-Curtis, mostrando la variación en la composición de la comunidad microbiana entre tres localizaciones geográficas distintas (Polonia, España y Reino Unido). Los puntos representan las muestras recolectadas en cada localización y están codificados por colores según su origen geográfico. Las flechas indican las OTUs más relevantes que contribuyen a la variación observada entre las muestras. La longitud y dirección de las flechas reflejan la magnitud y el sentido de la relación entre las OTUs y las muestras en el espacio ordinatorio. Flechas más largas indican una mayor contribución de las OTUs en la variación de la composición microbiana entre las localizaciones. El gráfico permite visualizar las diferencias en la composición y estructura de las comunidades microbianas en función de la localización geográfica y las OTUs más influyentes en dicha variación.

Como se puede observar en la figura, la separación, a lo largo de los ejes del PCoA, entre las muestras del piloto polaco (rojo) y el español (verde) es muy significativa (adonis2 p.val < 0,001*** , Tabla 5), tanto para las muestras V1 como para las muestras V2. Las

muestras del piloto británico (azul) quedan repartidas en un punto intermedio entre los dos pilotos mencionados previamente. Otro de los puntos de interés de este análisis es la inclusión de las OTUs para determinar el peso de las principales secuencias capaces de separar los distintos grupos. En este caso, se puede observar como las OTUs 9197 y 9190 tienen una mayor influencia en la separación de las muestras observadas en el cuadrante inferior derecho del PCoA V1 (PC1 vs PC2) y el cuadrante inferior izquierdo del PCoA V2 (PC1 vs PC2). Estas muestras mayoritariamente pertenecen a voluntarios reclutados en el piloto situado en Polonia. Ambas OTUs pertenecen a la misma asignación taxonómica al nivel de género (p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Clostridiales;f__Lachnospiraceae;g__Roseburia). Este género ha sido descrito anteriormente. En total, 129 OTUs han sido asignadas al género *Roseburia* en la clasificación taxonómica de las secuencias obtenidas para todos los voluntarios. Sin embargo, tan solo 2 de estas OTUs, la 9197 y la 9190 son las que tienen un mayor impacto en la diferenciación entre la beta diversidad del piloto polaco y el piloto español. También hay 2 OTUs que desplazan la distribución de las muestras en un sentido contrario, siendo más prevalente en las muestras del piloto español. Estas 2 OTUs son la 2909 Ambas OTU pertenecen a la familia *Ruminococcaceae*. Las bacterias del género *Ruminococcus* degradan y convierten polisacáridos complejos en una variedad de nutrientes para sus huéspedes, entre ellos ácidos grasos de cadena corta que profieren protección contra la inflamación intestinal y ayuda al mantenimiento de la homeostasis de la microbiota intestinal [187] [188]. En otro de los ejes destaca la OTU 0388, más prevalente en las muestras del piloto de España. Las bacterias del género *Christensenellaceae* R-7 tienen una abundancia relativa mayor en sujetos metabólicamente sanos en comparación a sujetos metabólicamente alterados en base al análisis de antropometría, triglicéridos, colesterol HDL, HOMA-IR y presión arterial sistólica y diastólica [189] y es uno de los biomarcadores de mayor impacto en la diferenciación entre las personas normopeso y obesos tal y como se ha discutido durante la sección 4.1.1. Los resultados de los pilotos van en la misma línea, ya que los voluntarios del piloto español son los que tienen un estado metabólico más saludable en comparación a los pilotos polacos y británicos.

Finalmente, otras 3 OTU desvían la distribución de unas muestras independientemente del piloto, son las 5666, 5613 y 5689. En este caso, las 3 OTU pertenecen a la misma asignación taxonómica (p__Bacteroidetes;c__Bacteroidia;o__Bacteroidales;f__Prevotellaceae;g__Prevotella 9).

La mayor abundancia de este género, previamente descrito en la sección 4.1.2, desvía la distribución de las muestras hacia un patrón diferente de la mayoría de las muestras.

Finalmente, los datos de beta diversidad fueron utilizados para calcular las diferencias significativas entre las diferentes variables del estudio. En este caso, se utilizó la función Adonis2 para determinar si los valores de beta diversidad son significativamente diferenciales entre los grupos. Los resultados se muestran en la Tabla 5.

En primer lugar, se puede observar como las diferencias entre pilotos son muy significativas, tanto para las muestras V1 como para las muestras V2 ($p = 0,001^{***}$). Estos valores confirman la hipótesis de que la composición de la microbiota intestinal entre los pilotos es diferente, tanto al inicio como al final de la intervención. Sin embargo, las diferencias no son significativas cuando se comparan los grupos de intervención entre sí (CT vs PN vs PP). En este caso, en el estado basal, el p valor = 0,406 tras finalizar la intervención disminuye (0,132), indicando un grado de separación mayor en comparación al estado basal, no obstante, las diferencias siguen siendo no significativas.

Otras de las variables incluidas en el análisis Adonis2 fueron sexo y IMC. Para ambas variables, las diferencias son significativas, indicando una asociación entre cambios en la composición de la microbiota intestinal con el sexo y el IMC de los voluntarios. El sexo es una variable biológica importante que puede influir en la composición de la microbiota intestinal. Diversos estudios en humanos han demostrado que existen diferencias en la diversidad y composición de la microbiota intestinal entre hombres y mujeres [190]. Este estudio reveló que las diferencias en la dieta individual tienen efectos dependientes del sexo en la microbiota intestinal de los vertebrados, incluidos los humanos. Las diferencias en la composición de la microbiota entre hombres y mujeres pueden ser parcialmente atribuidas a la influencia de las hormonas sexuales en la función del sistema inmunológico y en el metabolismo. La diferencia entre el IMC y la microbiota ha sido previamente discutida en el apartado 4.1.1 demostrando la capacidad de predicción del IMC en base a la composición de la microbiota intestinal de los voluntarios.

Tabla 5 Valores obtenidos tras aplicar la función Adonis2 en las muestras V1 y V2 por separado.

Adonis2 (Bray Curtis) V1					
	DF	SumOfSqs	R ²	F	Pr(>F)
Cluster	5	1,453	0,013	1,22	0,004**
Grupo	2	0,479	0,0043	1,01	0,406
Sexo	1	0,475	0,0042	2,00	0,001***
IMC	1	0,933	0,0083	3,93	0,001***
Piloto	2	0,947	0,0085	1,99	0,001***

Adonis2 (Bray Curtis) V2					
	DF	SumOfSqs	R ²	F	Pr(>F)
Cluster	5	1,672	0,021	1,16	0,009**
Grupo	2	0,544	0,007	1,13	0,132
Sexo	1	0,352	0,0045	1,47	0,010**
IMC	1	0,774	0,01	3,23	0,001***
Piloto	2	1,09	0,014	2,27	0,001***

Finalmente, destaca la diferencia significativa entre los *clusters*, tanto para las muestras V1 ($p = 0,004$) y V2 ($p = 0,009$). Estos valores indican que la composición de la microbiota intestinal de los voluntarios sufre variaciones significativas en relación al *cluster* metabólico al cual han sido asignados, indicando posibles correlaciones entre los metabolitos del huésped y la microbiota intestinal. A continuación, se explora la asociación de la microbiota intestinal con la obesidad/sobrepeso en los voluntarios del proyecto PREVENTOMICS para cada piloto en particular.

4.1.4. Efecto del tipo de dieta en la microbiota intestinal humana en el estudio de intervención en España

A continuación, se exponen los resultados del piloto de España para la caracterización de la microbiota y el impacto de las dietas personalizadas en su modulación.

En primer lugar, se estudió si la distribución de los voluntarios en los tres grupos de intervención (CN, PN y PP) fue correctamente aleatoria. Los resultados comparativos indican que no hay diferencias significativas, entre los tres grupos de intervención, para ninguna de las once variables bajo estudio (Tabla 8) y, por lo tanto, demuestran la correcta distribución de los individuos.

Tabla 6 Características basales de los participantes del piloto de España por grupo de intervención. Los datos se expresan como media \pm desviación estándar, o n (porcentajes). IMC: índice de masa corporal; PAS: presión arterial sistólica; PAD: presión arterial diastólica; MEDAS: Mediterranean Diet Adherence Screener. P de ANOVA o chi-cuadrado.

Variable	CN (n = 51)	PN (n= 62)	PP (n= 56)	P
Edad, a	42 \pm 12	41 \pm 11	41 \pm 10	0.91
Mujeres, n (%)	33 (65)	46 (74)	36 (64)	0.43
Peso, kg	71 \pm 12	71 \pm 13	71 \pm 15	0.92
IMC, kg/m²	25.4 \pm 4.4	25.5 \pm 4.6	25.4 \pm 4.1	0.98
Cintura circunferencia				
Mujeres, cm	85.3 \pm 14.4	84.8 \pm 10.8	82.4 \pm 11.0	0.56
Hombres, cm	85.8 \pm 10.6	88.5 \pm 13.0	92.8 \pm 14.5	0.26
Cadera circunferencia, cm	104.7 \pm 9.2	103.3 \pm 8.6	103.5 \pm 9	0.70
Índice de conicidad	0.8 \pm 0.1	0.8 \pm 0.1	0.8 \pm 0.1	0.59
PAS, mm Hg	114.2 \pm 16.2	115.3 \pm 11.5	111.6 \pm 16.3	0.39
PAD, mm Hg	69.1 \pm 11.9	70.7 \pm 8.6	69.8 \pm 8.8	0.68
Presión pulso, mm Hg	65.8 \pm 10.7	70.3 \pm 12	66.5 \pm 11.4	0.08
MEDAS, total	6 \pm 1	7 \pm 1	6 \pm 1	0.64

A continuación, se ha analizado la alfa diversidad utilizando tres índices distintos: *Observed diversity*, *Chao1* y *Shannon* (Figura 21)

En el caso del piloto español, no se observan diferencias significativas a nivel de alfa diversidad en ninguna de las comparaciones realizadas. Por esta razón, podemos concluir que las intervenciones nutricionales, tanto la control como las personalizadas, no tienen un impacto diferencial en la diversidad de la microbiota intestinal de los voluntarios. Estos resultados van en consonancia con los observados en el desempeño de los *global scores* metabólicos, ya que para este piloto, no se obtuvieron cambios significativos en

los global scores al finalizar las intervenciones. La principal hipótesis de estas no diferencias entre ambos tiempos y las diferentes intervenciones nutricionales es debido al estado basal de los voluntarios. Tal y como ya se ha descrito, la mayoría de estos voluntarios son mayoritariamente sanos, con unos índices de masa corporal normales y con valores menos alterados en comparación a los otros dos pilotos. En un reciente meta-análisis donde fueron incluidos 64 estudios de intervención dietética suplementados con fibras prebióticas en 2099 adultos sanos, no se encontraron diferencias de efecto entre la intervención y los comparadores para la α -diversidad [185]. No obstante, distintos estudios de intervenciones nutricionales en personas obesas sí que observan diferencias significativas en los valores de alfa diversidad al acabar la intervención [191], [192].

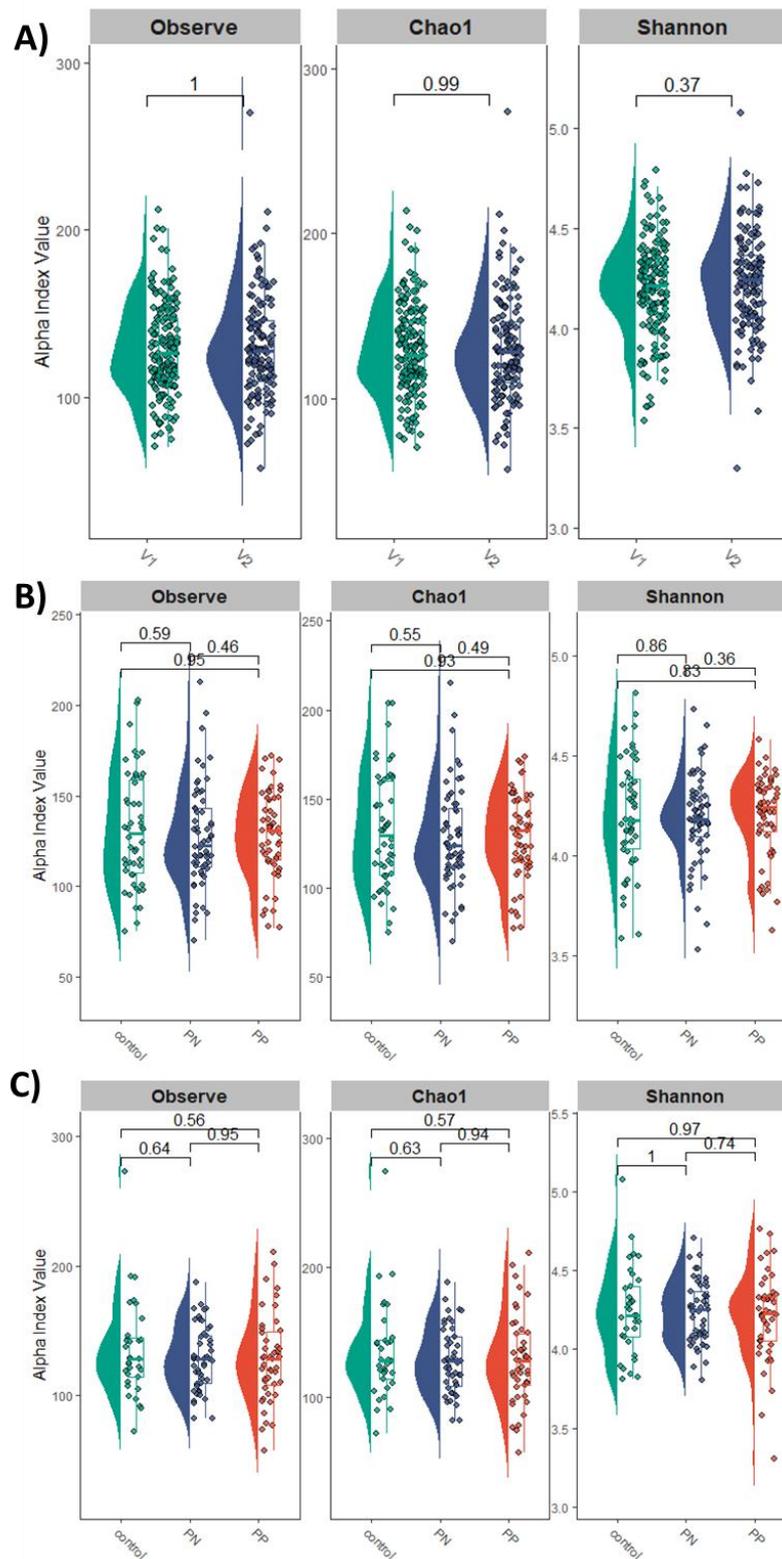


Figura 21 Diagrama de cajas de los valores de alfa diversidad Observe, Chao1 y Shannon para; A) todas las muestras del piloto de España separadas por tiempo de intervención, B) las muestras V1 y C) las muestras V2 separadas por grupo de intervención. Los valores p se añadieron tras aplicar el test de Wilcoxon.

A continuación, la siguiente comparación llevada a cabo fue entre las diferentes intervenciones para cada tiempo con el objetivo de determinar si la personalización de la

dieta induce cambios significativos en la composición de la microbiota (beta diversidad) en comparación a una intervención no personalizada (Figura 22). Los resultados de la significación estadística y las comparaciones pareadas entre los grupos se pueden consultar en la Tabla 9. En las muestras de tiempo V1 podemos observar que no hay diferencias significativas, ya sea a nivel general, o tras realizar las comparaciones pareadas entre las diferentes intervenciones. Estas no diferencias a nivel basal entre los grupos son las deseadas ya que esto indica que no existen diferencias en la composición de la microbiota intestinal de los voluntarios cuando inician las intervenciones. En las muestras V2 es donde se analiza el desempeño de las dietas y la capacidad moduladora de las dietas personalizadas en comparación a una dieta no personalizada. En este caso, tampoco hay diferencias significativas entre las 3 intervenciones nutricionales al finalizar el estudio piloto. Estos resultados indican que la personalización de las dietas en base al metaboloma de los voluntarios no modifica de forma diferencial la microbiota intestinal en comparación a una dieta no personalizada en un grupo de voluntarios mayoritariamente normo peso.

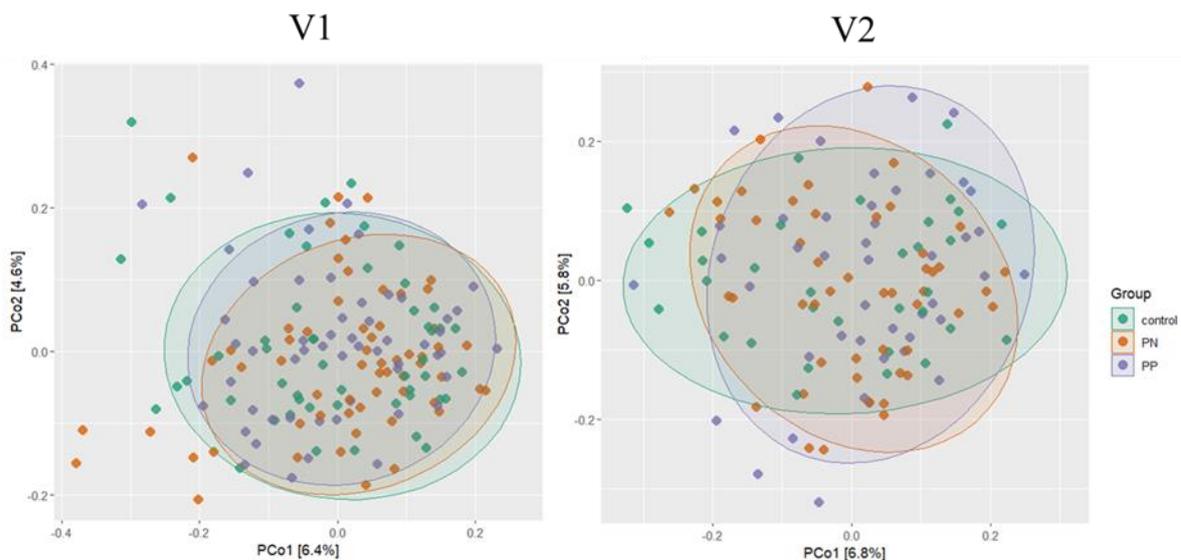


Figura 22 Representación de las 2 coordenadas principales de del análisis de beta diversidad Bray Curtis para el piloto español, comparando las intervenciones nutricionales entre sí, separando las muestras por tiempo de intervención. Se muestran las 2 coordenadas con las mayores diferencias y los elipsoides de confianza normales para los conjuntos de muestras.

Tabla 7 Valores p de función Adonis2 tras comparar los valores de beta diversidad Bray Curtis entre las diferentes intervenciones dietéticas para cada uno de los tiempos por separado.

	P.valorV1	P.valorV2
Dif. Total	0,524	0,945
PP vs PN	0,426	0,853
PP vs Control	0,654	0,850
PN vs Control	0,380	0,892

A continuación, las mismas comparaciones fueron llevadas a cabo utilizando la métrica de beta diversidad Bray Curtis. En el caso de las intervenciones individualizadas, no observamos diferencias significativas entre el tiempo basal y el tiempo final para ninguno de los tres grupos (CT, PN y PP). No obstante, cuando se utilizan las muestras de todas las intervenciones conjuntamente, se observa una cierta diferencia estadísticamente significativa entre las muestras V1 y V2 ($p = 0,011^*$). Una de las razones por las que no se observan diferencias a nivel de intervenciones individualizadas y sí se observen a nivel general puede ser la N utilizada en cada análisis. En el caso de cada intervención, el número de voluntarios es menor, por consiguiente, las posibles diferencias en la composición microbiana inducidas por las intervenciones nutricionales no se diferencian significativamente. En cambio, el conjunto de datos general es mucho más robusto y teniendo en cuenta todos los voluntarios, los cambios generales inducidos por las intervenciones dietéticas son estadísticamente significativos. Algunos estudios publicados donde se llevan a cabo intervenciones nutricionales en personas no obesas prolongadas en el tiempo tienen resultados similares. Por ejemplo, Fragiadakis et al. tampoco detectan diferencias significativas en los índices de alfa y beta diversidad al comparar la composición de la microbiota antes y después de las intervenciones nutricionales. Las diferencias que observan se basan en la abundancia de géneros diferenciales [193]. Otro estudio similar llevado a cabo en Canadá con un enfoque en las dietas ricas en vegetales tampoco detectan cambios a nivel de diversidad en personas no obesas tras 3 meses de intervención [194]. Cabe destacar que la mayoría de los estudios con intervenciones dietéticas se llevan a cabo en voluntarios obesos ya que son los principales candidatos a poder revertir un estado patológico a través de la dieta. Los estudios de intervención en personas no obesas son menos abundantes. A nivel general, en los datos analizados para la intervención de este piloto tampoco se han observado cambios significativos entre el estado basal de cada intervención y las muestras post intervención para los valores de alfa y beta diversidad, independientemente de la personalización o no de las dietas.

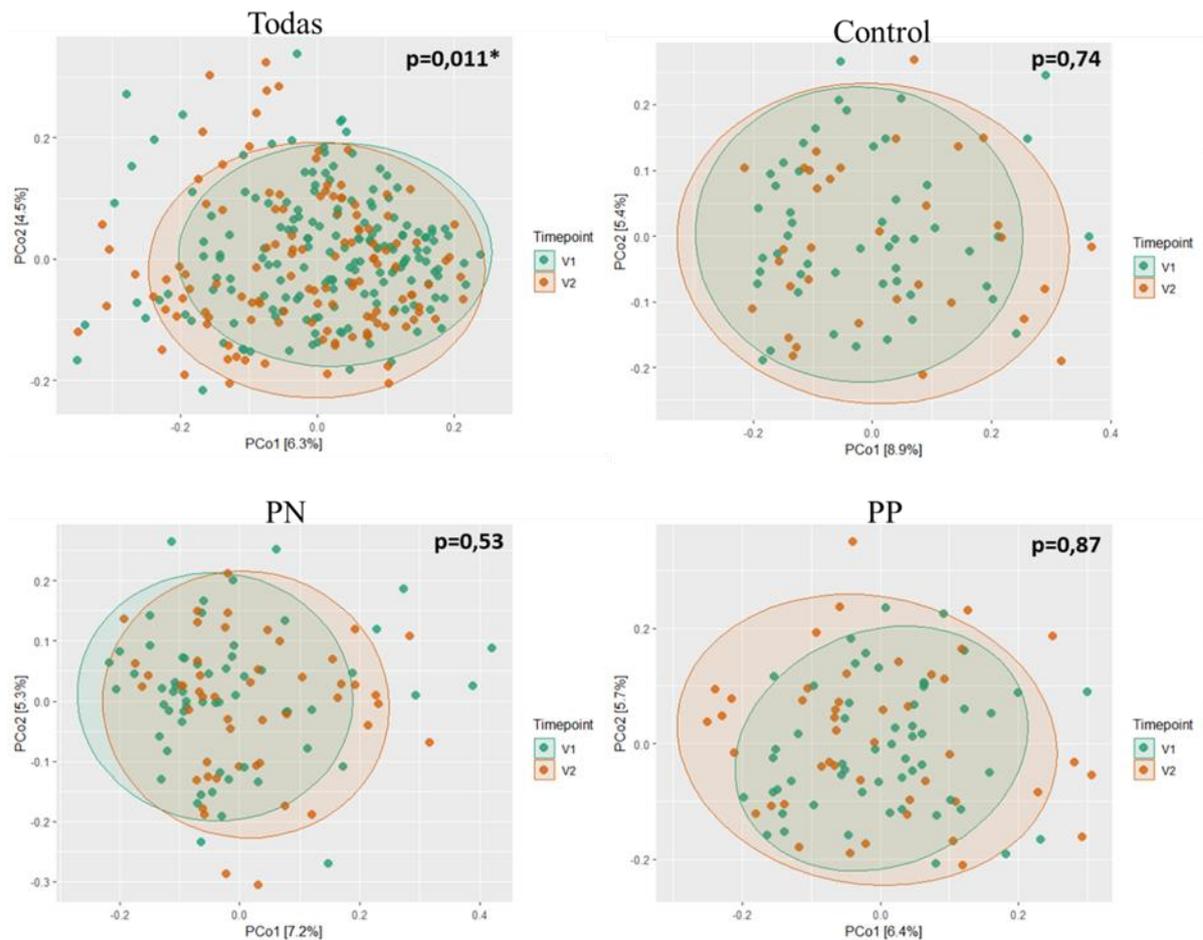


Figura 23 Representación de las 2 coordenadas principales de del análisis de beta diversidad Bray Curtis para el piloto español, comparando los dos tiempos de intervención, utilizando todas las muestras conjuntamente y para cada intervención por separado. Los p valores de la permutación Adonis2 ha sido incluida en cada gráfico. Se incluyen los elipsoides de confianza normales para los conjuntos de muestras.

El análisis de la composición general de la microbiota se complementa con las distribuciones gráficas del “core microbiome” (Figura 24) y la abundancia relativa de los 20 géneros más abundantes (Figura 24). La distribución de los géneros bacterianos más abundantes y prevalentes que conforman el “core microbiome” se mantiene para ambos tiempos estudiados. No se observan cambios importantes entre los principales géneros. Estos resultados van en la línea con los observados en los análisis de beta diversidad.

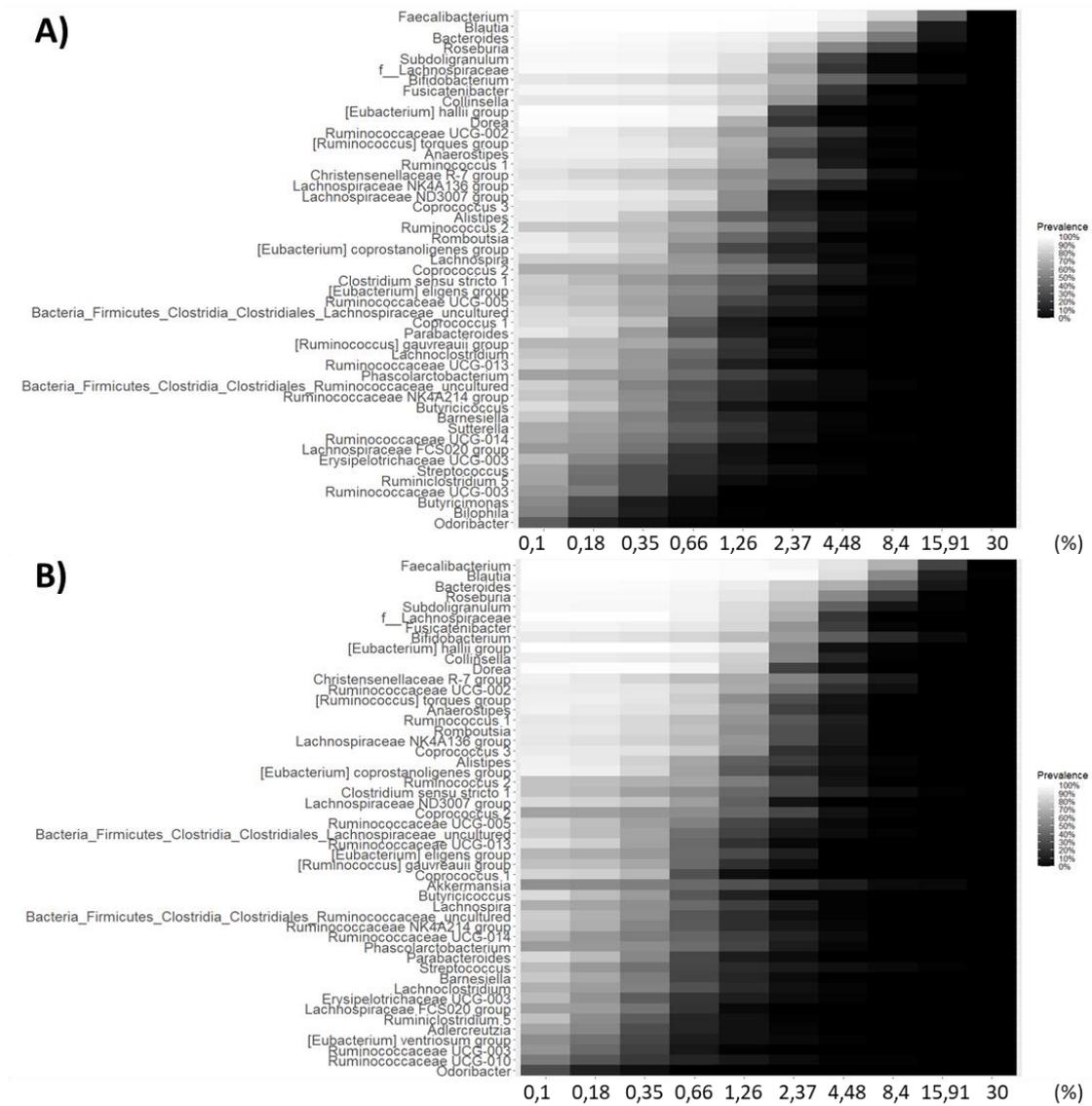


Figura 24 Representación gráfica mediante mapa de calor del “Core Microbiome” mediante la prevalencia para cada fracción de abundancia relativa en escala exponencial. En el eje de las Y se representan los géneros bacterianos, en el eje de la X se representan las abundancias relativas en combinación con la prevalencia de cada género bacteriano. A) Muestras pertenecientes al tiempo inicial (V1) B) Muestras pertenecientes al tiempo final (V2).

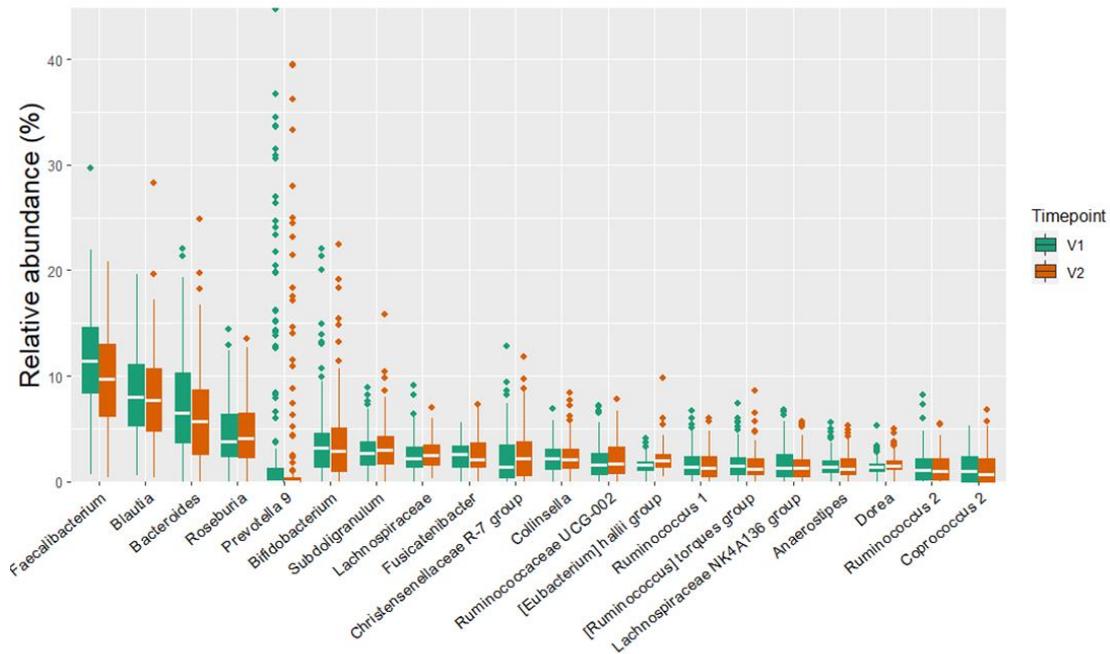


Figura 25 Gráfico de caja (box plot) que representa la abundancia relativa de los 20 géneros bacterianos más prevalentes entre las muestras V1 y V2 de la intervención nutricional. Cada caja muestra la mediana (línea horizontal dentro de la caja), el primer y tercer cuartil (bordes inferior y superior de la caja, respectivamente), y los valores atípicos. Este gráfico permite comparar la distribución y variabilidad de la abundancia de cada género bacteriano entre los diferentes tiempos, y evidencia las diferencias en la composición de la microbiota.

Finalmente, el último análisis llevado a cabo para este piloto fue un análisis de abundancia diferencial, en este caso un análisis lineal discriminante (LDA) utilizando las abundancias relativas de todas las asignaciones taxonómicas, desde cepa hasta filo.

Cuando se utilizan todas las muestras del piloto, un total de 29 asignaciones taxonómicas tienen una abundancia diferencial entre el tiempo V1 y V2. Los resultados más significativos los encontramos para el filo *Bacteroidetes* orden *Bacteroidales* y clase *Bacteroidia*. Estas asignaciones taxonómicas son las que presentan mayores abundancias relativas en este subconjunto de datos, con abundancia de entre el 10 y el 20%. En este caso, la abundancia es mayor en las muestras V1, indicando una pérdida significativa de estas bacterias tras finalizar las intervenciones nutricionales. Las bacterias *Bacteroides* son bacterias anaerobias gramnegativas y desempeñan múltiples funciones en la microbiota intestinal. Como comensales, mutualistas son organismos beneficiosos probados, ayudan al huésped proporcionándole numerosos beneficios para la salud. No obstante, algunas especies de *Bacteroides* pueden desempeñar un doble papel beneficioso y patógeno en función de su localización en el huésped, siendo a menudo beneficiosas en el intestino y también patógenas oportunistas [195]. Esta dualidad en la funcionalidad de estas bacterias hace difícil establecer conclusiones robustas o hipótesis respaldadas por

literatura científica. Otro resultado que destaca es la diferencia significativa del género *Faecalibacterium*, más abundante en las muestras V1. La asociación positiva de este género a estados más saludables y menos inflamatorios ha sido discutida previamente en apartados anteriores. En base a la hipótesis inicial del estudio, los resultados esperables son contrarios a los obtenidos para este género en concreto. No obstante, para cada intervención por separado, las diferencias entre las abundancias de *Faecalibacterium* no son significativas.

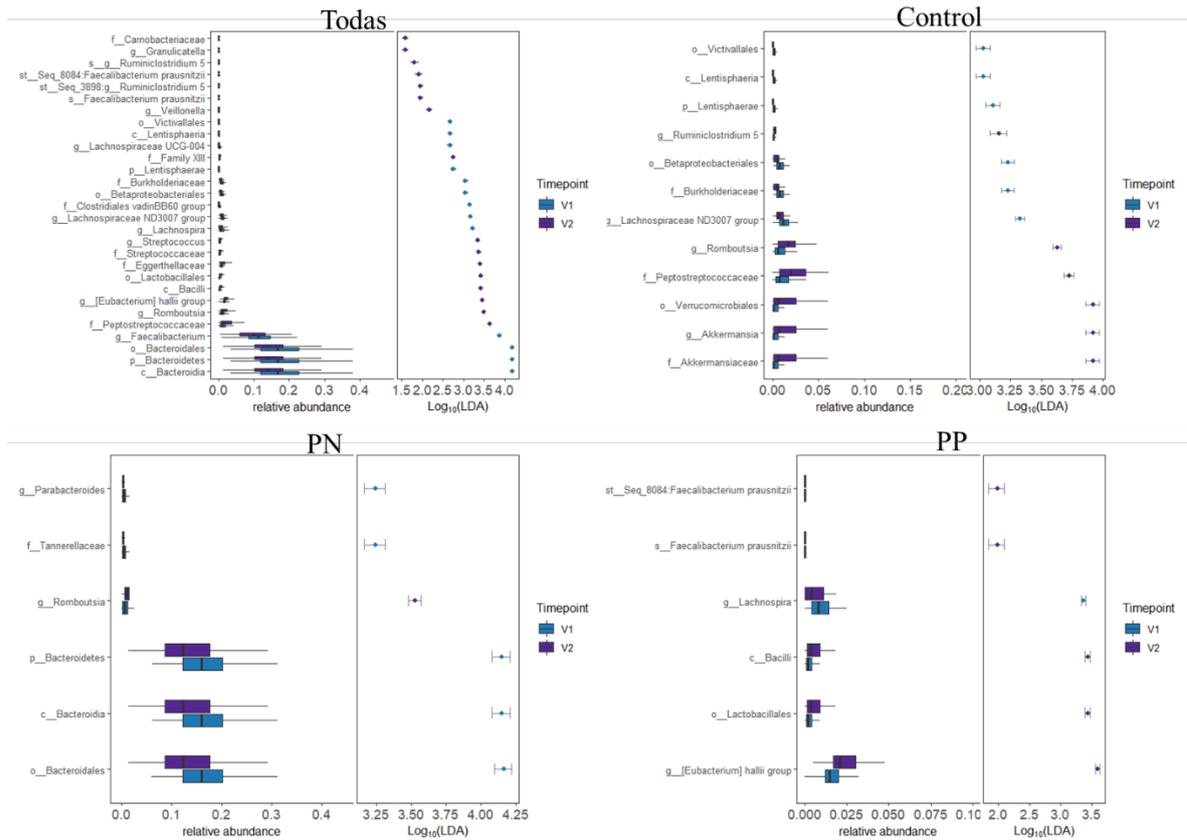


Figura 26 Análisis linear discriminante (LDA) entre todas las asignaciones taxonómicas para el piloto español. Se muestran los resultados de las asignaciones significativas tras la doble validación donde las abundancias de cada taxón se representan en forma de diagrama de cajas y los valores de los scores LDA en Log10 se muestran a la derecha de cada taxón. Los scores del LDA indican la diferenciación entre la condición a comparar, cuanto mayor sea la diferenciación, más significativa es la abundancia de esa taxonomía entre las dos condiciones. El p valor de corte utilizado para la primera comparación y para el ajuste fue 0,01

Todos las otras asignaciones taxonómicas con diferenciales significativos entre V1 y V2 tienen abundancia relativas inferiores a las 2 asignaciones taxonómicas bacterianas citadas anteriormente, oscilando entre el 0 y el 2%. Por otro lado, cuando estudiamos cada intervención nutricional de forma individualizada, encontramos un mayor número de diferencias significativas en el grupo control en comparación a las intervenciones personalizadas (12 control, 6 PN y 6 PP), aunque en asignaciones taxonómicas muy poco abundantes en sus respectivas comunidades bacterianas. Prácticamente ninguna

asignación diferencial se repite entre los grupos de intervención, a excepción del género *Romboustia* que se repite para la intervención control y PN. Las especies del género *Romboustia* son anaerobios facultativos que están adaptados a un entorno rico en nutrientes en el que los carbohidratos y las fuentes exógenas de aminoácidos y vitaminas están disponibles en abundancia. El incremento relativo de la abundancia relativa de este género ha sido descrito en intervenciones basadas en probióticos [196]. De este modo, aunque los mecanismos de acción son ampliamente desconocidos aún, es probable que exista alguna relación entre los géneros bacterianos probióticos y *Romboustia*.

Dentro del grupo control, destaca una mayor abundancia de *Akkermansia* al finalizar la intervención. Muy recientemente en un estudio llevado a cabo en 10534 personas, una menor abundancia de *Akkermansia* ha sido descubierta en las personas obesas. En concreto se detectó una asociación no lineal entre *Akkermansia* y el riesgo de obesidad ($P = 0,01$) [197]. En sentido contrario y dentro del mismo grupo se observa una disminución del género *Lachnospiraceae ND3007 group*. Los miembros del grupo ND3007 de *Lachnospiraceae* son supuestos productores de ácidos grasos de cadena corta con efectos positivos en la salud [198]. Finalmente, la última familia dentro del grupo control con una abundancia diferencial son las *Burkholderiaceae*. Esta familia se caracteriza por la presencia de organismos ecológicamente muy diversos y contiene organismos verdaderamente saprofitos del medio ambiente, fitopatógenos, patógenos oportunistas, así como patógenos primarios para los seres humanos y los animales [199]. En este caso, se observa una disminución de la abundancia de este género en el grupo control al finalizar la intervención, provocando así un posible efecto positivo.

En el grupo PN, destaca la abundancia diferencial del filo *Bacteroidetes* y el género *Romboustia*, descritos previamente en la diferenciación de las muestras totales.

En el grupo PP destaca una mayor abundancia en las muestras V2 del género *Eubacterium hallii group*. *Eubacterium hallii* se considera un microbio importante en relación con el equilibrio metabólico intestinal debido a su capacidad de utilizar la glucosa y los intermediarios de fermentación acetato y lactato, para formar butirato e hidrógeno [200]. También el orden *Lactobacillales*, más abundante en las muestras post intervención, contienen un gran número de bacterias potencialmente probióticas del género *Lactobacillus*. El último género con una significación similar a las dos anteriores es *Lachnospira*. En este caso, el potencial positivo de esta variación no está tan claro como en los otros dos casos ya que por ejemplo la abundancia de este género ha sido correlacionada con mayor actividad física [201], y se encuentra en mayor medida en

personas con una IMC bajo [202]. La tendencia observada en este género es disminución en el grupo post intervención.

En general, los resultados de la caracterización de la microbiota en la intervención del piloto español va en la misma línea que los resultados metabolómicos o antropométricos registrados por los otros socios del proyecto. No se observan diferencias significativas a nivel de incremento de la diversidad bacteriana. Tampoco los cambios observados a nivel de composición (beta diversidad) son significativos entre intervenciones. Finalmente, el análisis diferencial a nivel de asignaciones taxonómicas muestra cambios significativos entre los dos tiempos analizados, no obstante, no todos los cambios observados tienen asociaciones positivas. Una de las hipótesis más plausibles por las cuales no se observan grandes cambios a nivel de la composición de la microbiota tras realizar las intervenciones nutricionales es el punto de partida saludables a partir del cual empezaban la intervención la gran mayoría de los voluntarios de este piloto.

A continuación, vamos a profundizar en el análisis individualizado de las otras dos cohortes, que sí presentan alteraciones en las muestras V1, con una mayor prevalencia de la obesidad.

4.1.5. Efecto del tipo de dieta en la microbiota intestinal humana en el estudio de intervención en Polonia

A continuación, se muestran los resultados obtenidos para el piloto realizado en Polonia. Las variables antropométricas recogidas en el tiempo V1 se pueden consultar en la Tabla 8. No hay ninguna diferencia de partida entre los grupos para las variables edad, IMC y circunferencia de cintura. Por otro lado, existe una mayor proporción de mujeres participantes en el estudio.

Tabla 8 Características basales de los participantes del piloto de Polonia por grupo de intervención. IMC: Índice de masa corporal. P de ANOVA o chi-cuadrado.

	CT (n=88)	PN (n=88)	PP (n=89)	p-valor
Mujeres (%)	69%	78%	70%	0,31
	Mediana (Q1-Q3)			
Edad (años)	47 (37-52)	44 (35-51)	44 (36-48)	0,15
IMC (kg/m²)	32 (28,7-35,9)	32,5 (29,1-35,9)	31,3 (27,9-35,1)	0,29
Cintura c. (cm)	105 (97-114)	104 (96-115)	104 (95-112)	0,74

Los resultados de los análisis de alfa diversidad se muestran en la Figura 27. Para las 3 métricas de alfa diversidad utilizadas, existe una tendencia hacia un incremento en sus valores, al final de las intervenciones nutricionales. No obstante, hay que destacar que la comparación estadística no es significativa, aunque los valores son muy cercanos a $p < 0,05$ (*Shannon* $p = 0,052$, *Observed* $p = 0,071$, *Chao1* $p = 0,18$).

A continuación, las diferentes intervenciones nutricionales fueron comparadas entre sí, tanto para el tiempo V1 como para el tiempo V2. Como era esperable, no existen diferencias entre los grupos para el tiempo V1, ya que todos los voluntarios parten del mismo estado basal. Estas no diferencias confirman que la inclusión de los voluntarios al estudio ha sido aleatoria en cuanto a la diversidad de su microbioma intestinal. Sin embargo, a diferencia de las muestras V1, en el tiempo V2 (Figura 27C) se pueden observar diferencias significativas entre las intervenciones nutricionales. La intervención con una mayor diversidad bacteriana al finalizar el piloto es el grupo control y grupo PN. El grupo PP es el que presenta valores inferiores de alfa diversidad. Estas diferencias son significativas para el índice *Observed* $p = 0,021$, y *Chao 1* $p = 0,02$ respecto a las muestras

del grupo control. La misma tendencia se observa al comparar el grupo PN y PP, no obstante, estas diferencias no son significativas; *Observed* $p = 0,053$, y *Chao 1* $p = 0,11$. Los resultados obtenidos indicarían un posible impacto positivo del cambio de dieta en la alfa diversidad de la microbiota intestinal, especialmente en los voluntarios con prevalencias mayores de obesidad como en el caso del piloto de Polonia. En otros estudios de intervención nutricional llevados a cabo, la tendencia de mejora en los índices de alfa diversidad post intervención son más habituales en personas con sobrepeso y obesidad. Por ejemplo, en un estudio donde se administró dieta Mediterránea a personas obesas y con sobrepeso durante 8 semanas, observaron un incremento en los índices de alfa diversidad post intervención [203]. En un estudio similar basado en la intervención de la dieta a través de la restricción calórica, un método clásico de intervención nutricional aplicado por los nutricionistas similar a la dieta control de los pilotos del proyecto PREVENTOMICS, los investigadores descubrieron un incremento significativo en el índice Shannon al finalizar la intervención de 8 semanas en comparación a las muestras del inicio de la intervención [204]. Otro estudio similar en 71 personas obesas basado en intervenciones de restricciones calóricas obtienen resultados similares, con incrementos en los índices de Shannon y Observed ($p < 0,001$) al finalizar la intervención [205]. Sin embargo, hay que destacar que es complicado realizar comparaciones directas entre las intervenciones llevadas a cabo en el proyecto PREVENTOMICS y otros estudios publicados debido a la disparidad de criterios de inclusión, localización geográfica, duración de la intervención o número de voluntarios.

Hay que destacar que en nuestros resultados la mejora en la diversidad bacteriana no parece depender de la personalización de la dieta, ya que uno de los grupos con mayores valores de diversidad alfa es el grupo control.

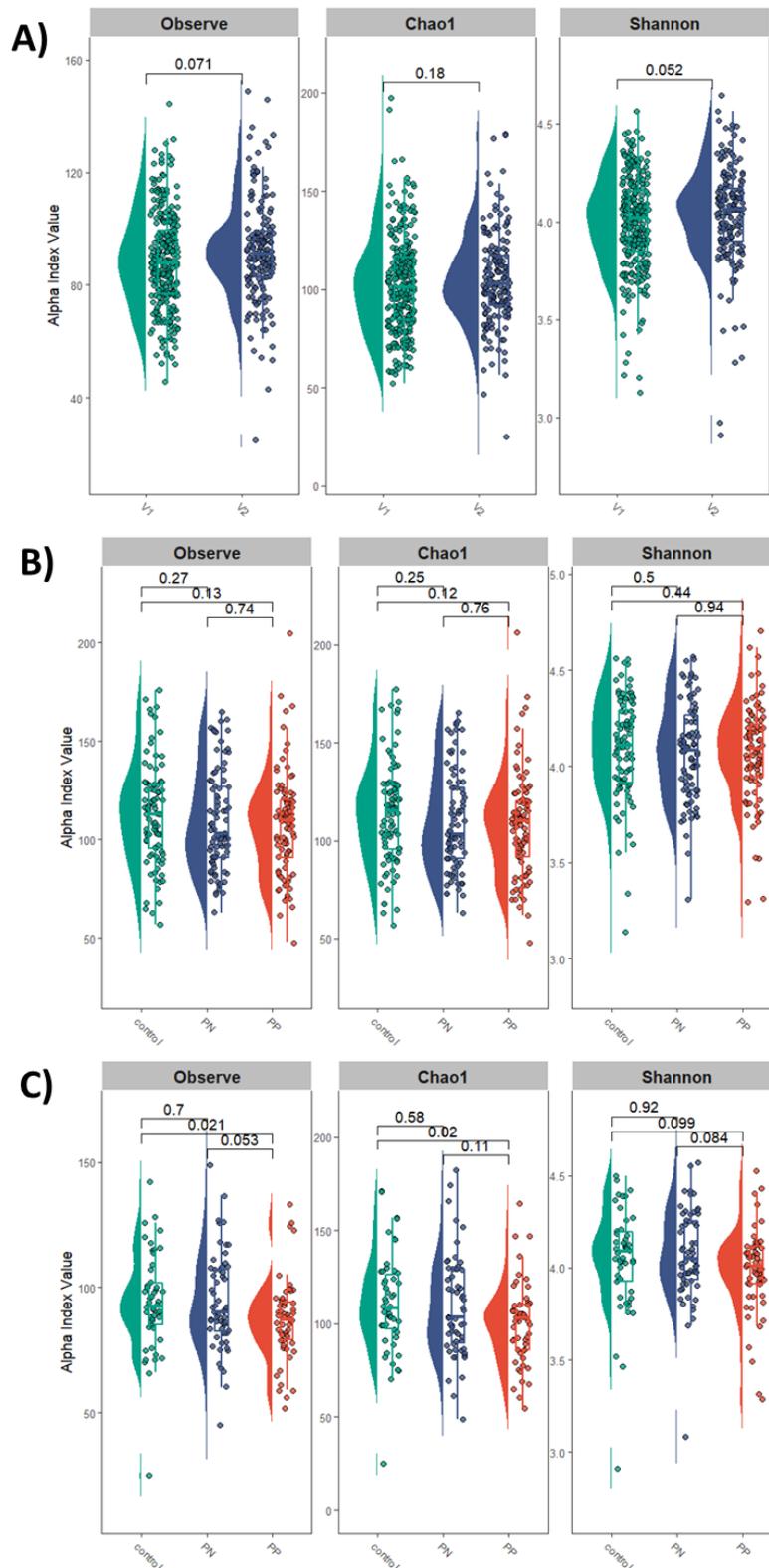


Figura 27 Diagrama de cajas de los valores de alfa diversidad Observe, Chao1 y Shannon para; A) todas las muestras del piloto de Polonia separadas por tiempo de intervención, B) las muestras VI y C) las muestras V2 separadas por grupo de intervención. Los valores p se añadieron tras aplicar el test de Wilcoxon.

El mismo tipo de análisis fue llevado a cabo con los valores de beta diversidad (Bray Curtis). Las métricas de beta diversidad fueron utilizadas para comparar el desempeño de cada intervención dietética en comparación a las otras. Estos resultados se muestran en la

Figura 29 y Figura 28. Los resultados obtenidos van en la línea de los observados para la alfa diversidad. A tiempo V1, no se observan diferencias a nivel de composición entre las 3 intervenciones, este resultado indica una distribución homogénea de los voluntarios en los diferentes grupos de intervención a tiempo V1. La tendencia en las muestras V2 es diferente, se observa una cierta diferenciación entre las 3 intervenciones, sin embargo, las diferencias no son estadísticamente significativas. A nivel general, todos los valores p disminuyen en las comparaciones pareadas indicando una mayor diferenciación en la composición de la microbiota intestinal de los voluntarios que han seguido las diferentes intervenciones nutricionales. En este sentido, las diferentes dietas parecen favorecer la diferenciación de la composición de la microbiota intestinal, aunque no se alcance la diferenciación estadística. La mayor diferenciación la observamos al comparar el grupo PN vs PP ($p = 0,053$) seguido de PP vs control ($p = 0,156$). Del mismo modo que en los resultados de alfa diversidad, las diferencias entre el grupo PN y control son menores ($p = 0,399$).

En el caso de las intervenciones individualizadas (Figura 28), no observamos diferencias significativas entre el tiempo basal y el tiempo final. Un p valor ligeramente inferior se observa al comparar todas las muestras entre sí, no obstante esta diferencia no es significativa, $p = 0,161$. Estos resultados indican que a nivel de la composición mayoritaria de la microbiota intestinal, no se observan cambios significativos en el piloto polaco en los valores de beta diversidad al comparar las muestras de los voluntarios V1 vs V2 para ninguna de las 3 intervenciones nutricionales realizadas. Resultados similares fueron reportados en un estudio de intervención donde se estudiaron 3 estrategias distintas en personas obesas; restricción calórica, dieta Mediterránea y cirugía de reducción gástrica. En ninguna de las tres intervenciones se observaron diferencias significativas en los índices de beta diversidad entre las muestras iniciales y las finales [192]. En otro estudio similar llevado a cabo en España en 362 voluntarios con sobrepeso y obesidad donde fueron realizadas intervenciones nutricionales junto a cambios en el estilo de vida durante 1 año, no se observaron cambios significativos en los índices de beta diversidad Bray-Curtis, Weighted y Unweighted Unifrac al comparar las muestras iniciales del estudio respecto a las muestras finales [206]. Otros estudios apuntan a la posibilidad de que el microbioma intestinal tenga un cierto grado de resiliencia a los cambios inducidos por intervenciones nutricionales o la pérdida de peso [193] evitando así observar cambios estructurales a nivel de la composición general de la microbiota intestinal. También llama la atención el hecho que muchos estudios de intervención llevados a cabo en personas

con obesidad no reportan los resultados de beta diversidad, centrándose tan solo en los cambios observados entre los géneros bacterianos diferenciales, donde sí se encuentran diferencias significativas de forma más recurrente. Por ejemplo, en un una revisión sistemática de ensayos controlados aleatorizados, de los 18 estudios incluidos en la revisión, tan solo 7 incluyen análisis de beta diversidad [207].

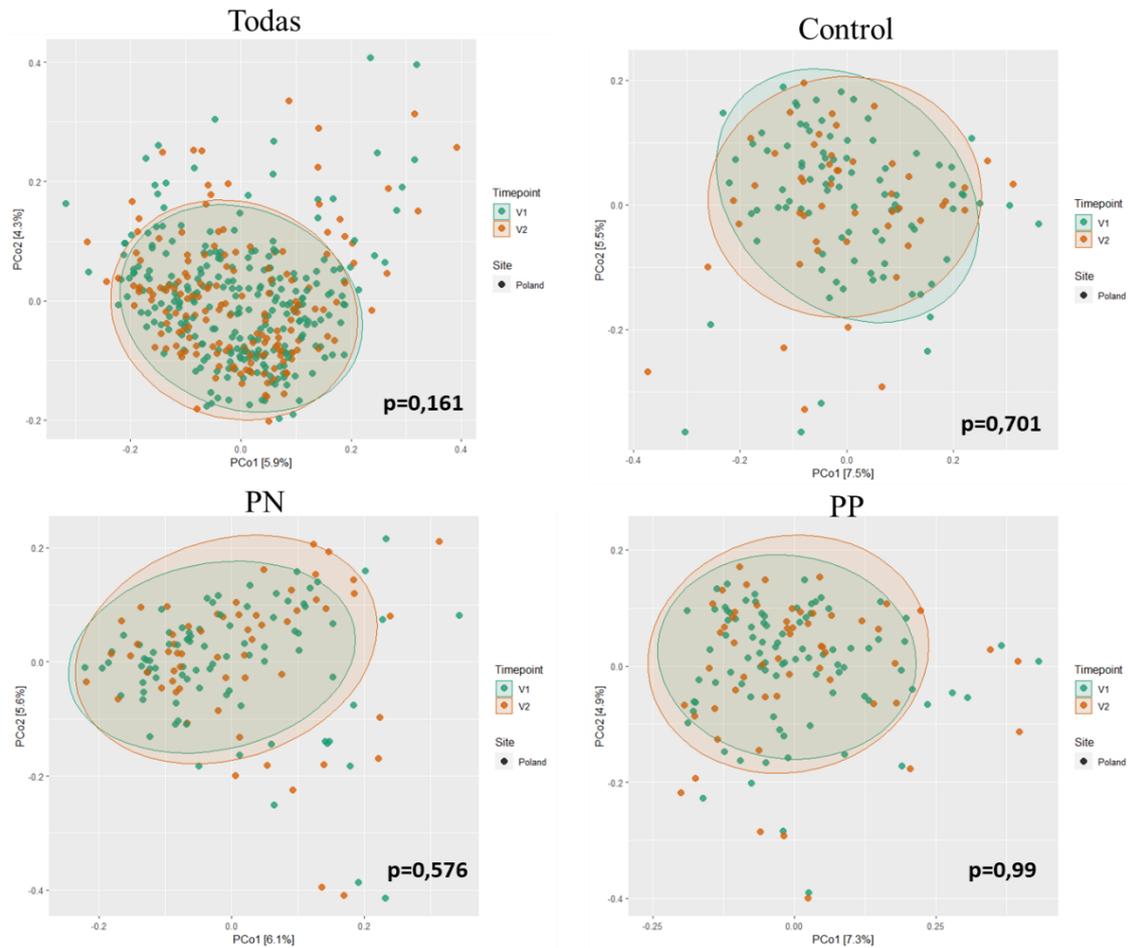


Figura 28 Representación de las 2 coordenadas principales de del análisis de beta diversidad Bray Curtis para el piloto polaco, comparando los dos tiempos de intervención, utilizando todas las muestras conjuntamente y para cada intervención por separado. Los p valores de la permutación Adonis2 ha sido incluida en cada gráfico.

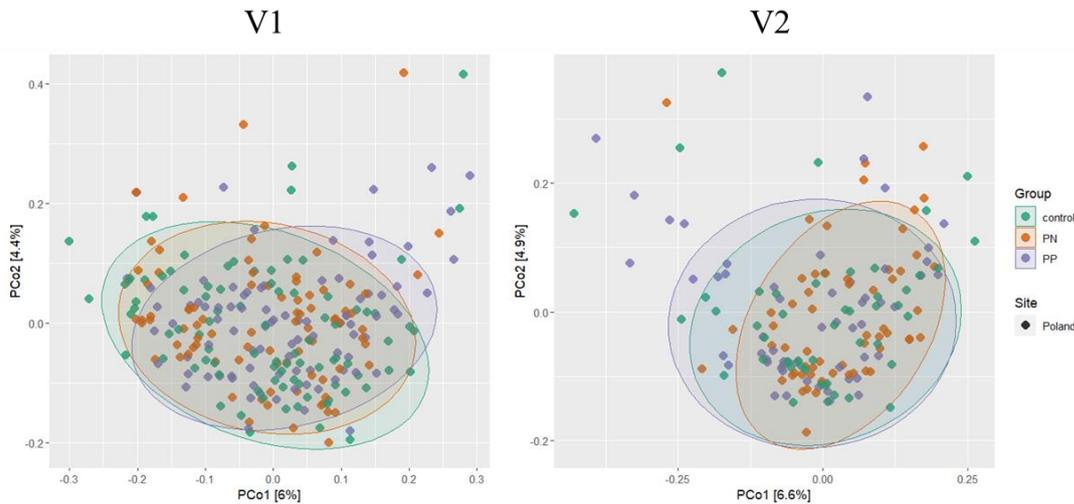


Figura 29 Representación de las 2 coordenadas principales de del análisis de beta diversidad Bray Curtis para el piloto polaco, comparando las intervenciones nutricionales entre sí, separando las muestras por tiempo de intervención.

Tabla 9 Valores p de función Adonis2 tras comparar los valores de beta diversidad Bray Curtis entre las diferentes intervenciones dietéticas para cada uno de los tiempos por separado.

	P.valorV1	P.valorV2
Dif. Total	0,296	0,087
PP vs PN	0,343	0,053
PP vs Control	0,271	0,156
PN vs Control	0,426	0,399

El análisis de la composición general de la microbiota se complementa con las distribuciones gráficas del “core microbiome” (Figura 30) y la abundancia relativa de los 20 géneros más abundantes (Figura 31).

La distribución de los géneros bacterianos más abundante y prevalentes que conforman el “core microbiome” se mantiene para ambos tiempos estudiados. No se observan cambios importantes entre los principales géneros entre los dos tiempos de análisis. Estos resultados van en la misma línea con los resultados de beta diversidad donde no se observan grandes cambios estructurales en la composición de la microbiota intestinal.

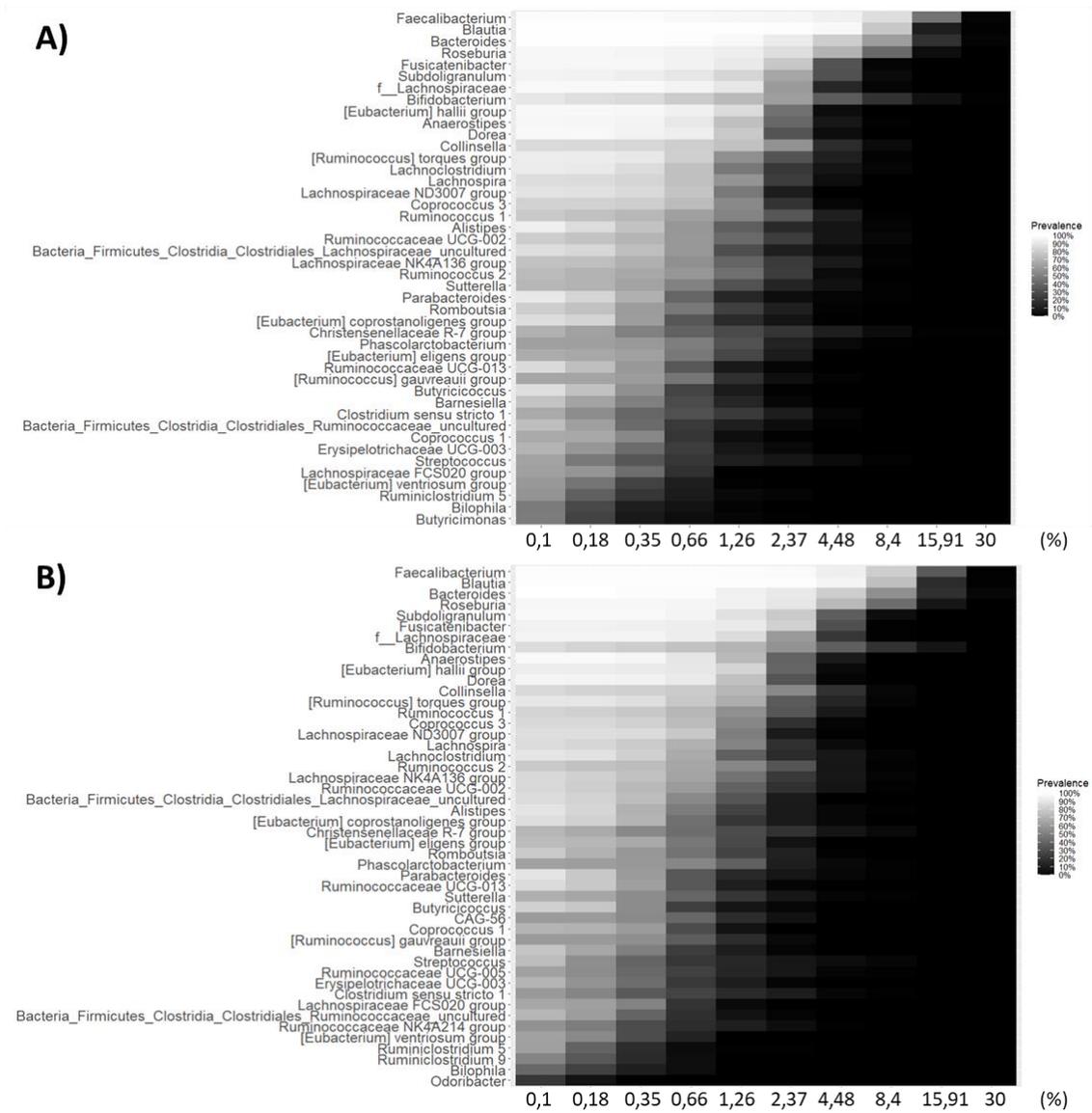


Figura 30 Representación gráfica mediante mapa de calor del “Core Microbiome” mediante la prevalencia para cada fracción de abundancia relativa en escala exponencial. En el eje de las Y se representan los géneros bacterianos, en el eje de la X se representan las abundancias relativas en combinación con la prevalencia de cada género bacteriano. A) Muestras pertenecientes al tiempo inicial (V1) B) Muestras pertenecientes al tiempo final (V2).

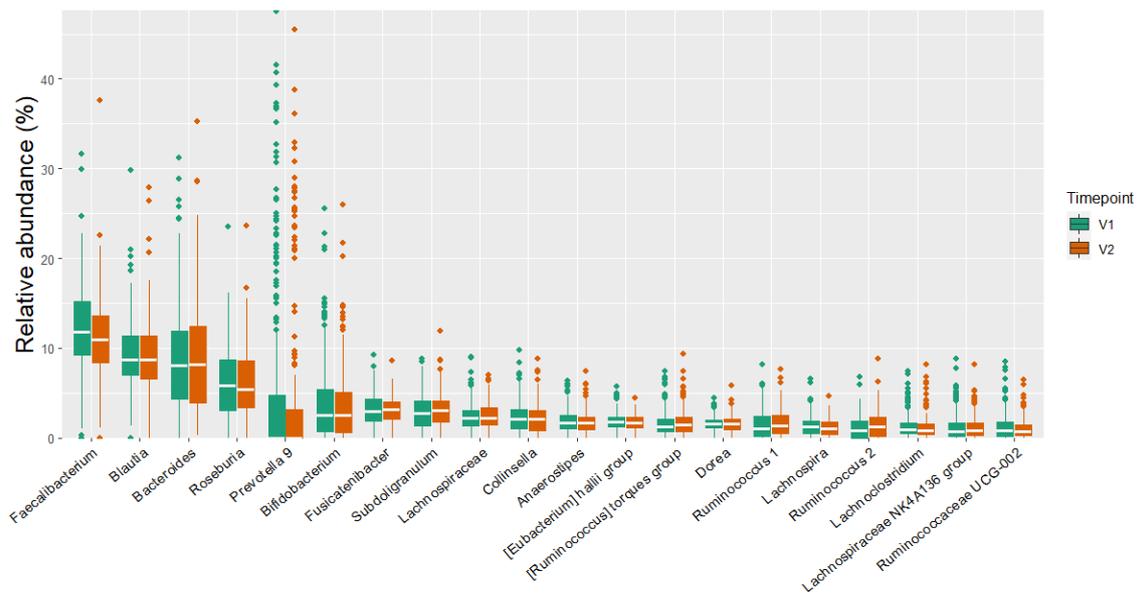


Figura 31 Gráfico de caja (box plot) que representa la abundancia relativa de los 20 géneros bacterianos más prevalentes entre las muestras V1 y V2 de la intervención nutricional. Cada caja muestra la mediana (línea horizontal dentro de la caja), el primer y tercer cuartil (bordes inferior y superior de la caja, respectivamente), y los valores atípicos. Este gráfico permite comparar la distribución y variabilidad de la abundancia de cada género bacteriano entre los diferentes tiempos, y evidencia las diferencias en la composición de la microbiota.

Por último, un análisis LDA se ha aplicado para estudiar las diferencias taxonómicas entre las diferentes intervenciones nutricionales. En la Figura 32 se muestran los resultados significativos. Un total de 10 asignaciones taxonómicas son diferenciales al comparar el conjunto de las muestras antes y después de la intervención. A nivel individual, 7 asignaciones taxonómicas tienen una abundancia diferencial entre los tiempos V1 y V2 para la intervención PN, mientras que la intervención control presenta tan solo 2 y la PP una. No hay taxonomías diferenciales compartidas entre las intervenciones.

Empezando por el grupo PN, las diferencias más significativas las encontramos en el orden *Betaproteobacteriales*. Al igual que el piloto español, estas bacterias tienen una abundancia diferencial antes y después de la intervención. Dentro del orden *Betaproteobacteriales* se pueden encontrar diversas bacterias con potencial patógeno proinflamatorio [199][208]. Esta reducción puede llegar a tener un efecto positivo en la microbiota intestinal. Otro resultado que apunta en la misma dirección es la abundancia diferencial de la OTU 7095 que pertenece al género *Lachnospiraceae*. La implicación de este género en la salud se ha discutido anteriormente, ya que es un productor de AGCCs y en nuestro set de datos, la correlación de este género era muy significativa con un menor IMC. Otro de los géneros diferenciales dentro del mismo grupo PN es *Aghatobacter*. Recientemente, un estudio llevado a cabo en personas con una alta probabilidad de desarrollar síndrome metabólico ha demostrado que la abundancia de este género se asocia a una disminución del colesterol total plasmático, indicando una posible

correlación positiva con parámetros asociados a la salud metabólica [209]. En nuestro caso, podemos observar como *Aghatobacter* incrementa su abundancia en las muestras V2 en comparación a las muestras V1, posiblemente a causa de las mejoras del estado metabólico de los voluntarios al finalizar la intervención.

Las otras 3 asignaciones taxonómicas diferenciales pertenecen al género *Prevotella*, aunque la abundancia y los LDA *scores* son bastante inferiores en comparación a las otras taxonomías.

Los resultados de los otros dos grupos, PP y control, también pertenecen a OTUs y géneros muy poco abundantes en la cohorte. En el grupo PP, destaca la OTU 8120, perteneciente al género *Alistipes*. En cuanto a la patogenicidad de este género, existen pruebas contrastadas que indican que *Alistipes* puede tener efectos protectores contra algunas enfermedades, como la fibrosis hepática, la colitis, la inmunoterapia del cáncer y las enfermedades cardiovasculares [210]. Por el contrario, otros estudios indican que el *Alistipes* es patógeno en el cáncer colorrectal y se asocia con signos mentales de depresión [211]. En este caso, es complicado determinar la implicación del cambio observado tratándose de una diferencia poco prevalente.

Finalmente, en el grupo control, hay 2 asignaciones taxonómicas diferenciales, aunque igual que en el caso del grupo PP, sus abundancias relativas son muy bajas, inferiores al 0,10%. Por esta razón, es complicado extraer conclusiones robustas a partir de estos datos.

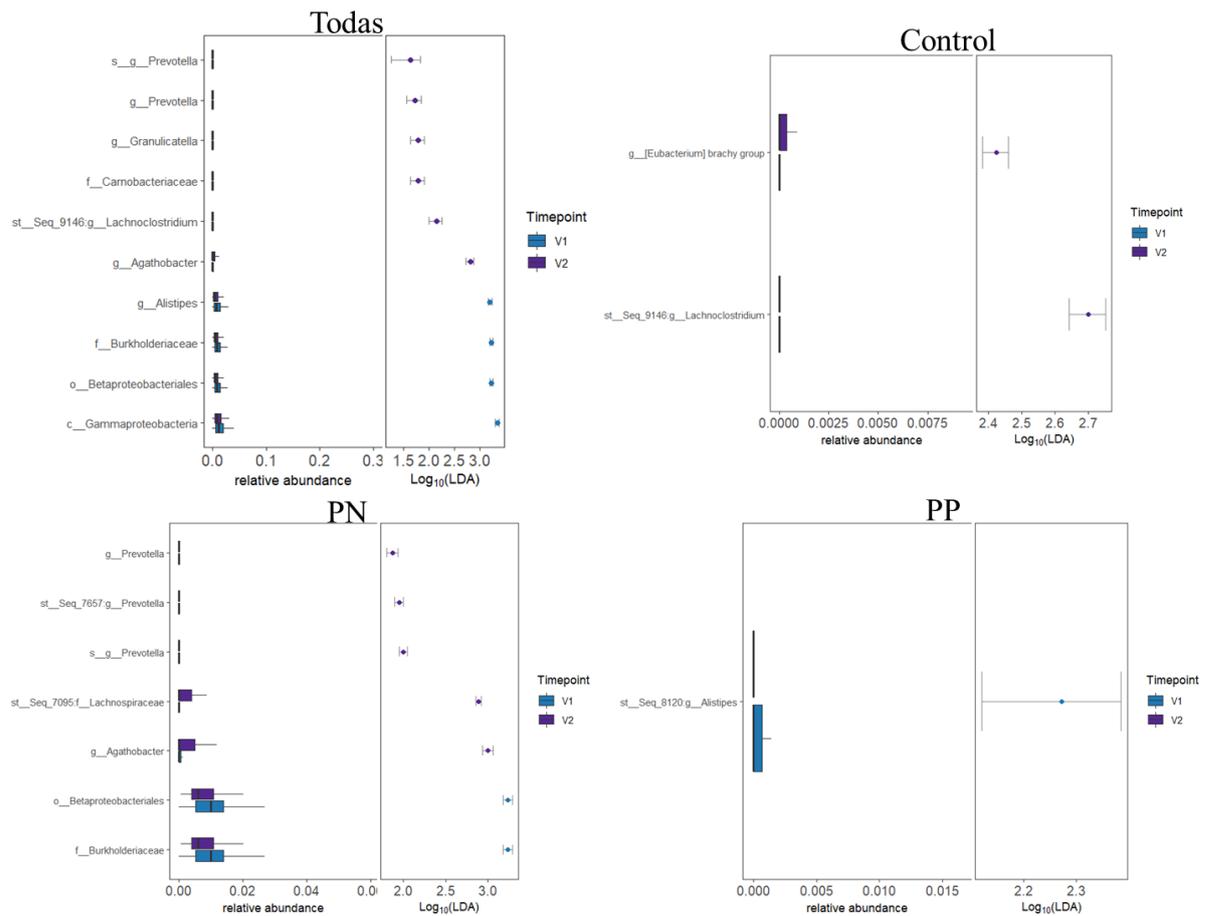


Figura 32 Análisis lineal discriminante (LDA) entre todas las asignaciones taxonómicas para el piloto polaco, comparando los dos tiempos de intervención, utilizando todas las muestras conjuntamente y para cada intervención por separado. El p valor de corte utilizado para la primera comparación y para el ajuste fue 0,01.

Algunos de los resultados obtenidos en el análisis de este piloto son diferentes de los observados en el anterior piloto. En primer lugar, se observa una cierta tendencia de una mejora de los valores de alfa diversidad en los voluntarios que siguieron la intervención dietética. Por otro lado, las diferencias entre las diferentes intervenciones a nivel de beta diversidad son más marcadas aunque no son estadísticamente significativas entre las diferentes intervenciones. Finalmente, la cantidad de géneros diferenciales es menor en comparación al piloto español, no obstante, en base a la literatura científica consultada, los cambios observados en los géneros bacterianos diferenciales podrían llegar a inducir cambios positivos en la comunidad bacteriana intestinal del huésped.

A continuación, se presentan los resultados para un piloto con unos criterios de inclusión similares al piloto polaco.

4.1.6. Efecto del tipo de dieta en la microbiota intestinal humana en el estudio de intervención en Reino Unido

El último de los pilotos pertenece a los voluntarios del Reino Unido. Este piloto presenta algunas particularidades, aunque los criterios de inclusión fueron similares a los del piloto de Polonia. El principal obstáculo al realizar este piloto fue el número reducido de voluntarios reclutados, muy inferior a los otros dos pilotos. La baja muestra de este piloto hace difícil realizar algunas de las comparaciones entre grupos llevadas a cabo en los otros dos pilotos. No obstante, la caracterización de variables fue mucho más extensa a lo largo del estudio, tal y como se puede observar en la Tabla 10.

Tabla 10 Características basales de los participantes del piloto UK por grupo de intervención.

Grupo	Control (n=15)		PN (n=15)		PP (n=7)		p
	Media	SD/IQR	Media	SD/IQ R	Media	SD/IQR	
Mujeres (n (%))	12 (71)		14 (64)		17 (81)		0.440
Hombres (n (%))	5 (29)		8 (36)		4 (19)		
Edad (años)	45.4	14.0	43.7	13.4	43.5	12.6	0.900
PSS (mmHg)	129	121-150	132	120-140	124	115-143	0.426
PSD (mmHg)	83	15	81	12	78	11	0.579
Peso (kg)	90.5	83.0-98.0	91.3	86.2- 101.9	86.9	78.7-96.4	0.328
Altura (cm)	171.1	7.8	170.0	7.5	169.0	8.1	0.716
IMC (kg/m ²)	30.9	30.1-33.3	31.2	29.5- 37.3	30.3	27.7-34.3	0.257
Cintura C (cm)	100.5	98.5-106.5	102.3	95.9- 109.4	95.3	89.9-102.1	0.224
Cadera C (cm)	114.6	7.4	115.8	9.5	113.6	7.3	0.670
Masa muscular magra (kg)	54.0	48.9-60.1	56.4	48.6-61.8	49.9	46.8-54.0	0.391
Masa de grasa (kg)	35.8	6.2	35.6	8.2	33.8	8.1	0.653
Masa de grasa (%)	38.2	4.2	37.4	6.2	37.6	4.9	0.887
Colesterol total (mmol/L)	5.05	0.78	5.24	0.86	5.02	1.14	0.741
LDL (mmol/L)	3.02	0.72	3.17	0.68	2.85	0.85	0.385
HDL (mmol/L)	1.41	0.31	1.47	0.25	1.47	0.27	0.730
TAG (mmol/L)	1.3	0.9-1.4	1.3	0.9-1.5	1.1	0.9-2.0	0.849
F-Glucosa (mmol/L)	5.6	0.6	5.3	0.5	5.3	0.4	0.101
F-Insulina (pmol/L)	64.6	44.1-91.5	49.3	36.8-96.8	41.2	26.6-97.3	0.416
HOMA-IR	2.6	1.6-4.0	1.8	1.4-3.5	1.6	1.0-3.7	0.335
Urato (μmol/L)	334.7	71.4	319.4	103.1	328.6	91.5	0.869
Leptina (μg/L)	38.1	28.3-63.4	34.0	15.6-48.1	46.3	28.1-72.9	0.142
Adiponectina (μg/L)	3673	2798-5199	5577	3611- 6894	5613	3114-9541	0.226
CRP (mg/L)	2.14	1.84-2.23	2.25	1.53-2.34	2.16	1.44-2.29	0.705
MCP-1 (pg/ml)	211.0	164.1-244.0	221.9	165.0- 262.9	199.8	168.2-266.1	0.953
TNFα (pg/ml)	0.89	0.33-1.08	0.59	0.43-0.79	0.37	0.26-0.55	0.293
IL-6 (pg/ml)	1.69	1.26-2.11	1.56	1.14-2.16	1.40	1.11-2.07	0.667
CD14 (ng/ml)	1496	1382-1632	1407	1255- 1574	1465	1334-1682	0.896
LDL oxigadado (U/L)	49.8	16.5	53.2	18.6	49.8	17.9	0.770
Creatinina (μmol/L)	60	54-71	65	60-74	65	61-70	0.171
ALT (U/L)	21	19-30	29 ^A	24-36	18	13-21	0.009

GGT (U/L)	30	20-50	26	17-37	23	13-38	0.428
------------------	----	-------	----	-------	----	-------	-------

Al comparar los valores basales de las variables registradas, se obtienen valores p superiores a 0,05, a excepción de la variable alanina aminotransferasa (ALT), con un p valor = 0,009. Esta variable indicativa de posible daño hepático tiene valores ligeramente superiores en el grupo PN. Es probable que esta diferencia sea significativa debido al bajo número de voluntarios por grupo para este piloto. Tampoco se conoce los valores de ALT en los otros pilotos ya que no fue una variable incluida en la caracterización de los voluntarios en el estado basal.

En este caso del piloto Reino Unido, los análisis llevados a cabo no fueron separados por grupo de intervención igual que en los anteriores pilotos debido al bajo número de voluntarios por grupo, especialmente en el grupo PP. La validez de los análisis estadísticos de la varianza en los estudios de microbioma dependen del número de grupos de exposición o intervención (grados de libertad), el número de sujetos por grupo (grados de libertad residuales), las distancias dentro del grupo (suma de cuadrados dentro del grupo) y el tamaño del efecto (la diferencia entre la suma de cuadrados entre grupos y la suma de cuadrados dentro del grupo). El error de tipo II aumenta y la potencia estadística disminuye con más grupos, menos sujetos, mayor distancia dentro del grupo y menores efectos [212]. Además, la relación entre la compleja estructura de las comunidades microbianas intestinales y las distancias dentro del grupo suele ser confusa, y el tamaño del efecto que cabe esperar de las exposiciones previstas o de las intervenciones nutricionales sobre el microbioma suele ser algo incierto, siendo complicado definir un número adecuado de voluntarios por grupo. Debido a esto, los posibles resultados obtenidos al comparar un grupo con una N de 7 voluntarios no tendrían la misma robustez y validez en comparación a los resultados obtenidos con un tamaño muestral de 50 voluntarios por grupo en el caso del piloto español o 80 voluntarios por grupo en el caso del piloto polaco. Por esta razón, en el caso de este piloto en particular se ha decidido analizar conjuntamente todos los grupos, independientemente de la personalización de las intervenciones.

A continuación, se detallan los resultados de los análisis de alfa diversidad. En la Figura 34 se representan los valores de alfa diversidad *Observed*, *Chao 1* y *Shannon*, antes y después de las intervenciones. La tendencia de las muestras V2 es incrementar los valores de alfa diversidad para las 3 métricas, indicando un cierto incremento de las diversidades bacterianas en los voluntarios al finalizar las intervenciones. No obstante, debido al bajo

tamaño muestral y a la variabilidad pueden dificultar detectar diferencias significativas no; *Observe* $p = 0,057$, *Chao 1* $p = 0,054$, *Shannon* $p = 0,063$. Sin embargo, los valores p obtenidos se acercan mucho al límite estadístico establecido ($p < 0,05$).

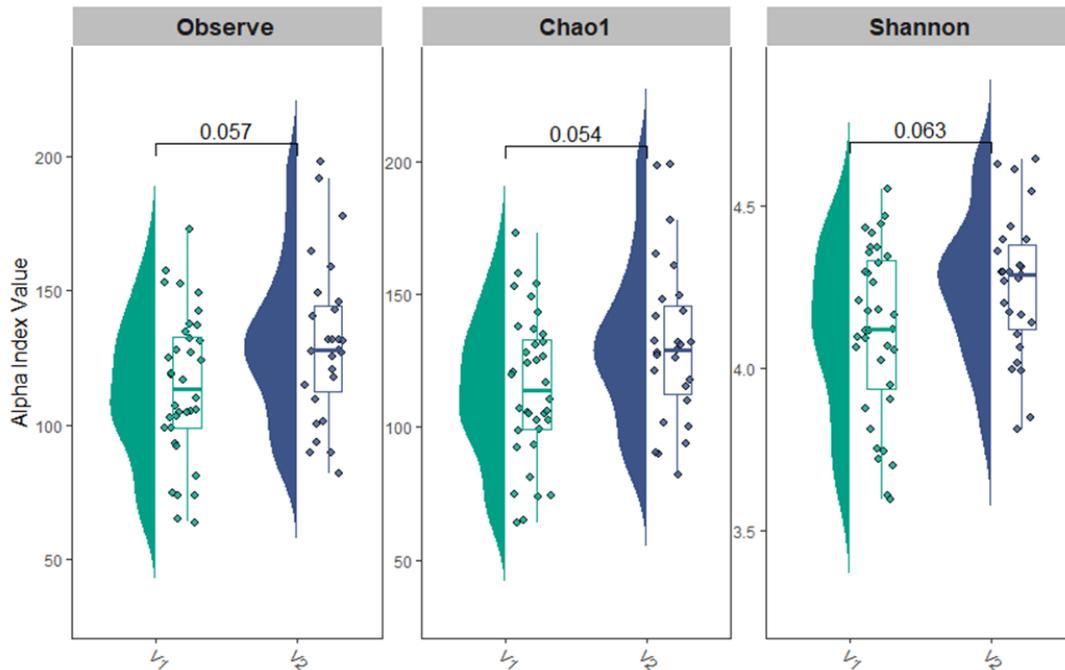


Figura 33 Diagrama de cajas de los valores de alfa diversidad Observe, Chao1 y Shannon para las muestras V1 y V2. Los valores p se añadieron tras aplicar el test de Wilcoxon.

Los índices de beta diversidad fueron utilizados para estudiar los cambios generales en la composición de la microbiota inducidos por las intervenciones nutricionales. En la Figura 34 se puede observar un gran solapamiento entre las muestras V1 y V2, indicando poca variación en la composición general de la microbiota tras las intervenciones nutricionales. Esta poca variación se confirma al aplicar el test adonis2, obteniendo un valor $p = 0,933$. En cuanto a las muestras separadas por grupo de intervención, se observa una gran dispersión entre los grupos, tanto para las muestras V1 como para las muestras V2. El p valor obtenido para las muestras V1 es 0,94, indicando una importante similitud en cuanto a la composición de la microbiota de los voluntarios en el punto de partida de la intervención. Un valor similar se obtiene al finalizar la intervención. La misma dispersión y prácticamente el mismo p valor se obtiene al comparar la composición de la microbiota entre los grupos. Estos resultados indican que las intervenciones personalizadas tienen un desempeño similar en cuanto a su implicación en la modulación general de la microbiota. Aunque hay que tener en cuenta que estos resultados se basan en la comparación estadística de un tamaño muestral muy inferior a los otros dos pilotos de intervención y se tienen que tener en cuenta las limitaciones citadas previamente.

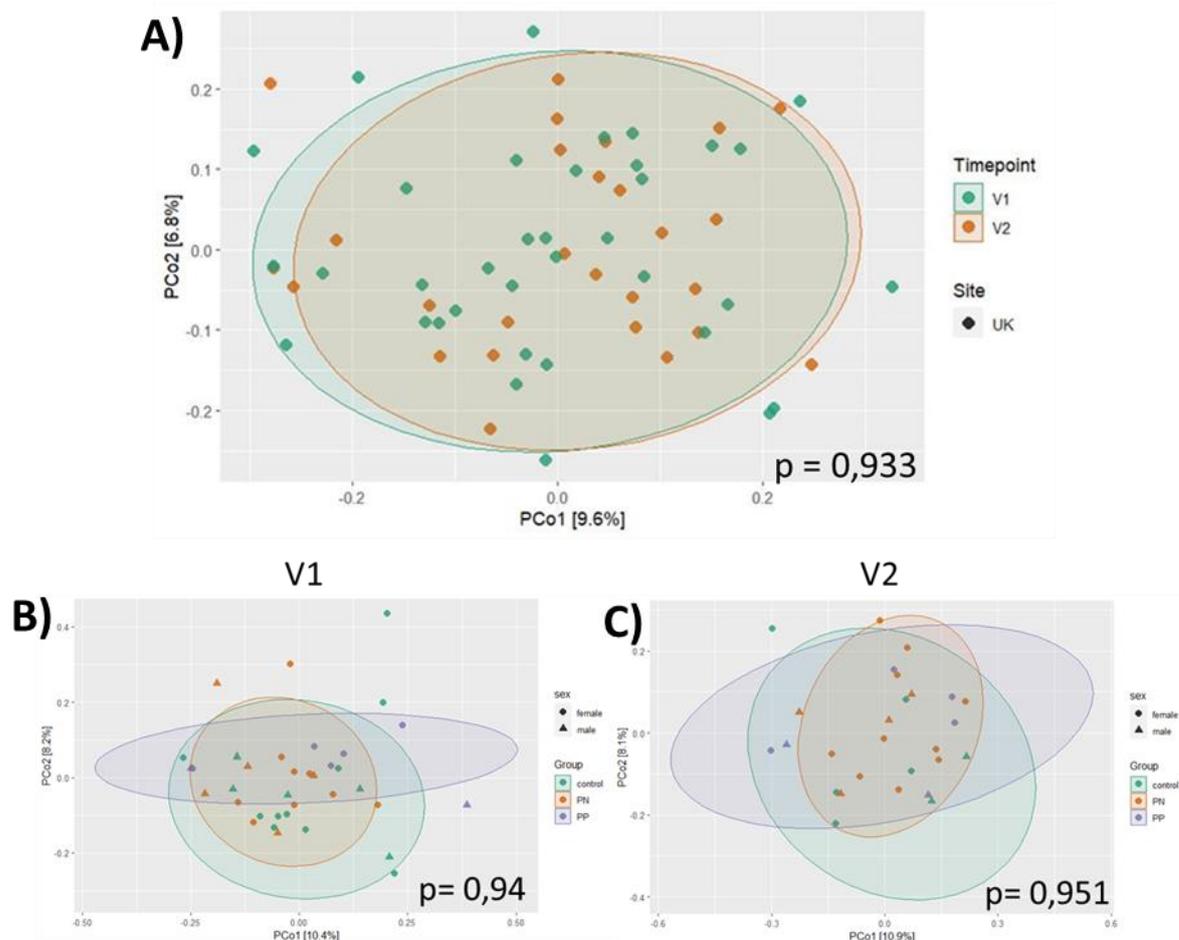


Figura 34 PCoA del índice de betadiversidad Bray Curtis utilizando las dos coordenadas principales. A) Todas las muestras de estudio fueron utilizadas en la representación gráfica separando las muestras por tiempo de intervención; verde: V1, naranja: V2. B) Representación gráfica de las muestras V1 separadas por grupo de intervención; verde: Control, naranja: PN, azul: PP. C) Representación gráfica de las muestras V2 separadas por grupo de intervención; verde: Control, naranja: PN, azul: PP. Se incluyen los p valores tras aplicar el test Adonis2 en la comparación entre grupos de intervención y el tiempo de intervención..

Los análisis de “core microbiome” (Figura 34) y de los 20 géneros más abundantes (Figura 30) muestran resultados similares a los observados para la beta diversidad. Existe muy poca variabilidad entre los géneros más prevalentes y abundantes cuando se compara la composición de la microbiota intestinal al finalizar las intervenciones con las muestras del estado basal.

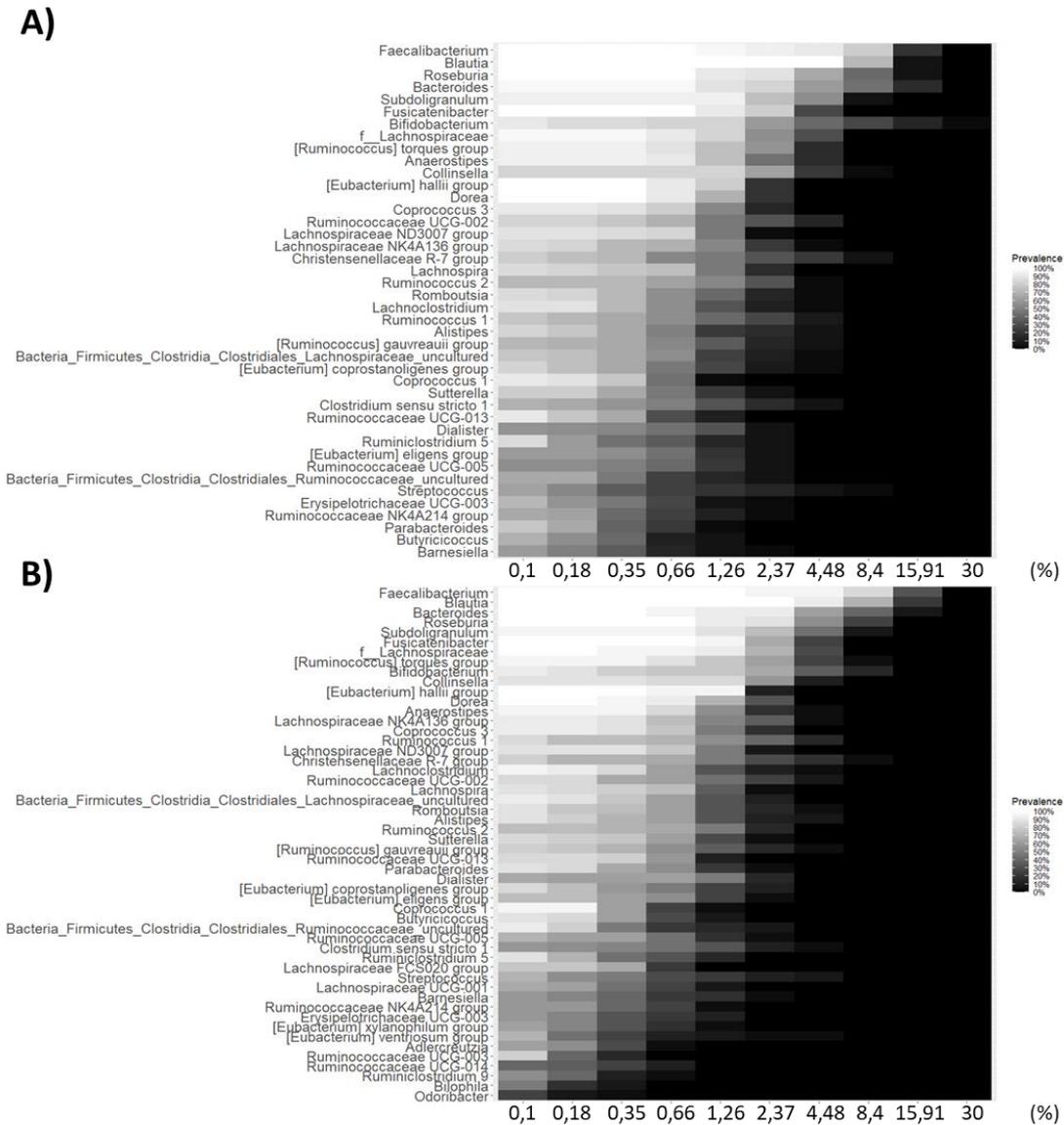


Figura 35 Representación gráfica mediante mapa de calor del “Core Microbiome” mediante la prevalencia para cada fracción de abundancia relativa en escala exponencial. En el eje de las Y se representan los géneros bacterianos, en el eje de la X se representan las abundancias relativas en combinación con la prevalencia de cada género bacteriano. A) Muestras pertenecientes al tiempo inicial (V1) B) Muestras pertenecientes al tiempo final (V2).

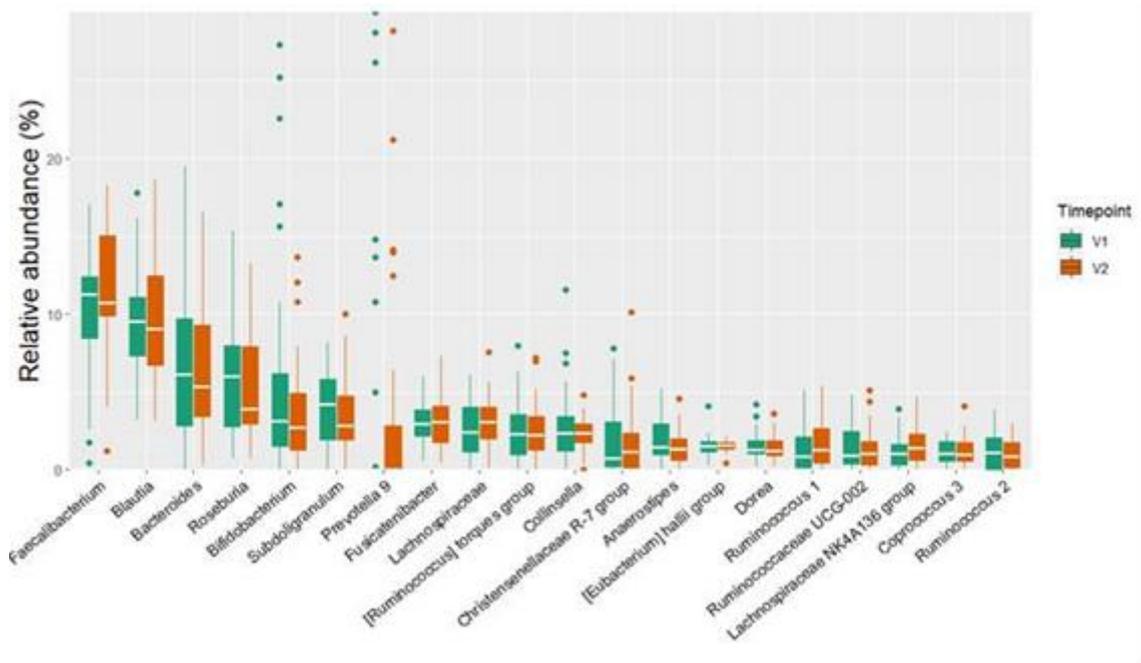


Figura 36 Gráfico de caja (box plot) que representa la abundancia relativa de los 20 géneros bacterianos más prevalentes entre las muestras V1 y V2 de la intervención nutricional. Cada caja muestra la mediana (línea horizontal dentro de la caja), el primer y tercer cuartil (bordes inferior y superior de la caja, respectivamente), y los valores atípicos. Este gráfico permite comparar la distribución y variabilidad de la abundancia de cada género bacteriano entre los diferentes tiempos, y evidencia las diferencias en la composición de la microbiota.

Finalmente, el análisis de este piloto se ha completado con el estudio de las diferentes taxonomías bacterianas con abundancia diferencial antes y después de la intervención. En la Figura 37, se representan las abundancias relativas y los LDA scores para las asignaciones significativas. Todos los resultados significativos obtenidos tienen el mismo patrón, mayor abundancia en las muestras V2 en comparación a las V1.

El género *Parabacteroides* tiene implicación en el metabolismo de los carbohidratos y la secreción de ácidos grasos de cadena corta. Dos cepas de este género *Parabacteroides distasonis* y *Parabacteroides goldsteinii* pueden ser vistos como potenciales candidatos probióticos de próxima generación debido a sus efectos protectores sobre la inflamación y la obesidad en ratones [213].

Otro género con abundancia relativas superiores en las muestras V2 es *Blautia*. *Blautia* también es un género con potencial probiótico cuyo metabolismo es importante para llevar a cabo mejoras en el estado metabólico del huésped [214].

A continuación, destaca la presencia de la OTU 8795_ *Lachnospiraceae* y el género *Lachnospiraceae FCS020*, también más abundantes al final de la intervención. La implicación de estos géneros en la protección frente a la obesidad ha sido descrita previamente, ya que estas bacterias son importantes productoras de AGCCs y su correlación negativa con el IMC es muy significativa [215]. Otro género de la misma familia *Lachnospiraceae* es *Marvinbryantia*.

En el caso del piloto británico, es destacable la prevalencia de los géneros y familias bacterianas con abundancias diferenciales antes y después de la intervención. Muchos de los géneros descritos, como *Blautia*, *Parabacteroides* o *Lachnospiraceae*, se encuentran siempre entre los 20 géneros más abundantes en la microbiota humana.

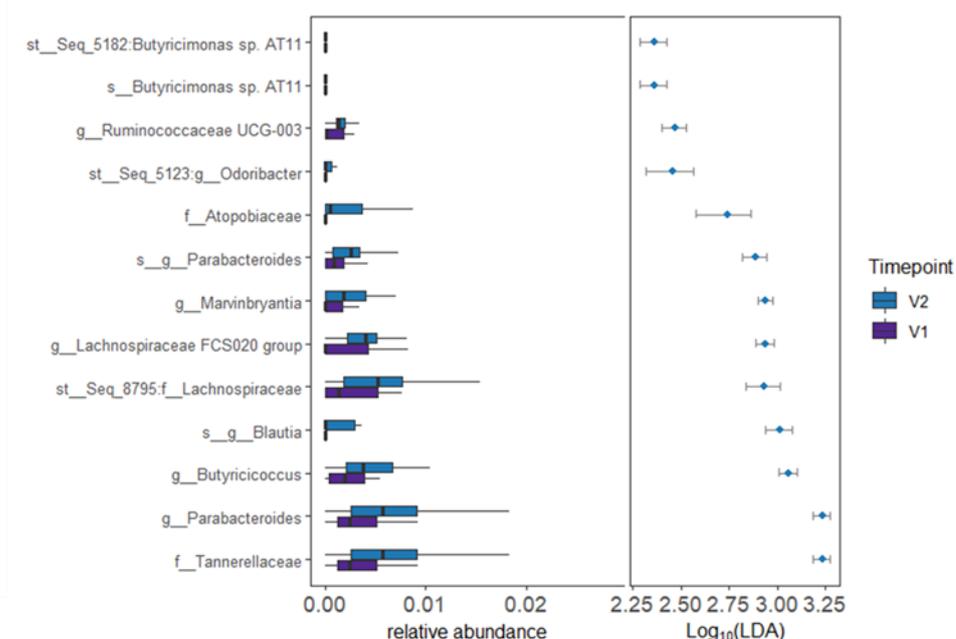


Figura 37 Análisis lineal discriminante (LDA) aplicado a las abundancias relativas de las diferentes asignaciones taxonómicas. A) Diagrama de cajas de las abundancias relativas y los LDA scores en Log₁₀ de las taxonomías más significativas. El p valor de corte utilizado para la primera comparación y para el ajuste fue 0,01. B) Árbol filogenético resaltando las taxonomías diferenciales entre las dos condiciones.

A pesar del bajo número de voluntarios reclutados para este piloto, los resultados obtenidos son similares a los del piloto polaco ya que en base a la literatura consultada, los géneros bacterianos descritos anteriormente que han incrementado su abundancia relativa tras las intervenciones dietéticas tienen asociaciones positivas con un estado metabólico más saludable. No obstante, estos cambios son independientes de la personalización de las intervenciones. Del mismo modo que en el piloto polaco, tal y como se ha discutido previamente, un estado basal más alterado de los voluntarios puede favorecer la posibilidad de observar cambios positivos en la microbiota, siendo más abundantes los estudios de intervención que reportan cambios significativos en la microbiota de personas obesas en comparación a estudios de intervención en personas normo peso. Del mismo modo, estos cambios no se observaron en el piloto español, donde la mayoría de los voluntarios parten de un estado metabólico más saludable.

A partir de los diferentes enfoques de análisis llevados a cabo, el apartado 4.1 presenta nueva evidencia científica acerca de la gran correlación que existe entre la dieta, la obesidad y la microbiota intestinal. Muchas de estas correlaciones han sido previamente descritas en la literatura científica y la mayor parte de los resultados van en la misma dirección. La innovación de estos estudios consistía en analizar la implicación de las dietas personalizadas en la modulación de la microbiota en comparación a las dietas control. A nivel general, los resultados obtenidos demuestran que tiene un mayor peso el hecho de realizar una intervención nutricional que la personalización de dicha intervención en base al estado metabólico del voluntario. Los cambios llevados a cabo en las dietas control inducen efectos positivos de por sí, mientras que el valor añadido de la personalización no tiene el mismo impacto diferenciador.

Otro de los puntos a discutir es el estado basal de partida de los voluntarios. Tanto a nivel metabólico, como a nivel de la microbiota intestinal, los cambios más significativos se han observado en aquellos voluntarios que ya partían de un estado más alterado en cuanto al metabolismo y la obesidad. En este caso, los dos pilotos con IMCs más elevados de partida, Polonia y Reino Unido, son los que presentan más cambios potencialmente positivos, tanto a nivel de microbiota como de metaboloma tras analizar los *global scores*. Aunque no se observen diferencias importantes en el piloto español, las intervenciones no han tenido un efecto negativo en el estado metabólico o en la microbiota de los voluntarios. A su vez, los cambios observados en los pilotos con mayor prevalencia de la obesidad reducen las diferencias de partida observadas entre los pilotos de Reino Unido y Polonia con el piloto de España.

Los cambios observados en la microbiota intestinal inducidos por las intervenciones dietéticas son mayoritariamente descriptivos. Las abundancias relativas de distintas secuencias del gen 16S rRNA se comparan entre diferentes condiciones con el objetivo de determinar si hay variaciones o asociaciones con patrones de interés. No obstante, a menudo estos tipos de estudios necesitan complementarse con otro tipo de estudios donde se intente demostrar la causalidad que existe entre los cambios en la microbiota y el cambio observado en el fenotipo. Por esta razón, dentro del marco del proyecto PREVENTOMICS, las muestras de los voluntarios han sido utilizadas en un estudio *in vivo* con FMT.

El objetivo principal de este estudio fue evaluar si los cambios inducidos por la intervención dietética en la microbiota influían en el estado fisiológico y el metabolismo asociados al sobrepeso y la obesidad.

A continuación, se exponen los resultados tanto de la puesta a punto de estos modelos *in vivo*, como el experimento realizado utilizando las muestras de los voluntarios.

4.2. Puesta a punto modelo animal PGF con trasplante de microbiota fecal

Los resultados de este apartado intentan dar respuesta a la hipótesis y los objetivos planteados en la sección 2.2. Estos resultados pertenecen a dos experimentos independientes con el mismo diseño experimental. Los detalles del diseño experimental se pueden consultar en la sección 3.3.1. La puesta a punto de estos modelos, con muestras de voluntarios de los estudios de intervención ampliamente descritos en la sección 4.1, ha sido clave para poder obtener resultados científicamente válidos en el estudio del impacto de los cambios en la microbiota intestinal, producidos por intervenciones nutricionales, en la obesidad y el sobrepeso, utilizando este tipo de modelos in vivo. Los resultados de este último estudio serán presentados en la sección 4.3 de la presente tesis doctoral.

4.2.1. Viabilidad en las muestras de heces humanas

Las muestras de heces de voluntarios sanos recibidas fueron caracterizadas en LEITAT para obtener los datos de abundancia y viabilidad para cada una de las muestras. Los resultados de calidad obtenidos para las muestras de cada voluntario preparadas para el FMT, se detallan en la Tabla 11.

Tabla 11 Valores de recuentos viables para cada voluntario.

ID	Sexo	Edad	IMC	bact/ml CFU	C. Petroff	% viables	[DNA] ng/ul	Viables/ml
1N	F	33	21,3	7,50E+09	4,21E+10	34,0%	27,5	1,43E+10
1O	F	48	20,1	1,70E+09	3,86E+10	39,6%	44,4	1,53E+10
1R	F	44	21,1	1,50E+10	8,19E+10	50,3%	86,6	4,12E+10
1T	F	50	27,6	1,00E+09	2,50E+10	70,6%	46,3	1,76E+10
1Z	F	23	23,4	1,00E+09	7,97E+10	56,0%	19,7	4,46E+10
1dd	M	46	25,8	5,00E+09	4,81E+10	24,6%	68,3	1,18E+10
1Ñ	M	49	28,1	5,00E+09	6,58E+10	48,1%	50,2	3,16E+10
1P	M	36	23,9	9,00E+08	5,01E+10	75,1%	28,9	3,76E+10
1S	M	44	26,1	5,00E+08	4,43E+10	67,4%	41,2	2,98E+10
1W	M	47	24,9	4,00E+08	2,54E+10	71,0%	45,7	1,80E+10

Los recuentos obtenidos con la cámara Petroff indicaron una concentración de entre 2,5 a $7,2 \cdot 10^{10}$ microorganismos/ml, y fueron siempre mayores que los de CFUs en aproximadamente un orden de magnitud. Los porcentajes de viabilidad variaron en función del voluntario, oscilando entre el 24,6% y el 75,1%. Las imágenes obtenidas para

realizar los cálculos de viabilidad se pueden observar en la Figura 38. Los valores considerados para los cálculos del FMT fue la concentración de viables/ml.

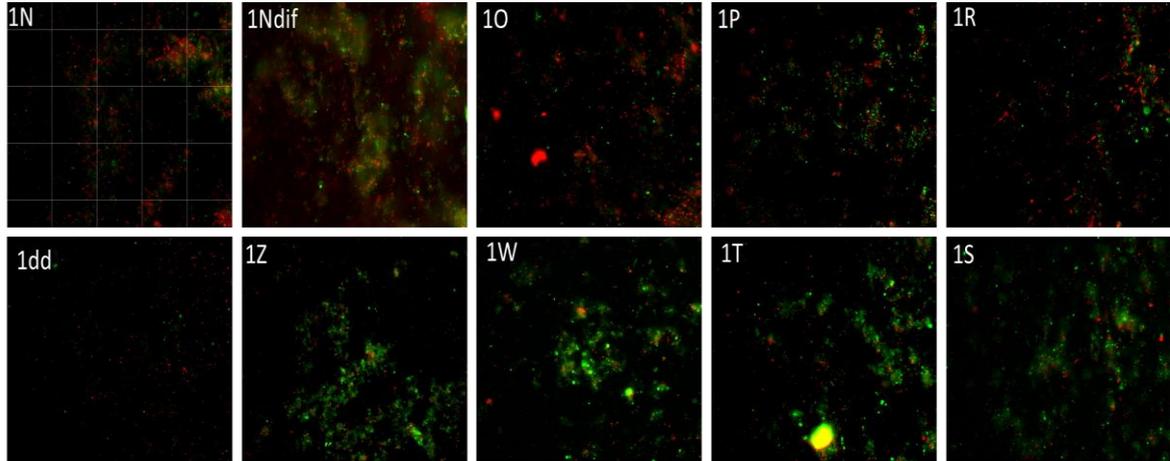


Figura 38 Imágenes obtenidas mediante microscopia de fluorescencia de cada una de las muestras de los voluntarios, aumento 100X. En verde, las bacterias viables, en rojo, las bacterias no viables. La identificación de cada imagen con el código de una letra y un número corresponde al código anonimizado de los voluntarios.

4.2.2. Parámetros del animal durante el proceso de FMT

A continuación, se detallan los resultados de la evolución de los animales durante los dos experimentos para el peso corporal y el peso de los órganos hígado, bazo e intestinos.

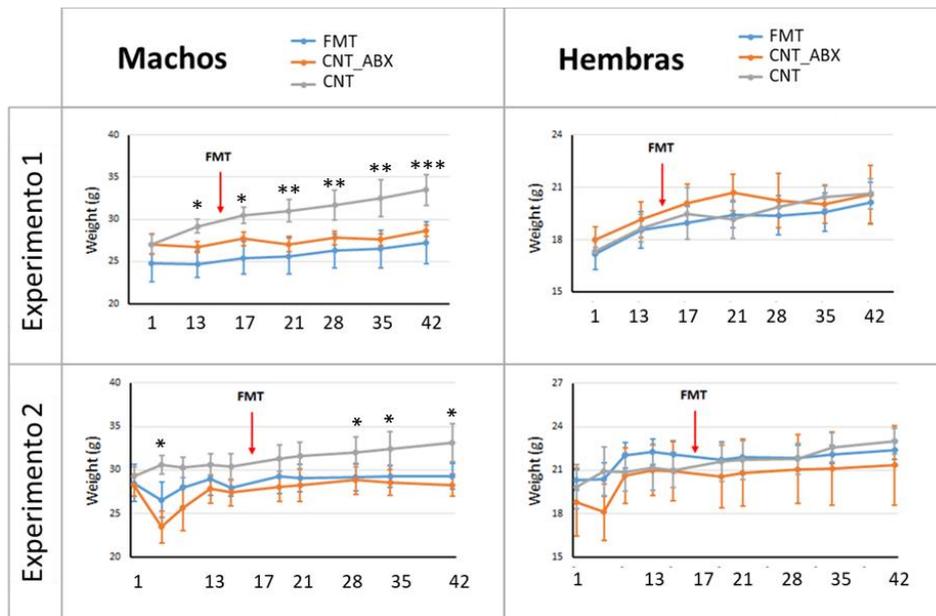


Figura 39 Evolución del peso (gramos) de los animales por sexo y grupo, durante ambas fases del estudio. Los datos representan el promedio \pm SD. Para la diferenciación estadística se ha utilizado un ANOVA con comparación post hoc

mediante la prueba de Tuckey. Los valores p obtenidos se representan de la siguiente forma: * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$.

En el experimento 1, no se observaron pérdidas en el peso de los animales tanto para hembras como para los machos. El grupo CNT ganó más peso en comparación a los grupos tratados con antibiótico, sin embargo, el FMT no parece incidir en la modificación del peso corporal de los ratones, ya que la evolución del grupo CNT_ABX y FMT es similar, sin ninguna diferencia estadística entre estos 2 grupos. En el caso de los machos, existe una diferencia estadística entre la evolución del peso de los animales del grupo CNT y los otros 2 grupos a partir del día 13 hasta el final del estudio. La tendencia del grupo CNT es aumentar el peso corporal a lo largo del experimento, incrementando cada vez más la diferencia estadística respecto a los otros 2 grupos. Estas diferencias no se observan en el grupo de las hembras ya que no hay ninguna diferencia estadísticamente significativa entre el grupo CNT, CNT_ABX y FMT a lo largo de todo el experimento.

Durante el experimento 2, se observó una pérdida de peso tras los primeros días de administración de los antibióticos. El peso se monitorizó más a menudo en este caso al observar esta pérdida, sin embargo, los animales acabaron recuperando el peso en ambos grupos tras la pérdida de peso sufrida en los primeros dos días. La posibilidad de sufrir una pérdida de peso en los animales durante la administración de antibiótico está documentada ya que diversos estudios en modelos PGF reportan pérdidas de peso significativas tras la administración de cócteles de antibiótico [216] [217][103]. No obstante, es complicado explicar el desempeño diferencial entre dos experimentos llevados a cabo del mismo modo, con la misma cepa de ratones, edad, dieta y condiciones de estudio. Una de las hipótesis podría ser la administración *ad libitum* del antibiótico en el biberón de bebida y que durante un experimento los ratones hubieran consumido más agua, por consiguiente, más antibiótico, induciendo así efectos diferenciales entre los experimentos debido a la cantidad final de antibiótico ingerida, a lo largo de las 2 semanas del tratamiento de depleción de la microbiota. Por esta razón, la estandarización de la administración de antibióticos podría ser una estrategia válida para limitar la variabilidad inter-experimental de la pérdida de peso asociado a la ingesta de antibióticos.

A continuación, se presentan los resultados del peso de los órganos –hígado y bazo registrados a punto final (t=día 42) para los animales macho (Figura 44) y para las hembras (Figura 45). Los resultados se representan en porcentaje respecto al peso corporal. Para los animales macho no hay diferencias significativas entre los grupos para los órganos medidos en ninguno de los 2 experimentos, no obstante, se observa una

tendencia a la disminución del peso del bazo en el experimento 2, aunque esta diferencia no es significativa. Sin embargo, en el caso de los animales hembra si observamos diferencias significativas entre los grupos con el peso del bazo para el experimento 2, estas diferencias no son significativas en el experimento 1. La pérdida de peso del bazo está ampliamente descrita en literatura en modelos animales que fueron tratados con cocteles de antibióticos durante periodos similares a los experimentos llevados a cabo [218] [89]. Tal y como se hipotetizó anteriormente en este mismo apartado, estas diferencias entre experimentos pueden ser debidas a la administración *ad libitum* del antibiótico en el agua de bebida y por consiguiente el consumo de antibiótico haya podido ser diferente entre animales.

Según los resultados obtenidos para la pérdida de peso de los órganos asociados al consumo de antibióticos se ha llegado a la conclusión que el consumo de antibiótico tiene que estandarizarse intentando evitar consumos diferenciales entre animales y experimentos. Para futuros experimentos es aconsejable administrar una dosis fija diaria de antibiótico por sonda oral, como ya han demostrado algunos investigadores mediante la comparación de ambos métodos, por sonda oral vs *ad libitum* observando una disminución de la carga bacteriana inicial más robusta y consistente en la administración por sonda oral [219].

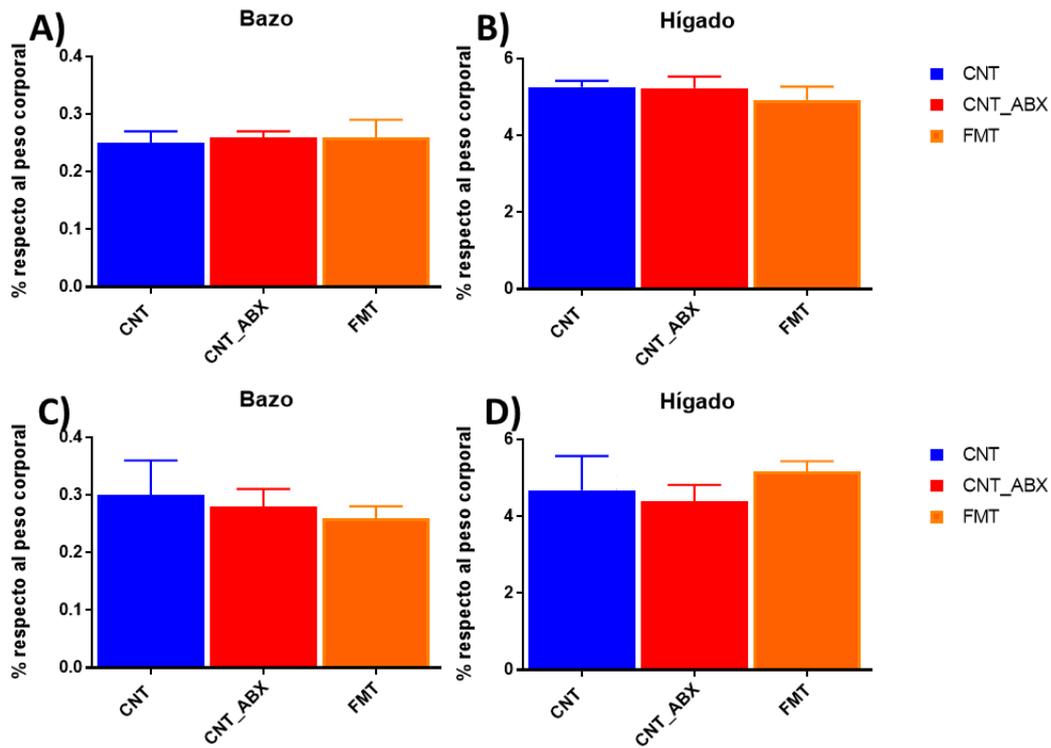


Figura 40 Gráfico de barras de los animales macho con los pesos de los órganos de A) Bazo experimento 1, B) Hígado experimento 1, C) Bazo experimento 2 y D) Hígado experimento 2. Se representa la media \pm la desviación estándar. Se ha aplicado un test ANOVA de 1 factor con comparaciones múltiples de Tuckey para determinar las diferencias estadísticas entre los grupos.

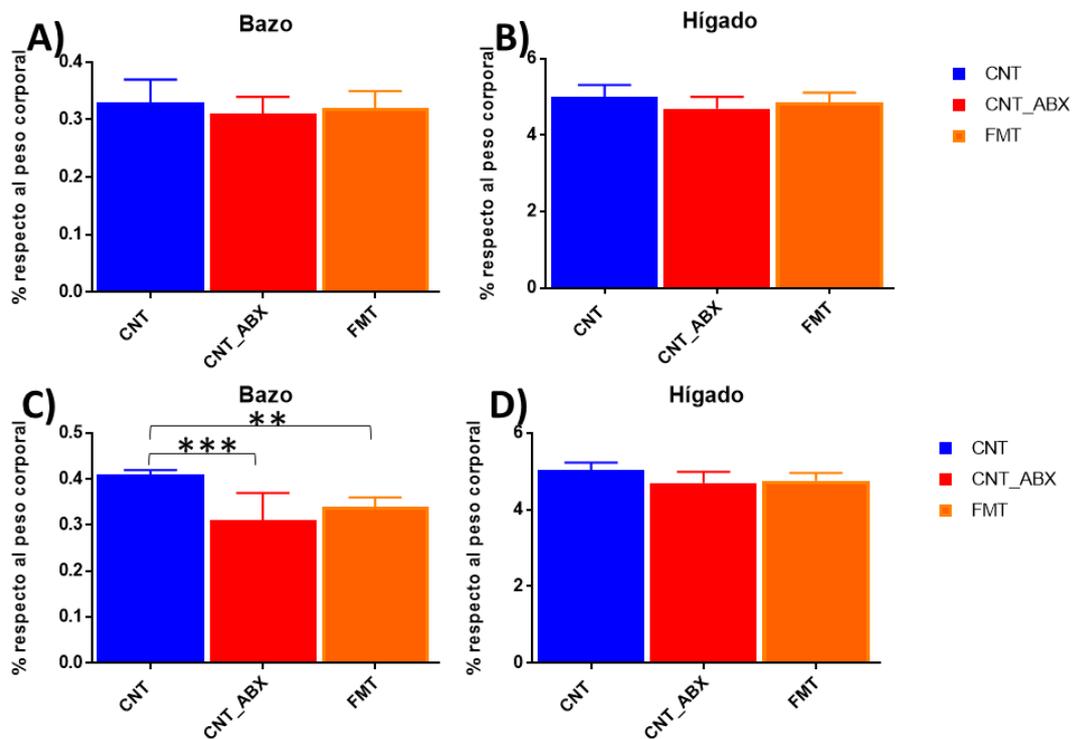


Figura 41 Gráfico de barras de los animales hembra con los pesos de los órganos de A) Bazo experimento 1, B) Hígado experimento 1, C) Bazo experimento 2 y D) Hígado experimento 2. Se representa la media \pm la desviación estándar. Se ha aplicado un test ANOVA de 1 factor con comparaciones múltiples de Tuckey para determinar las diferencias estadísticas entre los grupos.

4.2.3. Depleción de la microbiota propia de los ratones previa al trasplante de microbiota fecal

Para ambos experimentos, la carga total bacteriana tras acabar el tratamiento con el coctel de antibióticos fue medida mediante qPCR del gen 16S rRNA.

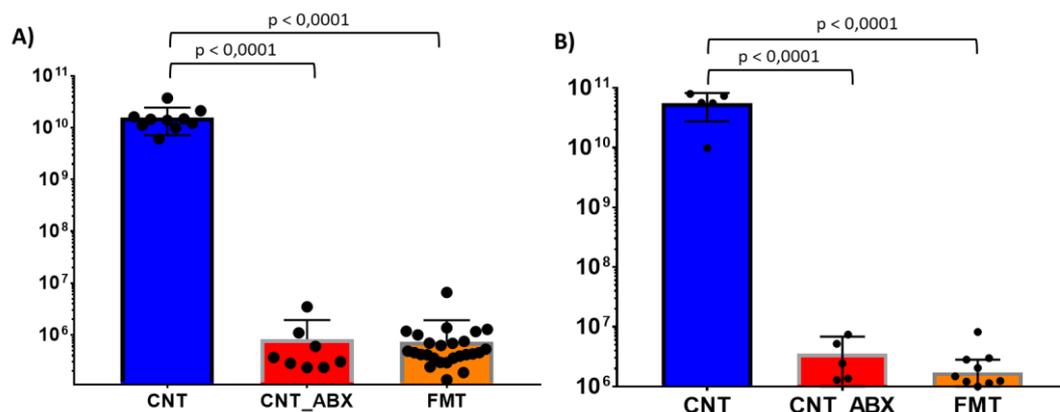


Figura 42 Gráfico de barras en escala logarítmica de las copias del gen 16S rRNA por gramo de heces al acabar el tratamiento con antibiótico (día 13) para A) Experimento 1 y B) Experimento 2. Las barras representan la media de los grupos y la barra de error la desviación estándar. Las diferencias estadísticas entre grupos se han calculado aplicando un test ANOVA con comparación múltiple de Tuckey (95,00% CI.).

En la Figura 42 se detallan los datos obtenidos tras la cuantificación por qPCR. En ambos experimentos, se observa una disminución de hasta cinco logaritmos en los grupos tratados con antibiótico, CNT_ABX y FMT. Esto equivale a la eliminación del 99,999% de la carga bacteriana total.

Según los resultados de disminución obtenidos, consideramos que la eliminación de la microbiota propia de los ratones usados en el estudio fue satisfactoria, ya que los resultados obtenidos fueron similares a otros estudios reportados, con una disminución similar [220] [221], incluso con una disminución mayor de la microbiota de los ratones en comparación a otros estudios [222] [104] [223].

4.2.4. Análisis de la microbiota a lo largo de la puesta a punto del modelo animal pseudo-germ free con trasplante de microbiota fecal

A nivel taxonómico, en la Figura 43 se observan diferencias de composición entre la microbiota humana de los 10 voluntarios y la microbiota de los ratones *wild type* con o sin tratamiento de antibióticos, a día 1 y 13 de tratamiento. A día 1 la composición taxonómica de los tres grupos murinos (CNT, CNT_ABX y FMT) es muy similar, lo que indica que los 3 grupos parten del mismo estado basal con una composición bacteriana

parecida. Tras las 2 semanas de tratamiento con antibiótico (día 13) la composición de los grupos CNT_ABX y FMT ha cambiado drásticamente, tanto en fase 1 como en la fase 2, mientras que el grupo CNT ha mantenido su composición taxonómica bacteriana, aunque con ciertas variaciones en la abundancia relativa de las familias bacterianas, especialmente un aumento de *Bifidobacteriaceae* en el experimento 1.

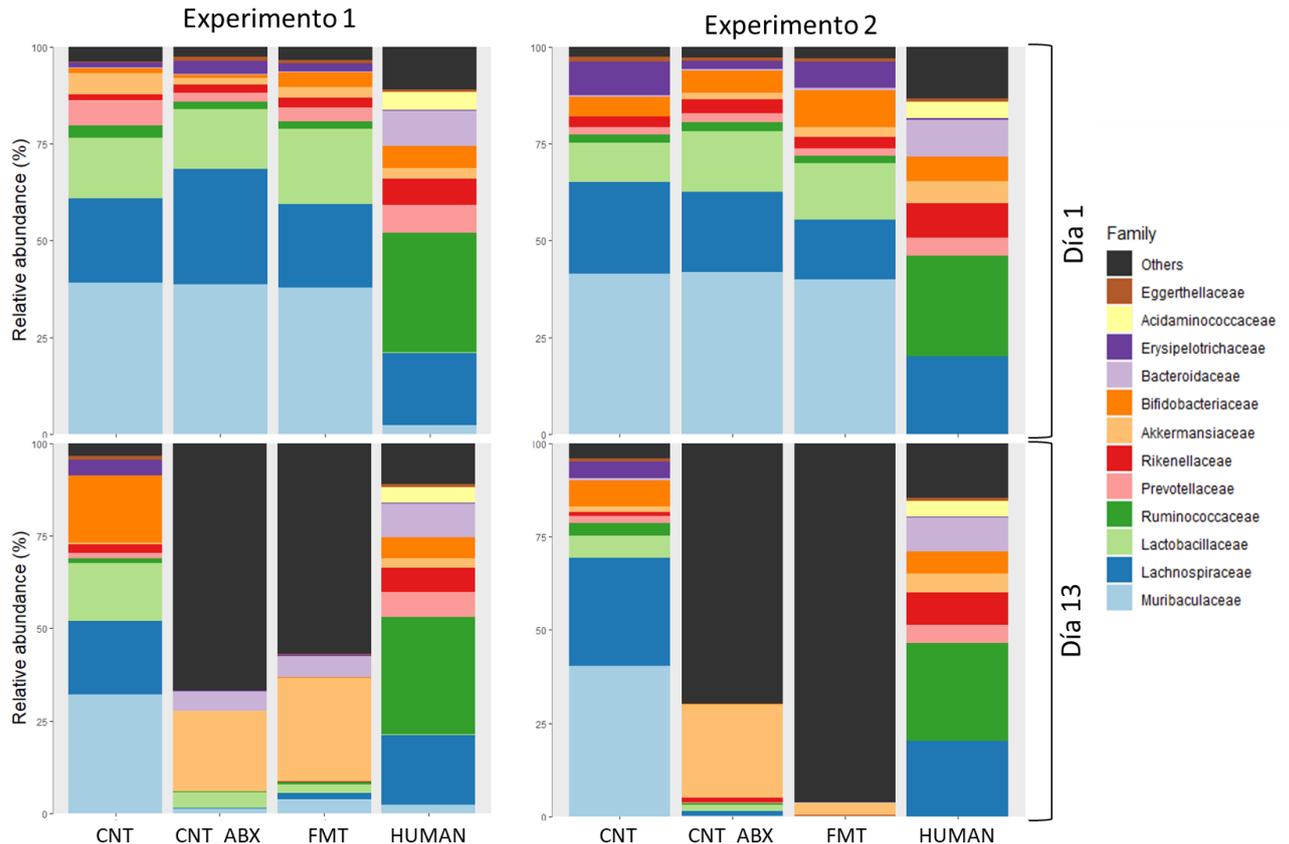


Figura 43 Gráfico de barras taxonómico a nivel de familia al inicio y finalización del tratamiento con antibiótico para la fase 1 y la fase 2 (CNT = Control, CNT_ABX = Control antibiótico, FMT = Fecal Microbiome transplantation), HUMAN = Muestras humanas)

La carga bacteriana total de los grupos CNT_ABX y FMT es muy inferior en comparación al grupo CNT tal como se demostró en la Figura 42. Por esta razón, a día 13, los grupos CNT_ABX y FMT representan una abundancia total aproximada del 0,001% respecto a la concentración bacteriana de los grupos CNT y HUMAN. La distribución de esta proporción mínima de material genético bacteriano restante tras la administración de antibiótico (día 13) pertenece mayoritariamente a familias bacterianas muy poco abundantes en las muestras control o muestras humanas y fueron clasificadas como “*Others*” en las representaciones gráficas.

En la Figura 44 se representan los 4 grupos experimentales a nivel taxonómico tras 2 días (día 17) y 7 días post trasplante fecal (día 21).

A día 17 se observan las mayores diferencias a nivel de composición taxonómica entre los grupos CNT_ABX y FMT. El grupo FMT adquiere una distribución taxonómica más parecida a las muestras humanas, lo que indica una transferencia directa de cepas bacterianas pertenecientes a dichas muestras, mediante el trasplante fecal.

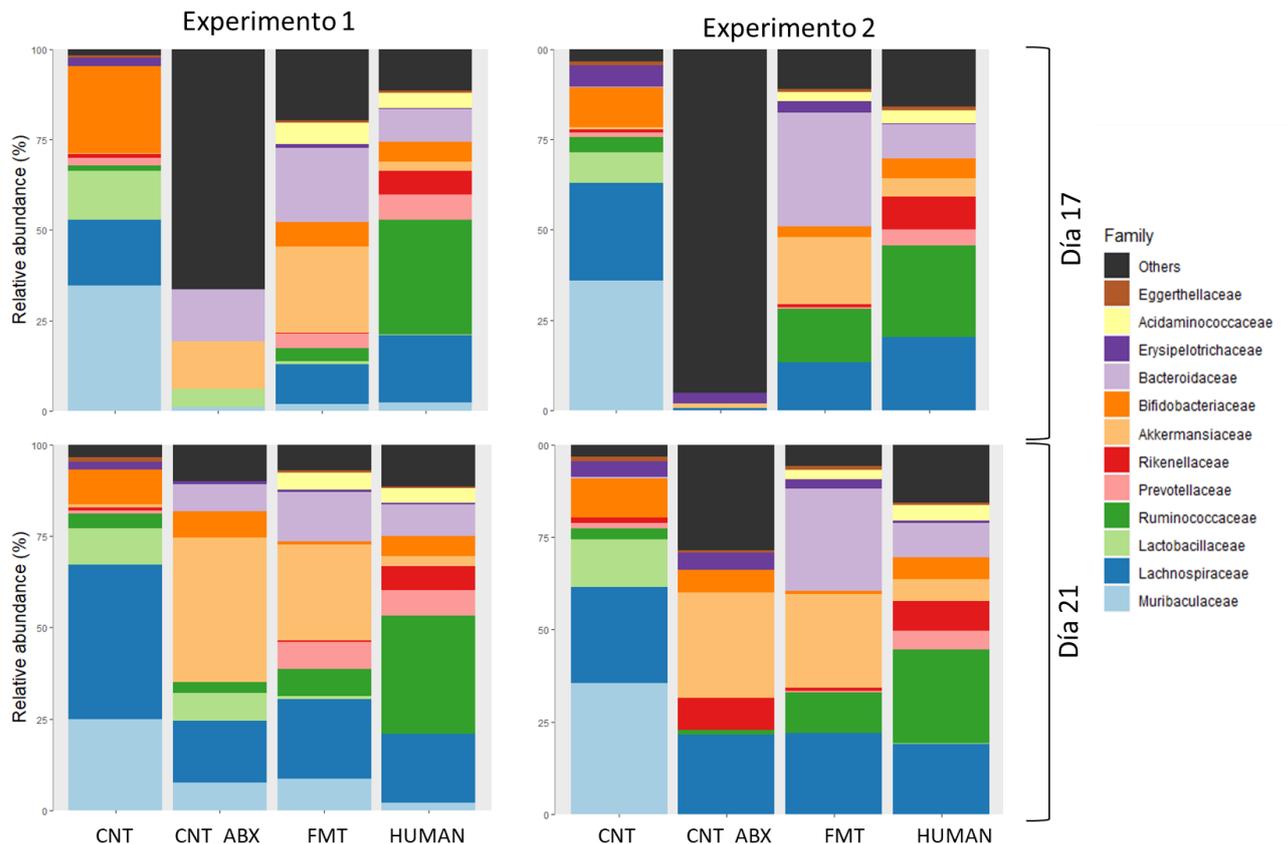


Figura 44 Gráfico de barras taxonómico a nivel de familia tras 2 días y 7 días post trasplante fecal para la fase 1 y la fase 2 (CNT = Control, CNT_ABX = Control antibiótico, FMT = Fecal Microbiome transplantation), HUMAN = Muestras humanas)

Sin embargo, las diferencias entre CNT_ABX no son tan claras a nivel taxonómico a día 21. Algunas de las familias bacterianas que eran muy poco abundantes a día 17 en el grupo CNT_ABX como *Lachnospiraceae*, *Rikenellaceae* o *Akkermansiaceae* vuelven a incrementar su abundancia total relativa tras 8 días de finalizar el tratamiento con antibiótico (día 21). Estos resultados parecen indicar que la composición de la microbiota del ratón tiende a recuperarse de manera progresiva y las bacterias remanentes que no fueron eliminadas por el tratamiento con antibiótico vuelven a colonizar el nicho ecológico intestinal de ratón cuando se interrumpe la administración del coctel de antibióticos. Este comportamiento se ha reportado en otros estudios en ratones de 6-8

semanas donde se observa una recuperación progresiva de ciertas cepas bacterianas que veían disminuida su abundancia total drásticamente durante la administración de antibióticos [224]. Los autores de este estudio atribuyen la recuperación a la dieta, al contexto de comunidad y a los reservorios ambientales. También hay que destacar que otro estudio similar demuestra que la recuperación post antibiótico de la microbiota es más rápida en ratones jóvenes-adultos (6-8 semanas de edad) en comparación a ratones adultos-ancianos (40 semanas) [225]. En este sentido, la edad de los ratones de nuestro experimento puede haber influido también en una recuperación más acelerada de la microbiota intestinal del grupo CNT_ABX.

Por otro lado, los resultados de alfa diversidad Shannon para ambos experimentos en los días 1 (tiempo inicial) y 17 (día con mayores cambios en la microbiota debido al trasplante), no muestran, a día 1, diferencias significativas en la diversidad alfa de las muestras al comparar los 4 grupos experimentales. Este resultado indica que la diversidad bacteriana entre las muestras *wild type* de ratón y la microbiota humana es similar en las muestras analizadas en nuestros experimentos. Estudios similares tampoco encontraron diferencias significativas en los índices Shannon, PD y Observed OTUs al comparar muestras humanas con muestras de ratón [226]. Sin embargo, a día 17, existen diferencias significativas entre los 4 grupos. Se puede destacar la diferencia marcada entre el grupo CNT_ABX y FMT, siendo esta muy significativa ($p < 0,001$). Esta diferencia indica que el trasplante fecal induce un incremento en la diversidad bacteriana de los ratones que no se observa en los ratones no trasplantados que han seguido el mismo tratamiento con antibiótico. No obstante, la diversidad alfa del grupo FMT sigue siendo estadísticamente menor en comparación al grupo CNT y HUMAN.

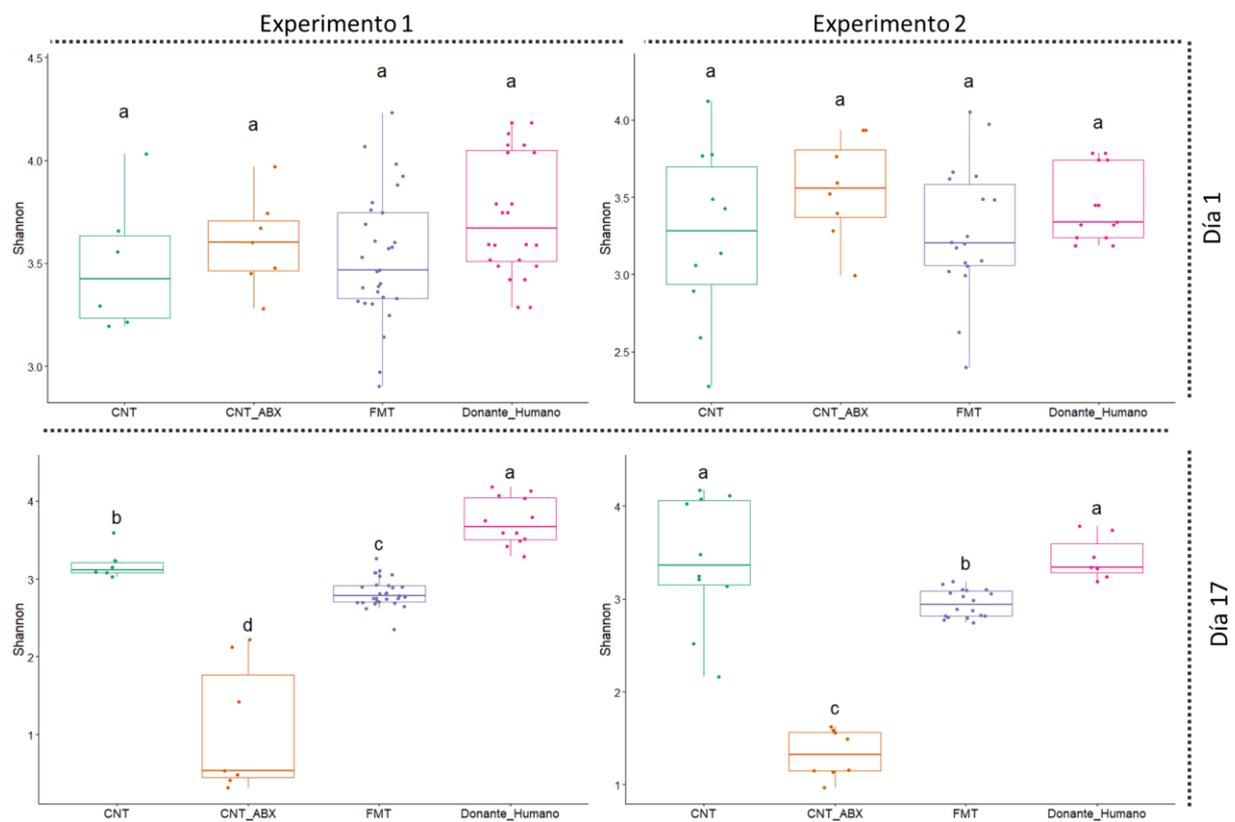


Figura 45 Box plot del índice de alfa diversidad Shannon Para determinar las diferencias estadística entre grupos se han utilizado un test ANOVA con comparaciones pareadas. Las letras a, b, c y d denotan las diferencias estadísticas entre grupos. (CNT = Control, CNT_ABX = Control antibiótico, FMT = Fecal Microbiome transplantation), Donante_Humano = Muestras humanas)

Los resultados obtenidos para el análisis de beta diversidad se pueden observar en la Figura 46 para el experimento 1 y la Figura 47 para el experimento 2. En el punto de partida, día 1, se puede observar un solapamiento de las elipses de los tres grupos de muestras de ratón (CNT, CNT_ABX y FMT), tanto para el experimento 1 como el 2. Las muestras humanas se separan claramente de las muestras de ratón para ambos experimentos. Los valores estadísticos de la comparación PERMANOVA entre los grupos demuestran que las diferencias entre las muestras humanas y las muestras del ratón a día 1 son significativas, sin embargo, no existen diferencias significativas en el día 1 entre los 3 grupos de ratón (Tabla 12 y Tabla 13). Estos resultados indican una composición de la microbiota similar para todos los ratones del estudio, a día 1.

A día 17 la separación, en el PCoA, entre los grupos es muy marcada. Los 4 grupos experimentales se separan entre sí en ambos experimentos. Destaca el acercamiento del grupo FMT a las muestras humanas, tanto para el experimento 1 como para el

experimento 2. Esto indica una composición más similar entre estos 2 grupos, y por lo tanto una tendencia a la humanización de la microbiota intestinal de los ratones incluidos en este grupo experimental. Sin embargo, las diferencias estadísticas siguen siendo significativas a día 17 entre los grupos FMT y Donante_Humano (Tabla 12 y Tabla 13). En los otros días; 21, 28, 35 y 42 se puede observar una clara tendencia para ambos experimentos. En este caso, las elipses del grupo FMT tienden a acercarse cada vez más al grupo CNT_ABX y separándose cada vez más del grupo Donante_Humano. Las diferencias entre los grupos FMT y CNT_ABX siguen siendo estadísticamente significativas para todos los tiempos, no obstante, los valores p son cada vez mayores a medida que avanza el experimento. Este incremento de los valores p a lo largo del tiempo indican un acercamiento en la composición de la microbiota de los grupos FMT y CNT_ABX.

Otro de los puntos destacables es la agrupación dentro del grupo FMT de las muestras según el voluntario utilizado para el trasplante. A partir del día 17, los replicados experimentales se agrupan según la etiqueta del donante utilizado, indicando una colonización específica en base a cada voluntario de forma individualizada.

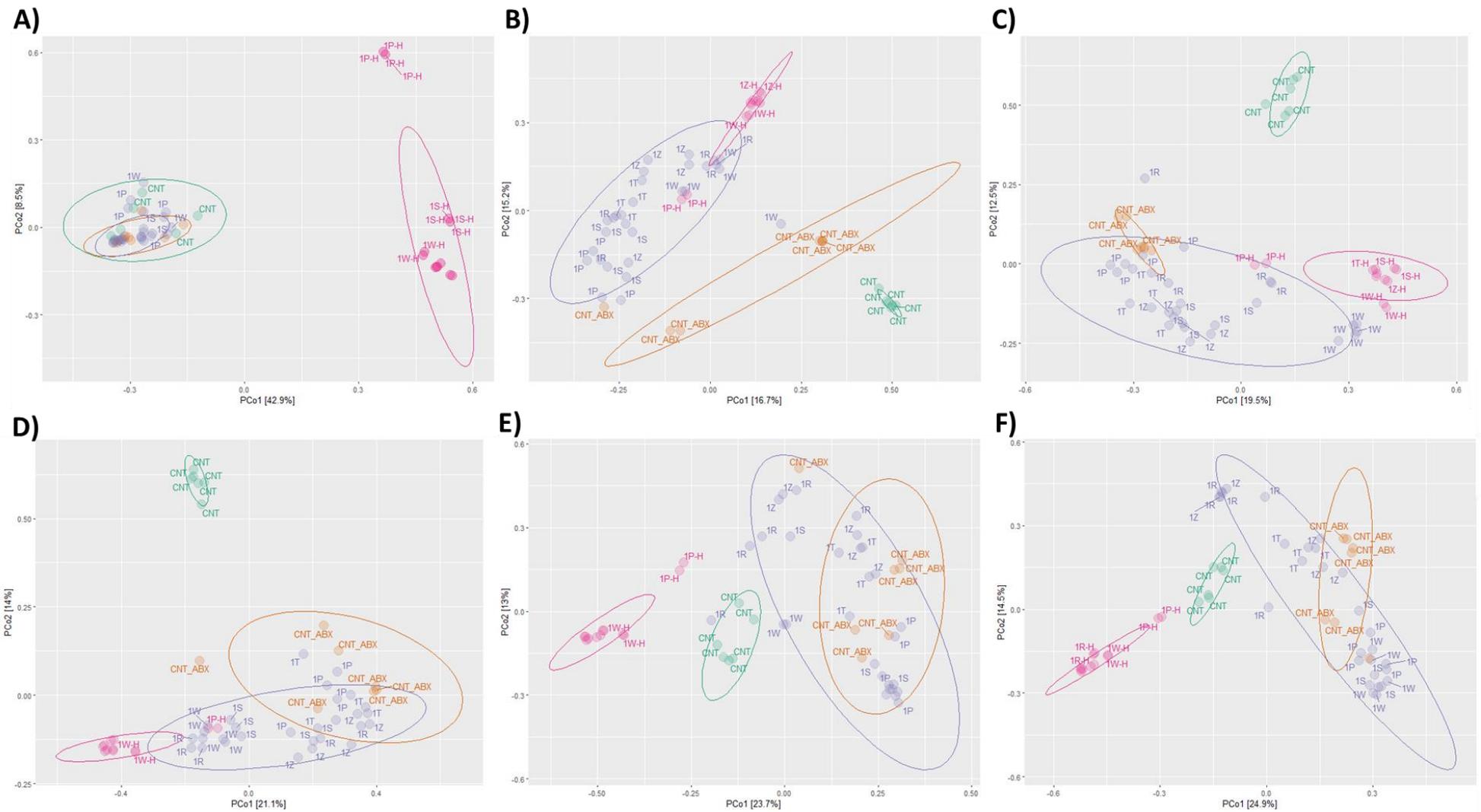


Figura 46 Análisis de beta diversidad Bray Curtis (Experimento 1) separado por tiempos de estudio A) día 1, B) día 17, C) día 21, D) día 28, E) día 35, F) día 42. En verde (●) grupo CNT, naranja (●) grupo CNT_ABX, azul (●) grupo FMT y rosa (●) grupo Donante_Humano.

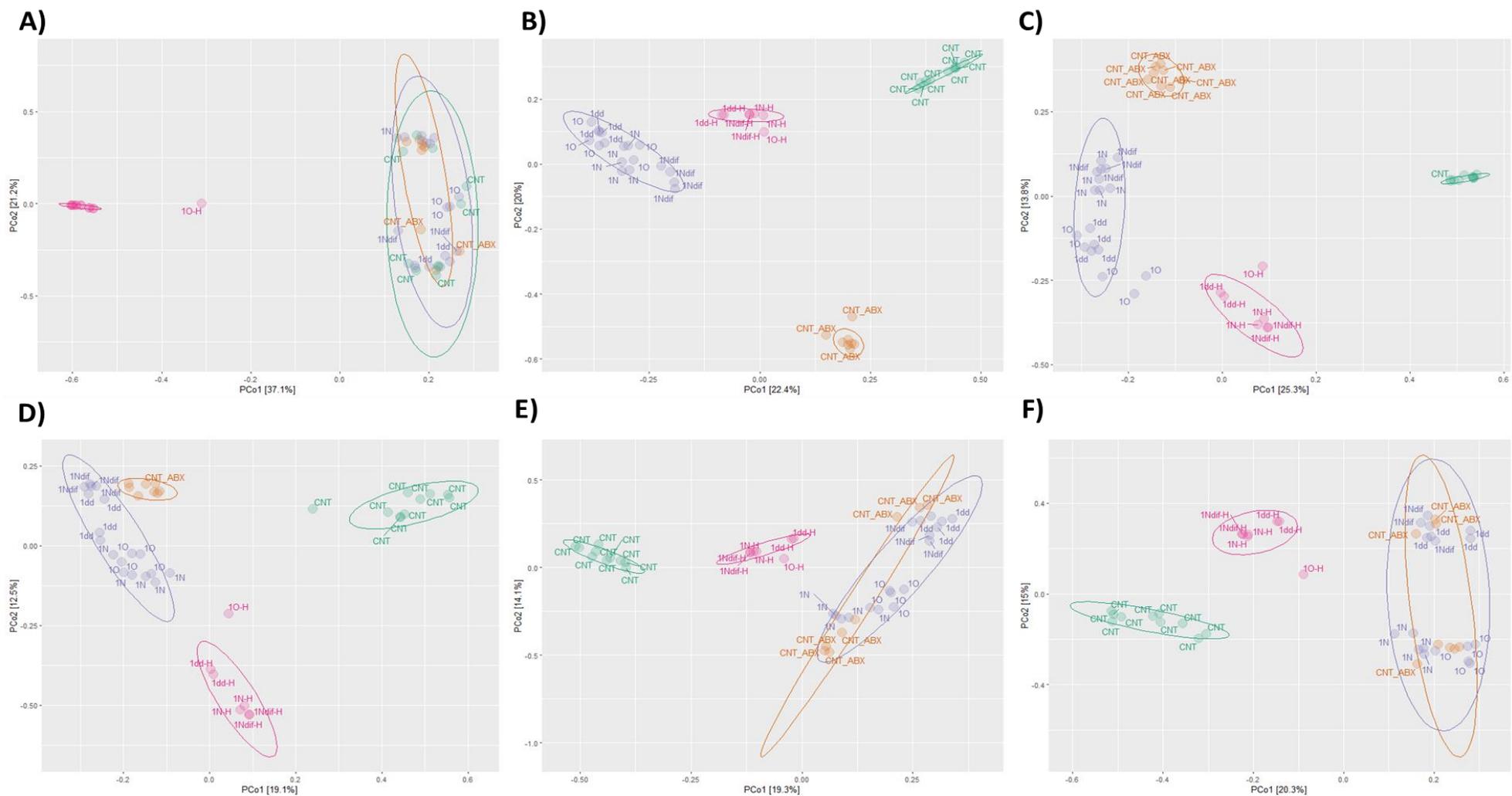


Figura 47 Análisis de beta diversidad Bray Curtis (Experimento 2) separado por tiempos de estudio A) día 1, B) día 17, C) día 21, D) día 28, E) día 35, F) día 42. En verde (●) grupo CNT, naranja (●) grupo CNT_ABX, azul (●) grupo FMT y rosa (●) grupo Donante_Humano.

Tabla 12 Experimento 1, p-valores ajustados con False Discovery Rate del test MANOVA con 999 permutaciones utilizando las métricas de betadiversidad Bray Curtis (Figura 46) con comparaciones pareadas entre los grupos experimentales CNT, CNT_ABX, FMT y Donante_Humano.

Condición	Día					
	1	17	21	28	35	42
FMT vs Donante_Humano	0,002**	0,001***	0,001***	0,0015**	0,0015**	0,0015**
FMT vs CNT_ABX	0,4152	0,001***	0,001***	0,002**	0,013*	0,018*
FMT vs CNT	0,4152	0,001***	0,001***	0,0015**	0,0015**	0,0015**
CNT_ABX vs Donante_Humano	0,002**	0,001***	0,001***	0,0015**	0,0015**	0,0015**
CNT_ABX vs CNT	0,585	0,001***	0,001***	0,002**	0,0036**	0,0024**
Donante_Humano vs CNT	0,002**	0,001***	0,001***	0,0015**	0,0015**	0,0015**

Tabla 13 Experimento 2, p-valores ajustados con False Discovery Rate del test MANOVA con 999 permutaciones utilizando las métricas de betadiversidad Bray Curtis (Figura 46) con comparaciones pareadas entre los grupos experimentales CNT, CNT_ABX, FMT y Donante_Humano.

Condición	Día					
	1	17	21	28	35	42
FMT vs Donante_Humano	0,002**	0,001***	0,001***	0,001***	0,002**	0,001***
FMT vs CNT_ABX	0,4644	0,001***	0,001***	0,001***	0,002**	0,001***
FMT vs CNT	0,483	0,001***	0,001***	0,001***	0,002**	0,001***
CNT_ABX vs Donante_Humano	0,002**	0,001***	0,001***	0,001***	0,002**	0,001***
CNT_ABX vs CNT	0,174	0,001***	0,001***	0,001***	0,002**	0,001***
Donante_Humano vs CNT	0,002**	0,001***	0,001***	0,001***	0,002**	0,001***

Una visión más detallada de la transferencia de las bacterias de la microbiota humana a la microbiota de ratón se muestra en la Figura 48. En este caso, se han representado los 40 géneros bacterianos más abundantes detectados a día 17, el día con una mayor transferencia de bacterias humanas según se ha mostrado en las figuras anteriores, tanto para el experimento 1 como para el experimento 2. Hay que destacar que muchos de los géneros más abundantes son compartidos entre ratón y humano, y en este caso, mediante la representación de mapa de calor a nivel de género, es imposible saber si algunos de estos géneros compartidos provienen de las muestras humanas o son géneros bacterianos de ratón. En cambio, para esos géneros que observamos que no están presentes ni el grupo

CNT ni CNT_ABX pero si en el grupo HUMAN y FMT, la probabilidad de que se encuentren en el grupo FMT debido al éxito del trasplante es muy alta.

Algunos de los géneros más abundantes que, con elevada probabilidad, se están transfiriendo de las muestras humanas a los ratones son: *Faecalibacterium*, *Biophila*, *Blautia*, *Prevotella*, *Parasutterella*, *Collisinella*, *Paraprevotella*, *Escherichia-Shigella*, *Ruminococcaceae*, *Barnesiella*, *Butyricoccus*, *Adilecreutzia*, *Fusicatenibacter*, *Anaerostipes* o *Lachnospiraceae*. La importancia de algunos de estos géneros y su asociación a distintas patologías está ampliamente descrita en la literatura científica. Por ejemplo, *Faecalibacterium*, especialmente *Faecalibacterium prausnitzii*, es una de las especies bacterianas más abundantes en el intestino humano. Se ha asociado con efectos antiinflamatorios y la promoción de la salud intestinal [227]. Su disminución se ha relacionado con enfermedades inflamatorias intestinales como la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa [228].

Biophila es un género bacteriano que ha sido asociado con una dieta alta en grasas y la producción de sulfuro de hidrógeno, lo que puede aumentar la inflamación en el intestino y contribuir al desarrollo de enfermedades como la colitis [229].

Blautia, otro género bacteriano presente en el intestino, se ha relacionado con la producción de AGCCs que son importantes para mantener la integridad de la barrera intestinal y tienen efectos antiinflamatorios ([230]. Además, *Blautia* se ha asociado con la protección contra la obesidad y la resistencia a la insulina [231].

Prevotella, un género bacteriano abundante en el intestino se ha relacionado con una dieta rica en fibra y carbohidratos complejos. Las personas con altos niveles de *Prevotella* podrían tener una mayor capacidad para metabolizar estos compuestos y, por lo tanto, podrían tener un menor riesgo de desarrollar enfermedades metabólicas como la diabetes tipo 2 [232].

Collinsella es un género bacteriano que se ha asociado con un mayor riesgo de aterosclerosis, enfermedades cardiovasculares y resistencia a la insulina [233].

Paraprevotella es otro género bacteriano presente en el intestino humano y se ha relacionado con la degradación de polisacáridos y proteínas en la dieta. Su papel en la salud humana aún no está completamente comprendido [230].

Escherichia-Shigella es un grupo de bacterias que incluye especies tanto comensales como patógenas. Algunas cepas de *Escherichia coli* pueden ser parte de la microbiota intestinal normal, mientras que otras cepas pueden causar enfermedades como infecciones del tracto urinario, diarrea y colitis hemorrágica [234].

Por otro lado, en la misma figura, también se pueden detectar una serie de géneros bacterianos presentes en las muestras humanas y que no han sido capaces de colonizar el tracto intestinal del ratón, ya sea por la incapacidad de estos géneros de adaptarse a un nuevo ambiente o por tener comprometida su viabilidad a la hora de realizar el trasplante fecal. Algunos de los géneros que no se han detectado en la microbiota del ratón a día 17 tras el trasplante fecal son: *Ruminococcaceae* UCG-002, *Ruminococcus* 2, *Christensenellaceae* R-7, *Eubacterium*, *Ruminococcus* 2, *Eubacterium*, *Rikenellaceae*, *Ruminococcus* 1, *Alloprevotella*, *Prevotella* 9, *Ruminococcaceae* UCG-014.

Todos los géneros que no han podido ser transferidos corresponden a bacterias anaerobias estrictas. Muchos anaerobios estrictos pueden soportar un breve periodo de exposición al oxígeno atmosférico y reanudar su crecimiento tras el restablecimiento de la anaerobiosis. Cuanto mayor es la actividad de las enzimas superóxido dismutasa y catalasa, mayor es la aerotolerancia. Entre los anaerobios obligados, también pueden distinguirse distintos niveles de sensibilidad al oxígeno hasta los comúnmente denominados "extremadamente sensibles al oxígeno" (EOS) [235].

La mayoría de las bacterias que no pudieron ser transferidas pertenecen a géneros EOS, con una gran acumulación de una misma clase, *Firmicutes/Clostridia/Clostridiales*. Que la mayoría de estos géneros pertenezcan a géneros muy cercanos filogenéticamente puede estar indicando una incompatibilidad generalizada de estas clases bacterianas al realizar el trasplante de ratón a humano y una sensibilidad extrema a la aerobiosis en periodos cortos de tiempo debido a actividades menor de las enzimas encargadas de la defensa en frente a la toxicidad generada por los radicales libres del oxígeno [236]. No obstante, algunas especies EOS si se pudieron transferir durante estos experimentos, por ejemplo, una de las especies EOS con mayor implicación en el estado metabólico y la obesidad, *Faecalibacterium prausnitzii*, considerada EOS por su alta sensibilidad al oxígeno se puede transferir mediante el trasplante fecal tanto en el experimento 1 como en el experimento 2.

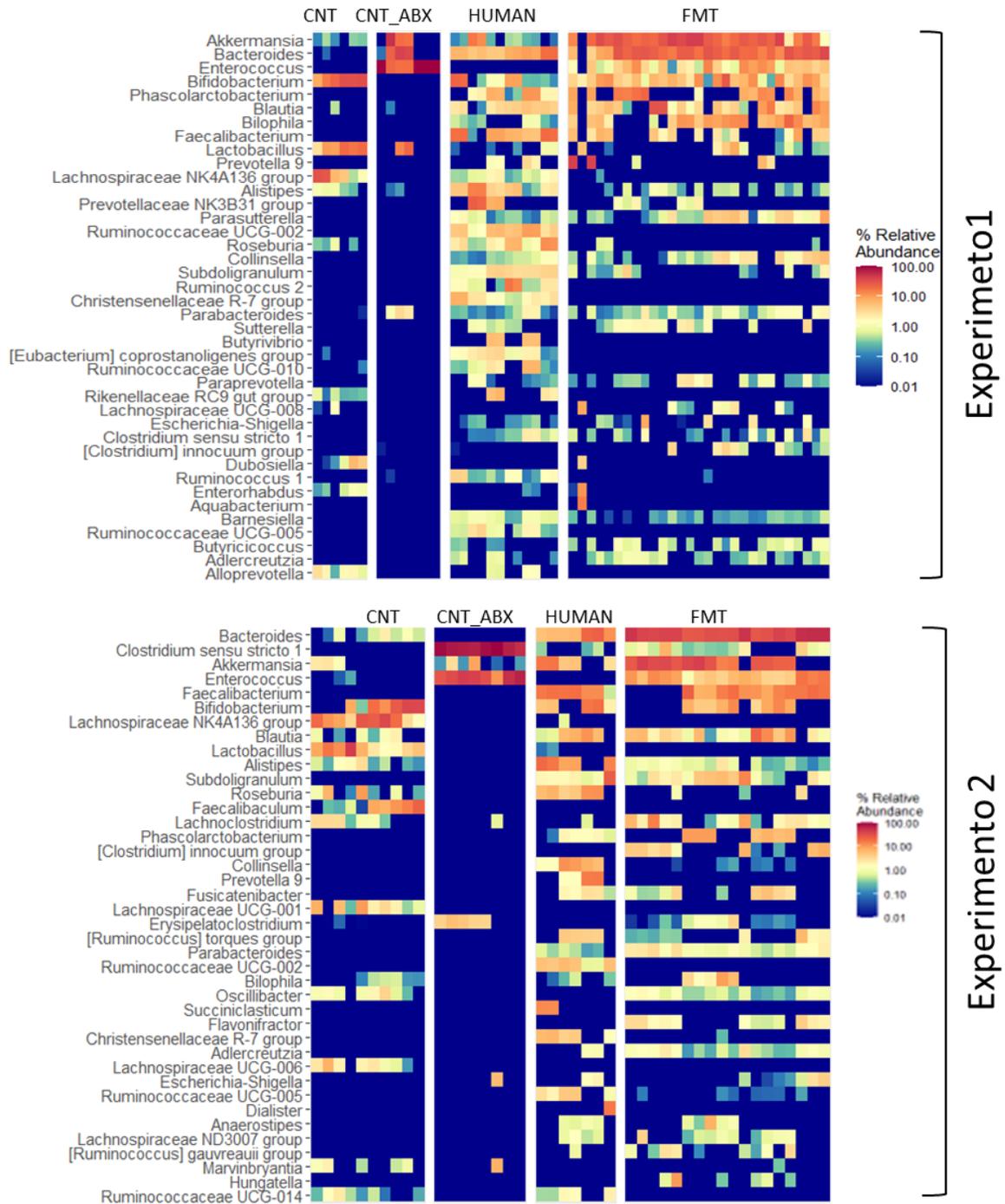


Figura 48 Heatmap de los 40 géneros más abundantes a día 17. (CNT = Control, CNT_ABX = Control antibiótico, FMT = Fecal Microbiome transplantation), HUMAN = Muestras humanas)

La evolución del trasplante también se ha estudiado a nivel de OTUs compartidas entre la condición FMT y Donante_Humano (Figura 49). La tendencia en ambos experimentos es muy parecida, en primer lugar, tanto a día 1 como a día 13, las OTUs compartidas FMT-Humano (línea naranja Figura 49) son muy poco abundantes, 7 OTUs compartidas de un total de 439 OTUs humanas para el experimento 1 y 4 OTUs compartidas de 211

OTUs humanas para el experimento 2. Esta proporción incrementa drásticamente a partir del día 17 con 124 y 56 OTUs compartidas respectivamente para el experimento 1 y 2 entre el grupo FMT y el grupo Donante_Humano. Este es el pico máximo de OTUs compartidas entre ambas condiciones ya que a partir del día 17 las OTUs compartidas disminuyen tanto para el experimento 1 como para el experimento 2. A la vez, las OTUs exclusivas de las muestras humanas incrementan a partir del día 17 hasta el día 42 cuando finalizan los experimentos.

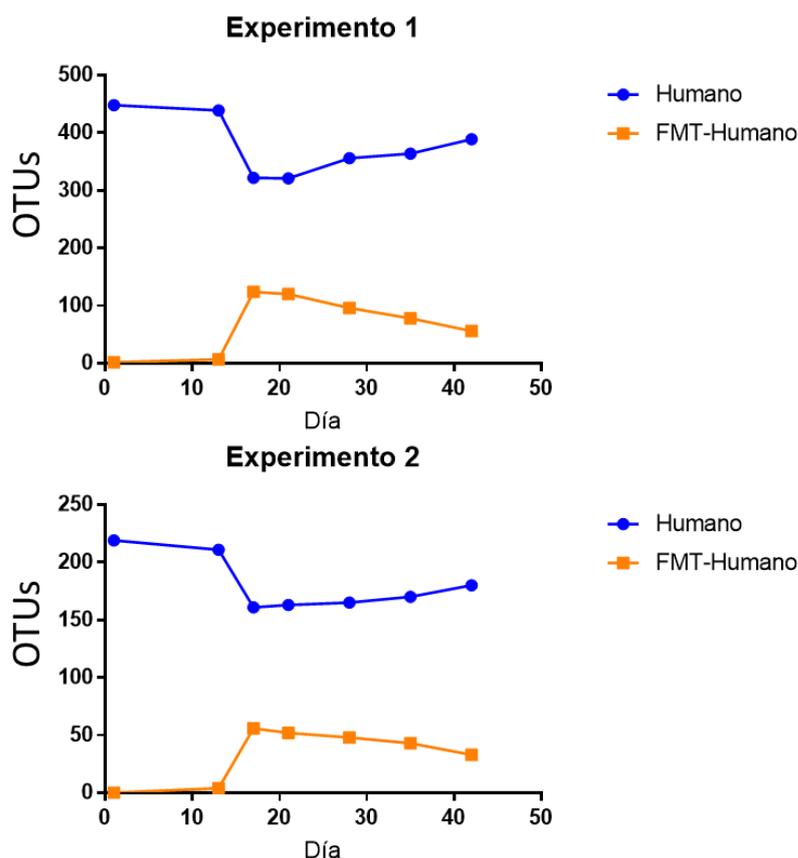


Figura 49 Evolución de las OTUs compartidas entre el grupo Donante_Humano y FMT a lo largo del tiempo para experimento 1 y experimento 2. Esta representación permite observar la evolución de la microbiota humana trasplantada en el modelo animal durante los experimentos.

Los resultados de la evolución de las OTUs compartidas a lo largo del experimento pone de manifiesto la tendencia de los ratones trasplantados a una disminución de las OTUs humanas en la microbiota del ratón. Estos resultados van en el mismo sentido al observado en los análisis de beta diversidad donde la composición general de la microbiota es cada vez más diferente a lo largo del tiempo en ambos experimentos realizados entre las muestras humanas y las muestras FMT tras realizar el trasplante fecal. En la Tabla 14 y Tabla 15 se muestran los valores p ajustados mediante FDR ordenados de más a menos significativo en los resultados del modelo a día 1. El objetivo de este tipo

de análisis ha sido determinar qué géneros bacterianos humanos tienen una mayor capacidad de adaptación al intestino del ratón y cómo evoluciona la abundancia de estos géneros diferenciales tras una única administración de muestra de microbiota humana.

Los resultados del análisis de abundancia diferencial de géneros bacterianos, mediante Random Forest, muestran en el experimento 1, un total de 68 géneros bacterianos con una abundancia relativa significativamente mayor en las muestras humanas respecto a las muestras de ratón y 15 géneros bacterianos con una abundancia significativamente mayor en los ratones en comparación a las muestras humanas. En el experimento 2, las diferencias de partida son 34 géneros más abundantes en las muestras humanas y 15 en las muestras de ratón. De entrada, esta diferencia de géneros diferenciales entre el experimento 1 y 2 en el punto de partida puede estar relacionada con el número voluntarios de cada experimento.

La evolución de los valores p tras la realización de los trasplantes se puede observar para cada género bacteriano a lo largo del tiempo. Destaca como algunos de los géneros con un p valor significativo a día 1 desaparecen tras realizar el FMT a lo largo de todo el experimento. Algunos de estos géneros para el experimento 1 son: *Parasuterella*, *Bacteroides*, *Parabacteroides*, *Phaseolabacterium*, *Butyricimonas*, *Aldercreutzia*, *Biolophila*, *Ruminococcus gauvreauii*, *ASF365*, *Coriobacteriaceae UCG-002*, *Mucispirillum*, *Prevotellaceae NK3B31*, *Howardella*, *Ruminoclostridium*, *Turcibacter* y *Anaerotruncus*, para el experimento 2: *Parabacteroides*, *Bacteroides*, *Phaseolabacterium*, *Lachnospiraceae*, *Barnesiella* y *Coprobacter*. Estos géneros bacterianos se han trasplantado de las muestras humanas al intestino del ratón y han mantenido una abundancia relativa similar a las muestras humanas durante 4 semanas tras una única inoculación.

Si observamos la evolución de los otros géneros bacterianos, los resultados son muy parecidos a los destacados anteriormente con los análisis de beta diversidad y OTUs únicas. El mayor cambio de valores p respecto al día 1 se observa en el día 17. Un total de 32 de 68 géneros bacterianos pierden la diferencia significativa a día 17 en el experimento 1 y 19 de 34 en el experimento 2. Posteriormente, en los siguientes días el número de valores p significativos aumentan, observando la misma tendencia de vuelta al estado basal del ratón.

Tabla 14 Experimento 1, valores *p* ajustados con FDR tras aplicar el test de análisis diferencial Random Forest comparando las abundancias relativas de los géneros bacterianos para los grupos muestras humanas y FMT. Los primeros géneros de cada tabla son los que tienen una abundancia relativa mayor en las muestras humanas en comparación al punto de partida de la microbiota del ratón (día 1).

Taxa	Mayor abundancia	Día 1	Día 17	Día 21	Día 28	Día 35	Día 42
g_Collinsella	Humano	8,24E-10	NS	3,28E-04	8,08E-07	6,68E-08	6,68E-08
g_Barnesiella	Humano	8,24E-10	2,51E-04	NS	NS	NS	NS
g_[Ruminococcus] torques group	Humano	8,24E-10	1,18E-04	2,43E-06	8,22E-04	4,41E-07	1,24E-07
g_Coprococcus 3	Humano	8,24E-10	3,37E-04	5,56E-07	1,34E-07	6,68E-08	6,68E-08
g_Ruminococcaceae UCG-002	Humano	8,24E-10	6,68E-08	5,56E-07	1,34E-07	6,68E-08	6,68E-08
g_Subdoligranulum	Humano	8,24E-10	4,95E-05	9,15E-05	1,79E-06	6,68E-08	6,68E-08
g_Christensenellaceae R-7 group	Humano	1,11E-09	6,68E-08	1,33E-05	8,00E-07	6,25E-07	1,24E-07
g_Parasutterella	Humano	6,09E-09	NS	NS	NS	NS	NS
g_Dorea	Humano	6,27E-09	4,44E-06	5,56E-07	7,42E-07	3,18E-07	2,47E-07
g_Fusicatenibacter	Humano	6,27E-09	4,54E-06	1,39E-02	1,22E-02	3,52E-04	7,36E-06
g_Faecalibacterium	Humano	6,27E-09	3,23E-03	1,74E-02	1,57E-03	5,86E-06	7,78E-07
g_Ruminococcaceae UCG-005	Humano	6,27E-09	2,78E-07	2,45E-05	1,29E-06	3,18E-07	2,47E-07
g_Ruminococcus 2	Humano	6,27E-09	2,78E-07	8,97E-06	8,29E-05	2,81E-06	5,31E-06
g_Ruminococcus 1	Humano	6,59E-09	1,54E-07	8,97E-06	9,82E-07	4,41E-07	1,06E-06
g_Bacteroides	Humano	1,05E-08	NS	NS	NS	NS	NS
g_Parabacteroides	Humano	2,97E-08	NS	NS	NS	NS	NS
g_Clostridium sensu stricto 1	Humano	5,11E-08	NS	2,43E-06	1,29E-06	1,05E-06	9,92E-07
g_[Eubacterium] eligens group	Humano	5,11E-08	1,40E-06	1,33E-05	1,29E-06	1,05E-06	9,92E-07
g_[Eubacterium] hallii group	Humano	5,11E-08	2,45E-05	2,45E-05	1,29E-06	1,05E-06	9,92E-07
g_Romboutsia	Humano	5,11E-08	1,03E-05	6,51E-06	1,29E-06	1,05E-06	9,92E-07
g_Ruminococcaceae UCG-013	Humano	5,11E-08	7,73E-04	3,54E-05	2,37E-03	4,66E-04	5,63E-06
g_Phascolarctobacterium	Humano	5,11E-08	NS	NS	NS	NS	NS
g_Ruminococcaceae NK4A214 group	Humano	1,94E-07	1,40E-06	1,33E-05	3,66E-06	7,87E-06	9,92E-07
g_Butyricimonas	Humano	4,70E-07	NS	NS	NS	NS	NS
g_Anaerostipes	Humano	4,70E-07	4,30E-02	NS	3,24E-03	1,69E-04	5,31E-06
g_Coprococcus 2	Humano	4,70E-07	7,79E-06	9,73E-06	6,49E-06	5,86E-06	5,31E-06
g_Lachnospira	Humano	4,70E-07	1,54E-04	9,73E-06	6,49E-06	5,86E-06	5,31E-06
g_[Eubacterium] coprostanoligenes group	Humano	2,63E-06	6,68E-08	3,03E-05	4,46E-04	9,03E-04	2,80E-04
g_[Eubacterium] ventriosum group	Humano	4,07E-06	3,54E-05	3,54E-05	1,57E-03	7,63E-04	5,34E-04
g_Lachnospiraceae ND3007 group	Humano	4,07E-06	NS	2,32E-02	1,43E-03	3,24E-05	2,76E-05
g_Ruminococcaceae UCG-003	Humano	4,07E-06	3,54E-05	1,30E-04	1,48E-04	3,24E-05	1,04E-04
g_Escherichia-Shigella	Humano	4,07E-06	NS	NS	1,77E-02	1,67E-04	5,34E-04
g_Ruminococcaceae UCG-010	Humano	4,84E-06	1,40E-06	2,43E-06	1,29E-06	1,05E-06	9,92E-07
g_Blautia	Humano	1,74E-05	NS	NS	6,91E-03	1,06E-03	1,11E-03
g_Paraprevotella	Humano	3,09E-05	NS	NS	NS	NS	1,54E-03
g_Streptococcus	Humano	3,09E-05	1,69E-04	1,69E-04	1,91E-04	1,67E-04	1,37E-04
g_Family XIII AD3011 group	Humano	3,09E-05	NS	1,69E-04	1,91E-04	5,65E-04	1,37E-04
g_Roseburia	Humano	8,64E-05	8,89E-07	1,01E-04	4,87E-02	7,83E-03	NS
g_Adlercreutzia	Humano	1,88E-04	NS	NS	NS	NS	NS
g_CAG-56	Humano	1,88E-04	7,28E-04	7,28E-04	8,58E-04	6,16E-04	6,16E-04
g_Coprococcus 1	Humano	1,88E-04	8,21E-03	7,28E-04	7,61E-03	6,16E-04	6,16E-04
g_Erysipelotrichaceae UCG-003	Humano	1,88E-04	4,34E-02	2,44E-02	2,22E-02	1,27E-02	1,38E-02
g_Holdemanella	Humano	1,88E-04	NS	2,11E-02	8,58E-04	6,16E-04	6,16E-04
g_Sutterella	Humano	1,88E-04	NS	NS	1,83E-02	6,16E-04	2,57E-03
g_Ruminiclostridium 6	Humano	4,27E-04	8,15E-05	3,67E-04	9,52E-03	5,08E-04	1,38E-03
g_Ruminiclostridium 5	Humano	4,46E-04	4,02E-04	NS	NS	NS	NS
g_Ruminococcaceae UCG-014	Humano	8,17E-04	6,68E-08	5,56E-07	8,00E-07	5,92E-07	5,43E-07
g_Bifidobacterium	Humano	8,17E-04	NS	NS	NS	NS	NS
g_Slackia	Humano	1,06E-03	NS	3,24E-03	3,24E-03	2,74E-03	2,57E-03
g_[Eubacterium] ruminantium group	Humano	1,06E-03	3,33E-03	3,24E-03	3,24E-03	2,74E-03	2,57E-03
g_[Ruminococcus] gnavreuii group	Humano	1,06E-03	NS	NS	NS	NS	NS
g_Lachnospiraceae FCS020 group	Humano	1,06E-03	NS	NS	NS	NS	2,57E-03
g_Alistipes	Humano	1,08E-03	3,29E-04	6,06E-04	1,11E-03	2,07E-04	1,58E-05
g_ASF356	Humano	1,57E-03	NS	NS	NS	NS	NS
g_Coriobacteriaceae UCG-002	Humano	3,01E-03	NS	NS	NS	NS	NS
g_Mucispirillum	Humano	3,01E-03	NS	NS	NS	NS	NS
g_A2	Humano	3,01E-03	NS	NS	NS	NS	NS
g_Senegalimassilia	Humano	5,35E-03	1,36E-02	1,39E-02	1,22E-02	1,13E-02	1,07E-02
g_Prevotella 9	Humano	5,35E-03	NS	NS	NS	NS	1,07E-02
g_Prevotellaceae NK3B31 group	Humano	5,35E-03	NS	NS	NS	NS	NS
g_Butyrvibrio	Humano	5,35E-03	1,36E-02	1,39E-02	1,22E-02	1,13E-02	1,07E-02
g_Howardella	Humano	5,35E-03	NS	NS	NS	NS	NS
g_Negativibacillus	Humano	5,35E-03	NS	NS	NS	1,13E-02	1,07E-02
g_Ruminiclostridium	Humano	1,02E-02	NS	NS	NS	NS	NS
g_Peptococcus	Humano	2,75E-02	NS	NS	4,76E-02	4,68E-02	4,53E-02
g_Ruminococcaceae UCG-004	Humano	2,75E-02	NS	NS	NS	NS	4,53E-02
g_Turicibacter	Humano	2,75E-02	NS	NS	NS	NS	NS
g_Anaerotruncus	Humano	3,39E-02	NS	NS	NS	NS	NS
g_Muribaculum	FMT	3,97E-09	NS	NS	NS	NS	NS
g_Dubosiella	FMT	6,62E-09	NS	NS	NS	NS	NS
g_Lactobacillus	FMT	9,72E-09	NS	NS	NS	NS	NS
g_Lachnospiraceae NK4A136 group	FMT	1,94E-07	NS	NS	5,76E-03	6,88E-05	1,18E-05
g_Enterorhabdus	FMT	1,98E-07	NS	NS	NS	NS	NS
g_Rikenella	FMT	3,02E-07	NS	NS	NS	NS	NS
g_Faecalibaculum	FMT	1,88E-06	NS	NS	NS	NS	NS
g_Marvinbryantia	FMT	4,75E-06	NS	NS	2,89E-02	2,86E-04	NS
g_Prevotellaceae UCG-001	FMT	4,56E-05	NS	NS	NS	NS	NS
g_Lachnospiraceae UCG-008	FMT	4,88E-05	NS	NS	NS	NS	NS
g_Alloprevotella	FMT	8,01E-05	NS	NS	NS	NS	NS
g_Candidatus Saccharimonas	FMT	1,04E-04	NS	NS	NS	NS	NS
g_Lachnospiraceae UCG-006	FMT	2,02E-04	NS	NS	NS	NS	NS
g_Lachnospiraceae UCG-001	FMT	3,29E-04	NS	NS	NS	NS	NS
g_Lachnoclostridium	FMT	5,35E-03	NS	NS	6,59E-04	5,50E-04	3,31E-05

Tabla 15 Experimento 2, valores p ajustados con FDR tras aplicar el test de análisis diferencial Random Forest comparando las abundancias relativas de los géneros bacterianos para los grupos muestras humanas y FMT. Los primeros géneros de cada tabla son los que tienen una abundancia relativa mayor en las muestras humanas en comparación al punto de partida de la microbiota del ratón (día 1).

Taxa	Mayor abundancia	Día 1	Día 17	Día 21	Día 28	Día 35	Día 42
g__[Eubacterium] hallii group	Humano	2,08E-05	NS	NS	2,58E-03	9,40E-04	2,36E-04
g__Faecalibacterium	Humano	2,08E-05	NS	NS	6,18E-03	8,25E-03	1,33E-03
g__Ruminococcaceae UCG-002	Humano	2,08E-05	3,53E-04	9,95E-04	1,99E-03	7,07E-04	2,36E-04
g__Subdoligranulum	Humano	2,08E-05	NS	NS	1,34E-02	9,40E-04	2,36E-04
g__Collinsella	Humano	5,60E-05	2,20E-02	1,66E-02	1,34E-02	1,18E-02	5,47E-03
g__Parabacteroides	Humano	5,60E-05	NS	NS	NS	NS	NS
g__Dorea	Humano	5,60E-05	5,20E-03	1,54E-03	2,06E-03	1,24E-03	1,24E-03
g__Bacteroides	Humano	1,13E-04	NS	NS	NS	NS	NS
g__[Eubacterium] coprostanoligenes group	Humano	1,13E-04	3,53E-04	9,95E-04	2,58E-03	5,62E-03	9,30E-03
g__Romboutsia	Humano	1,21E-04	5,20E-03	1,54E-03	2,06E-03	1,24E-03	1,24E-03
g__Phascolarctobacterium	Humano	1,21E-04	NS	NS	NS	NS	NS
g__Fusicatenibacter	Humano	1,24E-03	NS	NS	NS	2,19E-02	5,47E-03
g__Ruminococcaceae UCG-013	Humano	1,24E-03	2,95E-02	2,70E-02	1,34E-02	1,75E-02	1,99E-02
g__Ruminococcus 2	Humano	1,24E-03	6,15E-03	NS	NS	NS	NS
g__Blautia	Humano	2,25E-03	NS	NS	NS	NS	2,01E-02
g__Prevotella 9	Humano	2,74E-03	1,81E-02	1,92E-02	1,34E-02	1,18E-02	1,10E-02
g__Streptococcus	Humano	2,74E-03	1,81E-02	1,92E-02	1,34E-02	1,18E-02	1,10E-02
g__[Ruminococcus] torques group	Humano	2,74E-03	NS	NS	NS	1,18E-02	1,10E-02
g__Coprococcus 2	Humano	2,74E-03	1,81E-02	1,92E-02	1,34E-02	1,18E-02	1,10E-02
g__Coprococcus 3	Humano	2,74E-03	NS	NS	4,98E-02	1,18E-02	1,10E-02
g__Lachnospiraceae ND3007 group	Humano	2,74E-03	NS	NS	NS	NS	NS
g__Ruminococcaceae UCG-005	Humano	2,74E-03	NS	NS	3,95E-02	3,31E-02	1,07E-02
g__Erysipelotrichaceae UCG-003	Humano	2,74E-03	1,81E-02	1,92E-02	1,34E-02	1,18E-02	1,10E-02
g__Roseburia	Humano	2,83E-03	9,46E-03	8,21E-03	NS	NS	NS
g__Christensenellaceae R-7 group	Humano	4,39E-03	1,51E-02	NS	NS	NS	NS
g__Ruminococcaceae NK4A214 group	Humano	4,39E-03	6,15E-03	2,70E-02	NS	NS	NS
g__Anaerostipes	Humano	6,86E-03	NS	NS	1,34E-02	1,18E-02	1,10E-02
g__Barnesiella	Humano	7,16E-03	NS	NS	NS	NS	NS
g__Victivallis	Humano	7,16E-03	1,81E-02	1,92E-02	1,34E-02	1,18E-02	1,10E-02
g__Clostridium sensu stricto 1	Humano	1,92E-02	NS	NS	NS	4,79E-02	4,55E-02
g__Lachnospira	Humano	1,92E-02	NS	NS	NS	4,79E-02	4,55E-02
g__Copro bacter	Humano	4,68E-02	NS	NS	NS	NS	NS
g__Holdemanella	Humano	4,68E-02	NS	NS	NS	4,79E-02	4,55E-02
g__Sutterella	Humano	4,68E-02	NS	NS	NS	4,79E-02	4,55E-02
g__Muribaculum	FMT	6,81E-05	NS	NS	NS	NS	NS
g__Lactobacillus	FMT	1,12E-04	NS	NS	NS	NS	NS
g__Lachnospiraceae NK4A136 group	FMT	1,13E-04	NS	NS	6,18E-03	5,62E-03	5,47E-03
g__Lachnospiraceae UCG-001	FMT	2,94E-04	NS	NS	NS	NS	NS
g__Faecalibaculum	FMT	2,94E-04	NS	NS	NS	NS	NS
g__Enterorhabdus	FMT	4,29E-04	NS	NS	NS	NS	NS
g__Lachnospiraceae UCG-006	FMT	2,74E-03	NS	NS	NS	1,18E-02	1,10E-02
g__Ruminiclostridium	FMT	2,74E-03	NS	NS	NS	NS	NS
g__Marvinbryantia	FMT	5,10E-03	NS	NS	1,96E-02	5,62E-03	5,47E-03
g__Oscillibacter	FMT	1,01E-02	6,15E-03	4,63E-02	NS	NS	2,72E-02
g__Alloprevotella	FMT	1,92E-02	NS	NS	NS	NS	NS
g__Desulfovibrio	FMT	1,92E-02	NS	NS	NS	NS	NS
g__Lachnoclostridium	FMT	2,08E-02	NS	8,21E-03	6,18E-03	5,62E-03	5,81E-03
g__Rikenella	FMT	3,55E-02	NS	NS	NS	NS	NS
g__A2	FMT	3,55E-02	NS	NS	NS	NS	1,63E-02

Finalmente, el último análisis llevado a cabo ha sido un modelo predictivo utilizando Random Forest para las muestras a día 17. En este caso, las variables de la microbiota han sido utilizadas para intentar clasificar las muestras a cada grupo en base a la composición de la microbiota. De este modo, si la microbiota de cada grupo es suficientemente diferente, el modelo clasificará satisfactoriamente cada muestra al grupo que pertenece, mientras que si la composición es muy similar, el modelo será incapaz de clasificar de forma predictiva la asignación de las muestras al grupo que pertenecen.

El desempeño del modelo se puede consultar en la Figura 50.

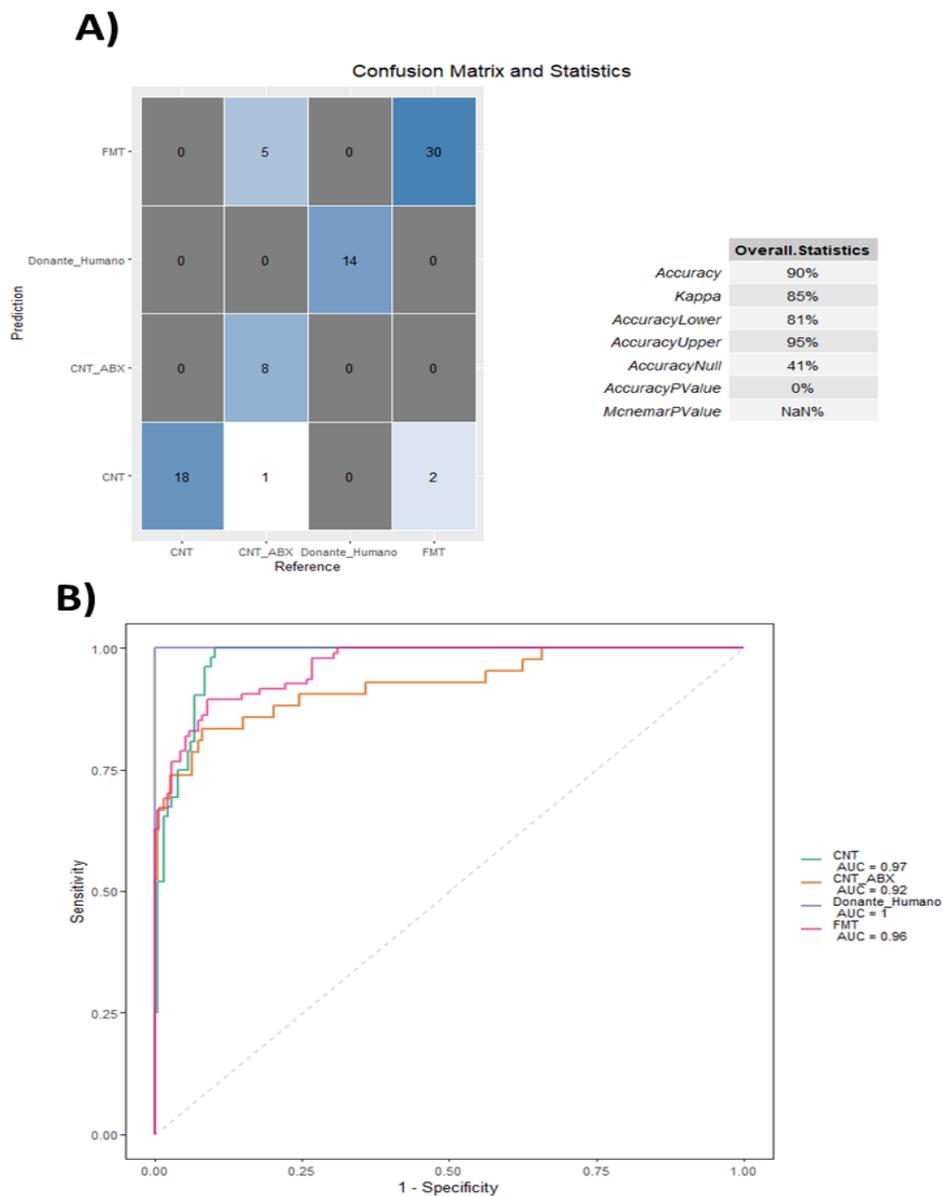


Figura 50 Resultados del modelo Random Forest para la predicción de las muestras en base al grupo de estudio. A) Matriz de confusión que muestra la clasificación de las muestras predichas en comparación con las muestras de

referencia, junto con las estadísticas asociadas, como la precisión, sensibilidad y especificidad. Los valores en la diagonal representan las clasificaciones correctas, mientras que los valores fuera de la diagonal indican clasificaciones incorrectas. B) Gráfico de Área bajo la curva (AUC) que ilustra el rendimiento del modelo Random Forest en la predicción de las muestras. Un valor de AUC cercano a 1 indica un alto nivel de precisión en la clasificación, mientras que un valor cercano a 0,5 sugiere un rendimiento no mejor que el azar. Este gráfico permite evaluar la capacidad del modelo para discriminar correctamente entre los diferentes grupos de estudio.

Los resultados obtenidos muestran que el modelo predice la asignación de las muestras de forma bastante precisa. La precisión del modelo es del 90%, mientras que las áreas bajo la curva (AUC) son muy elevadas para cada grupo analizado (Donante_Humano = 1, CNT = 0,97, CNT_ABX = 0,92, FMT = 0,96). Estos resultados refuerzan la hipótesis de que tanto en trasplante fecal, como el tratamiento con antibiótico tienen un efecto muy diferencial en la modificación de la microbiota intestinal de los ratones, permitiendo una predicción acertada de las muestras a su grupo de estudio.

A nivel general, se ha demostrado que la transferencia de la microbiota humana a un modelo animal *in vivo* de ratón es factible ya que muchas OTUs exclusivamente humanas se transfieren a los ratones y algunas de ellas se mantienen sostenidamente en el tiempo. No obstante, la tendencia general de este modelo tras una única inoculación de microbiota es modificar su composición hacia un patrón cada vez más alejado de la composición de las muestras humanas. Si el objetivo de un diseño experimental es mantener un porcentaje de humanización de la microbiota del animal lo más alto posible, es probable que la estrategia de una única inoculación no sea la más adecuada y se requieran varias inoculaciones. Según los últimos estudios consultados de transferencia de microbiota humana a ratones PGF la dosis-volumen y la duración de la administración de microbiota fecal van desde una dosis única a dos veces por semana durante varias semanas [237] [238] [239]. Para estos estudios, los diseños experimentales que utilizaron solo una dosis de FMT acabaron observando una baja estabilidad del microbioma. Los FMT realizados dos veces durante la primera semana permitió la implantación de bacterias subdominantes, como *Bifidobacterium*. En base a los resultados de estos estudios, el FMT de las heces humanas a ratones una vez a la semana durante cuatro semanas puede ser una de las mejores estrategias, ya que permitió la colonización de bacterias dominantes, como *Faecalibacterium*, que no se identificó en los FMT realizados con una única administración [238].

En la actualidad, no está claro cuántas dosis de FMT son necesarias para mantener la microbiota del donante en el receptor para un periodo prolongado en el tiempo, ni si existe alguna relación entre las dosis de FMT y la estabilidad de la microbiota del donante. Tampoco está totalmente definido si una composición específica de la comunidad

microbiana afecta a la eficacia del FMT [240]. Por lo tanto, se necesitan más estudios para determinar la dosis óptima.

La transferencia de bacterias humanas a modelos animales, en lugar de utilizar modelos animales con su microbiota original, tiene especial relevancia debido a varios factores clave que pueden mejorar los estudios científicos y permiten una mayor comprensión de las interacciones huésped-microbiota en el contexto humano.

En primer lugar, la composición de la microbiota intestinal humana y la de los animales, como ratones, puede ser significativamente diferente en términos de diversidad y abundancia de especies bacterianas tal y como se ha demostrado en este capítulo de esta tesis. Al transferir bacterias humanas a un modelo animal, se crea un entorno que simula de manera más precisa la composición y las interacciones de la microbiota intestinal humana. Además, la transferencia de bacterias humanas a modelos animales facilita el estudio de las interacciones huésped-microbiota específicas del ser humano, lo que a su vez ayuda a comprender cómo ciertas especies bacterianas pueden afectar la salud humana y contribuir al desarrollo de enfermedades. Esto es especialmente importante en el caso de enfermedades que tienen una prevalencia diferente entre humanos y animales o que están asociadas con una microbiota específica en humanos.

La utilización de modelos animales con microbiota *wild type* puede generar resultados que no sean del todo aplicables a los humanos debido a las diferencias en la composición de la microbiota. Al transferir bacterias humanas a modelos animales, se pueden investigar de manera más efectiva los efectos de la microbiota en la salud humana y la progresión de enfermedades, lo que resulta en una mejor comprensión de los mecanismos implicados y en el desarrollo de tratamientos y terapias más eficaces.

Por esta razón, la transferencia de bacterias humanas a modelos animales es esencial para garantizar la relevancia y aplicabilidad de los resultados obtenidos en investigaciones relacionadas con la microbiota intestinal y la salud humana. Estos modelos animales colonizados con bacterias humanas ofrecen un enfoque más sólido y útil para la investigación en este campo en constante evolución.

Estos dos experimentos independientes llevados a cabo durante esta tesis han permitido conocer la evolución de la microbiota humana trasplantada en un modelo animal a lo largo del tiempo tras una única administración de FMT. Los resultados obtenidos demuestran que la transferencia de microbiota humana a un modelo animal es exitosa tras una única administración, sin embargo, igual que en la mayoría de los estudios ya

publicados, la tendencia de las comunidades bacterianas es disminuir el grado de humanización de la microbiota tras el trasplante.

Los resultados obtenidos han sido tenidos en cuenta de cara al diseño experimental del modelo animal del proyecto PREVENTOMICS donde la re inoculación de la microbiota humana parece ser la mejor estrategia posible de cara a intentar mantener una composición “*humanizada*” de la microbiota en el modelo animal PGF.

4.3. Estudio del efecto de la microbiota intestinal humana tras una intervención nutricional en un modelo animal *pseudo-germ-free*.

El diseño experimental y parte de la metodología de este modelo animal difiere de los experimentos de puesta a punto expuestos anteriormente en el apartado 4.2. El conocimiento y los resultados generados en estos modelos han permitido modificar la metodología con el objetivo de responder a las preguntas e hipótesis de este proyecto de una forma más precisa.

En primer lugar, el método de administración de antibiótico fue cambiado de *ad libitum* en el biberón de bebida a administración diaria por sonda oral. El objetivo de este cambio fue reducir al máximo la variabilidad y el tiempo de respuesta en la eliminación de la microbiota de los ratones. El tiempo de administración también fue modificado, en este caso, se redujo de 14 a 7 días con el objetivo de evitar al máximo la pérdida de peso inducida por el antibiótico observado en algunos de los animales en los anteriores experimentos. Finalmente, el cambio más importante fue el incremento de FMTs, de un único trasplante en los experimentos de puesta a punto a 6 administraciones en el modelo del proyecto PREVENTOMICS. Según lo observado en los modelos de puesta a punto, una única administración de muestra humana no era suficiente para mantener una distribución de la microbiota parecida a las muestras humanas ya que la tendencia natural del ratón FMT era volver a su estado basal, proliferando cada vez más las bacterias adaptadas al intestino del ratón. En este caso, el objetivo del modelo animal era mantener una microbiota humanizada el máximo de tiempo posible y así poder estudiar si los cambios de la microbiota inducidos por la dietas personalizadas tienen un efecto positivo en la pérdida de peso y en la mejora del fenotipo obeso de los animales. Para mantener al máximo esta humanización de la microbiota en los animales, se realizaron 3 trasplantes en la primera semana post tratamiento con antibiótico con el objetivo de incrementar las posibilidades de una mayor implantación de la microbiota humana en la primera colonización. Posteriormente, para mantener esa implantación se realizó un trasplante extra cada semana.

4.3.1. Inducción de la obesidad en ratones C57BL/6

La media del peso corporal de los animales que siguieron la inducción de la obesidad aumentó significativamente tras la primera semana de administración de la dieta alta en

grasas, alcanzando un incremento del 31,7% de media, en el día 70 de estudio en comparación al peso inicial registrado en el día 1 (Figura 51A). En el grupo de la dieta control (dieta NO FMT CT), el peso corporal se mantuvo estable durante la inducción de la obesidad. En el grupo HFD se observó una reducción del peso corporal asociada a la administración de antibióticos desde el día 70 hasta el día 77. Sin embargo, esta reducción no disminuyó el incremento del peso corporal de los ratones por debajo del 20% respecto al control, límite a partir del cual el modelo animal HFD se considera obeso. Por lo tanto, se consideró que el modelo HFD es válido para empezar la transferencia de la microbiota humana a un modelo de obesidad inducida [241].

En cuanto al consumo de alimentos (Figura 51B), el grupo HFD presentó valores más altos que el grupo de la dieta control la primera semana del estudio. Posteriormente, dicho consumo se mantuvo estadísticamente similar entre los grupos, hasta el día 70. Los resultados muestran que la administración de antibióticos entre los días 70 y 77, produce una disminución en el consumo alimenticio de los ratones del grupo HFD. Esta bajada en el consumo se asocia como la causa de la pérdida de peso observada en los ratones del grupo HFD en el mismo periodo de tiempo.

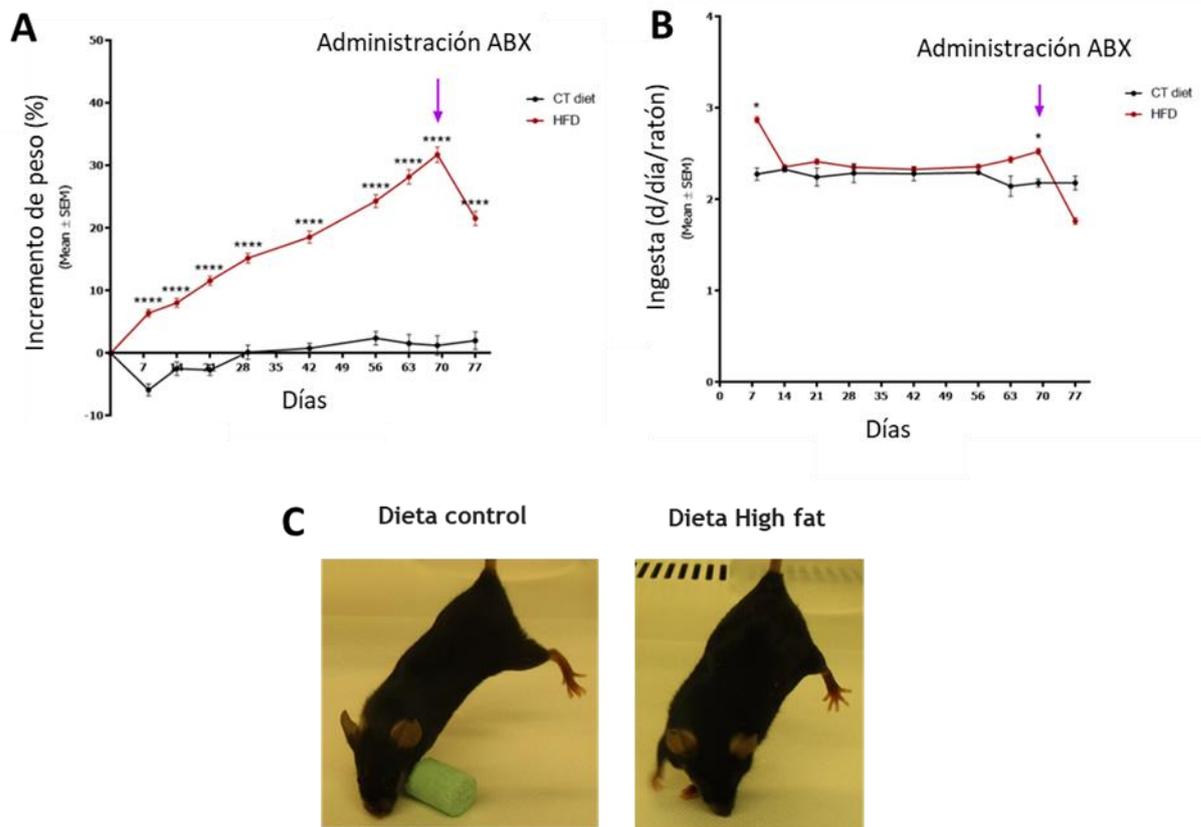


Figura 51 A) Porcentaje de cambio de peso corporal de los ratones C57BL/6 durante los 77 días de inducción de sobrepeso/obesidad (n=9 grupo de dieta CT, n=90 grupo HFD) B) Ingesta de alimentos en g/día (n=9 grupo de dieta

CT, n=90 grupo HFD). C) Imagen comparativa de dos ratones, dieta control frente a dieta alta en grasas a día 77. Las comparaciones estadísticas entre los grupos dieta control y dieta High Fat se llevaron a cabo mediante two-way ANOVA seguido de la prueba de Tukey para comparaciones pareadas. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$.

Para complementar los resultados obtenidos de la inducción de la obesidad, se estudiaron los cambios bioquímicos inducidos por la HFD en el plasma de los ratones al final del periodo de inducción. La Tabla 16 muestra los diferentes parámetros analizados, mostrando niveles estadísticamente significativos en colesterol total, HDL, triglicéridos y glucosa, con valores más altos en el grupo de HFD (Control NO FMT HFD) en comparación con el grupo de dieta Control. Estudios similares utilizando la composición de esta misma dieta consiguieron resultados similares en cuanto a inducción de la obesidad y alteración de los parámetros metabólicos [242][243].

Tabla 16 Valores bioquímicos de los biomarcadores asociados a obesidad. Los valores se expresan como media \pm desviación estándar. N = 9 animales por grupo. El t-test de Student no pareado ha sido utilizado para determinar las diferencias significativas entre los grupos. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$.

Grupos	No FMT CT	No FMT HFD
Colesterol total (mg/dL)	110,00 \pm 24,05	160 \pm 23,19***
Colesterol HDL (mg/dL)	57,38 \pm 11,97	81,58 \pm 11,21***
Colesterol LDL (mg/dL)	8,18 \pm 1,68	8,80 \pm 1,89
Triglicéridos (mg/dL)	86,44 \pm 12,64	73,11 \pm 7,55*
Glucosa(mg/dL)	139,60 \pm 29,81	168,9 \pm 22,94 *

4.3.2. Tratamiento con antibiótico para disminuir su microbiota intestinal

Los resultados de recuentos de células bacterianas viables en placas de Petri sembradas con Columbia agar, tras el periodo de tratamiento con antibiótico, mostraron una media de CFU/g superior a 10^9 para el grupo control, mientras que no se observaron colonias bacterianas en las placas pertenecientes al grupo tratado con antibióticos (Figura 52A).

De forma complementaria, en la Figura 52B se puede observar el número de copias del gen 16SrRNA para las mismas muestras. Hay que destacar que, con este método, no es posible distinguir entre la señal procedente de bacterias vivas y muertas, ya que el ADN perteneciente a las bacterias muertas puede ser amplificado por la qPCR. Se detectó una disminución de aproximadamente 3 logaritmos en la carga total de copias del gen 16S rRNA con una desviación estándar muy similar en todos los animales analizados. En comparación a los resultados de los experimentos de puesta a punto, los valores detectados mediante qPCR en el grupo tratado con antibiótico es superior en este experimento. Es probable que esta diferencia sea provocada por la diferencia en el tiempo

del tratamiento entre ambos experimentos. En el caso, se priorizó reducir el tiempo de administración para reducir la pérdida de peso asociada a la ingesta de antibiótico, observada previamente en los experimentos de puesta a punto. Por otro lado, es probable que la eliminación de las bacterias muertas por la acción de los antibióticos no se haya llevado a cabo en su totalidad, y que la señal observada en la qPCR provenga de ADN bacteriano muerto. Los resultados de los recuentos de viabilidad apoyan esta hipótesis, ya que no se pudo cultivar ninguna bacteria en el grupo tratado con antibiótico.

No obstante, las diferencias estadísticas en ambos casos fueron muy significativas ($p < 0,0001$) y la proporción de ADN bacteriano en el grupo tratado con antibiótico es inferior al 0,1% de la carga bacteriana intestinal del grupo control. Estudios similares reportan niveles de reducción parecidos en modelos PGF [244] [238]. Teniendo en cuenta el resultado de ambas técnicas utilizadas, se puede concluir que el tratamiento con antibióticos ha disminuido la microbiota original de ratón significativamente.

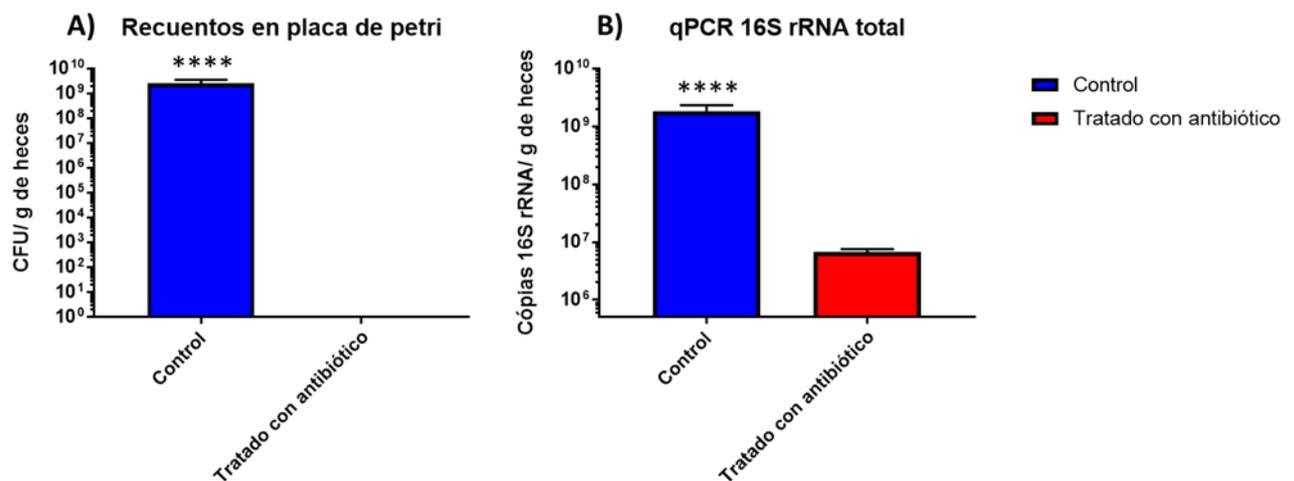


Figura 52 A) Los valores obtenidos de los recuentos en placa agar en medio Columbia Blood agar en condiciones anaeróbicas tras 72 horas de incubación. Control $N = 18$, Tratado con antibiótico $N = 18$. B) Copias del gen 16S rRNA detectado mediante SYBRGREEN qPCR. Control $N = 18$, Tratado con antibiótico $N = 63$. **** $p < 0,0001$ para el test de t de Student no pareado.

4.3.3. Pérdida de peso asociada a los FMT.

Los resultados de la evolución del peso de los animales tras los trasplantes de las muestras humanas muestran una reducción del peso corporal de los ratones en los grupos CT V1, CT V2, PN V1, PN V2, PP V1, PP V2, NO FMT HFD, NO FMT HFD ABX. Mostrando todos ellos valores significativamente inferiores a los del grupo de dieta control Figura 53 A,B,C. No obstante, no se observaron diferencias significativas en el % de cambio de

peso corporal de los ratones que recibieron FMT de individuos antes de intervenir su dieta (V1) y después (V2), independientemente del grupo de intervención (CT, PN y PP). La pérdida de peso parece ser inducida principalmente por el cambio de la dieta y no por el cambio de la microbiota a través del FMT realizado.

También hay que destacar que, al realizar el cambio de dieta, el consumo en los ratones que habían sido alimentados con HFD durante 77 días y posteriormente fueron cambiados a dieta control disminuyó significativamente (Figura 53D). Esta no aceptación de la nueva dieta por parte de los animales también influyó en la marcada pérdida de peso en la primera semana post FMT. Sin embargo, tras una semana recibiendo la dieta control, los valores de consumo de la dieta se establecieron y las diferencias dejaron de ser significativas entre los grupos (Figura 53D).

En este experimento llevado a cabo el cambio de dieta HFD a dieta control parece enmascarar un posible efecto diferenciador en la pérdida de peso inducido por la microbiota de las personas que fueron sometidas a intervenciones dietéticas.

Así pues, a nivel de pérdida de peso, la microbiota post intervención dietética no modifica significativamente el peso de los animales obesos en comparación a los animales trasplantados con las muestras pre intervención. Por otro lado, la personalización de la dieta tampoco aporta un efecto diferenciador en cuanto a la evolución del peso de los animales ya que no hay diferencias significativas entre los tres grupos de intervención (CT, PN y PP) en las muestras V2.

Comparar los resultados obtenidos con otros estudios publicados ha sido complicado, ya que de los 271 artículos consultados en la base de datos PubMed tras filtrar por palabras clave "*diet intervention*", "*FMT*", "*mice model*", "*obesity and microbiota*" ninguno de los estudios presenta un diseño experimental parecido complicando así la comparación directa de resultados entre estudios. No obstante, en un estudio reciente donde se analizó el impacto de las dietas HFD, el ejercicio y el FMT en el mismo modelo animal de ratón utilizado en esta tesis, los investigadores llegaron a la conclusión que la dieta es el factor de mayor impacto en la modificación de los parámetros asociados a la obesidad, más que el ejercicio y el FMT [245].

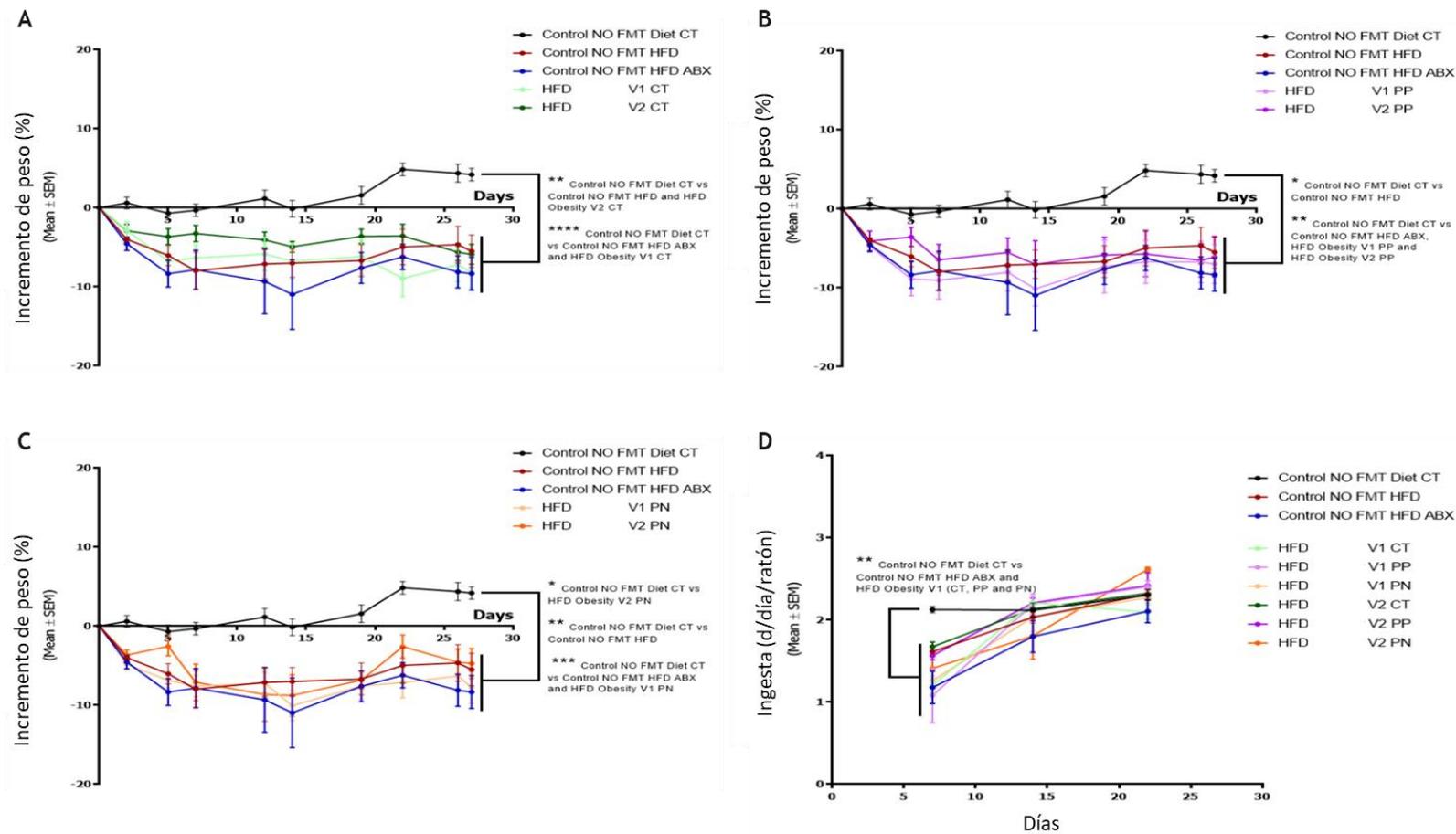


Figura 53 A) Cambio en el porcentaje de peso corporal y consumo de alimento tras el trasplante fecal microbiota (FMT) en ratones de los tres grupos: Control, Obesidad V1 y Obesidad V2 sometidos a dieta alta en grasas (HFD). A) Cambio en el porcentaje de peso corporal en el grupo Control con HFD y trasplante de CT. B) Cambio en el porcentaje de peso corporal en el grupo Obesidad V1 con HFD y trasplante de PP. C) Cambio en el porcentaje de peso corporal en el grupo Obesidad V2 con HFD y trasplante de PN. D) Ingesta de alimentos expresada en gramos por día por ratón para cada grupo de estudio. Las estadísticas se llevaron a cabo utilizando ANOVA de una vía seguido de la prueba post-hoc de Tukey para comparaciones múltiples. Significancia estadística representada como: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ ($n = 7-9$ por grupo). Estos resultados muestran el efecto del FMT en el cambio de peso corporal y la ingesta de alimentos en los diferentes grupos de ratones.

4.3.4. Análisis bioquímico tras el FMT de muestras humanas

Al finalizar el estudio se estudiaron los cambios bioquímicos en los marcadores asociados a sobrepeso y obesidad: colesterol total, colesterol HDL, colesterol LDL, triglicéridos y hemoglobina glicosilada HbA1c. La Tabla 17 muestra los resultados obtenidos para cada uno de los marcadores analizados. Para cada grupo pareado (V1 vs V2) se realizó un test de Student con el objetivo de determinar si existen diferencias significativas en la variación de los marcadores bioquímicos.

No se observaron diferencias estadísticas entre los grupos en los diferentes parámetros analizados, excepto en el Grupo V2 PP para el HDL, que presentó valores más bajos que el correspondiente grupo V1 PP.

La tendencia de los resultados de los parámetros bioquímicos a final del estudio es similar a los resultados observados para la pérdida de peso. Los grupos se homogenizan y el comportamiento de las variables Colesterol, HDL, LDL, triglicéridos y hemoglobina glicosilada es similar entre los grupos V1 y V2 para cada grupo de intervención.

También se puede observar el efecto del cambio de dieta de HFD a dieta control ya que los valores entre el grupo CT no FMT y HFD no FMT se reducen a final del estudio si comparamos los resultados con los representados en la Tabla 16.

Tabla 17 Parámetros bioquímicos de los grupos experimentales a final del estudio. Los datos se representan como media \pm SD. N = 7-9 grupo. Las comparaciones pareadas entre cada grupo V1 vs V2 se ha realizado utilizando el test de Student no pareado. * = $p < 0,05$.

Grupos	No	No	No	V1 CT	V1 PP	V1 PN	V2 CT	V2 PP	V2 PN
	FMT	FMT	FMT						
	CT	HFD	HFD						
			ABX						
Colesterol total (mg/dL)	98,77 \pm 25,18	104,70 \pm 22,47	102,8 \pm 18,29	105,7 \pm 18,58	118,7 \pm 20,22	93,82 \pm 19,18	103,70 \pm 13,97	104,00 \pm 13,49	109,6 \pm 16,43
Colesterol HDL (mg/dL)	79,36 \pm 20,67	83,76 \pm 17,58	87,21 \pm 16,49	88,78 \pm 14,52	95,38 \pm 12,28	75,2 \pm 16,89	79,8 \pm 12,9	82,33 \pm 10,98*	87,23 \pm 12,58
Colesterol LDL (mg/dL)	7,2 \pm 3,61	7,46 \pm 4,38	9,71 \pm 2,96	6,82 \pm 1,92	7,89 \pm 2,53	9,46 \pm 4,65	9,10 \pm 5,71	7,31 \pm 5,15	6,71 \pm 1,2
Triglicéridos (mg/dL)	76,67 \pm 11,49	85,11 \pm 13,29	74,75 \pm 13,58	83,78 \pm 8,86	90,33 \pm 7,63	89,67 \pm 14,47	84,00 \pm 16,87	88,22 \pm 13,54	81,71 \pm 16,7
Hemoglobina glicosilada (%)	5,51 \pm 1,2	4,7 \pm 0,69	5,17 \pm 0,44	5,07 \pm 1,00	4,74 \pm 0,16	4,81 \pm 0,38	4,50 \pm 0,29	5,01 \pm 0,69	4,53 \pm 0,41

4.3.5. Análisis histológico

El análisis histológico de las muestras a final del estudio fue realizado en el hígado, un órgano con una importante implicación en el sobrepeso y la obesidad debido a las acumulaciones de grasa, la síntesis de colesterol o la eliminación de sustancias tóxicas. Las muestras de H/E revelaron la presencia de vacuolación/esteatosis de los hepatocitos en algunas muestras de hígado de animales sometidos a una dieta alta en grasas. Las imágenes obtenidas revelaron presencia de macrovesículas en estos grupos y consistía en grandes vacuolas en el citoplasma con núcleos periféricos. Sin embargo, no se observó vacuolación/esteatosis en ninguna de las muestras del grupo de dieta de control (a excepción de una muestra que presentaba esteatosis). La tinción OR confirmó la presencia de abundantes depósitos de lípidos. El abombamiento de los hepatocitos observado en todas las muestras de este estudio, incluidas las del grupo de dieta control, era una forma especial de degeneración de los hepatocitos asociada a la hinchazón y el aumento de tamaño de las células que suele considerarse un sello distintivo de la esteatohepatitis. La principal diferencia observada entre los grupos de control y de HFD fue la distribución de la lesión en el lóbulo hepático. Mientras que en el grupo de control se distribuía principalmente en las células hepáticas de la zona mediolobular, en los grupos de HFD se distribuía de forma más extensa, afectando a las zonas medio-perilobular y en algunos casos panlobular. La presencia de varios globos hepáticos en el grupo de dieta control, así como una muestra de hígado con esteatosis de mercado, podría estar probablemente relacionada con la edad de los ratones al final del estudio, ya que en los ratones mayores puede producirse una leve esteatosis y degeneración de los globos hepáticos [246]. Los infiltrados inflamatorios presentes en la mayoría de los hígados consistían en pequeños focos de células mononucleares con células polimorfonucleares dispersas. En algunos de ellos también se observó necrosis/apoptosis de hepatocitos aislados. Estos infiltrados estaban presentes en bajo número y distribuidos aleatoriamente por el parénquima hepático. También se observó un bajo número de infiltrados inflamatorios en algunos tractos portales.

La asignación de “scores” (1-4) para cada una de las muestras analizadas, tanto en el caso de H/E como OR ha permitido estudiar las diferencias entre los grupos.

En la Figura 54 se puede observar la representación de los *scores* (1-4). A continuación, en la

Figura 55 están representados los valores obtenidos de los *scores* para ambas técnicas histopatológicas utilizadas. En este caso, tanto para H/E como para OR no se observaron diferencias significativas al comparar las medias de los grupos. Estos resultados indican que los trasplantes fecales realizados no influyen en la acumulación de grasa en el hígado. Estos resultados son similares a los anteriores 2 apartados, 4.3.3 y 4.3.4, donde tanto la personalización de la dieta, como el tiempo de intervención no modifica significativamente los parámetros estudiados.

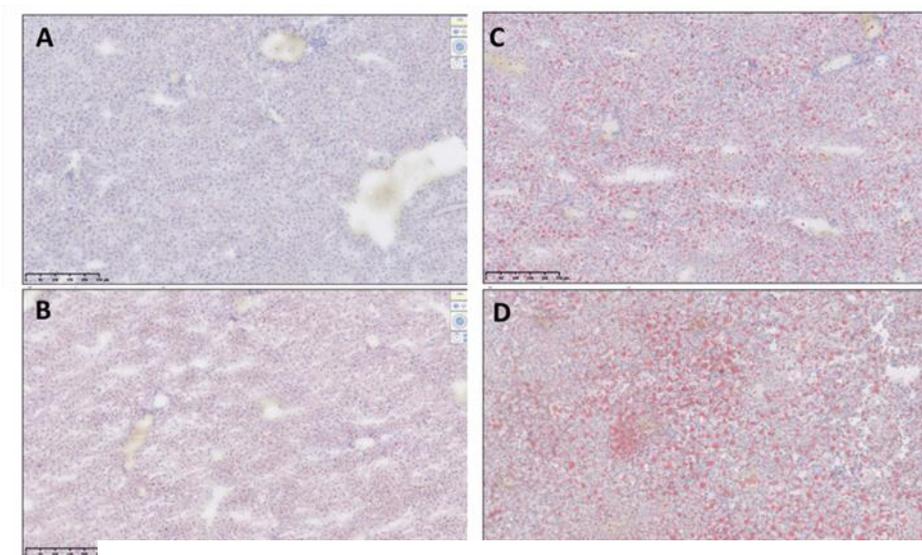


Figura 54 Imágenes representativas de Oil Red (OR) A) score 1 B) score 2 C) score 3 D) score 4

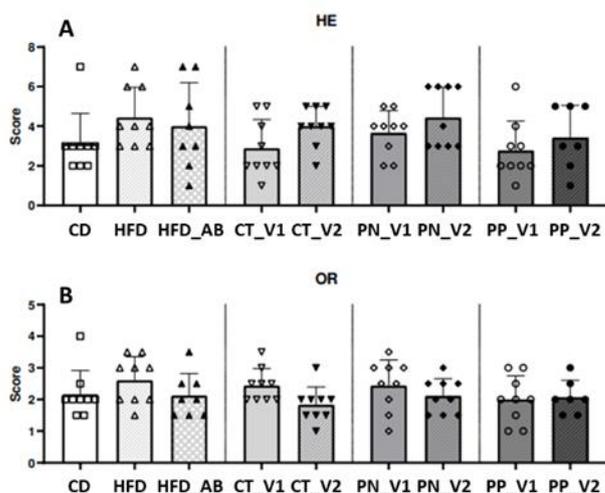


Figura 55 Gráfico de barras representando los valores de los scores histopatológicos para A) Hematoxilina/eosina (HE) y B) Oil Red (OR). Los datos se presentan como media \pm SD para cada grupo experimental. N = 7-9 / grupo.

4.3.6. Caracterización de la microbiota en el modelo animal *pseudo-germ-free*

Un total de 522 muestras pertenecientes a 7 tiempos distintos han sido incluidas en el análisis de la microbiota del modelo animal.

Los resultados más destacables del análisis de la microbiota de los ratones incluidos en el diseño experimental, se muestran en las siguientes tres figuras, las cuales incluyen los mismos tipos de análisis para cada grupo de intervención (Figuras 57, 58 y 59).

Para cada grupo de intervención se muestra en primer lugar un gráfico de barras con la clasificación taxonómica de las muestras en los diferentes tiempos. A continuación, las métricas de beta diversidad Bray Curtis y Unweighted Unifrac separados por tiempo y grupo (V1 vs V2). También se incluyen los resultados de índice Shannon tras analizar la alfa diversidad de las muestras y finalmente el análisis para cada grupo se completa con un test de abundancia diferencial Random Forest comparando las muestras V1 con las V2 una vez el trasplante de la microbiota humana se ha estabilizado en los animales.

En cuanto a la clasificación taxonómica, para los tres grupos destaca la colonización mayoritaria de una familia bacteriana, en concreto en dos tiempos (t76 y t79). El tiempo t76 pertenece al momento donde se retira el tratamiento con antibiótico y aún no se ha realizado ningún trasplante y el tiempo t79 es el tiempo a partir del cual se ha realizado ya una inoculación de la microbiota humana. En ambos casos, predomina la familia

Lactobacillales, más en concreto toda la diversidad la compone una misma OTU perteneciente al género *Lactococcus*.

Cuando una población bacteriana se expone a un cóctel de antibióticos bactericidas, la mayoría de las células mueren. Para sobrevivir al tratamiento con antibióticos, las células pueden adquirir resistencia mediante, por ejemplo, la exportación del antibiótico utilizando bombas de resistencia a múltiples fármacos o mediante la expresión de enzimas degradantes del antibiótico [247]. Estas células latentes pueden revivir espontáneamente cuando las condiciones cambian. Dos estados de latencia bien conocidos son el estado de persistencia y el estado viable pero no cultivable (VBNC). Una de las hipótesis es que la OTU *Lactococcus* que abunda en los tiempos t76 y t79 tenga un estado VBNC. Algunos estudios publicados apuntan hacia la posibilidad de que cepas del género *Lactococcus* tengan estos mecanismos que les permiten adquirir resistencia bactericida a algunos de los antibióticos utilizados en el cóctel [248] [249]. Por otro lado, los resultados del apartado 4.3.2 apoyan esta hipótesis ya que para el tiempo t76 no se pudo cultivar ninguna colonia viable en las placas de Petri para las muestras tratadas con antibiótico. Sin embargo, en el mismo apartado se puede observar una señal en la qPCR, no obstante, la concentración total de esa señal es inferior al 0,1% de la carga total bacteriana en los grupos no tratados con antibiótico. Por esta razón, una de las posibilidades es que una cepa del género *Lactococcus* forme parte de la microbiota intestinal del ratón, con una abundancia respecto a la microbiota original inferior al 0,1% y que posibles mecanismos VBNC le permitiera resistir el tratamiento con antibiótico aún sin poder replicarse ni crecer.

También es destacable la abundancia mayoritaria de este taxon *Lactococcus* tras el primer FMT realizado. No obstante, en algunas muestras se puede observar la colonización de otras cepas, desplazando la abundancia total relativa de *Lactococcus*, las principales siendo bacterias del filo *Proteobacteria*, en particular las del género *Escherichia-Sigella* y *Pseudomonas*. Estas bacterias tienen un metabolismo muy diverso, con una capacidad de colonización versátil. En un ambiente con poca competencia poblacional microbiana estos géneros podrían ser los primeros en colonizar el nuevo nicho ecológico [250] . También destaca la diferencia de implantación entre el día t79 de este experimento y los resultados observados en la puesta a punto del modelo PGF, tanto para el experimento 1 como para el experimento 2. Esta diferencia podría ser debida al tiempo de espera entre la finalización del tratamiento con antibiótico y la administración del primer FMT. En los experimentos de puesta a punto se optó por dejar 2 días entre la finalización del antibiótico

y la única administración de FMT, sin embargo, en el modelo animal del proyecto PREVENTOMICS se optó por 3 administraciones en la primera semana post antibiótico, empezando la primera el mismo día tras la retirada del antibiótico. Es probable que la primera administración de FMT no tuviera un alto grado de implantación debido a la presencia aún en el organismo de restos de antibiótico. No obstante, en los posteriores puntos temporales la composición taxonómica bacteriana de las comunidades difiere de las observadas en los días t76 y t79, demostrando que las administraciones de FMT han ayudado a la colonización de la microbiota humana en el ratón.

La evolución de la alfa diversidad es muy similar para los 3 grupos. Las muestras humanas tienen un índice Shannon cercano a 4. Tras finalizar la inducción de la obesidad (t69) la diversidad de las muestras de ratón es muy similar en comparación con las muestras humanas. Sin embargo, tras la finalización de la administración de antibiótico, la diversidad disminuye drásticamente tanto para el día t76 como para el día t79. Esta disminución está relacionada con la administración de antibiótico y el posible estado VBNC de las cepas *Lactococcus*. Esta disminución de la alfa diversidad en ratones tras ciclos de antibiótico está bien documentada en otros estudios [251] [252] [223] [253]. No obstante, en los siguientes días, la diversidad bacteriana incrementa de forma significativa para los tiempos t89, t96 y t103. En los 3 grupos, las diferencias de diversidad alfa se estabilizan entre el día t96 y t103. Según los resultados del test ANOVA no hay diferencias significativas para los valores Shannon de alfa diversidad entre los tiempo t96 y t103. Aún con el incremento en la diversidad alfa en comparación a los días t76 y t79, la diversidad alfa de las muestras t96 y t103 no alcanzan los niveles de la diversidad de las muestras humanas utilizadas para el FMT y tampoco de las muestras de ratón antes de empezar el tratamiento con antibiótico (t69). Estos resultados parecen indicar que la transferencia de las bacterias humanas al intestino del ratón no es completa. Un efecto similar fue observado en los experimentos de puesta a punto en el capítulo anterior.

Los análisis de beta diversidad Bray Curtis y Unweighted Unifrac ayudan a entender la evolución de las comunidades microbianas durante el experimento. La métrica Bray Curtis es utilizada para estudiar la composición de las comunidades microbianas, poniendo especial énfasis en los grupos bacterianos más abundantes y prevalentes en dichas comunidades. A su vez, la métrica Unweighted Unifrac es muy útil para estudiar la evolución de las comunidades microbianas desde el punto de vista de las OTUs menos abundantes, ya que los componentes principales son calculados en base a la presencia/ausencia de OTUs.

En ambas métricas, se puede observar una clara separación entre los diferentes *clusters* en base al tiempo del experimento. La tendencia es muy similar para las 3 figuras (Figura 56C y D, Figura 57C y D Figura 58C y D). Los tiempos t69, t76 y t79 se separan claramente de los tiempos t89, t96 y t103. Las muestras humanas (t0), forman su propio *cluster*, y se acercan más al *cluster* de los tiempos t89, t96 y t103, especialmente en el Unweighted Unifrac. Este acercamiento en el gráfico de las muestras humanas indica que la composición bacteriana de las muestras trasplantadas es más parecida a las muestras humanas que la composición de las muestras de ratón sin trasplantar.

La variable tiempo modifica claramente la composición de la microbiota debido a los cambios llevados a cabo en el modelo animal (antibiótico, FMT, cambio de dieta). No obstante, para conocer las diferencias entre la microbiota de los animales V1 y V2 para las tres intervenciones nutricionales se han llevado a cabo otros análisis complementarios. En primer lugar, se ha aplicado un modelo Random Forest de análisis diferencial en el subconjunto de tiempo t89, t96 y t103, tiempos a partir de los cuales la microbiota humana tiene una mayor implantación en los ratones trasplantados, con el objetivo de conocer si hay géneros bacterianos que sean más abundantes en los ratones V1 y V2 en cada intervención dietética.

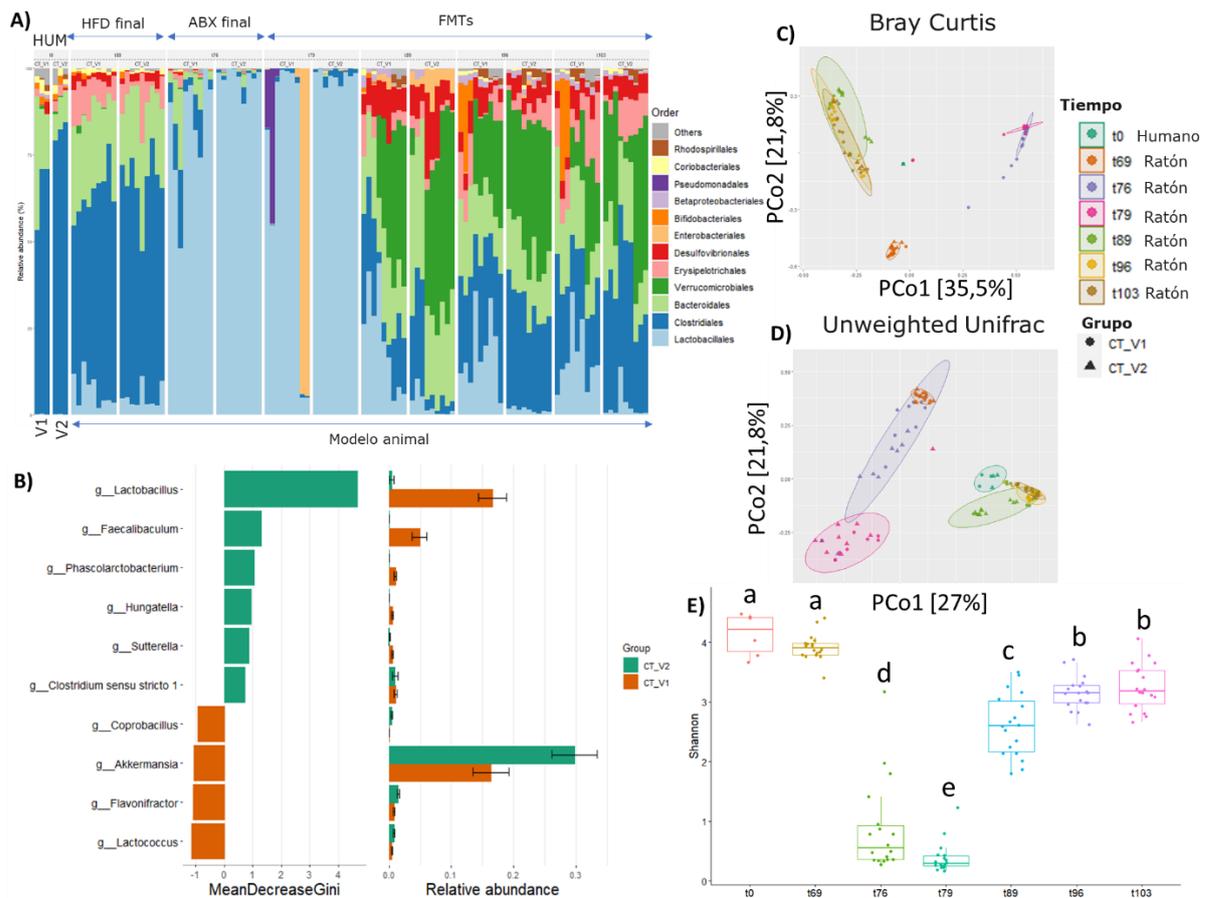


Figura 56 Análisis de la microbiota de los ratones para el grupo CT A) Taxa barplot de la abundancia relativa de las 12 familias bacterianas más prevalentes. B) Análisis diferencial mediante Random Forest ajustado a nivel de género de los tiempos t89, t96 y t103. C) Representación gráfica de las dos primeras coordenadas del análisis de beta diversidad Bray Curtis, separado por tiempo y grupo. D) Representación gráfica de las dos primeras coordenadas del análisis de beta diversidad Unweighted Unifrac, separado por tiempo y grupo E) Diagrama de cajas de los valores Shannon de alfa diversidad. Las diferencias entre los tiempos han sido calculadas mediante ANOVA de comparaciones múltiples.

En el caso de la intervención CT, los animales receptores de las muestras V1 tienen una abundancia mayor de distintos géneros bacterianos. En primer lugar, el género *Lactobacillus*, uno de los géneros probióticos con diversas asociaciones positivas para la microbiota intestinal. En segundo lugar, el género *Faecalibaculum* el cual es un género exclusivamente murino, por consiguiente es probable que sea un género que haya recolonizado el ambiente del intestino del ratón [254]. Otro género bacteriano con mayor abundancia en las muestras V1 es *Phascolarctobacterium*. Algunos artículos apuntan a la posible correlación de estas bacterias con mecanismos asociados a la anti obesidad[255]. Por otro lado, otros géneros más abundantes en las muestras V1 no tienen tantos beneficios como los descritos anteriormente. Por ejemplo, *Hungatella* es un género bacteriano con mayor abundancia en personas que desarrollan reacciones adversas y severas a la infección por SARS-COV-2 [256]. *Sutterella*, otro de los géneros con mayor abundancia en el grupo CT V1 ha sido asociado a una abundancia mayor en personas con

autismo[257]. También *Clostridium sensu stricto 1* se ha asociado a altos niveles de *igE*, siendo más abundante en personas que desarrollan distintos tipos de alergias [258].

En el caso de los animales CT V2, los géneros bacterianos con una abundancia diferencial en comparación a los CT V1 son: *Lactococcus*, otro de los géneros con mayor abundancia de cepas probióticas. Es probable que su incremento se deba a un mecanismo compensatorio por la baja abundancia del género *Lactobacillus* en las muestras CT V2. *Flavonifractor* es otro género más abundante en las muestras CT V2. Se ha demostrado que el incremento de estas bacterias está asociado con la presencia de flavonoides en la dieta, tanto en estudios *in vitro* como en *in vivos* con animales PGF trasplantados con muestras humanas [259]. También destaca la mayor abundancia del género *Akkermansia*. En este caso, la práctica totalidad de las OTUs clasificadas como *Akkermansia* pertenecen a la especie *Akkermansia muciniphila*.

Akkermansia muciniphila es muy abundante en individuos delgados y no diabéticos. Se ha comprobado que tiene una abundancia relativa menor en varias afecciones como la obesidad, la diabetes, la inflamación intestinal o las enfermedades hepáticas. Esto se asocia a una alteración de la función de la barrera intestinal que acaba desencadenando una inflamación de bajo grado y trastornos metabólicos. Además, en el contexto de los trastornos asociados a la obesidad, *Akkermansia muciniphila* está inversamente correlacionada con los factores de riesgo cardiometabólico [260]. Estos factores incluyen la resistencia a la insulina, los lípidos séricos, el BMI y la adiposidad. Por el contrario, se correlaciona positivamente con marcadores de protección como la lipoproteína de alta densidad HDL. Además, los niveles intestinales basales de la bacteria en sujetos con sobrepeso u obesidad podrían ser un marcador pronóstico potencial para predecir el éxito de las intervenciones dietéticas. De hecho, en un estudio tras una dieta hipocalórica de 6 semanas, los individuos obesos con niveles basales más altos de *Akkermansia muciniphila* mostraron una mejora de los parámetros relacionados con la tolerancia a la glucosa y con otros factores de riesgo cardiometabólico [261]. Finalmente, *Coprobacillus* es un género que ha sido detectado de forma más abundante en personas ancianas con una diversidad bacteriana mayor que viven en comunidad en comparación a personas ancianas con depresión que viven solas [262].

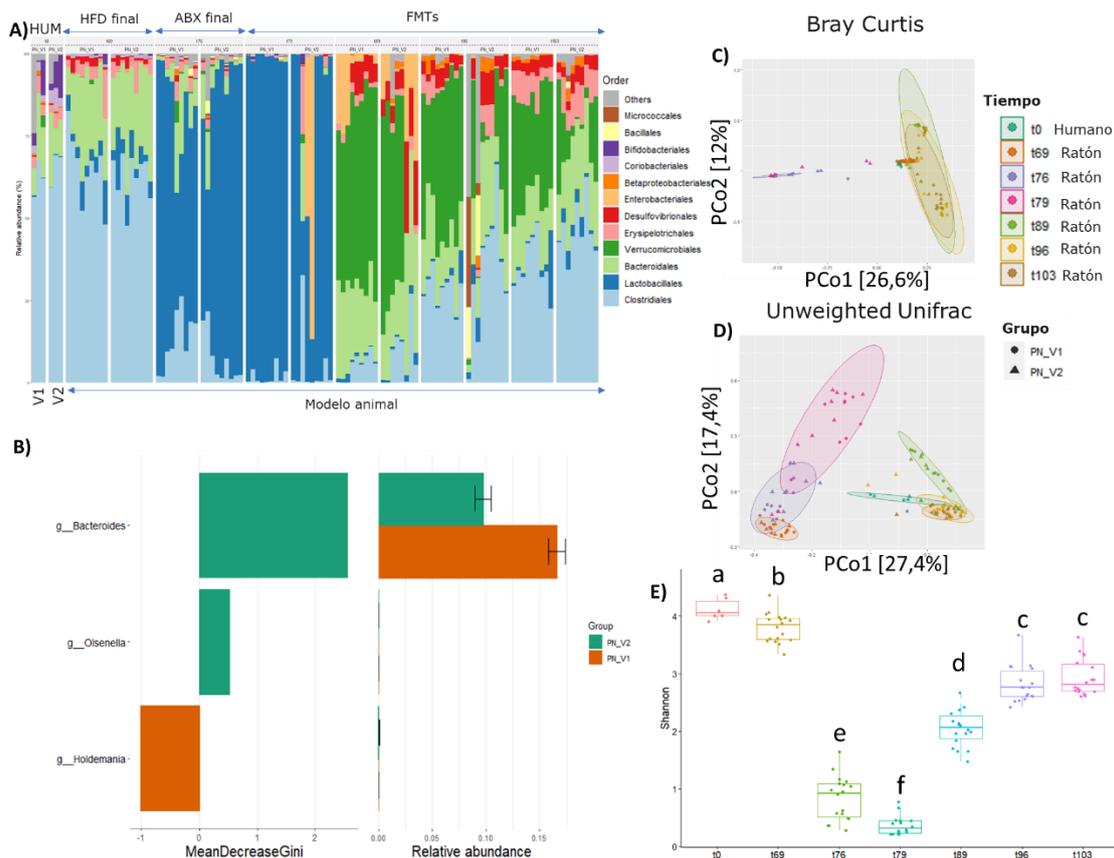


Figura 57 Análisis de la microbiota de los ratones para el grupo PN A) Taxa barplot de la abundancia relativa de las 12 familias bacterianas más prevalentes. B) Análisis diferencial mediante Random Forest ajustado a nivel de género de los tiempos t89, t96 y t103. C) Representación gráfica de las dos primeras coordenadas del análisis de beta diversidad Bray Curtis, separado por tiempo y grupo. D) Representación gráfica de las dos primeras coordenadas del análisis de beta diversidad Unweighted Unifrac, separado por tiempo y grupo E) Diagrama de cajas de los valores Shannon de alfa diversidad. Las diferencias entre los tiempos han sido calculadas mediante ANOVA de comparaciones múltiples.

Para el análisis de abundancia diferencial en el grupo PN entre las muestras V1 y V2 se han detectado tan solo 3 géneros bacterianos con abundancia diferenciales, 2 más abundantes en V1 y 1 más abundante en V2.

En el caso de los más abundantes en V1, destacan *Bacteroides* y *Olsenella*. Los miembros del género *Bacteroides* son colonizadores potenciales del colon y representan una fracción importante de la microbiota intestinal. Estos anaerobios gramnegativos desempeñan múltiples funciones en el intestino. Como comensales, mutualistas y organismos beneficiosos, no sólo desempeñan el papel de comensales para el huésped y otras bacterias que residen cerca de ellos, sino que también ayudan al huésped proporcionando numerosos beneficios para la salud. No obstante, algunas especies de *Bacteroides* pueden desempeñar un doble papel, beneficioso por un lado y también pueden llegar a ser patógenos. Por esta razón, es complicado conocer el efecto desempeñado por este género en la abundancia diferencial en el grupo PN V1.

Olsenella es un género descrito muy recientemente (2019) y no existen muchos estudios al respecto, no obstante, algunos han descubierto abundancias más elevadas en ratones que consumieron dietas ricas en grasas[263]. *Holdemania* por otro lado, más abundante en PN V2, se ha demostrado su asociación positiva con la alopecia [264], las pérdidas de memoria [265] o también con la reducción en la microbiota de las personas vegetarianas [266].

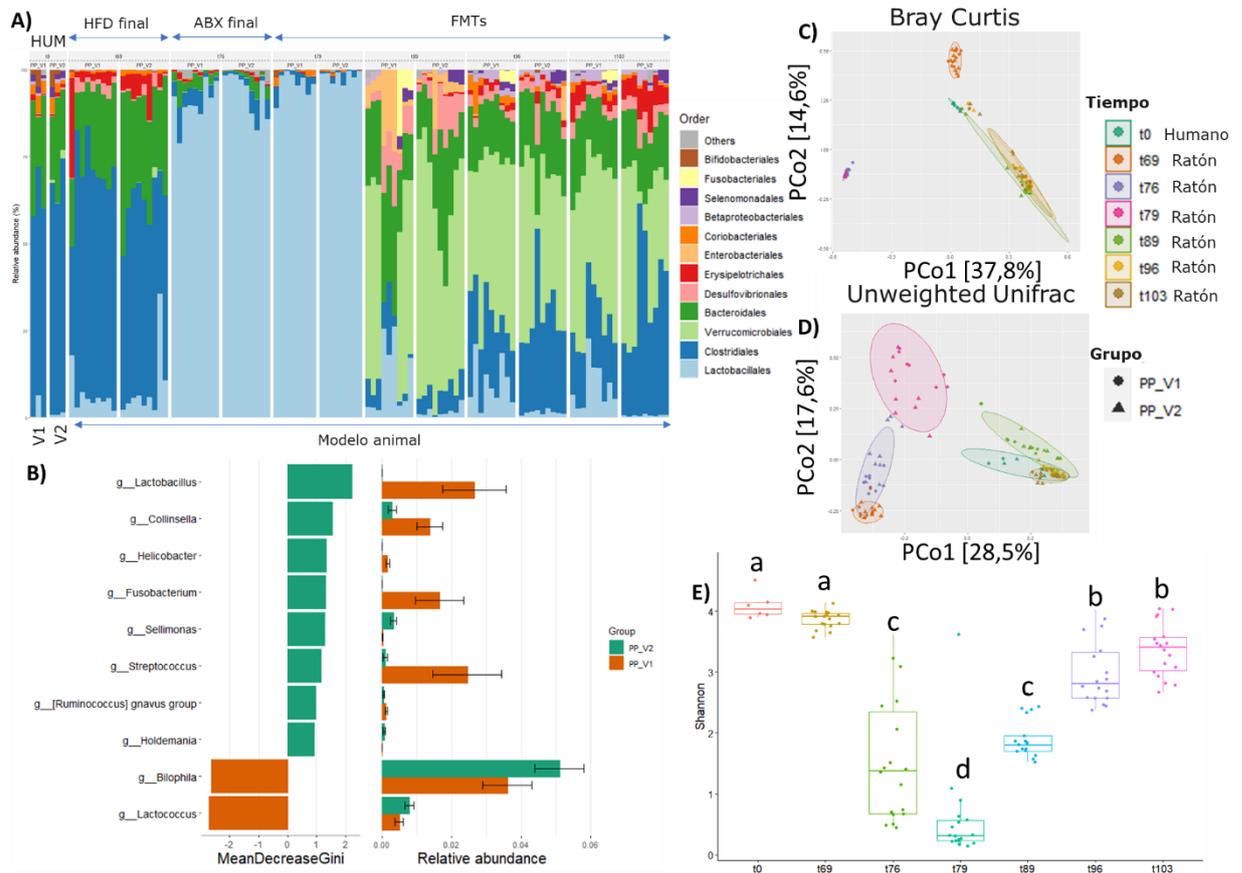


Figura 58 Análisis de la microbiota de los ratones para el grupo PP A) Taxa barplot de la abundancia relativa de las 12 familias bacterianas más prevalentes. B) Análisis diferencial mediante Random Forest ajustado a nivel de género de los tiempos t89, t196 y t103. C) Representación gráfica de las dos primeras coordenadas del análisis de beta diversidad Bray Curtis, separado por tiempo y grupo. D) Representación gráfica de las dos primeras coordenadas del análisis de beta diversidad Unweighted Unifrac, separado por tiempo y grupo E) Diagrama de cajas de los valores Shannon de alfa diversidad. Las diferencias entre los tiempos han sido calculadas mediante ANOVA de comparaciones múltiples.

Del mismo modo que en el grupo CT V1, en el grupo PP V1 se observa una diferencia significativa en la abundancia del género *Lactobacillus*, este hecho ha sido discutido previamente. Otro de los géneros con una abundancia diferencial en las muestras PP V1 en comparación a las PP V2 es *Collinsella*. Un reciente estudio descubre la capacidad de este género bacteriano en predecir la severidad de infecciones por SARS-COV-2. Cuanto más baja es la abundancia de este género en un modelo GLM menos mortalidad presentaban los pacientes [267]. En el mismo sentido algunas de las cepas pertenecientes

a este género presentan una clara correlación positiva con la infectividad del mismo virus [268]. *Helicobacter*, otro de los géneros con una abundancia mayor en las muestras PP V1 en comparación a PP V2 está relacionado con diversas patologías intestinales [269], también con el cáncer gástrico [270] siendo uno de los primeros géneros cuya presencia ha sido relacionada de forma directa con el desarrollo de patologías intestinales. También destaca la mayor abundancia en las muestras PP V1 del género *Fusobacterium*. Este género, en particular la cepa *Fusobacterium nucleatum* ha generado mucho interés dentro de la comunidad científica, ya que su prevalencia es muy superior en los tejidos de cáncer colorectal en comparación a los tejidos sanos de un mismo individuo [271]. Aún no se conocen los mecanismos a partir de los cuales este género pueda llegar a tener un impacto en el desarrollo de esta patología, pero su prevalencia y abundancia diferencial en estos tejidos puede jugar un papel importante en futuros tratamientos contra el cáncer de colon. Otros 2 géneros con mayor abundancia en las muestras PP V1 son *Sellimonas* y *Streptococcus*. Recientemente, ha sido descrita una mayor abundancia diferencial de estos dos géneros en concreto en pacientes UC con depresión y ansiedad respecto a pacientes UC sin depresión ni ansiedad [272]. Finalmente, el género *Ruminococcus gnavus* con mayor abundancia en las muestras PP V1 tiene mayor prevalencia en las enfermedades inflamatorias intestinales y una asociación positiva con el grado de enfermedad [188].

Por otro lado, los únicos dos géneros con una mayor abundancia en el grupo PP V2 son *Lactococcus* y *Bilophila*. La mayor abundancia de *Lactococcus* también se observó en el grupo CT V2 en comparación a CT V1 y ya ha sido descrita, del mismo modo, se observa la misma tendencia de una mayor abundancia de *Lactobacillus* en las muestras V1 y de *Lactococcus* en las muestras V2, producida probablemente por un mecanismo compensatorio de la pérdida de *Lactobacillus* en las muestras V2. El género *Bilophila*, se ha encontrado en mayor abundancia en dietas basadas en alimentación omnívora en comparación a dietas basadas en plantas [273]. Aunque los mecanismos de acción de este género son poco conocidos, según los estudios publicados hasta la fecha no parece tener posibles efectos positivos en la salud de las personas, más bien lo contrario.

A pesar del incremento observado de *Bilophila* en las muestras PP V2, otros géneros bacterianos ven reducida su abundancia en las muestras PP V2 en comparación a las PP V1. Algunos de estos géneros tienen gran relevancia científica como *Fusobacterium* y su asociación al cáncer de colon, *Helicobacter* y su asociación al cáncer de estómago, otros asociados a enfermedades inflamatorias intestinales como *Ruminococcus gnavus* o

Sellimonas y hasta géneros con un posible potencial asociado a una mayor infectividad y mortalidad debido a la infección por SARS-COV-2.

Tabla 18 Valores p ajustados tras aplicar la función *adonis2* en las métricas de betadiversidad Bray Curtis y Unweighted Unifrac para cada grupo por separado; CT, PN y PP. Las diferentes variables categóricas han sido probadas mediante la función (*Grupo, Voluntario, Tipo de muestra y Animal*)

	CT		PN		PP	
	Bray	UnW	Bray	UnW	Bray	UnW
V1 vs V2	0,004**	0,077	0,565	0,455	0,085	0,44
Voluntario	0,001***	0,012*	0,213	0,002**	0,001***	0,022**
Muestra	0,001***	0,002**	0,002**	0,001***	0,001***	0,001***
Animal	1	1	1	1	1	1

Tabla 19 Valor p ajustados mediante FDR tras aplicar la función *adonis2* comparando los distintos tiempos de estudio para las métricas de beta diversidad Bray Curtis (*bray*) y Unweighted Unifrac (*unW*). (* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$)

Grupos	t0 vs t 69	t69 vs t76	t76 vs t79	t79 vs t89	t89 vs t96	t96 vs t103
CT_bray	0,012**	0,0012**	0,0023**	0,0012**	0,046*	0,713
PN_bray	0,0011**	0,0011**	0,013*	0,001**	0,0011**	0,467
PP_bray	0,001**	0,001**	0,001**	0,001**	0,001**	0,674
CT_unW	0,001**	0,001**	0,001**	0,001**	0,001**	0,435
PN_unW	0,001**	0,001**	0,001**	0,001**	0,001**	0,251
PP_unW	0,001**	0,001**	0,001**	0,001**	0,001**	0,276

A parte de los géneros bacterianos diferenciales entre los grupos V1 y V2 para cada grupo, se han utilizado las métricas de beta diversidad Bray Curtis y Unweighted Unifrac para estudiar las diferencias y la evolución de la composición general de la microbiota de los ratones para cada grupo de intervención. Estas diferencias han sido calculadas utilizando la función *adonis2*.

En primer lugar, en la Tabla 18 se representan los valores p ajustados obtenidos tras comparar las métricas de beta diversidad en base a distintas variables utilizadas durante el experimento. Los resultados obtenidos van en consonancia con los observados en los anteriores análisis de abundancia diferencial. En el grupo CT, hay una clara diferencia entre la composición de la microbiota de las muestras V1 en comparación a la V2 si nos fijamos en los valores obtenidos para la métrica Bray Curtis ($p = 0,004$). En el mismo sentido, el grupo PP obtiene un valor p ajustado bajo, aunque no llega a alcanzar la

significación ($p = 0,085$). No obstante, para el grupo PN, los valores obtenidos tanto para Bray Curtis como para Unweighted Unifrac se alejan del límite $< 0,05$ marcado.

En la misma tabla, son destacables algunos otros resultados obtenidos, por ejemplo, la variable **Voluntario** separa de forma significativa la composición de la microbiota en todos los grupos, a excepción del grupo PN en la métrica Bray Curtis. Este resultado indica que la microbiota de los ratones se coloniza de forma diferencial en base al voluntario utilizado para realizar el trasplante. Esta hipótesis se ve reforzada por el hecho de que los resultados de p valores ajustados para la variable **Animal** no son significativos en ninguno de los casos ($p = 1$). No obstante, las diferencias entre las muestras humanas y las muestras de ratón, variable **Muestra**, siguen siendo significativas, demostrando que las muestras de ratón trasplantado no adquieren una composición igual a las muestras de partida utilizadas para realizar el trasplante.

Otro dato relevante del experimento se puede observar en la Tabla 19. Utilizando ambas métricas de beta diversidad, los distintos tiempos son comparados entre sí con el objetivo de determinar cuando la composición de la microbiota trasplantada se estabiliza. La estabilización de la microbiota trasplantada se alcanza en el día 96, ya que no se observan diferencias significativas entre el tiempo t_{96} y t_{103} , mientras que las diferencias entre los otros tiempos son muy significativas.

La misma evolución se puede observar en la Figura 59 con las OTUs compartidas entre las muestras humanas y el ratón. Al acabar la inducción de la obesidad a día 69 las OTUs compartidas entre ratón y humano son prácticamente 0 y tras iniciar las administración de FMT esa proporción va en aumento hasta llegar a día 96, donde esa transferencia de OTUs entre Humano y ratón parece estabilizarse.

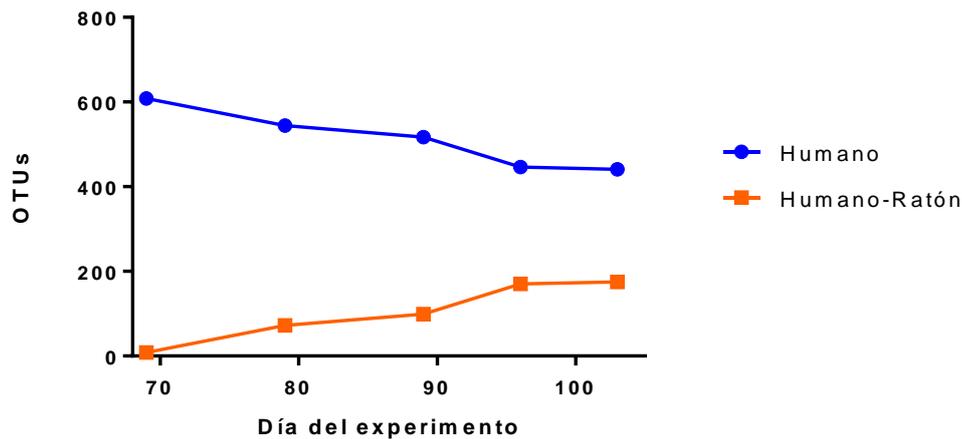


Figura 59 Evolución de las OTUs compartidas entre las muestras humanas y los ratones trasplantados con las mismas muestras humanas. Humano (muestras humanas de los grupos CTV1, CTV2, PNV1, PNV2, PPV1, PPV2). Humano-Ratón (ratones de los grupos CTV1, CTV2, PNV1, PNV2, PPV1, PPV2).

Para entender la transferencia que se ha llevado a cabo de las muestras humanas a los ratones trasplantados, este análisis se ha complementado con un estudio detallado a nivel de OTU. Los resultados se pueden observar en la Tabla 20 en combinación con la Figura 60.

En la Figura 60 se representan las abundancias relativas de las familias bacterianas presentes en las muestras humanas utilizadas para el trasplante fecal. Estas 20 familias representan una abundancia total de 99,12%. De las 20 familias principales hay 3 que no se han transferido de humano a ratón. Estas familias son *Bifidobacteriaceae*, *Veillonellaceae* y *Succinivibrionaceae*. Estas 3 familias representan el 6,11% de la abundancia total relativa de las muestras humanas. Para el resto de familias, hay al menos 1 OTU específica de humano que ha podido ser transferida al modelo de ratón. No obstante, no todas las familias bacterianas se acaban trasplantando del mismo modo. Para la familia más abundante en las muestras humanas, *Lachnospiraceae*, de un total de 96 OTUs humanas, 25 pudieron ser transferidas al modelo de ratón (26,04%) mientras que de las 127 OTUs específicamente humanas pertenecientes a *Ruminococcaceae*, 21 fueron transferidas de forma exitosa al ratón (16,54%). Una de las tasas más bajas de transferencias de OTU la observamos para la familia *Prevotellaceae* donde tan sólo 1 de las 32 OTUs humanas han podido ser transferidas (3,13%). Estos resultados indican que las bacterias humanas de familia *Prevotellaceae* no tiene una buena afinidad hacia el intestino del ratón al ser transferidas. En un reciente artículo donde se lleva a cabo trasplante fecal de humano a ratón C57bl6 para estudiar la enfermedad del hígado graso no alcohólico, los investigadores tampoco encontraron presencia de la familia

Prevotellaceae es los ratones trasplantados con las muestras humanas [274]. Los investigadores hipotetizan con la posibilidad de que esta no detección se deba a la preferencia de las bacterias *Prevotellaceae* por la degradación de fibras, las cuales no eran abundantes en la dieta de los ratones, no obstante, esta no transferencia también podría ser causa de la no adaptación de estas cepas al nuevo ambiente o a la sensibilidad al oxígeno durante la manipulación de la muestra [275].

En sentido contrario, otras familias bacterianas presentan una alta tasa de transferencia de humano a ratón. Por ejemplo, para la cuarta familia más abundante en las muestras humanas, *Bacteroidaceae*, la transferencia de humano a ratón a nivel de OTU alcanza un 58,14% (24 de 43 OTUs), indicando una mayor adaptación de esta familia al intestino de ratón.

En base a los resultados del modelo predictivo PLS-DA del apartado 4.1.1 es especialmente relevante conocer si la transferencia de las bacterias con mayor capacidad diferencial en base al IMC se implanta al modelo de ratón. En base a los resultados obtenidos y a la literatura consultada, esos géneros pueden tener una implicación más determinante en el desarrollo del fenotipo obeso. En el caso de los géneros más propensos a la obesidad, *Lachnoclostridium* y *Roseburia* (VIP scores: 2,051, 1,939), ambos pertenecen a la familia *Lachnospiraceae*, la más abundante de las muestras humanas. Para ambos géneros hay transferencia de OTUs de la microbiota humana a las muestras del modelo de ratón. En el caso de las variables con mayor peso en los IMC bajos, *Christensenellaceae R-7* y *Ruminococcaceae UCG-002* (VIP scores: 1,939, 1,782) se observa una transferencia directa de las OTUs *Christensenellaceae R-7* con 4 OTUs de las 20 totales, sin embargo, las OTUs del género *Ruminococcaceae UCG-002* no se detectan en el ratón, aunque si se detectan otros géneros de la misma familia *Ruminococcaeae* con funcionalidades similares [276].

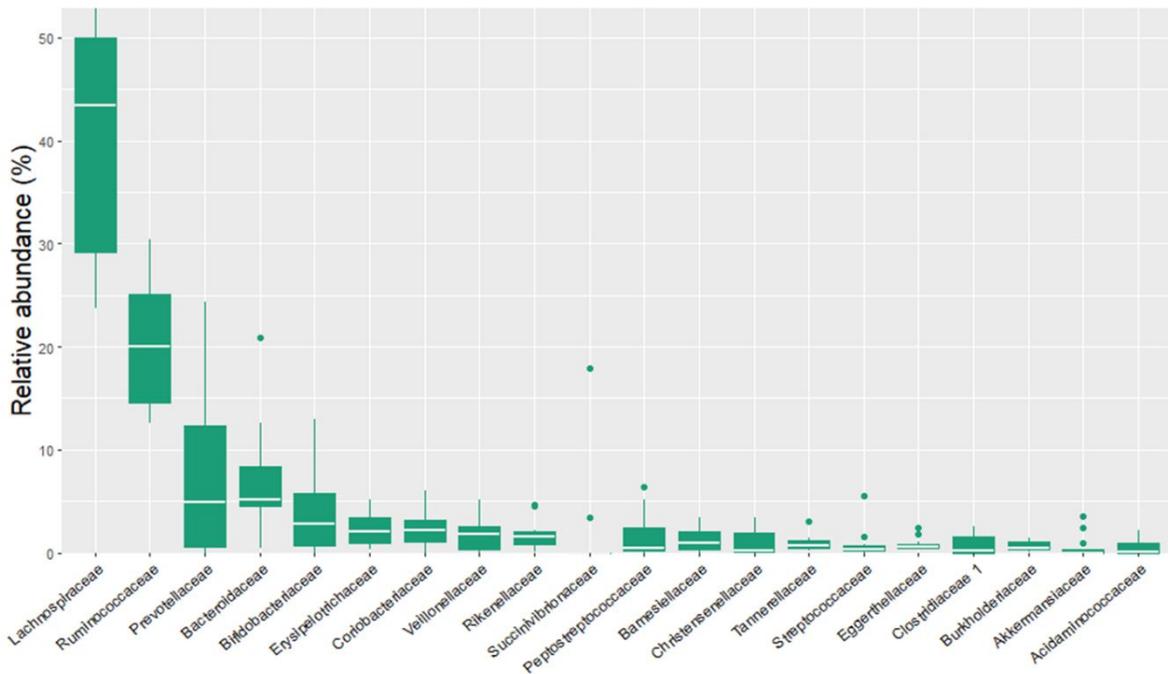


Figura 60 Diagrama de cajas de la abundancia relativa a nivel de familia para las muestras humanas utilizadas en el trasplante fecal en los modelos PGF. Las familias están ordenadas en base a la abundancia relativa total, de mayor a menor.

A nivel general, estos resultados ayudan a demostrar que la transferencia de bacterias de la microbiota humana al modelo de ratón se está llevando a cabo de forma correcta, a excepción de algunas de las familias bacterianas citadas anteriormente. Sin embargo, esta transferencia no es perfectamente completa ya que no todas las OTUs humanas se llegan a trasplantar al modelo del ratón a pesar de incrementar las inoculaciones de FMT.

Tal y como se discutió en el capítulo anterior, es muy complejo conseguir una transferencia completa de una comunidad microbiana tan diversa y sensible como la microbiota humana a un nuevo ambiente y conseguir una implantación del 100%. Lo que acabamos obteniendo con este tipo de modelos es una transferencia de la mayor parte de familias bacterianas, en mayor o menor grado, alcanzando una composición híbrida entre la microbiota transferida y la afinidad de la colonización del nuevo ambiente por parte de las bacterias trasplantadas.

Tabla 20 Tabla resumen de la transferencia de OTUs exclusivamente humanas a los ratones en el día t103 para las 25 familias bacterianas más abundantes. La tabla está organizada en función de la abundancia relativa total de cada familia bacteriana, en orden descendente. La columna "OTUs Humanas" muestra las OTUs humanas que no se pudieron transferir a los ratones, mientras que las columnas "OTUs Humano-Ratón" indican las OTUs de origen humano que fueron exitosamente transferidas a los ratones. Los colores en la tabla representan el éxito del trasplante de humano a ratón: en naranja, las familias bacterianas en las que al menos 1 OTU fue transferida con éxito de humano a ratón; en azul, las familias bacterianas en las que ninguna OTU pudo ser transferida de humano a ratón en este experimento.

Orden abundancia	Filo	Clase	Orden	Familia	OTUs Humanas	OTUs Humano-Ratón
41,59%	p__Firmicutes	c__Clostridia	o__Clostridiales	f__Lachnospiraceae	71	25
20,12%	p__Firmicutes	c__Clostridia	o__Clostridiales	f__Ruminococcaceae	106	21
8,96%	p__Bacteroidetes	c__Bacteroidia	o__Bacteroidales	f__Prevotellaceae	31	1
6,38%	p__Bacteroidetes	c__Bacteroidia	o__Bacteroidales	f__Bacteroidaceae	18	25
2,87%	p__Actinobacteria	c__Actinobacteria	o__Bifidobacteriales	f__Bifidobacteriaceae	1	0
2,23%	p__Firmicutes	c__Erysipelotrichia	o__Erysipelotrichales	f__Erysipelotrichaceae	9	11
2,16%	p__Actinobacteria	c__Coriobacteriia	o__Coriobacteriales	f__Coriobacteriaceae	3	2
1,71%	p__Firmicutes	c__Negativicutes	o__Selenomonadales	f__Veillonellaceae	11	0
1,55%	p__Bacteroidetes	c__Bacteroidia	o__Bacteroidales	f__Rikenellaceae	13	6
1,53%	p__Proteobacteria	c__Gammaproteobacteria	o__Aeromonadales	f__Succinivibrionaceae	4	0
1,39%	p__Firmicutes	c__Clostridia	o__Clostridiales	f__Peptostreptococcaceae	2	1
1,15%	p__Bacteroidetes	c__Bacteroidia	o__Bacteroidales	f__Barnesiellaceae	1	8
1,04%	p__Firmicutes	c__Clostridia	o__Clostridiales	f__Christensenellaceae	16	4
1,03%	p__Bacteroidetes	c__Bacteroidia	o__Bacteroidales	f__Tannerellaceae	0	7
0,96%	p__Firmicutes	c__Bacilli	o__Lactobacillales	f__Streptococcaceae	8	1
0,85%	p__Actinobacteria	c__Coriobacteriia	o__Coriobacteriales	f__Eggerthellaceae	6	4
0,70%	p__Firmicutes	c__Clostridia	o__Clostridiales	f__Clostridiaceae 1	2	2
0,70%	p__Proteobacteria	c__Gammaproteobacteria	o__Betaproteobacteriales	f__Burkholderiaceae	7	4
0,52%	p__Verrucomicrobia	c__Verrucomicrobiae	o__Verrucomicrobiales	f__Akkermansiaceae	0	2
0,47%	p__Firmicutes	c__Negativicutes	o__Selenomonadales	f__Acidaminococcaceae	4	2
0,45%	p__Proteobacteria	c__Deltaproteobacteria	o__Desulfovibrionales	f__Desulfovibrionaceae	8	5
0,24%	p__Firmicutes	c__Clostridia	o__Clostridiales	f__Family XIII	10	3
0,20%	p__Bacteroidetes	c__Bacteroidia	o__Bacteroidales	f__Marinifilaceae	1	2
0,16%	p__Actinobacteria	c__Coriobacteriia	o__Coriobacteriales	f__Atopobiaceae	3	2
0,15%	p__Proteobacteria	c__Gammaproteobacteria	o__Enterobacteriales	f__Enterobacteriaceae	0	1

En base a la hipótesis planteada en el tercer objetivo de esta tesis podemos concluir que el trasplante de microbiota fecal provenientes de muestras antes y después de la intervención no modifican el fenotipo obeso del animal, ya que no observamos cambios significativos entre los grupos en la pérdida de peso, el análisis bioquímico y el análisis histológico. La personalización de las dietas tampoco induce cambios significativos mediante la transferencia de la microbiota a los modelos animales ya que las comparaciones entre grupos no son significativas. La modificación del fenotipo obeso en modelos animales a través del trasplante de microbiota de personas antes y después de una intervención dietética es un tema de investigación en constante evolución y puede ser difícil de observar debido a varias razones interconectadas [277] [278]. Aunque se ha observado una relación entre la microbiota intestinal y la obesidad, no siempre se observan cambios significativos en el fenotipo de los modelos animales tras la transferencia de microbiota.

Una posible explicación para la falta de cambios fenotípicos significativos en estos experimentos es que las intervenciones dietéticas pueden no haber inducido cambios suficientemente significativos en la composición de la microbiota en las personas [279]. Si los cambios en la microbiota son mínimos, como los observados para el piloto polaco, es menos probable que se observen cambios en el fenotipo obeso de los modelos animales. Además, la capacidad de la microbiota trasplantada para colonizar y establecerse en el intestino del modelo animal puede variar [280]. Si la microbiota trasplantada no se establece de manera efectiva, es menos probable que influya en el fenotipo del receptor. Tal y como hemos visto, no todas las OTUs humanas se acaban implantando en el modelo animal y es posible que algunas de estas OTUs tengan importancia en el traslado del fenotipo obeso. La interacción entre la microbiota y el huésped es compleja y multifactorial. La genética, el ambiente y otros factores del huésped pueden influir en la capacidad de la microbiota para modificar el fenotipo obeso [281].

Por último, la duración del estudio puede ser insuficiente para observar cambios significativos en el fenotipo obeso [184]. Los efectos de la modificación de la microbiota pueden tardar en manifestarse, y estudios de mayor duración podrían ser necesarios para evaluar los cambios en el fenotipo.

La caracterización taxonómica de las comunidades bacterianas en muchos casos es insuficiente para determinar si los cambios inducidos por una comunidad compleja como la microbiota humana tiene un impacto en el desarrollo de una patología como la obesidad. En ocasiones es necesario complementar estas técnicas de estudio con otros

métodos que permitan entender los cambios que se están llevando a cabo no solo a nivel composicional, si no también a nivel metabólico.

En este sentido, el análisis metabolómico en un modelo animal tras realizar un trasplante fecal es importante para evaluar cómo la transferencia de microbiota de personas antes y después de una intervención dietética afecta el perfil metabólico en el modelo animal [282]. Al estudiar los cambios metabólicos resultantes de la transferencia de microbiota, se puede obtener una visión detallada de cómo la microbiota intestinal interactúa con el huésped y afecta su metabolismo [283], lo que es esencial para comprender la modificación del fenotipo obeso.

Los metabolitos producidos por la microbiota pueden afectar al huésped de diversas maneras. La microbiota puede producir compuestos bioactivos, como aminas biógenas, que pueden modular la función de neurotransmisores en el huésped y afectar el comportamiento alimentario y la homeostasis energética [55]. Otros metabolitos producidos por la microbiota incluyen sales biliares secundarias, que pueden influir en la absorción de lípidos y glucosa, y modulación de vías metabólicas del huésped [284].

El análisis metabolómico puede ayudar a identificar estos metabolitos y cómo afectan al huésped, proporcionando una comprensión más profunda de las interacciones huésped-microbiota y los mecanismos subyacentes en la modificación del fenotipo obeso.

4.3.7. Análisis metabolómico en plasma

El perfil metabólico no dirigido analizado por UPLC-ESI(+/-)-QqTOF-MS permitió la detección de 6327 señales metabólicas (2911 y 3416 características en los modos ESI+ y ESI-, respectivamente adquiridas en dos lotes independientes) tras preprocesar y limpiar los datos. Además, el análisis específico de la vía del triptófano mediante metabolómica dirigida permitió la cuantificación del ácido antranílico, el ácido 3-hidroxiántanílico, la fenilalanina, la serotonina, el ácido cinurénico, el ácido xanturénico, la cinurenina, la hidroxiquinurenina, la N'-formilquinurenina, el ácido indolelático, el triptófano, la tirosina y la S-adenosilhomocisteína. La Figura 20 resume las principales clases metabólicas de las características anotadas en base a la MS/MS en los modos ESI+ y ESI. Las clases con los mayores conjuntos de características anotadas fueron los glicerofosfolípidos (239), los ácidos carboxílicos y derivados (31), los acilos grasos (22), los indoles y derivados (18), los compuestos organohalogenados (18) y los esfingolípidos (17).

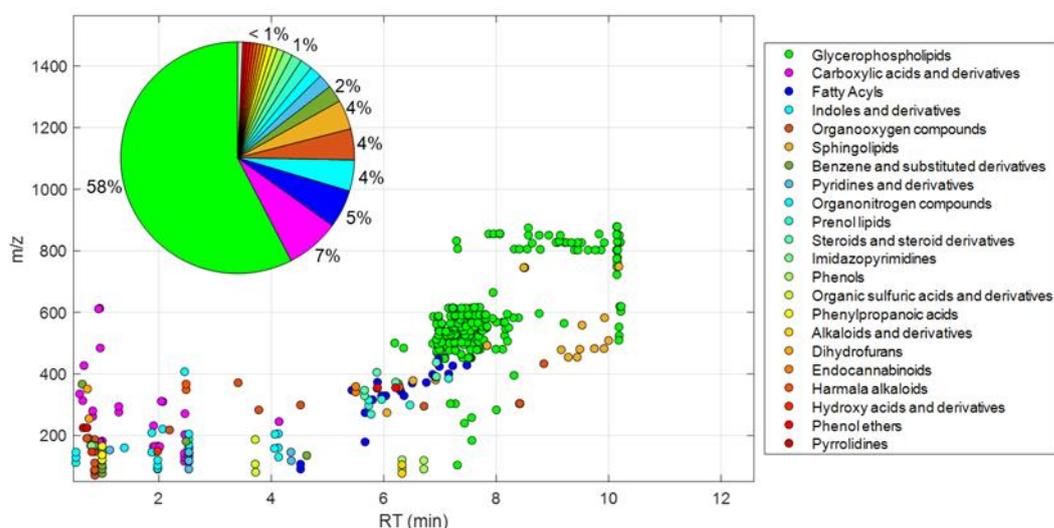


Figure 20. Análisis no dirigido de UPLC-MS Distribución de las características anotadas y sus clases después del preprocesamiento y limpieza de los datos. Inserción: gráfico circular que representa los porcentajes relativos de las características anotadas de cada clase con respecto al total de datos. Este gráfico permite visualizar la diversidad y distribución de las características anotadas, facilitando la identificación de posibles compuestos o moléculas de interés en el análisis de los datos obtenidos mediante UPLC-MS.

El análisis de componentes principales (PCA) se utilizó inicialmente para un análisis exploratorio de las tendencias globales del conjunto de datos. La figura muestra los gráficos de puntuación de un modelo PCA de dos componentes que resume el 43% de la variación de los datos. La distribución aleatoria de las puntuaciones PC1 y PC2 de las réplicas de QC en función del orden de inyección y la estrecha agrupación de los QC en

la puntuación PC1-PC2 representada en la figura apoya la estabilidad instrumental y la precisión del sistema analítico durante el análisis de los lotes ESI+ y ESI-.

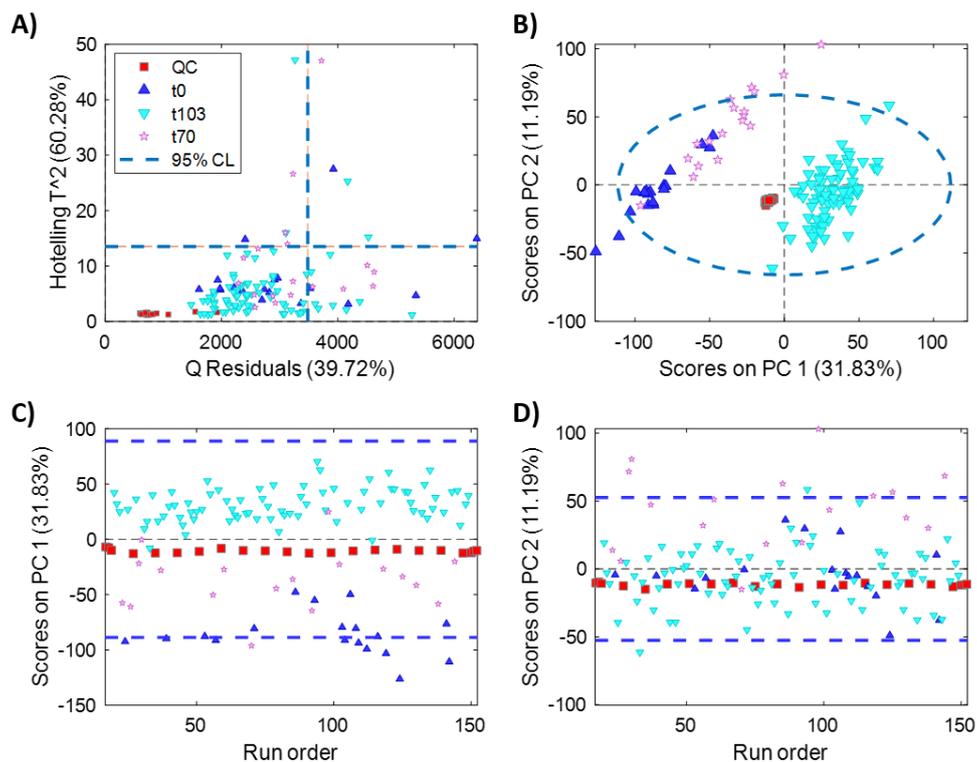


Figura 61 Análisis UPLC-MS no dirigido. A) Hotelling T^2 frente a los residuales Q para la identificación de posibles valores atípicos; B) gráficos de puntuación PCA del análisis de datos LC-MS. Puntuaciones PC1 vs PC2; C) Puntuaciones PC1 y PC2 (D) en función del orden de inyección.

4.3.8. Impacto de las dietas personalizadas en el metaboloma del ratón

Los resultados de las diferencias en los perfiles metabólicos, representados en la Figura 62A, muestran un solapamiento entre las muestras pertenecientes a las tres subclases bajo estudio, a tiempo V2 "FMT CT-V2", "FMT PN-V2" y "FMT PP-V2". Este solapamiento es similar para las muestras recogidas en V1 con una ligera desviación de las muestras FMT CT-V1.

Estos resultados parecen indicar que los cambios en el microbioma inducidos por las dietas de intervención en los voluntarios condujeron a un cambio homogéneo en los perfiles metabólicos de los ratones tras el FMT, independientemente del tipo de intervención dietética. Además, los resultados obtenidos de la validación cruzada mostrada en la Figura 62B confirmaron la separación observada de las muestras en base

al tiempo (V1 vs V2) apoyando así la hipótesis de que el cambio en la dieta tuvo un impacto significativo en los perfiles metabólicos de los ratones sometidos a FMT.

A continuación, la Figura 62C resume la importancia relativa de cada metabolito detectado e incluido en el modelo PLS-DA. En los extremos superiores del eje de las X se representan los metabolitos con un mayor VIP score. En el extremo izquierdo, los metabolitos con mayor peso en las muestras V1 (CNT, PN y PP) y en el extremo derecho, los metabolitos con mayor peso en las muestras V2 (CNT, PN, PP). Dos de los metabolitos anotados con mayor VIP score (véase la Figura D) como el 5,6-epoxi 18R-HEPE potencialmente vinculado a la actividad antiinflamatoria, y el LysoPE(22:6/0) implicado en la función de señalización de los lisofosfolípidos son los que presentan una mayor diferenciación entre los dos tiempos de estudio.

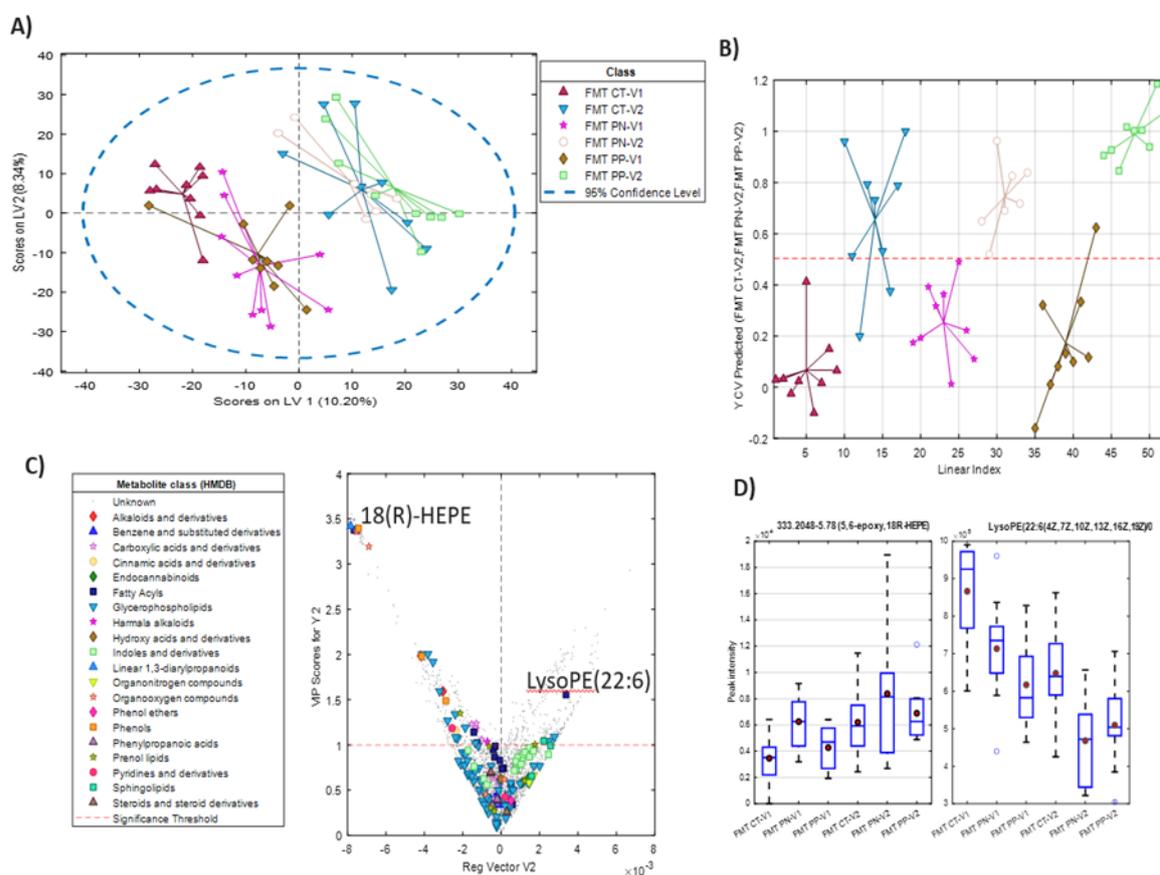


Figura 62 Análisis UPLC-MS no dirigido. A) Gráfico de puntuaciones PLS-DA de un modelo construido para discriminar entre las muestras recogidas después de la FMT en V1 y V2; B) Clases predichas por validación cruzada PLS-DA; C) Valores de la puntuación VIP y del vector de regresión en el modelo PLS-DA; D) Boxplots que muestran la distribución de los valores de 2 metabolitos anotados seleccionados con altos valores VIP en el modelo PLS-DA.

A continuación, con el objetivo de profundizar más al detalle en el impacto que ha tenido los FMT en cada intervención dietética por separado (CT, PN y PP) los datos metabolómicos se han dividido según estos 3 grupos.

En la Figura 63 se puede observar los resultados obtenidos para el grupo CT al comparar el metaboloma de los ratones que recibieron trasplante de los voluntarios antes y después de acabar la intervención dietética. En primer lugar, destaca la cantidad de metabolitos con abundancias significativamente diferenciales en el volcano plot de la Figura 63A. En la parte derecha del gráfico (en rojo) destacan los metabolitos con una abundancia relativa significativamente mayor en el grupo CT V2 en comparación al grupo CT V1 y en la parte izquierda (en rojo) los metabolitos con abundancia diferencial en el grupo CT V1 respecto a CT V2. A continuación, en la misma figura en el apartado B se destacan las rutas metabólicas más enriquecidas en el grupo CT V2 respecto al grupo CT V1. Algunas de las rutas más enriquecidas en estos animales están relacionadas con la síntesis de aminoácidos (metabolismo de la fenilalanina, tirosina, triptófano, síntesis de la arginina). También destacan los aminoacil-ARNt, sustratos para la traducción que son fundamentales para determinar cómo se interpreta el código genético en forma de aminoácidos. Por otro lado, destaca el incremento de la biosíntesis de los ácidos grasos no saturados en las muestras de grupo CT V2. La biosíntesis de estos compuestos es muy importante para la homeostasis y la prevención de la obesidad ya que su falta se asocia con las enfermedades coronarias y una concentración elevada de colesterol en sangre [285].

Esta diferencia en cuanto a la respuesta del metaboloma del animal entre las muestras CT V1 y V2 también se puede observar en la misma figura (subapartados C, D y E). Se puede destacar una clara separación entre los 2 *clusters* en el PCA, para los tres primeros PC que explican una varianza del 46,9%. Finalmente, los resultados del modelo predictivo de validación doble cruzada PLS-DA demuestra que la clasificación de las muestras en base al *cluster* V1 y V2 es prácticamente perfecta. La línea discontinua de la Figura 63D separa ambos *clusters* y asigna cada una de las muestras en base a la predicción del modelo. Como se puede observar, todas las muestras V2 (rojo) se agrupan a la derecha de la línea discontinua y las muestras V1 (azul) a la izquierda.

Los valores estadísticos del modelo demuestran una precisión muy cercana al 100% y un área bajo la curva de 0,96 (Figura 63E).

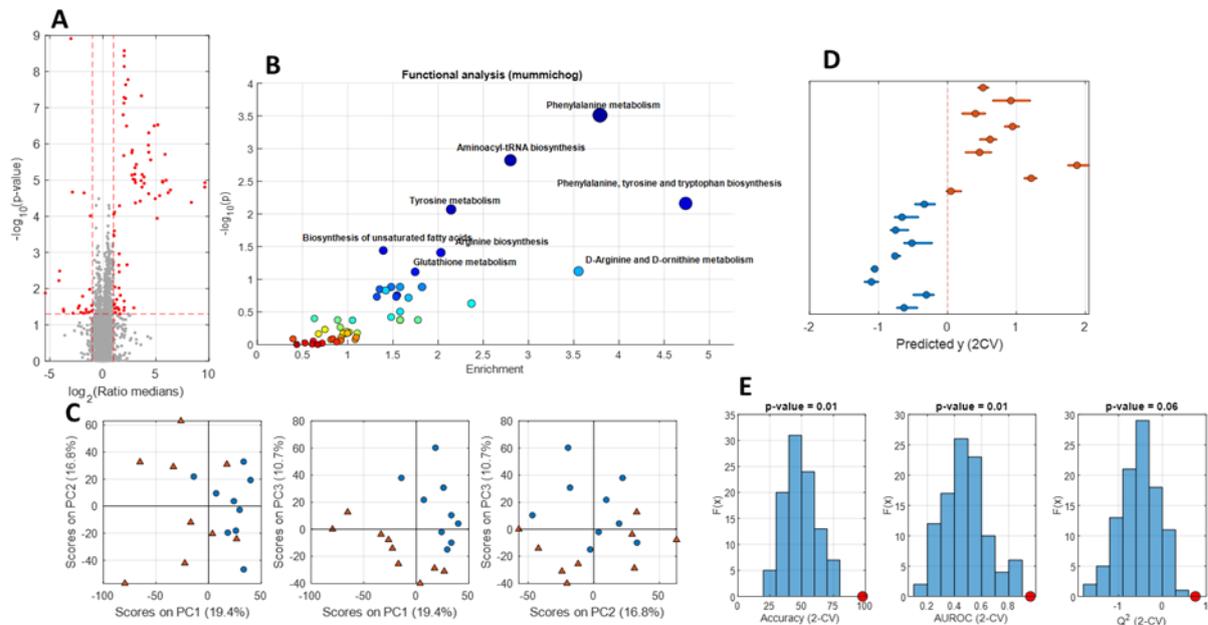


Figura 63 Análisis metabólico usando todos los datos disponibles ESI+/- y aminoácidos comparando V1 vs V2 en el grupo control A) Diagrama de volcán usando \log_2 (mediana V1 / mediana V2) prueba t p-valor (varianzas desiguales). B) Análisis funcional utilizando mummichog. El modo analítico es mixto p-value cutoff: 0.05 library: KEGG. C) PCA X-block: autoescalado Azul: V1, Rojo: V2. D, E) PLS-DA Validación cruzada doble, CV repetido al azar (n=5) 6 veces. Preprocesamiento del bloque X: autoescala. Preprocesamiento del bloque Y: centro medio Evaluación de la significación estadística de las cifras de mérito de 2CV: Prueba de permutación (100 permutaciones) Azul: V1, Rojo: V2.

El mismo tipo de análisis explicado anteriormente se ha llevado a cabo para los grupos PP (Figura 64) y el grupo PN (Figura 65) comparando por separado las muestras V1 vs V2.

En el grupo PN, destaca la abundancia significativamente diferencial de más metabolitos en el grupo V2 en comparación a las muestras V1 (Figura 64A), por consiguiente, también se ven afectadas más vías metabólicas (Figura 64B), sin embargo, igual que en la grupo CT, la mayoría de estas vías están asociadas a la síntesis de aminoácidos como la valina, leucina, isoleucina, triptófano y tirosina y a la metabolización de arginina, prolina, fenilalanina, alanina, aspartato, glutamato y serina. La microbiota intestinal juega un papel fundamental en la síntesis y degradación de diferentes aminoácidos. Los sustratos de aminoácidos preferidos de las bacterias colónicas incluyen la lisina, la arginina, la glicina y los BCAA leucina, valina e isoleucina [286], lo que da lugar a la generación de una compleja mezcla de productos metabólicos finales que incluyen, entre otros, amoníaco, AGCC (acetato, propionato y butirato) y ácidos grasos de cadena ramificada (AGCR; valerato, isobutirato e isovalerato). Estos metabolitos generados modulan la expresión génica bacteriana que conduce a la producción de enzimas implicadas en el metabolismo de los aminoácidos [287]. A nivel general, la mayor circulación de aminoácidos libres en sangre, en especial de los BCAA, se asocia con la disminución en

la sensibilidad a la insulina [288], predisponiendo a sufrir diabetes melitus de tipo II. Tambien, los cambios en los niveles de AGCC asociados a la obesidad pueden estar relacionados con el catabolismo microbiano de aminoácidos, ya que al no metabolizarse estos aminoácidos, son utilizados como sustrato por las bacterias en el intestino, acumulando así su concentración total. En línea con esta hipótesis, se ha demostrado que la modulación de la microbiota intestinal mediante antibióticos aumenta las concentraciones plasmáticas de aminoácidos en modelos animales en comparación con los controles [289]. En el grupo PN V2, la mayoría de las rutas metabólicas asociadas a los aminoácidos ven incrementada la metabolización de estos compuestos, proporcionando así un hipotético potencial efecto beneficioso en el metabolismo del ratón.

En cambio, los aminoácidos que ven incrementada su actividad de biosíntesis, como los BCAA parecen regularse a través de la degradación de estos mismos aminoácidos, otra de las rutas metabólicas incrementadas en las muestras PN V2 en comparación a las muestras PN V1, (Figura 64B).

Otra de las rutas enriquecidas en el subconjunto de muestras PN V2 en comparación a PN V1 es el metabolismo del glioxilato. El ciclo del glioxilato describe un importante subconjunto de reacciones que participan en la biosíntesis de los hidratos de carbono a partir de los ácidos grasos. Otra de las rutas metabólicas incrementadas es la vía de la pentosa fosfato (PPP). La PPP se ramifica a partir de la glucosa 6-fosfato (G6P), produce NADPH y ribosa 5-fosfato (R5P), y devuelve los carbonos a la vía glucolítica o gluconeogénica. Se ha demostrado que la PPP es un importante regulador de la homeostasis de la reducción-oxidación (redox) celular y de la biosíntesis [290]. También es destacable el incremento en el metabolismo del butanoato (butirato). Estos metabolitos forman parte de los SCFAs y son producidos exclusivamente por las bacterias intestinales. La abundancia del butirato se asocia positivamente con la salud intestinal y la reducción de bacterias proinflamatorias [291] [292]. Otra de las rutas incrementadas en las muestras V2 con potencial efecto beneficioso es la biosíntesis de ácidos biliares primarios. Los ácidos biliares desempeñan varias funciones importantes; son las principales vías catabólicas para la eliminación del colesterol del organismo. También están involucrados en la eliminación de sustancias tóxicas endógenas y exógenas, como la bilirrubina, los xenobióticos y los metabolitos de los fármacos. Cuando llegan al intestino, la acción de los ácidos biliares facilita la absorción de las grasas y las vitaminas liposolubles [293].

En cuanto a los resultados del modelo de validación cruzada PLS-DA la predicción no es tan buena como en el grupo CT sin embargo, se puede observar en la Figura 64D una separación clara entre los grupos V1 y V2 a excepción de una muestra de cada grupo. El conjunto de los resultados obtenidos para el grupo PN indican una clara diferencia en el metabolismo de los ratones que recibieron las microbiotas post intervención dietética (V2) en comparación a los ratones que recibieron la microbiota de los voluntarios antes de iniciar la intervención.

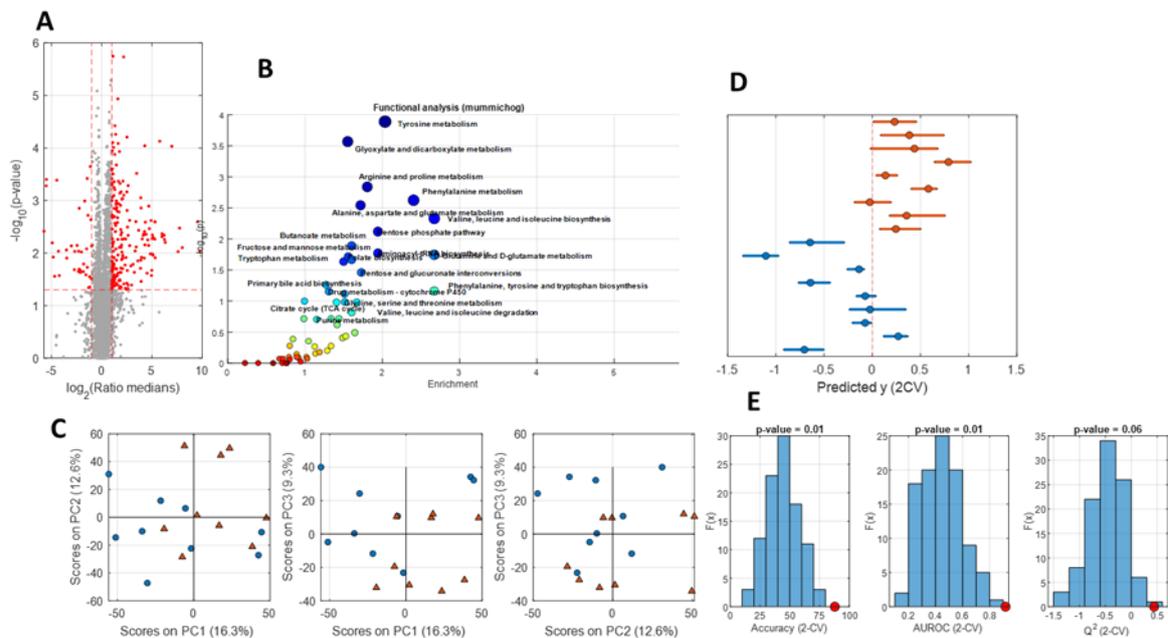


Figura 64 Análisis metabólico usando todos los datos disponibles ESI+/- y aminoácidos comparando V1 vs V2 en el grupo PNA) Diagrama de volcán usando \log_2 (mediana V1 / mediana V2) prueba t p-value (varianzas desiguales). B) Análisis funcional utilizando mummichog.. El modo analítico es mixto p-value cutoff: 0.05 library: KEGG. C) PCA X-block: autoescalado Azul: V1, Rojo: V2. D, E) PLS-DA Validación cruzada doble, CV repetido al azar (n=5) 6 veces. Preprocesamiento del bloque X: autoescala. Preprocesamiento del bloque Y: centro medio Evaluación de la significación estadística de las cifras de mérito de 2CV: Prueba de permutación (100 permutaciones) Azul: V1, Rojo: V2.

Finalmente, para el grupo PP (Figura 65), la distribución de los resultados y el desempeño del modelo PLS-DA es muy parecida a los resultados obtenidos para el grupo PN. Hay un par de muestras que se clasifican erróneamente para el grupo contrario (Figura 65D), sin embargo, la separación entre ambos grupos, V1 y V2 sigue siendo clara (Figura 65C,D,E). La principal diferencia entre los resultados obtenidos para el grupo PP y PN son los metabolitos diferenciales detectados entre los dos puntos de estudio. En este caso, en el volcano plot (Figura 65A) hay menos metabolitos con una abundancia diferencial, por consiguiente, las rutas metabólicas enriquecidas (Figura 65B) son menores que las observadas y descritas en el grupo PN (Figura 64B). Aun así, algunas de estas rutas son muy parecidas a las observadas en los grupos CT y PN, como las asociadas a la síntesis

proteica y de aminoácidos. Una de las rutas metabólicas destacables con mayor abundancia en las muestras V2 del grupo PP es el metabolismo del ácido linoleico. El ácido linoleico (LA) es un ácido graso esencial, que se metaboliza a gamma ácido linoleico (GLA). El GLA es un importante constituyente de la membrana fosfolipídica neuronal, también es un sustrato para la formación de las prostaglandinas. A su vez, las prostaglandinas son muy importantes para la preservación del flujo sanguíneo nervioso [294].

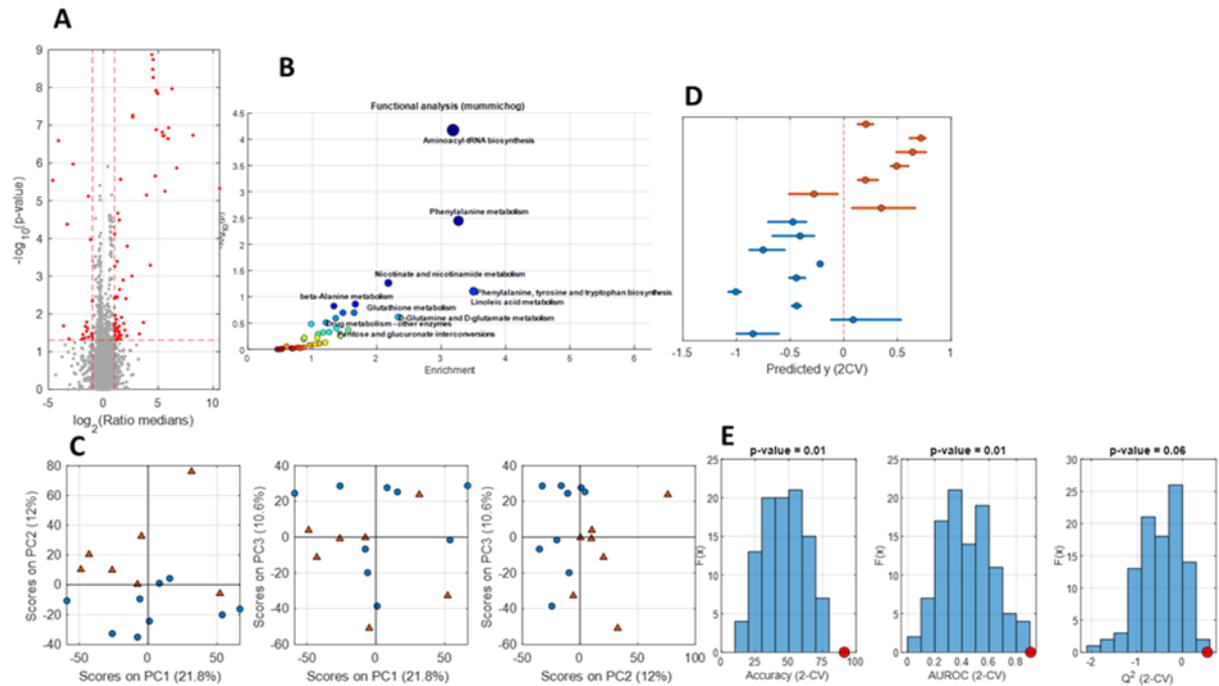


Figura 65 Análisis metabólico usando todos los datos disponibles ESI+/- y aminoácidos comparando V1 vs V2 en el grupo PP A) Diagrama de volcán usando \log_2 (mediana V1 / mediana V2) prueba t p-valor (varianzas desiguales). B) Análisis funcional utilizando mummichog.. El modo analítico es mixto p-value cutoff: 0.05 library: KEGG. C) PCA X-block: autoescalado Azul: V1, Rojo: V2. D, E) PLS-DA Validación cruzada doble, CV repetido al azar (n=5) 6 veces. Preprocesamiento del bloque X: autoescala. Preprocesamiento del bloque Y: centro medio Evaluación de la significación estadística de las cifras de mérito de 2CV: Prueba de permutación (100 permutaciones) Azul: V1, Rojo: V2.

En general, las microbiotas de las tres intervenciones post dietéticas tienen un efecto significativo en el metaboloma del ratón trasplantado. Para cada una de las intervenciones se detectan una serie importante de rutas metabólicas diferenciales entre los dos tiempos de intervención. Por otro lado, la clasificación de los modelos predictivos en base al tiempo de intervención es significativa para cada grupo, demostrando así que las muestras de los ratones trasplantados con muestras post intervención adquieren un metabolismo diferencial en comparación a los ratones que fueron trasplantados con muestras de los mismos voluntarios antes de iniciar las intervenciones. Aunque es complicado sacar conclusiones en firme a través de este tipo de análisis exploratorios, las diferencias observadas entre los dos tiempos de intervención tienen asociaciones positivas descritas

en literatura con estados metabólicos más saludables y menos prevalentes en obesidad. Algunas de estas rutas son la metabolización de distintos aminoácidos, el metabolismo del glicoxilato, el ácido linoleico o la síntesis de ácidos grasos no saturados.

Los resultados generales del análisis del metaboloma del modelo animal van en la misma dirección que los resultados observados para la caracterización de la microbiota del piloto polaco. Hay diferencias significativas para cada intervención al comparar las muestras V1 vs V2, sin embargo, las dietas personalizadas no parecen jugar un papel diferencial en la mejora del estado metabólico del ratón, ya que no se han encontrado diferencias a nivel metabólico entre las 3 intervenciones: CT, PN y PP. Del mismo modo que los resultados de la intervención dietética en humanos, realizar la intervención tiene un impacto mayor que el hecho de realizar una personalización de la intervención en base al metaboloma de los voluntarios.

4.3.9. Impacto del FMT en el metaboloma del ratón

El objetivo de este apartado es entender si el FMT de muestras humanas inducen cambios significativos en el metaboloma del ratón, cuáles son esos cambios y si la composición del metaboloma de los ratones PGF es estadísticamente diferente de la composición del metaboloma de los ratones *wyld type*.

En primer lugar, cabe destacar que el metaboloma de los ratones trasplantados con microbiota humana es muy diferente de los metabolomas de los ratones no trasplantados. Se puede observar una clara separación entre los 2 clusters en los PCA de la Figura 67. Esta separación observable explica el 36,1% de la varianza total de los datos incluidos en el análisis.

En la misma dirección, los resultados de la validación cruzada del modelo PLS-DA predice de forma muy precisa la asignación de cada muestra a su subgrupo (Figura 66D). En este caso, cuanto más se aleja del 0 los valores 2CV de las medias predichas del modelo, la clasificación es mejor y, por consiguiente, los metabolomas de esas muestras son más diferentes entre sí.

Todas las muestras de los 6 subgrupos FMT (CT V1, CT V2, PN V1, PN V2, PP V1, PP V2) se agrupan en las muestras FMT predichas, a excepción de una muestra del grupo PP V1 (Figura 66D).

Destaca la asignación predicha de las muestras Control ABX, con unos valores 2CV muy cercanos al cero. De los 3 grupos control, el grupo tratado con antibiótico pero sin FMT se sitúa en una posición intermedia entre los otros 2 grupos control y los 6 grupos que recibieron FMT humano (Figura 66D). Estos resultados indican que el tratamiento con antibiótico tiene la capacidad de alterar el metaboloma del ratón, sin embargo, el FMT de las muestras humanas modifica aún más el metaboloma del ratón, hacia otro patrón diferente al de los ratones *wild type*.

Las rutas metabólicas que se van más alteradas en este modelo son las asociadas al metabolismo proteico, como los Aminoacil ARNt descritos anteriormente, el metabolismo de la fenilalanina, glutamina, alanina, aspartato y la síntesis de tirosina, triptófano, fenilalanila, valina, isoleucina y arginina.

Otra de las rutas más incrementada en los animales trasplantados con la microbiota humana es la biosíntesis de esteroides. Los esteroides son moléculas de señalización conservadas que regulan diferentes funciones fisiológicas en los animales, como la reproducción, la homeostasis de los minerales, los lípidos y la glucosa [295]. Más en

concreto, el equilibrio entre esteroides y no esteroides está fuertemente mediado por las hidroxisteroides deshidrogenasas (HSD). Las enzimas HSD son producidas por bacterias de la microbiota intestinal como las que pertenecen a los filos *Actinobacterias*, *Proteobacterias* y *Firmicutes*. La transferencia de las bacterias humanas al ratón parece incrementar la producción de enzimas HSD que a su vez alteran la señalización de la biosíntesis de esteroides en el metabolismo del ratón, incrementando la producción de las hormonas esteroides.

Otra ruta metabólica alterada es el metabolismo del retinol o vitamina A.

Recientemente, el microbioma intestinal ha sido identificado como un nuevo actor en el metabolismo de la vitamina A del huésped. Los ratones *germ-free* expresan niveles más altos de enzimas sintetizadoras de retinol en su epitelio intestinal que los ratones con un microbioma *wild type*. La colonización del intestino por parte de bacterias reduce los niveles de retinol en el intestino, lo que se equilibra con un aumento de la forma de almacenamiento en el hígado [296]. Esta regulación parece ser dinámica y específica en base a las bacterias presentes en el microbioma. Las bacterias formadoras de esporas, como los *Clostridia*, promueven la reducción de los niveles de retinol. Una de las posibilidades por la cual la síntesis de retinol sea mayor en los grupos trasplantados se puede deber a la menor diversidad bacteriana observada en las muestras FMT en comparación a las muestras control que no fueron sometidas al tratamiento con antibiótico.

Otra de las rutas metabólicas más enriquecidas en el grupo FMT en comparación a los grupos control es la ruta del metabolismo del almidón y la sacarosa. El almidón, actúa como una de las principales fuentes de energía de la dieta diaria y es la mayor fracción entre las dietas humanas y de animales monogástricos. Además, la tasa, el grado y el sitio en el que se degrada el almidón pueden causar diferentes impactos fisiológicos en la función fisiológica del sistema gastrointestinal y la salud intestinal del huésped. Esta ruta metabólica es una de las principales vías de captación energética que se lleva a cabo en el intestino delgado. Los ratones con la microbiota humanizada inducen una mayor expresión en las rutas metabólicas del almidón y la sacarosa, por consiguiente, obtienen más energía de la dieta ingerida. La principal hipótesis de esta diferencia consiste en que la microbiota humana está más adaptada a la dieta occidental, rica en almidón, azúcares, grasas saturadas y carnes. Debido a esta mejor adaptación, las bacterias transferidas de los humanos a los ratones inducen en el metabolismo murino una mayor expresión en las vías

de la metabolización del almidón y la sacarosa en comparación a los ratones con la microbiota *wild type*.

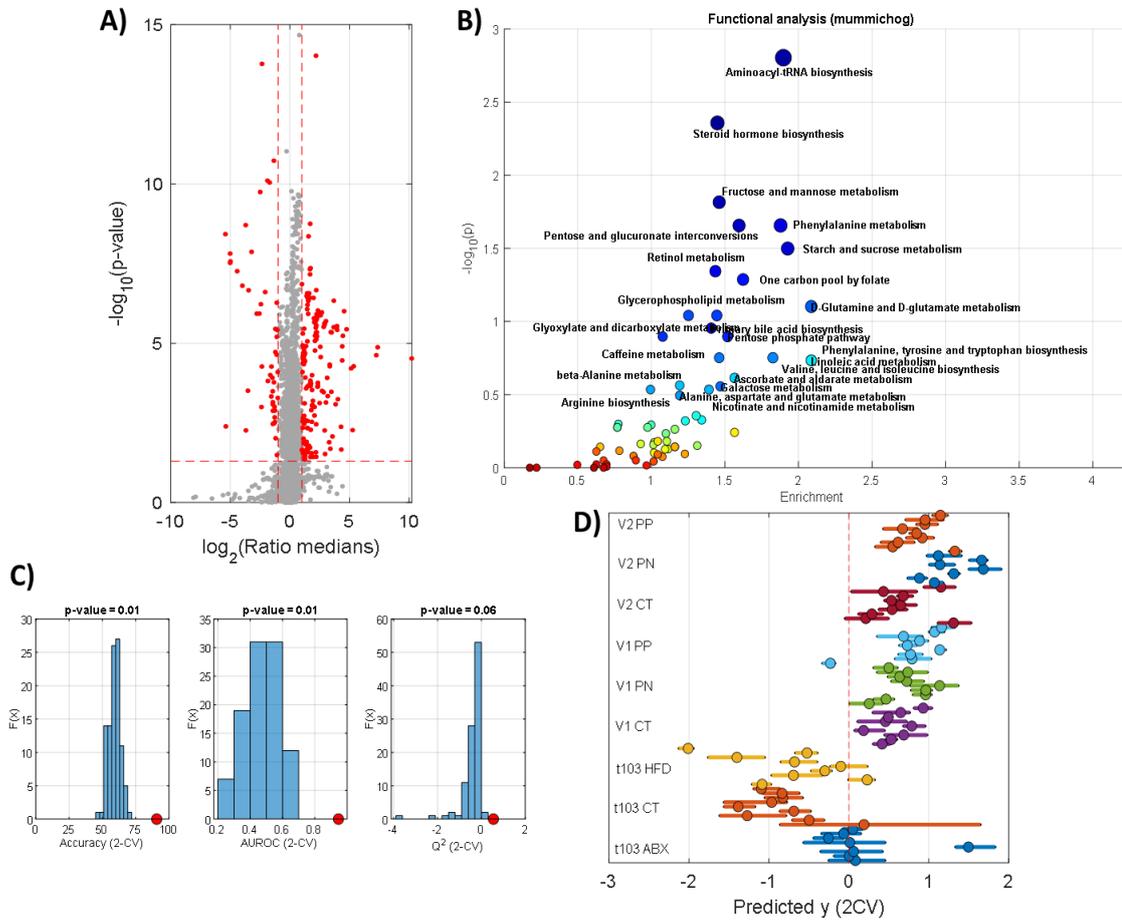


Figura 66 Análisis metabólico usando todos los datos disponibles ESI+/- y aminoácidos comparando las muestras que han recibido FMT con las muestras que no han recibido FMT A) Diagrama de volcán usando \log_2 (mediana FMT / mediana no FMT) prueba t p-valor (varianzas desiguales). B) Análisis funcional utilizando mummichog. El modo analítico es mixto p-value cutoff: 0.05 library: KEGG. C, D) PLS-DA Validación cruzada doble, CV repetido al azar (n=5) 6 veces. Preprocesamiento del bloque X: autoescala. Preprocesamiento del bloque Y: centro medio Evaluación de la significación estadística de las cifras de mérito de 2CV: Prueba de permutación (100 permutaciones)

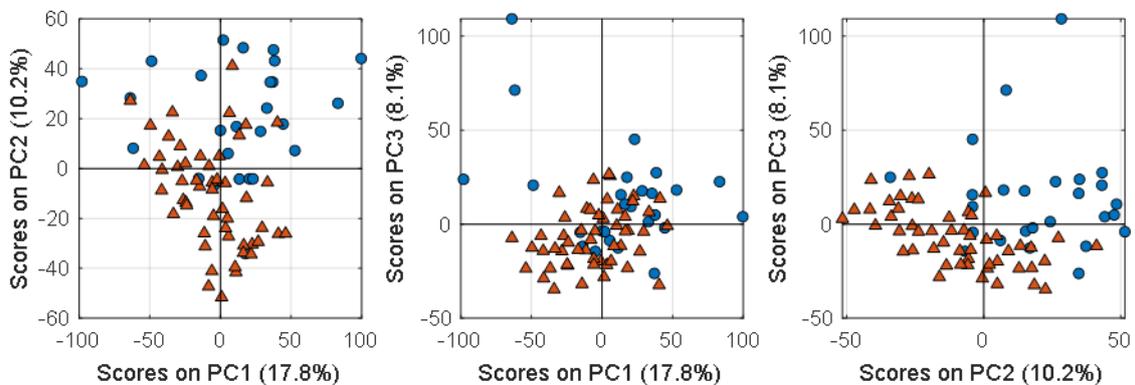


Figura 67 Gráfico PCA de la combinación de los 3 primeros PC para las muestras sin FMT (esfera azul) y las muestras que han recibido FMT (triángulo rojo).

Para profundizar en las diferencias entre los ratones que han recibido FMT y los que no, se representan los VIP scores de los metabolitos que muestran una diferencia mayor entre las dos condiciones del modelo (Figura 68). A izquierda de la figura principal, están representados los valores de estos metabolitos con una mayor abundancia en las muestras sin FMT. En cambio, en la derecha, están representados los valores de los metabolitos con un mayor impacto diferencial en los grupos que fueron inoculados con las microbiotas humanas.

Uno de los metabolitos con mayor abundancia en los ratones controles es la pilocarpina. La pilocarpina es un agonista colinérgico que se metaboliza en ácido pilocárpico por la esterasa sérica. En un reciente estudio, la administración de pilocarpina a ratones machos fue utilizada para inducir episodios epilépticos, tras esta administración, los ratones fueron trasplantados con microbiota de ratones sanos y ratones epilépticos. Los resultados proporcionaron una primera evidencia de que los ratones que recibieron microbiota de animales epilépticos son más propensos a desarrollar estado epiléptico, en comparación con los receptores de microbiota "sana", tras una dosis subclínica de pilocarpina. Los umbrales más bajos de actividad convulsiva encontrados en este estudio apoyan la hipótesis de que la microbiota, a través del eje intestino-cerebro, es capaz de afectar a la excitabilidad neuronal en el cerebro y que la pilocarpina juega un papel importante en algunas de las patologías neuronales como la epilepsia [297].

Otro metabolito encontrado en mayor abundancia en los grupos controles es ácido merulínico A. El ácido merulínico A es un lípido fenólico aislado de basidiomicetos como *Hapalopilus mutans*, *Phlebia radiata* y *Merulius tremellosus*. Tiene actividad antibacteriana, por ejemplo contra *Arthrobacter citreus*, *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium insidiosum*, *Micrococcus roseus* y *Sarcina lutea*. El ácido merulínico A, tiene una marcada actividad promotora y/o inhibidora de las membranas biológicas [298]. Por consiguiente, el trasplante fecal de las muestras humanas no tiene tan solo un efecto modulador en el metabolismo del ratón sino también en el metabolismo de los hongos, los cuales reducen la síntesis del ácido merulínico A cuando la microbiota humana es trasplantada al intestino del ratón.

En el sentido contrario, también hay una serie de metabolitos que son más abundantes en los ratones trasplantados con las muestras humanas. El metabolito que destaca más es el sulfato de p-Cresol. Este metabolito es un conjugado de sulfato del metabolito bacteriano p-cresol, que es una toxina urémica. El p-cresol sulfato se origina cuando las bacterias

intestinales fermentan las proteínas en el intestino grueso. Cuando las proteínas alimentarias llegan al intestino grueso, sus aminoácidos pueden ser sustratos de fermentación para las bacterias comensales. Algunos de los metabolitos resultantes son nutrientes esenciales, mientras que otros pueden ser perjudiciales para nuestra salud. El sulfato de p-Cresol es un producto de la fermentación de la tirosina por parte de bacterias de los géneros *Coriobacteriaceae* o *Clostridium*, seguido de la sulfatación por parte de las células del huésped. Este paso de sulfatación forma parte de los mecanismos de desintoxicación de fase II que promueven la eliminación de toxinas nocivas por los riñones. La concentración del p-cresol sulfato es mayor en los grupos FMT. En especial, se puede observar una gran diferencia entre la condición ABX y el resto de los grupos. Este resultado es muy similar al descrito en un estudio en el cual se comparaba el metaboloma de los ratones *germ-free* con ratones *wild type*. El p-cresol sulfato fue uno de los metabolitos diferenciales detectados al realizar esta comparación [299] con menor abundancia en los ratones *germ-free*. Aunque el grupo ABX no sean ratones *germ-free*, la eliminación de su microbiota autóctona altera claramente la síntesis del metabolito p-cresol sulfato, mientras que los ratones que recibieron la microbiota humana recuperan la síntesis de este metabolito llevado a cabo por las bacterias.

También es destacable la diferencia que se observa en la abundancia de este metabolito entre el grupo control que fue alimentado con la dieta control durante todo el estudio (T103 CT) y el grupo control alimentado con la dieta rica en grasas (T103 HFD). Los niveles de p-cresol sulfato son menores en los ratones alimentados con la dieta control. Existe una relación bien establecida entre los niveles elevados de sulfato de p-cresol en sangre y la mortalidad por enfermedad cardiovascular [300] [301]. Los niveles de sulfato de p-cresol parecen estar correlacionados negativamente tanto con la potencia cardíaca máxima como con la capacidad de ejercicio aeróbico en pacientes varones con enfermedades renales crónicas. En las células epiteliales, se cree que el sulfato de p-cresol y el sulfato de indoxilo (un metabolito del triptófano producido a través de la fermentación bacteriana en el intestino) también inducen la transición epitelial a mesenquimal, lo que conduce a la fibrosis y la calcificación de los vasos [302]. La exposición de los ratones a la dieta HFD durante la fase de inducción de la obesidad eleva los niveles del p-cresol sulfato, haciendo más propensos a los ratones con sobrepeso a enfermedades metabólicas cardiovasculares y renales.

Otro de los metabolitos con mayor abundancia en el plasma de los ratones FMT es el MG(0:0/20:5/0:0). El MG(0:0/20:5/0:0) es un monoacilglicérido, más correctamente

conocido como monoacilglicerol. El monoacilglicerol puede dividirse en dos grupos: 1-monoacilgliceroles (o 3-monoacilgliceroles) y 2-monoacilgliceroles, dependiendo de la posición del enlace éster en la fracción de glicerol. Los 2-monoacilgliceroles son un importante producto final de la digestión intestinal de las grasas alimentarias en los animales a través de la enzima lipasa pancreática. Son absorbidos directamente por las células intestinales y convertidos en triacilgliceroles a través de la vía del monoacilglicerol antes de ser transportados en la linfa al hígado. En el caso de los ratones que no fueron tratados con antibiótico, los niveles de este metabolito son muy bajos. En grupo control ABX sin FMT tiene niveles superiores, no obstante, los 6 grupos FMT con muestras de microbiota humana tienen niveles aún superiores. En la literatura científica no hay ninguna relación descrita del metabolito MG(0:0/20:5/0:0) con una funcionalidad asociada a la microbiota intestinal.

Tras analizar los resultados expuestos, una de las principales conclusiones extraídas es que el metabolismo del ratón se ve claramente influenciado por la presencia de la microbiota humana y muchos de estos cambios se pueden cuantificar en alteración de vías metabólicas y abundancias diferenciales de metabolitos en particular como los descritos anteriormente. Algunas de estas vías metabólicas o metabolitos están estrechamente relacionadas con la funcionalidad de la microbiota intestinal. Estos resultados ayudan a demostrar que el trasplante fecal de la microbiota humana a un modelo animal no ayuda tan solo a colonizar el intestino del ratón con los microorganismos característicos del intestino humano, también muchas de las funcionalidades llevadas a cabo por estas bacterias se trasladan y se pueden cuantificar en el modelo animal.

No obstante, hay que puntualizar que se necesita más investigación para comprender los mecanismos de acción a través de los cuales la microbiota humana modifica el metabolismo del ratón al ser trasplantada al modelo animal.

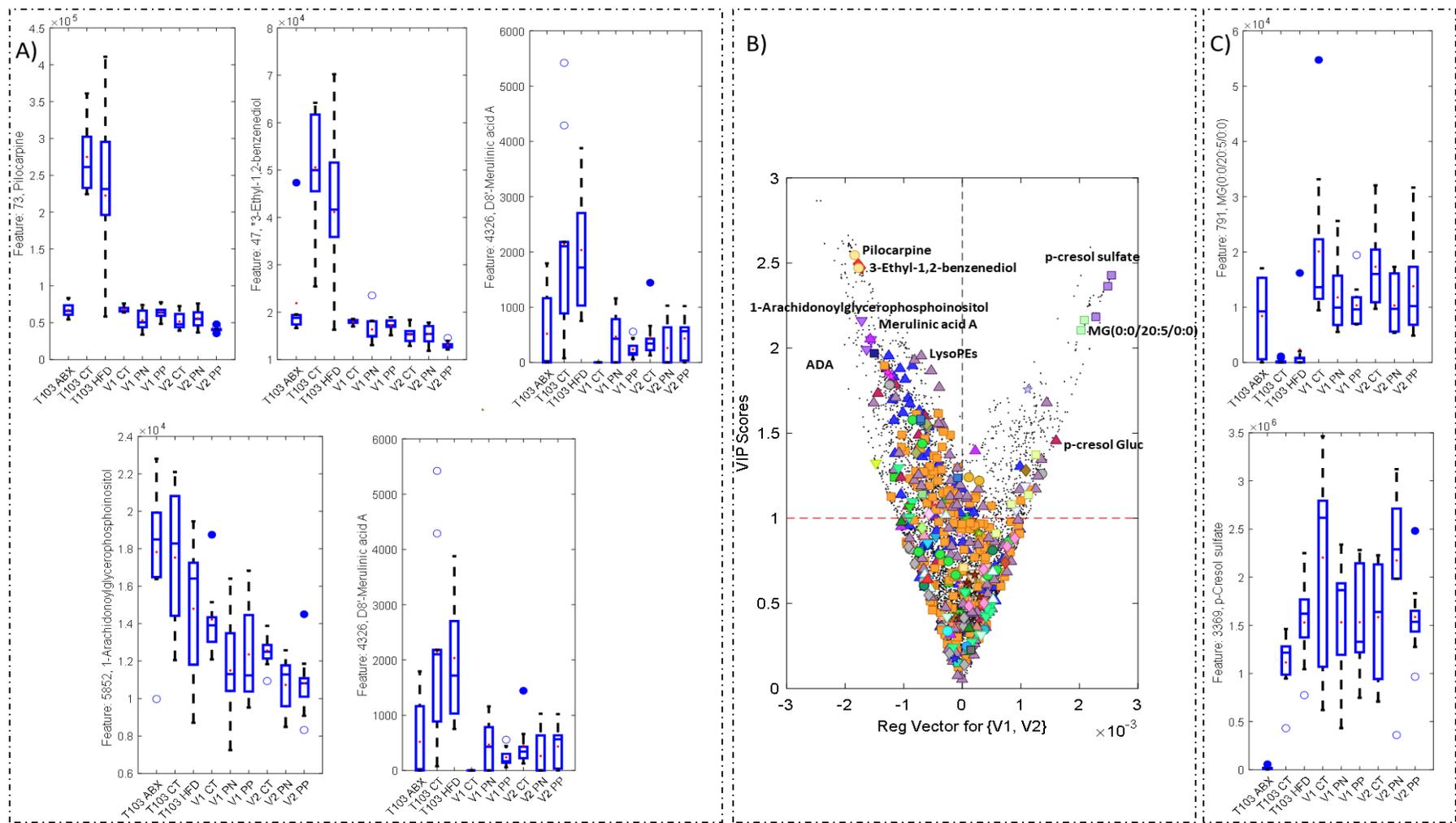


Figura 68 B) Valores de la puntuación VIP y del vector de regresión en el modelo PLS-DA; A, C) Boxplots que muestran la distribución de los valores de los metabolitos anotados seleccionados con mayores valores VIP en el modelo PLS-DA. A) Mayor abundancia en las muestras que no recibieron FMT C) Mayor abundancia en las muestras que recibieron FMT. Esta figura proporciona información sobre los metabolitos que contribuyen a la diferenciación entre las muestras que recibieron y no recibieron FMT, lo que permite una mejor comprensión de los cambios metabólicos asociados con el trasplante de microbiota y sus posibles implicaciones en la salud del huésped.

CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

A continuación, se presentan las principales conclusiones extraídas de la ejecución de esta tesis doctoral. En cuanto al primer capítulo de esta tesis que incluye el análisis de microbioma intestinal en 3 pilotos de intervención, las conclusiones más destacadas son las siguientes:

1. Se identificaron posibles biomarcadores de obesidad en la cohorte de análisis con el modelo PLS-DA, incluyendo a *Christensenellaceae R-7 group*, *Lachnoclostridium*, y varias especies de *Ruminococcaceae* y *Coprococcus*.
2. Se encontraron asociaciones y patrones en el análisis conjunto de datos del microbioma y metaboloma, con correlaciones significativas entre géneros bacterianos y valores metabolómicos.
3. La intervención dietética en el piloto de Reino Unido tuvo un mayor impacto en el aumento de la diversidad de la microbiota intestinal.
4. Las diferencias en la composición de la microbiota intestinal se asocian con el sexo y el IMC de los voluntarios.
5. En el estudio de intervención de España, no se observaron cambios significativos en la diversidad bacteriana ni en la composición (beta diversidad) entre intervenciones.
6. En el estudio de intervención polaco, se observó una tendencia hacia un incremento en la alfa diversidad al final de las intervenciones nutricionales, pero sin diferencias estadísticamente significativas.
7. En el estudio de intervención de Reino Unido, se observó un aumento en la alfa diversidad después de las intervenciones, aunque no se encontraron diferencias estadísticamente significativas.
8. Las intervenciones personalizadas mostraron un desempeño similar en la modulación general de la microbiota en los distintos pilotos, pero no se observaron cambios significativos en la beta diversidad tras las intervenciones nutricionales.
9. Un estado basal más alterado de los voluntarios podría favorecer la observación de cambios positivos en la microbiota, como sucedió en el piloto polaco y en el piloto de Reino Unido, pero no en el piloto español.

Las principales conclusiones asociadas al segundo capítulo de esta tesis son:

1. La transferencia de microbiota humana a ratones es factible, pero las OTUs humanas en la microbiota del ratón tienden a disminuir con el tiempo después de una sola administración de FMT.
2. Algunos géneros bacterianos humanos se adaptan mejor al intestino del ratón y pueden mantener una abundancia relativa similar a las muestras humanas durante 4 semanas.
3. Los análisis de beta diversidad muestran cambios en la composición de la microbiota a lo largo del tiempo, siendo el día 17 (2 días después del FMT) el punto con mayores diferencias en comparación con el estado basal de los ratones.
4. El modelo predictivo de Random Forest logra clasificar las muestras según su grupo de estudio con una precisión del 90%, lo que refuerza la hipótesis de que tanto el trasplante fecal como el tratamiento con antibiótico tienen un efecto diferencial en la modificación de la microbiota intestinal de los ratones.
5. La estrategia de una única inoculación puede no ser suficiente para mantener un alto porcentaje de humanización de la microbiota en el modelo animal. Serían necesarios más estudios para determinar la dosis óptima de FMT y la relación entre las dosis de FMT y la estabilidad de la microbiota del donante.
6. La transferencia de bacterias humanas a modelos animales es esencial para garantizar la relevancia y aplicabilidad de los resultados obtenidos en investigaciones relacionadas con la microbiota intestinal y la salud humana.
7. Se requiere de una o varias reinoculaciones para mantener una composición "humanizada" de la microbiota en el modelo animal PGF.

Las conclusiones del tercer capítulo asociadas al cambio en el fenotipo de los modelos animales a través del trasplante de microbiota humana del proyecto PREVENTOMICS se muestran a continuación:

1. La personalización de la dieta no aporta un efecto diferenciador en cuanto a la evolución del peso de los animales, y la pérdida de peso parece ser inducida principalmente por el cambio de la dieta y no por el cambio de la microbiota a través del FMT realizado.

2. La dieta ingerida por los animales es el factor de mayor impacto en la modificación de los parámetros asociados a la obesidad, más que el FMT.
3. Los trasplantes fecales realizados antes y después de la intervención no influyeron en la acumulación de grasa en el hígado ni en los marcadores asociados a sobrepeso y obesidad.
4. A nivel del análisis composicional de la microbiota intestinal de los ratones trasplantados, el grupo CT es el único que presenta una diferencia significativa entre las muestras V1 y V2 al analizar la beta diversidad mediante la métrica Bray Curtis.
5. La estabilización de la microbiota trasplantada se alcanza en el día 96 del experimento.
6. No todas las familias bacterianas se trasplantan del mismo modo, y algunas familias bacterianas presentan una mayor adaptación al intestino de ratón.
7. Se observaron transferencia de OTUs de los géneros *Lachnoclostridium* y *Roseburia*, relacionados con la obesidad, de la microbiota humana a las muestras del modelo de ratón.
8. Los cambios en el microbioma inducidos por las dietas de intervención en los voluntarios condujeron a un cambio homogéneo en los perfiles metabólicos de los ratones tras el FMT, independientemente del tipo de intervención dietética.
9. Los cambios en la dieta tienen un impacto significativo en el metabolismo de los ratones sometidos a FMT, lo que podría tener implicaciones en la salud intestinal, la prevención de enfermedades cardiovasculares y metabólicas.
10. El análisis PLS-DA demuestra una separación clara entre los grupos V1 y V2 en todos los grupos dietéticos (CT, PN y PP).
11. El FMT de muestras humanas induce cambios significativos en el metaboloma de los ratones, diferenciándose claramente del metaboloma de los ratones no trasplantados. Las rutas metabólicas más afectadas en los ratones trasplantados con microbiota humana están relacionadas con el metabolismo proteico, la biosíntesis de esteroides y el metabolismo del retinol o vitamina A.
12. Los ratones trasplantados con muestras humanas obtienen más energía de la dieta ingerida y presentan cambios en el metaboloma que podrían estar relacionados con la salud intestinal y metabólica del huésped, como el aumento de los niveles de sulfato de p-Cresol.

BIBLIOGRAFÍA

6. BIBLIOGRAFÍA

- [1] A. Woolfson, “Origins of life: An improbable journey,” *Nat. 2015 5207549*, vol. 520, no. 7549, pp. 617–618, Apr. 2015.
- [2] T. W. Lyons, C. T. Reinhard, and N. J. Planavsky, “The rise of oxygen in Earth’s early ocean and atmosphere,” *Nat. 2014 5067488*, vol. 506, no. 7488, pp. 307–315, Feb. 2014.
- [3] S. L. Schnorr, K. Sankaranarayanan, C. M. Lewis, and C. Warinner, “Insights into human evolution from ancient and contemporary microbiome studies,” *Curr. Opin. Genet. Dev.*, vol. 41, p. 14, Dec. 2016.
- [4] G. Berg *et al.*, “Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges,” *Microbiome*, vol. 8, no. 1, pp. 1–22, Jun. 2020.
- [5] J. K. Goodrich, E. R. Davenport, A. G. Clark, and R. E. Ley, “The relationship between the human genome and microbiome comes into view,” *Annu. Rev. Genet.*, vol. 51, p. 413, Nov. 2017.
- [6] M. S. Kennedy and E. B. Chang, “The microbiome: composition and locations,” *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.*, vol. 176, p. 1, Jan. 2020.
- [7] I. Cho and M. J. Blaser, “The human microbiome: At the interface of health and disease,” *Nat. Rev. Genet.*, vol. 13, no. 4, pp. 260–270, Apr. 2012.
- [8] G. Kim *et al.*, “Delayed Establishment of Gut Microbiota in Infants Delivered by Cesarean Section,” *Front. Microbiol.*, vol. 11, p. 2099, Sep. 2020.
- [9] D. Ríos-Covian, P. Langella, and R. Martín, “From Short- to Long-Term Effects of C-Section Delivery on Microbiome Establishment and Host Health,” *Microorganisms*, vol. 9, no. 10, Oct. 2021.
- [10] N. A. Cho *et al.*, “C-section birth increases offspring obesity risk dependent on maternal diet and obesity status in rats,” *Obesity (Silver Spring)*, vol. 29, no. 10, pp. 1664–1675, Oct. 2021.
- [11] K. A. Martinez *et al.*, “Increased weight gain by C-section: Functional significance of the primordial microbiome,” *Sci. Adv.*, vol. 3, no. 10, Oct. 2017.
- [12] L. W. J. van den Elsen, J. Garssen, R. Burcelin, and V. Verhasselt, “Shaping the gut microbiota by breastfeeding: The gateway to allergy prevention?,” *Front. Pediatr.*, vol. 7, no. FEB, p. 47, 2019.
- [13] D. Zheng, T. Liwinski, and E. Elinav, “Interaction between microbiota and immunity in health and disease,” *Cell Res. 2020 306*, vol. 30, no. 6, pp. 492–506, May 2020.
- [14] N. Kamada, G. Y. Chen, N. Inohara, and G. Núñez, “Control of Pathogens and Pathobionts by the Gut Microbiota,” *Nat. Immunol.*, vol. 14, no. 7, p. 685, Jul. 2013.
- [15] C. L. Williams, N. Garcia-Reyero, C. J. Martyniuk, C. W. Tubbs, and J. H. Bisesi, “Regulation of endocrine systems by the microbiome: Perspectives from comparative animal models,” *Gen. Comp. Endocrinol.*, vol. 292, p. 113437, Jun. 2020.
- [16] K. Ding, F. Hua, and W. Ding, “Gut Microbiome and Osteoporosis,” *Aging Dis.*, vol. 11, no. 2, p. 438, Mar. 2020.
- [17] R. a. Riedl, S. N. Atkinson, C. M. L. Burnett, J. L. Grobe, and J. R. Kirby, “The Gut Microbiome, Energy Homeostasis, and Implications for Hypertension,” *Curr. Hypertens. Rep.*, vol. 19, no. 4, p. 27, 2017.
- [18] V. T. Pham, S. Dold, A. Rehman, J. K. Bird, and R. E. Steinert, “Vitamins, the gut microbiome and gastrointestinal health in humans,” *Nutr. Res.*, vol. 95, pp. 35–53, Nov. 2021.

- [19] Z.-H. Geng, Y. Zhu, Q.-L. Li, C. Zhao, and P.-H. Zhou, “Enteric Nervous System: The Bridge Between the Gut Microbiota and Neurological Disorders.,” *Front. Aging Neurosci.*, vol. 14, p. 810483, Apr. 2022.
- [20] S. a Joyce and C. G. M. Gahan, “Bile Acids and the Gut Liver Axis Disease-Associated Changes in Bile Acid Profiles and Links to Altered Gut Microbiota,” *Dig Dis*, vol. 35, pp. 169–177, 2017.
- [21] T. Kitai, J. Kirsop, and W. H. W. Tang, “Exploring the Microbiome in Heart Failure,” *Curr. Heart Fail. Rep.*, vol. 13, no. 2, pp. 103–109, 2016.
- [22] V. B. Young and T. M. Schmidt, “Overview of the Gastrointestinal Microbiota,” *Adv. Exp. Med. Biol.*, vol. 635, p. 29, 2008.
- [23] J. Qin *et al.*, “A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing,” *Nat. 2010 4647285*, vol. 464, no. 7285, pp. 59–65, 2010.
- [24] A. Metwaly *et al.*, “Integrated microbiota and metabolite profiles link Crohn’s disease to sulfur metabolism,” *Nat. Commun. 2020 111*, vol. 11, no. 1, pp. 1–15, Aug. 2020.
- [25] R. H. Mills *et al.*, “Multi-omics analyses of the ulcerative colitis gut microbiome link *Bacteroides vulgatus* proteases with disease severity,” *Nat. Microbiol. 2022 72*, vol. 7, no. 2, pp. 262–276, Jan. 2022.
- [26] A. Tarasiuk, P. Mosińska, and J. Fichna, “The mechanisms linking obesity to colon cancer: An overview,” *Obes. Res. Clin. Pract.*, pp. 1–13, 2018.
- [27] P. Zheng, Z. Li, and Z. Zhou, “Gut microbiome in type 1 diabetes: A comprehensive review,” *Diabetes. Metab. Res. Rev.*, vol. 34, no. 7, Oct. 2018.
- [28] J. Ma and H. Li, “The Role of Gut Microbiota in Atherosclerosis and Hypertension,” *Front. Pharmacol.*, vol. 9, no. SEP, Sep. 2018.
- [29] A. Mehra *et al.*, “Gut microbiota and Autism Spectrum Disorder: From pathogenesis to potential therapeutic perspectives,” *J. Tradit. Complement. Med.*, Mar. 2022.
- [30] T. Shen *et al.*, “The Association Between the Gut Microbiota and Parkinson’s Disease, a Meta-Analysis,” *Front. Aging Neurosci.*, vol. 13, p. 40, Feb. 2021.
- [31] L. H. Morais, H. L. Schreiber, and S. K. Mazmanian, “The gut microbiota–brain axis in behaviour and brain disorders,” *Nat. Rev. Microbiol. 2020 194*, vol. 19, no. 4, pp. 241–255, Oct. 2020.
- [32] Z. Li *et al.*, “Gut Microbiota and Liver Fibrosis: One Potential Biomarker for Predicting Liver Fibrosis,” *Biomed Res. Int.*, vol. 2020, 2020.
- [33] Z. Tamanai-Shacoori *et al.*, “Roseburia spp.: a marker of health?,” *Future Microbiol.*, vol. 12, no. 2, pp. 157–170, Feb. 2017.
- [34] M. Blüher, “Obesity: global epidemiology and pathogenesis,” *Nat. Rev. Endocrinol. 2019 155*, vol. 15, no. 5, pp. 288–298, Feb. 2019.
- [35] World Health Organization, “WHO | Obesity and overweight,” *Fact sheet N°311*, 2017. .
- [36] K. K. Tsilidis, J. C. Kasimis, D. S. Lopez, E. E. Ntzani, and J. P. A. Ioannidis, “Type 2 diabetes and cancer: Umbrella review of meta-analyses of observational studies,” *BMJ*, vol. 350, no. January, pp. 1–11, 2015.
- [37] T. M. Powell-Wiley *et al.*, “Obesity and Cardiovascular Disease: A Scientific Statement From the American Heart Association,” *Circulation*, vol. 143, pp. E984–E1010, May 2021.
- [38] B. A. Peters *et al.*, “A taxonomic signature of obesity in a large study of American adults,” *Sci. Reports 2018 81*, vol. 8, no. 1, pp. 1–13, Jun. 2018.
- [39] Ö. Aydin, M. Nieuwdorp, and V. Gerdes, “The Gut Microbiome as a Target for the Treatment of Type 2 Diabetes,” *Curr. Diab. Rep.*, vol. 18, no. 8, Aug. 2018.

- [40] P. D. Cani, M. Osto, L. Geurts, and A. Everard, “Involvement of gut microbiota in the development of low-grade inflammation and type 2 diabetes associated with obesity,” *Gut Microbes*, vol. 3, no. 4, pp. 279–88, 2012.
- [41] C. L *et al.*, “Prevotella Abundance Predicts Weight Loss Success in Healthy, Overweight Adults Consuming a Whole-Grain Diet Ad Libitum: A Post Hoc Analysis of a 6-Wk Randomized Controlled Trial,” *J. Nutr.*, vol. 149, no. 12, pp. 2174–2181, Dec. 2019.
- [42] M. J. A. Saad, A. Santos, and P. O. Prada, “Linking gut microbiota and inflammation to obesity and insulin resistance,” *Physiology*, vol. 31, no. 4, pp. 283–293, 2016.
- [43] S. Wang *et al.*, “Gut microbiota mediates the anti-obesity effect of calorie restriction in mice,” *Sci. Rep.*, vol. 8, no. 1, Dec. 2018.
- [44] H. Yao *et al.*, “Effects of gut microbiota on leptin expression and body weight are lessened by high-fat diet in mice,” *Br. J. Nutr.*, vol. 124, no. 4, pp. 396–406, 2020.
- [45] D. Pérez-Reytor, C. Puebla, E. Karahanian, and K. García, “Use of Short-Chain Fatty Acids for the Recovery of the Intestinal Epithelial Barrier Affected by Bacterial Toxins,” *Front. Physiol.*, vol. 12, p. 650313, May 2021.
- [46] C. Demigné, C. Morand, M.-A. Levrat, C. Besson, C. Moundras, and C. Rémésy, “Effect of propionate on fatty acid and cholesterol synthesis and on acetate metabolism in isolated rat hepatocytes,” *Br. J. Nutr.*, vol. 74, no. 2, pp. 209–219, Aug. 1995.
- [47] C. Brütting, M. Lara Bisch, C. Brandsch, F. Hirche, and G. I. Stangl, “Impact of dietary propionate on fructose-induced changes in lipid metabolism, gut microbiota and short-chain fatty acids in mice,” <https://doi.org/10.1080/09637486.2020.1773415>, vol. 72, no. 2, pp. 160–173, 2020.
- [48] B. K. Beh *et al.*, “Anti-obesity and anti-inflammatory effects of synthetic acetic acid vinegar and Nipa vinegar on high-fat-diet-induced obese mice,” *Sci. Reports 2017 71*, vol. 7, no. 1, pp. 1–9, Jul. 2017.
- [49] C. D. Davis, “The Gut Microbiome and Its Role in Obesity,” *Nutr. Today*, vol. 51, no. 4, p. 167, 2016.
- [50] B. F *et al.*, “The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 101, no. 44, pp. 15718–15723, Nov. 2004.
- [51] J. L. Waters and R. E. Ley, “The human gut bacteria Christensenellaceae are widespread, heritable, and associated with health,” *BMC Biol. 2019 171*, vol. 17, no. 1, pp. 1–11, Oct. 2019.
- [52] L. K. Brahe, A. Astrup, and L. H. Larsen, “Can We Prevent Obesity-Related Metabolic Diseases by Dietary Modulation of the Gut Microbiota?,” *Adv. Nutr.*, vol. 7, no. 1, pp. 90–101, Jan. 2016.
- [53] B. J. Parker, P. A. Wearsch, A. C. M. Veloo, and A. Rodriguez-Palacios, “The Genus *Alistipes*: Gut Bacteria With Emerging Implications to Inflammation, Cancer, and Mental Health,” *Front. Immunol.*, vol. 11, p. 906, Jun. 2020.
- [54] P. D. Cani, “Human gut microbiome: hopes, threats and promises,” *Gut*, vol. 67, no. 9, pp. 1716–1725, Sep. 2018.
- [55] J. F. Cryan and T. G. Dinan, “Mind-altering microorganisms: the impact of the gut microbiota on brain and behaviour,” *Nat. Rev. Neurosci.*, vol. 13, no. 10, pp. 701–712, Oct. 2012.
- [56] T. L. A. Nguyen, S. Vieira-Silva, A. Liston, and J. Raes, “How informative is the

- mouse for human gut microbiota research?," *Dis. Model. Mech.*, vol. 8, no. 1, pp. 1–16, Jan. 2015.
- [57] H. Verhoeckx, K. Cotter, P. López-Expósito, I. Kleiveland, C., Lea, T., Mackie, A., Requena, T., Swiatecka, D., Wichers, *The Impact of Food Bioactives on Health: In Vitro and Ex Vivo Models*. 2015.
- [58] J. M. Auchtung, C. D. Robinson, and R. A. Britton, "Cultivation of stable, reproducible microbial communities from different fecal donors using minibioreactor arrays (MBRAs)," *Microbiome*, vol. 3, no. 1, p. 42, Dec. 2015.
- [59] D. Ulluwishewa *et al.*, "Live Faecalibacterium prausnitzii in an apical anaerobic model of the intestinal epithelial barrier," *Cell. Microbiol.*, vol. 17, no. 2, pp. 226–240, 2015.
- [60] M. Marzorati *et al.*, "The HMITM module: a new tool to study the Host-Microbiota Interaction in the human gastrointestinal tract in vitro.," *BMC Microbiol.*, vol. 14, p. 133, May 2014.
- [61] M. Sadaghian Sadabad *et al.*, "A simple coculture system shows mutualism between anaerobic faecalibacteria and epithelial Caco-2 cells," *Sci. Rep.*, vol. 5, no. 1, p. 17906, Nov. 2016.
- [62] H. J. Kim, D. Huh, G. Hamilton, and D. E. Ingber, "Human gut-on-a-chip inhabited by microbial flora that experiences intestinal peristalsis-like motions and flow," *Lab Chip*, vol. 12, no. 12, p. 2165, 2012.
- [63] P. Shah *et al.*, "A microfluidics-based in vitro model of the gastrointestinal human–microbe interface," *Nat. Commun.*, vol. 7, p. 11535, May 2016.
- [64] A. D. Kostic, M. R. Howitt, and W. S. Garrett, "Exploring host-microbiota interactions in animal models and humans.," *Genes Dev.*, vol. 27, no. 7, pp. 701–18, Apr. 2013.
- [65] C. K. Chun *et al.*, "Effects of colonization, luminescence, and autoinducer on host transcription during development of the squid-vibrio association.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 105, no. 32, pp. 11323–8, Aug. 2008.
- [66] J. A. Chandler, J. M. Lang, S. Bhatnagar, J. A. Eisen, and A. Kopp, "Bacterial communities of diverse Drosophila species: ecological context of a host-microbe model system.," *PLoS Genet.*, vol. 7, no. 9, p. e1002272, Sep. 2011.
- [67] C. L. Maynard, C. O. Elson, R. D. Hatton, and C. T. Weaver, "Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system.," *Nature*, vol. 489, no. 7415, pp. 231–41, Sep. 2012.
- [68] A. Spor, O. Koren, and R. Ley, "Unravelling the effects of the environment and host genotype on the gut microbiome," *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 9, no. 4, pp. 279–290, 2011.
- [69] E. C. Rose, A. T. Blikslager, and A. L. Ziegler, "Porcine Models of the Intestinal Microbiota: The Translational Key to Understanding How Gut Commensals Contribute to Gastrointestinal Disease," *Front. Vet. Sci.*, vol. 9, p. 330, Mar. 2022.
- [70] J. M. Brenchley and A. M. Ortiz, "Microbiome Studies in Non-human Primates," *Curr. HIV/AIDS Rep.*, vol. 18, no. 6, pp. 527–537, Dec. 2021.
- [71] A. D. Kostic, M. R. Howitt, and W. S. Garrett, "Exploring host-microbiota interactions in animal models and humans," *Genes Dev.*, vol. 27, no. 7, pp. 701–718, Apr. 2013.
- [72] C. Reinhardt *et al.*, "Tissue factor and PAR1 promote microbiota-induced intestinal vascular remodelling.," *Nature*, vol. 483, no. 7391, pp. 627–31, Mar. 2012.
- [73] K. Sjögren *et al.*, "The gut microbiota regulates bone mass in mice.," *J. Bone*

- Miner. Res.*, vol. 27, no. 6, pp. 1357–67, Jun. 2012.
- [74] M. I. Smith *et al.*, “Gut microbiomes of Malawian twin pairs discordant for kwashiorkor,” *Science*, vol. 339, no. 6119, pp. 548–54, Feb. 2013.
- [75] D. H. Dapito *et al.*, “Promotion of hepatocellular carcinoma by the intestinal microbiota and TLR4,” *Cancer Cell*, vol. 21, no. 4, pp. 504–16, Apr. 2012.
- [76] L. V Hooper, D. R. Littman, and A. J. Macpherson, “Interactions between the microbiota and the immune system,” *Science*, vol. 336, no. 6086, pp. 1268–73, Jun. 2012.
- [77] L. Krych, C. H. F. Hansen, A. K. Hansen, F. W. J. van den Berg, and D. S. Nielsen, “Quantitatively Different, yet Qualitatively Alike: A Meta-Analysis of the Mouse Core Gut Microbiome with a View towards the Human Gut Microbiome,” *PLoS One*, vol. 8, no. 5, May 2013.
- [78] B. S. Beresford-Jones *et al.*, “The Mouse Gastrointestinal Bacteria Catalogue enables translation between the mouse and human gut microbiotas via functional mapping,” *Cell Host Microbe*, vol. 30, no. 1, pp. 124-138.e8, Jan. 2022.
- [79] L. Valiquette and K. B. Laupland, “Something old, something new, something borrowed...,” *Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol.*, vol. 24, no. 2, p. 63, 2013.
- [80] J. Czepiel *et al.*, “Mortality Following Clostridioides difficile Infection in Europe: A Retrospective Multicenter Case-Control Study,” *Antibiotics*, vol. 10, no. 3, Mar. 2021.
- [81] M. C. Zanella Terrier, M. L. Simonet, P. Bichard, and J. L. Frossard, “Recurrent Clostridium difficile infections: The importance of the intestinal microbiota,” *World J. Gastroenterol.*, vol. 20, no. 23, p. 7416, Jun. 2014.
- [82] E. van Nood *et al.*, “Duodenal infusion of donor feces for recurrent Clostridium difficile,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 368, no. 5, pp. 407–415, Jan. 2013.
- [83] C. L. Hvas *et al.*, “Fecal Microbiota Transplantation Is Superior to Fidaxomicin for Treatment of Recurrent Clostridium difficile Infection,” *Gastroenterology*, vol. 156, no. 5, pp. 1324-1332.e3, Apr. 2019.
- [84] S. Vermeire *et al.*, “Donor Species Richness Determines Faecal Microbiota Transplantation Success in Inflammatory Bowel Disease,” *J. Crohns. Colitis*, vol. 10, no. 4, pp. 387–394, Apr. 2016.
- [85] B. P. Vaughn *et al.*, “Increased Intestinal Microbial Diversity following Fecal Microbiota Transplant for Active Crohn’s Disease,” *Inflamm. Bowel Dis.*, vol. 22, no. 9, p. 2182, Aug. 2016.
- [86] N. G. Rossen *et al.*, “Findings From a Randomized Controlled Trial of Fecal Transplantation for Patients With Ulcerative Colitis,” *Gastroenterology*, vol. 149, no. 1, pp. 110-118.e4, Jul. 2015.
- [87] D. Al-Ali *et al.*, “Fecal microbiota transplants: A review of emerging clinical data on applications, efficacy, and risks (2015–2020),” *Qatar Med. J.*, vol. 2021, no. 1, p. 5, Feb. 2021.
- [88] J. R. Allegretti *et al.*, “Impact of fecal microbiota transplantation with capsules on the prevention of metabolic syndrome among patients with obesity,” *Hormones*, vol. 20, no. 1, pp. 209–211, Mar. 2021.
- [89] E. A. Kennedy, K. Y. King, and M. T. Baldrige, “Mouse microbiota models: Comparing germ-free mice and antibiotics treatment as tools for modifying gut bacteria,” *Front. Physiol.*, vol. 9, no. OCT, p. 1534, Oct. 2018.
- [90] M. Yang *et al.*, “Involvement of gut microbiota in association between GLP-1/GLP-1 receptor expression and gastrointestinal motility,” *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, vol. 312, no. 4, pp. G367–G373, Apr. 2017.
- [91] K. J. Hintze *et al.*, “Broad scope method for creating humanized animal models

- for animal health and disease research through antibiotic treatment and human fecal transfer,” *Gut Microbes*, vol. 5, no. 2, pp. 183–191, Mar. 2014.
- [92] C. Eberl *et al.*, “Reproducible Colonization of Germ-Free Mice With the Oligo-Mouse-Microbiota in Different Animal Facilities,” *Front. Microbiol.*, vol. 10, Jan. 2020.
- [93] F. Bayer, S. Ascher, G. Pontarollo, and C. Reinhardt, “Antibiotic Treatment Protocols and Germ-Free Mouse Models in Vascular Research,” *Front. Immunol.*, vol. 10, p. 2174, Sep. 2019.
- [94] Z. Zákostelská *et al.*, “Intestinal Microbiota Promotes Psoriasis-Like Skin Inflammation by Enhancing Th17 Response,” *PLoS One*, vol. 11, no. 7, p. e0159539, Jul. 2016.
- [95] L. Wrzosek *et al.*, “Transplantation of human microbiota into conventional mice durably reshapes the gut microbiota,” *Sci. Rep.*, vol. 8, no. 1, Dec. 2018.
- [96] T. Le Roy *et al.*, “Comparative Evaluation of Microbiota Engraftment Following Fecal Microbiota Transfer in Mice Models: Age, Kinetic and Microbial Status Matter,” *Front. Microbiol.*, vol. 9, no. JAN, 2019.
- [97] G. Ferrere *et al.*, “Fecal microbiota manipulation prevents dysbiosis and alcohol-induced liver injury in mice,” *J. Hepatol.*, vol. 66, no. 4, pp. 806–815, Apr. 2017.
- [98] K. J. Hintze *et al.*, “Broad scope method for creating humanized animal models for animal health and disease research through antibiotic treatment and human fecal transfer,” *Gut Microbes*, vol. 5, no. 2, pp. 183–191, Mar. 2014.
- [99] V. Tremaroli *et al.*, “Roux-en-Y Gastric Bypass and Vertical Banded Gastroplasty Induce Long-Term Changes on the Human Gut Microbiome Contributing to Fat Mass Regulation,” *Cell Metab.*, vol. 22, no. 2, pp. 228–238, Aug. 2015.
- [100] J. K. Goodrich *et al.*, “Human genetics shape the gut microbiome,” *Cell*, vol. 159, no. 4, pp. 789–799, Nov. 2014.
- [101] V. K. Ridaura *et al.*, “Gut microbiota from twins discordant for obesity modulate metabolism in mice,” *Science*, vol. 341, no. 6150, 2013.
- [102] C. Staley *et al.*, “Stable engraftment of human microbiota into mice with a single oral gavage following antibiotic conditioning,” *Microbiome*, vol. 5, no. 1, p. 87, Aug. 2017.
- [103] K. J. Hintze *et al.*, “Broad scope method for creating humanized animal models for animal health and disease research through antibiotic treatment and human fecal transfer,” *Gut Microbes*, vol. 5, no. 2, p. 183, Mar. 2014.
- [104] B. Routy *et al.*, “Gut microbiome influences efficacy of PD-1-based immunotherapy against epithelial tumors,” *Science*, vol. 359, no. 6371, pp. 91–97, Jan. 2018.
- [105] E. Riquelme *et al.*, “Tumor Microbiome Diversity and Composition Influence Pancreatic Cancer Outcomes,” *Cell*, vol. 178, no. 4, pp. 795–806.e12, Aug. 2019.
- [106] X. Chen *et al.*, “Gut dysbiosis induces the development of pre-eclampsia through bacterial translocation,” *Gut*, vol. 69, no. 3, pp. 513–522, Mar. 2020.
- [107] J. Walter, A. M. Armet, B. B. Finlay, and F. Shanahan, “Establishing or Exaggerating Causality for the Gut Microbiome: Lessons from Human Microbiota-Associated Rodents,” *Cell*, vol. 180, no. 2, pp. 221–232, Jan. 2020.
- [108] E. Bolyen *et al.*, “Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2,” *Nature Biotechnology*, vol. 37, no. 8. Nature Publishing Group, pp. 852–857, 01-Aug-2019.
- [109] B. J. Callahan, P. J. McMurdie, M. J. Rosen, A. W. Han, A. J. A. Johnson, and S. P. Holmes, “DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon

- data,” *Nat. Methods*, vol. 13, no. 7, pp. 581–583, Jun. 2016.
- [110] K. Katoh, K. Misawa, K. I. Kuma, and T. Miyata, “MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 30, no. 14, pp. 3059–3066, Jul. 2002.
- [111] C. A. Lozupone, M. Hamady, S. T. Kelley, and R. Knight, “Quantitative and qualitative beta diversity measures lead to different insights into factors that structure microbial communities,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 73, no. 5, pp. 1576–1585, Mar. 2007.
- [112] P. Yilmaz *et al.*, “The SILVA and ‘All-species Living Tree Project (LTP)’ taxonomic frameworks,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 42, no. Database issue, Jan. 2014.
- [113] C. Liu, Y. Cui, X. Li, and M. Yao, “microeco: an R package for data mining in microbial community ecology,” *FEMS Microbiol. Ecol.*, vol. 97, no. 2, Jan. 2021.
- [114] P. J. McMurdie and S. Holmes, “phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data,” *PLoS One*, vol. 8, no. 4, p. e61217, Apr. 2013.
- [115] P. Dixon, “VEGAN, a package of R functions for community ecology,” *J. Veg. Sci.*, vol. 14, no. 6, pp. 927–930, Dec. 2003.
- [116] T. Rognes, T. Flouri, B. Nichols, C. Quince, and F. Mahé, “VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics,” *PeerJ*, vol. 4, no. 10, 2016.
- [117] D. Beck and J. A. Foster, “Machine learning techniques accurately classify microbial communities by bacterial vaginosis characteristics,” *PLoS One*, vol. 9, no. 2, Feb. 2014.
- [118] Y. S. Kim, T. Unno, B.-Y. Kim, and M.-S. Park, “Sex Differences in Gut Microbiota,” *World J. Mens. Health*, vol. 38, no. 1, p. 48, Jan. 2020.
- [119] T. MCB, G. RZ, S. M, G. L, F. AA, and L. M, “Interactions Between Stress and Sex in Microbial Responses Within the Microbiota-Gut-Brain Axis in a Mouse Model,” *Psychosom. Med.*, vol. 80, no. 4, pp. 361–369, May 2018.
- [120] D. H. Reikvam *et al.*, “Depletion of Murine Intestinal Microbiota: Effects on Gut Mucosa and Epithelial Gene Expression,” *PLoS One*, vol. 6, no. 3, p. e17996, Mar. 2011.
- [121] S. K. Kuss *et al.*, “Intestinal microbiota promote enteric virus replication and systemic pathogenesis,” *Science*, vol. 334, no. 6053, pp. 249–252, Oct. 2011.
- [122] S. Lario *et al.*, “Plasma sample based analysis of gastric cancer progression using targeted metabolomics,” *Sci. Reports 2017 71*, vol. 7, no. 1, pp. 1–10, Dec. 2017.
- [123] T. Martínez-Sena *et al.*, “Monitoring of system conditioning after blank injections in untargeted UPLC-MS metabolomic analysis,” *Sci. Rep.*, vol. 9, no. 1, Dec. 2019.
- [124] Á. Sánchez-Illana *et al.*, “Model selection for within-batch effect correction in UPLC-MS metabolomics using quality control - Support vector regression,” *Anal. Chim. Acta*, vol. 1026, pp. 62–68, Oct. 2018.
- [125] I. Ten-Doménech *et al.*, “Comparing Targeted vs. Untargeted MS 2 Data-Dependent Acquisition for Peak Annotation in LC-MS Metabolomics,” *Metabolites*, vol. 10, no. 4, Apr. 2020.
- [126] J. Kuligowski *et al.*, “Evaluation of the effect of chance correlations on variable selection using Partial Least Squares-Discriminant Analysis,” *Talanta*, vol. 116, pp. 835–840, 2013.
- [127] E. Szymańska, E. Saccenti, A. K. Smilde, and J. A. Westerhuis, “Double-check: validation of diagnostic statistics for PLS-DA models in metabolomics studies,” *Metabolomics*, vol. 8, no. Suppl 1, pp. 3–16, Jun. 2012.

- [128] J. G. Caporaso *et al.*, “QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data.,” *Nat. Methods*, vol. 7, no. 5, pp. 335–6, May 2010.
- [129] D. Rothschild *et al.*, “Environment dominates over host genetics in shaping human gut microbiota,” *Nat. 2018 5557695*, vol. 555, no. 7695, pp. 210–215, Feb. 2018.
- [130] J. Gong *et al.*, “Gut Microbiota Characteristics of People with Obesity by Meta-Analysis of Existing Datasets,” *Nutrients*, vol. 14, no. 14, Jul. 2022.
- [131] J. K. Goodrich *et al.*, “Human genetics shape the gut microbiome,” *Cell*, vol. 159, no. 4, pp. 789–799, Nov. 2014.
- [132] A. Nogal *et al.*, “Circulating Levels of the Short-Chain Fatty Acid Acetate Mediate the Effect of the Gut Microbiome on Visceral Fat,” *Front. Microbiol.*, vol. 12, p. 1943, Jul. 2021.
- [133] T. Li *et al.*, “A novel faecal *Lachnoclostridium* marker for the non-invasive diagnosis of colorectal adenoma and cancer,” *Gut*, vol. 69, no. 7, pp. 1248–1257, Jul. 2020.
- [134] X. Y. Wang *et al.*, “Gut Microbial Profile in Patients with Pancreatic Cancer,” *Jundishapur J. Microbiol. 2022 154*, vol. 15, no. 4, Apr. 2022.
- [135] E. Yilmaz *et al.*, “*Lachnoclostridium* and Immune Inflamed Gene Expression Signature Association in Head & Neck Cancers,” *Int. J. Radiat. Oncol.*, vol. 112, no. 5, p. e37, Apr. 2022.
- [136] K. I. Avgerinos, N. Spyrou, C. S. Mantzoros, and M. Dalamaga, “Obesity and cancer risk: Emerging biological mechanisms and perspectives,” *Metabolism*, vol. 92, pp. 121–135, Mar. 2019.
- [137] J. C. Encarnação, A. M. Abrantes, A. S. Pires, and M. F. Botelho, “Revisit dietary fiber on colorectal cancer: butyrate and its role on prevention and treatment,” *Cancer Metastasis Rev.*, vol. 34, no. 3, pp. 465–478, Sep. 2015.
- [138] E. K. Wright, M. A. Kamm, S. M. Teo, M. Inouye, J. Wagner, and C. D. Kirkwood, “Recent advances in characterizing the gastrointestinal microbiome in Crohn’s disease: A systematic review,” *Inflamm. Bowel Dis.*, vol. 21, no. 6, pp. 1219–1228, Apr. 2015.
- [139] Y. P. Silva, A. Bernardi, and R. L. Frozza, “The Role of Short-Chain Fatty Acids From Gut Microbiota in Gut-Brain Communication,” *Front. Endocrinol. (Lausanne)*, vol. 11, p. 25, Jan. 2020.
- [140] A. P. Lakshmanan, S. Al Zaidan, D. K. Bangarusamy, S. Al-Shamari, W. Elhag, and A. Terranegra, “Increased Relative Abundance of *Ruminococcus* Is Associated With Reduced Cardiovascular Risk in an Obese Population,” *Front. Nutr.*, vol. 9, p. 849005, Apr. 2022.
- [141] L. Calderón-Pérez *et al.*, “Gut metagenomic and short chain fatty acids signature in hypertension: a cross-sectional study,” *Sci. Rep.*, vol. 10, no. 1, Dec. 2020.
- [142] B. A. Peters *et al.*, “A taxonomic signature of obesity in a large study of American adults,” *Sci. Reports 2018 81*, vol. 8, no. 1, pp. 1–13, Jun. 2018.
- [143] S. Murugesan *et al.*, “Study of the diversity and short-chain fatty acids production by the bacterial community in overweight and obese Mexican children,” *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, vol. 34, no. 7, pp. 1337–1346, Jul. 2015.
- [144] Y. P. Hou *et al.*, “Human Gut Microbiota Associated with Obesity in Chinese Children and Adolescents,” *Biomed Res. Int.*, vol. 2017, 2017.
- [145] S. Pisanu *et al.*, “Impact of a Moderately Hypocaloric Mediterranean Diet on the Gut Microbiota Composition of Italian Obese Patients,” *Nutr. 2020, Vol. 12, Page 2707*, vol. 12, no. 9, p. 2707, Sep. 2020.

- [146] Y. Lv, X. Qin, H. Jia, S. Chen, W. Sun, and X. Wang, “The association between gut microbiota composition and BMI in Chinese male college students, as analysed by next-generation sequencing,” *Br. J. Nutr.*, vol. 122, no. 9, pp. 986–995, Nov. 2019.
- [147] B. Wang *et al.*, “Altered Fecal Microbiota Correlates with Liver Biochemistry in Nonobese Patients with Non-alcoholic Fatty Liver Disease,” *Sci. Reports 2016 61*, vol. 6, no. 1, pp. 1–11, Aug. 2016.
- [148] Y. Yun *et al.*, “Fecal and blood microbiota profiles and presence of nonalcoholic fatty liver disease in obese versus lean subjects,” *PLoS One*, vol. 14, no. 3, p. e0213692, Mar. 2019.
- [149] L. Zhu *et al.*, “Characterization of gut microbiomes in nonalcoholic steatohepatitis (NASH) patients: A connection between endogenous alcohol and NASH,” *Hepatology*, vol. 57, no. 2, pp. 601–609, Feb. 2013.
- [150] A. Chávez-Carbajal *et al.*, “Gut Microbiota and Predicted Metabolic Pathways in a Sample of Mexican Women Affected by Obesity and Obesity Plus Metabolic Syndrome,” *Int. J. Mol. Sci. 2019, Vol. 20, Page 438*, vol. 20, no. 2, p. 438, Jan. 2019.
- [151] F. Ottosson *et al.*, “Connection Between BMI-Related Plasma Metabolite Profile and Gut Microbiota,” *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 103, no. 4, pp. 1491–1501, Apr. 2018.
- [152] M. Yasir *et al.*, “Comparison of the gut microbiota of people in France and Saudi Arabia,” *Nutr. Diabetes 2015 54*, vol. 5, no. 4, pp. e153–e153, Apr. 2015.
- [153] K. H. Allin *et al.*, “Aberrant intestinal microbiota in individuals with prediabetes,” *Diabetologia*, vol. 61, no. 4, pp. 810–820, Apr. 2018.
- [154] X. Yuan, R. Chen, K. L. McCormick, Y. Zhang, X. Lin, and X. Yang, “The role of the gut microbiota on the metabolic status of obese children,” *Microb. Cell Fact.*, vol. 20, no. 1, pp. 1–13, Dec. 2021.
- [155] J. Bai, Y. Hu, and D. W. Bruner, “Composition of gut microbiota and its association with body mass index and lifestyle factors in a cohort of 7–18 years old children from the American Gut Project,” *Pediatr. Obes.*, vol. 14, no. 4, p. e12480, Apr. 2019.
- [156] D. Reiman, B. T. Layden, and Y. Dai, “MiMeNet: Exploring microbiome-metabolome relationships using neural networks,” *PLoS Comput. Biol.*, vol. 17, no. 5, p. e1009021, May 2021.
- [157] Q. P. Nguyen *et al.*, “Associations between the gut microbiome and metabolome in early life,” *BMC Microbiol.*, vol. 21, no. 1, pp. 1–19, Dec. 2021.
- [158] H. K. Pedersen *et al.*, “Human gut microbes impact host serum metabolome and insulin sensitivity,” *Nature*, vol. 535, no. 7612, pp. 376–381, 2016.
- [159] Z. Z. Tang *et al.*, “Multi-omic analysis of the microbiome and metabolome in healthy subjects reveals microbiome-dependent relationships between diet and metabolites,” *Front. Genet.*, vol. 10, no. MAY, p. 454, 2019.
- [160] J. A. Bell *et al.*, “Sex differences in systemic metabolites at four life stages: cohort study with repeated metabolomics,” *BMC Med.*, vol. 19, no. 1, pp. 1–13, Dec. 2021.
- [161] M. K. Vester-Andersen *et al.*, “Increased abundance of proteobacteria in aggressive Crohn’s disease seven years after diagnosis,” *Sci. Rep.*, vol. 9, no. 1, Dec. 2019.
- [162] M. J. Claesson *et al.*, “Composition, variability, and temporal stability of the intestinal microbiota of the elderly,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 108, no. SUPPL. 1, pp. 4586–4591, Mar. 2011.

- [163] H. Kawasuji *et al.*, “Bacteremia caused by *Slackia exigua*: A report of two cases and literature review,” *J. Infect. Chemother.*, vol. 26, no. 1, pp. 119–123, Jan. 2020.
- [164] K. S. Kim *et al.*, “Characterization of *Slackia exigua* Isolated from Human Wound Infections, Including Abscesses of Intestinal Origin,” *J. Clin. Microbiol.*, vol. 48, no. 4, p. 1070, Apr. 2010.
- [165] O. Castaner *et al.*, “The Gut Microbiome Profile in Obesity: A Systematic Review,” *Int. J. Endocrinol.*, vol. 2018, 2018.
- [166] C. Hidalgo-Cantabrana, S. Delgado, L. Ruiz, P. Ruas-Madiedo, B. Sánchez, and A. Margolles, “Bifidobacteria and Their Health-Promoting Effects,” *Microbiol. Spectr.*, vol. 5, no. 3, May 2017.
- [167] Y. Okada *et al.*, “Anti-inflammatory effects of the genus *Bifidobacterium* on macrophages by modification of phospho-I κ B and SOCS gene expression,” *Int. J. Exp. Pathol.*, vol. 90, no. 2, p. 131, Apr. 2009.
- [168] C. U. Riedel, F. Foata, D. Philippe, O. Adolfsson, B. J. Eikmanns, and S. Blum, “Anti-inflammatory effects of bifidobacteria by inhibition of LPS-induced NF- κ B activation,” *World J. Gastroenterol.*, vol. 12, no. 23, p. 3729, Jun. 2006.
- [169] O. Björkqvist *et al.*, “Alterations in the relative abundance of *Faecalibacterium prausnitzii* correlate with changes in fecal calprotectin in patients with ileal Crohn’s disease: a longitudinal study,” *Scand. J. Gastroenterol.*, vol. 54, no. 5, pp. 577–585, May 2019.
- [170] H. Sokol *et al.*, “*Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 105, no. 43, pp. 16731–16736, Oct. 2008.
- [171] E. Quévrain *et al.*, “Identification of an anti-inflammatory protein from *Faecalibacterium prausnitzii*, a commensal bacterium deficient in Crohn’s disease,” *Gut*, vol. 65, no. 3, pp. 415–425, Mar. 2016.
- [172] D. Rios-Covian, M. Gueimonde, S. H. Duncan, H. J. Flint, and C. G. De Los Reyes-Gavilan, “Enhanced butyrate formation by cross-feeding between *Faecalibacterium prausnitzii* and *Bifidobacterium adolescentis*,” *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 362, no. 21, p. 176, Nov. 2015.
- [173] D. E. Serban, “Microbiota in inflammatory bowel disease pathogenesis and therapy: Is it all about diet?,” *Nutrition in Clinical Practice*, vol. 30, no. 6. SAGE Publications Inc., pp. 760–779, 01-Dec-2015.
- [174] X. Liu *et al.*, “*Blautia*—a new functional genus with potential probiotic properties?,” *Gut Microbes*, vol. 13, no. 1, pp. 1–21, 2021.
- [175] H. Zafar and M. H. Saier, “Gut *Bacteroides* species in health and disease,” *Gut Microbes*, vol. 13, no. 1, pp. 1–20, 2021.
- [176] A. M. Patterson *et al.*, “Human gut symbiont *Roseburia hominis* promotes and regulates innate immunity,” *Front. Immunol.*, vol. 8, no. SEP, p. 26, Sep. 2017.
- [177] C. De Filippo *et al.*, “Diet, Environments, and Gut Microbiota. A Preliminary Investigation in Children Living in Rural and Urban Burkina Faso and Italy,” *Front. Microbiol.*, vol. 8, no. OCT, Oct. 2017.
- [178] F. De Filippis *et al.*, “Distinct Genetic and Functional Traits of Human Intestinal *Prevotella copri* Strains Are Associated with Different Habitual Diets,” *Cell Host Microbe*, vol. 0, no. 0, Feb. 2019.
- [179] G. Precup and D. C. Vodnar, “Gut *Prevotella* as a possible biomarker of diet and its eubiotic versus dysbiotic roles: a comprehensive literature review,” *Br. J. Nutr.*, vol. 122, no. 2, pp. 131–140, Jul. 2019.
- [180] P. J. Turnbaugh, “Microbes and Diet-Induced Obesity: Fast, Cheap, and Out of

- Control,” *Cell Host Microbe*, vol. 21, no. 3, pp. 278–281, 2017.
- [181] A. Woting and M. Blaut, “The intestinal microbiota in metabolic disease,” *Nutrients*, vol. 8, no. 4, 2016.
- [182] V. D. Badal *et al.*, “The Gut Microbiome, Aging, and Longevity: A Systematic Review,” *Nutrients*, vol. 12, no. 12, pp. 1–25, Dec. 2020.
- [183] S. Astbury, E. Atallah, A. Vijay, G. P. Aithal, J. I. Grove, and A. M. Valdes, “Lower gut microbiome diversity and higher abundance of proinflammatory genus *Collinsella* are associated with biopsy-proven nonalcoholic steatohepatitis,” *Gut Microbes*, vol. 11, no. 3, pp. 569–580, May 2020.
- [184] A. Cotillard *et al.*, “Dietary intervention impact on gut microbial gene richness,” *Nature*, vol. 500, no. 7464, pp. 585–588, 2013.
- [185] D. So *et al.*, “Dietary fiber intervention on gut microbiota composition in healthy adults: a systematic review and meta-analysis,” *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 107, no. 6, pp. 965–983, Jun. 2018.
- [186] C. H. Tseng and C. Y. Wu, “The gut microbiome in obesity,” *J. Formos. Med. Assoc.*, vol. 118, pp. S3–S9, Mar. 2019.
- [187] A. J. La Reau and G. Suen, “The Ruminococci: key symbionts of the gut ecosystem,” *J. Microbiol.*, vol. 56, no. 3, pp. 199–208, Mar. 2018.
- [188] A. B. Hall *et al.*, “A novel Ruminococcus *gnavus* clade enriched in inflammatory bowel disease patients,” *Genome Med.*, vol. 9, no. 1, Nov. 2017.
- [189] J. L. Waters and R. E. Ley, “The human gut bacteria Christensenellaceae are widespread, heritable, and associated with health,” *BMC Biol.* 2019 171, vol. 17, no. 1, pp. 1–11, Oct. 2019.
- [190] D. I. Bolnick *et al.*, “Individual diet has sex-dependent effects on vertebrate gut microbiota,” *Nat. Commun.* 2014 51, vol. 5, no. 1, pp. 1–13, Jul. 2014.
- [191] M. A. Stanislowski *et al.*, “The Gut Microbiota during a Behavioral Weight Loss Intervention,” *Nutrients*, vol. 13, no. 9, Sep. 2021.
- [192] C. Gutiérrez-Repiso *et al.*, “Different Weight Loss Intervention Approaches Reveal a Lack of a Common Pattern of Gut Microbiota Changes,” *J. Pers. Med.*, vol. 11, no. 2, pp. 1–17, Feb. 2021.
- [193] G. K. Fragiadakis, H. C. Wastyk, J. L. Robinson, E. D. Sonnenburg, J. L. Sonnenburg, and C. D. Gardner, “Long-term dietary intervention reveals resilience of the gut microbiota despite changes in diet and weight,” *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 111, no. 6, p. 1127, Jun. 2020.
- [194] C. Zhang *et al.*, “Impact of a 3-months vegetarian diet on the gut microbiota and immune repertoire,” *Front. Immunol.*, vol. 9, no. APR, p. 27, Apr. 2018.
- [195] H. M. Wexler, “Bacteroides: the Good, the Bad, and the Nitty-Gritty,” *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 20, no. 4, p. 593, Oct. 2007.
- [196] Y. T. Chen, S. Y. Chiou, A. H. Hsu, Y. C. Lin, and J. S. Lin, “Lactobacillus *rhamnosus* Strain LRH05 Intervention Ameliorated Body Weight Gain and Adipose Inflammation via Modulating the Gut Microbiota in High-Fat Diet-Induced Obese Mice,” *Mol. Nutr. Food Res.*, vol. 66, no. 1, Jan. 2022.
- [197] Q. Zhou *et al.*, “Gut bacteria *Akkermansia* is associated with reduced risk of obesity: evidence from the American Gut Project,” *Nutr. Metab.*, vol. 17, no. 1, pp. 1–9, Dec. 2020.
- [198] I. Burakova *et al.*, “The Effect of Short-Term Consumption of Lactic Acid Bacteria on the Gut Microbiota in Obese People,” *Nutrients*, vol. 14, no. 16, p. 3384, Aug. 2022.
- [199] T. Coenye, “The family Burkholderiaceae,” *The Prokaryotes: Alphaproteobacteria and Betaproteobacteria*, vol. 9783642301971, pp. 759–776,

- Aug. 2014.
- [200] C. Engels, H. J. Ruscheweyh, N. Beerenwinkel, C. Lacroix, and C. Schwab, “The Common Gut Microbe *Eubacterium hallii* also Contributes to Intestinal Propionate Formation,” *Front. Microbiol.*, vol. 7, no. MAY, 2016.
- [201] B. Dorelli *et al.*, “Can physical activity influence human gut microbiota composition independently of diet? A systematic review,” *Nutrients*, vol. 13, no. 6, p. 1890, Jun. 2021.
- [202] J. Companys *et al.*, “Gut microbiota profile and its association with clinical variables and dietary intake in overweight/obese and lean subjects: A cross-sectional study,” *Nutrients*, vol. 13, no. 6, Jun. 2021.
- [203] V. Meslier *et al.*, “Mediterranean diet intervention in overweight and obese subjects lowers plasma cholesterol and causes changes in the gut microbiome and metabolome independently of energy intake,” *Gut*, vol. 69, no. 7, pp. 1258–1268, Jul. 2020.
- [204] T. S. Dong *et al.*, “A High Protein Calorie Restriction Diet Alters the Gut Microbiome in Obesity,” *Nutrients*, vol. 12, no. 10, pp. 1–16, Oct. 2020.
- [205] M. A. Stanislowski *et al.*, “The Gut Microbiota during a Behavioral Weight Loss Intervention,” *Nutrients*, vol. 13, no. 9, Sep. 2021.
- [206] J. Muralidharan *et al.*, “Effect on gut microbiota of a 1-y lifestyle intervention with Mediterranean diet compared with energy-reduced Mediterranean diet and physical activity promotion: PREDIMED-Plus Study,” *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 114, no. 3, pp. 1148–1158, Sep. 2021.
- [207] T. Ayu, S. Tiyas, M. Sulchan, E. S. Lestari, E. R. Noer, and A. Pramono, “Effects of Dietary Interventions on Gut Microbiome in Overweight or Obese Adults: A Systematic Review of Randomized Controlled Trials,” *J. Gizi Indones. (The Indones. J. Nutr.)*, vol. 11, no. 1, pp. 18–38, Dec. 2022.
- [208] G. Rizzatti, L. R. Lopetuso, G. Gibiino, C. Binda, and A. Gasbarrini, “Proteobacteria: A common factor in human diseases,” *Biomed Res. Int.*, vol. 2017, 2017.
- [209] A. Velikonja, L. Lipoglavšek, M. Zorec, R. Orel, and G. Avguštin, “Alterations in gut microbiota composition and metabolic parameters after dietary intervention with barley beta glucans in patients with high risk for metabolic syndrome development,” *Anaerobe*, vol. 55, pp. 67–77, Feb. 2019.
- [210] B. J. Parker, P. A. Wearsch, A. C. M. Veloo, and A. Rodriguez-Palacios, “The Genus *Alistipes*: Gut Bacteria With Emerging Implications to Inflammation, Cancer, and Mental Health,” *Front. Immunol.*, vol. 11, p. 906, Jun. 2020.
- [211] B. J. Parker, P. A. Wearsch, A. C. M. Veloo, and A. Rodriguez-Palacios, “The Genus *Alistipes*: Gut Bacteria With Emerging Implications to Inflammation, Cancer, and Mental Health,” *Front. Immunol.*, vol. 11, p. 906, Jun. 2020.
- [212] B. J. Kelly *et al.*, “Power and sample-size estimation for microbiome studies using pairwise distances and PERMANOVA,” *Bioinformatics*, vol. 31, no. 15, p. 2461, Aug. 2015.
- [213] Y. Cui *et al.*, “Roles of intestinal Parabacteroides in human health and diseases,” *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 369, no. 1, Aug. 2022.
- [214] X. Liu *et al.*, “*Blautia*—a new functional genus with potential probiotic properties?,” *Gut Microbes*, vol. 13, no. 1, pp. 1–21, 2021.
- [215] M.-R. Wu, T.-S. Chou, T. Tzu, C. Hospital, C.-Y. Huang, and J.-K. Hsiao, “A potential probiotic-Lachnospiraceae NK4A136 group: Evidence from the restoration of the dietary pattern from a high-fat diet,” 2020.
- [216] Z. Miao *et al.*, “Antibiotics can cause weight loss by impairing gut microbiota in

- mice and the potent benefits of lactobacilli,” *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, vol. 84, no. 2, pp. 411–420, Feb. 2020.
- [217] K. S. Bongers *et al.*, “Antibiotics cause metabolic changes in mice primarily through microbiome modulation rather than behavioral changes,” *PLoS One*, vol. 17, no. 3, Mar. 2022.
- [218] X. Wan *et al.*, “Impact of broad-spectrum antibiotics on the gut–microbiota–spleen–brain axis,” *Brain, Behav. Immun. - Heal.*, vol. 27, p. 100573, Feb. 2023.
- [219] P. Tirelle, J. Breton, G. Riou, P. Déchelotte, M. Coëffier, and D. Ribet, “Comparison of different modes of antibiotic delivery on gut microbiota depletion efficiency and body composition in mouse,” *BMC Microbiol.*, vol. 20, no. 1, Dec. 2020.
- [220] K. S. Josefsdottir, M. T. Baldrige, C. S. Kadmon, and K. Y. King, “Antibiotics impair murine hematopoiesis by depleting the intestinal microbiota,” *Blood*, vol. 129, no. 6, p. 729, Feb. 2017.
- [221] S. C. Ganal *et al.*, “Priming of natural killer cells by nonmucosal mononuclear phagocytes requires instructive signals from commensal microbiota,” *Immunity*, vol. 37, no. 1, pp. 171–186, Jul. 2012.
- [222] M. Gury-BenAri *et al.*, “The Spectrum and Regulatory Landscape of Intestinal Innate Lymphoid Cells Are Shaped by the Microbiome,” *Cell*, vol. 166, no. 5, pp. 1231–1246.e13, Aug. 2016.
- [223] L. Grasa *et al.*, “Antibiotic-Induced Depletion of Murine Microbiota Induces Mild Inflammation and Changes in Toll-Like Receptor Patterns and Intestinal Motility,” *Microb. Ecol.*, vol. 70, no. 3, pp. 835–848, Oct. 2015.
- [224] K. M. Ng *et al.*, “Recovery of the Gut Microbiota after Antibiotics Depends on Host Diet, Community Context, and Environmental Reservoirs,” *Cell Host Microbe*, vol. 26, no. 5, pp. 650–665.e4, Nov. 2019.
- [225] D. Laubitz *et al.*, “Dynamics of Gut Microbiota Recovery after Antibiotic Exposure in Young and Old Mice (A Pilot Study),” *Microorganisms*, vol. 9, no. 3, pp. 1–12, Mar. 2021.
- [226] R. Nagpal *et al.*, “Comparative microbiome signatures and short-chain fatty acids in mouse, rat, non-human primate, and human feces,” *Front. Microbiol.*, vol. 9, no. NOV, p. 2897, Nov. 2018.
- [227] H. Sokol *et al.*, “Faecalibacterium prausnitzii is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 105, no. 43, pp. 16731–16736, Oct. 2008.
- [228] E. Quévrain *et al.*, “Identification of an anti-inflammatory protein from Faecalibacterium prausnitzii, a commensal bacterium deficient in Crohn’s disease,” *Gut*, vol. 65, no. 3, pp. 415–425, Mar. 2016.
- [229] S. Devkota *et al.*, “Dietary-fat-induced taurocholic acid promotes pathobiont expansion and colitis in Il10^{-/-} mice,” *Nature*, vol. 487, no. 7405, pp. 104–108, 2012.
- [230] D. Ríos-Covián, P. Ruas-Madiedo, A. Margolles, M. Gueimonde, C. G. De los Reyes-Gavilán, and N. Salazar, “Intestinal Short Chain Fatty Acids and their Link with Diet and Human Health,” *Front. Microbiol.*, vol. 7, no. FEB, Feb. 2016.
- [231] M. C. Dao *et al.*, “Akkermansia muciniphila and improved metabolic health during a dietary intervention in obesity: relationship with gut microbiome richness and ecology,” *Gut*, vol. 65, no. 3, pp. 426–436, Mar. 2016.
- [232] F. De Filippis *et al.*, “High-level adherence to a Mediterranean diet beneficially impacts the gut microbiota and associated metabolome,” *Gut*, vol. 65, no. 11,

- Nov. 2016.
- [233] F. H. Karlsson *et al.*, “Symptomatic atherosclerosis is associated with an altered gut metagenome,” *Nat. Commun.*, vol. 3, 2012.
- [234] M. A. Croxen, R. J. Law, R. Scholz, K. M. Keeney, M. Wlodarska, and B. B. Finlay, “Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*,” *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 26, no. 4, pp. 822–880, Oct. 2013.
- [235] C. Lehmann, “Experiment 4: Growth Conditions for strictly anaerobic Bacteria,” *Lab. to Biol. III*, pp. 2–5, 2003.
- [236] Z. Lu and J. A. Imlay, “When anaerobes encounter oxygen: mechanisms of oxygen toxicity, tolerance and defence,” *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 19, no. 12, p. 774, Dec. 2021.
- [237] N. Amorim *et al.*, “Refining a Protocol for Faecal Microbiota Engraftment in Animal Models After Successful Antibiotic-Induced Gut Decontamination,” *Front. Med.*, vol. 9, p. 189, Feb. 2022.
- [238] L. Wrzosek *et al.*, “Transplantation of human microbiota into conventional mice durably reshapes the gut microbiota,” *Sci. Rep.*, vol. 8, no. 1, Dec. 2018.
- [239] K. J. Hintze *et al.*, “Broad scope method for creating humanized animal models for animal health and disease research through antibiotic treatment and human fecal transfer,” *Gut Microbes*, vol. 5, no. 2, p. 183, Mar. 2014.
- [240] S. C. Bokoliya, Y. Dorsett, H. Panier, and Y. Zhou, “Procedures for Fecal Microbiota Transplantation in Murine Microbiome Studies,” *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, vol. 11, Sep. 2021.
- [241] J. Li, H. Wu, Y. Liu, and L. Yang, “High fat diet induced obesity model using four strains of mice: Kunming, C57BL/6, BALB/c and ICR,” *Exp. Anim.*, vol. 69, no. 3, p. 326, 2020.
- [242] T. Sabapathy, E. Helmerhorst, G. Ellison, S. C. Bridgeman, and C. D. Mamotte, “High-fat diet induced alterations in plasma membrane cholesterol content impairs insulin receptor binding and signalling in mouse liver but is ameliorated by atorvastatin,” *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.*, vol. 1868, no. 6, p. 166372, Jun. 2022.
- [243] J. R. Speakman, “Use of high-fat diets to study rodent obesity as a model of human obesity,” *Int. J. Obes. 2019 438*, vol. 43, no. 8, pp. 1491–1492, Apr. 2019.
- [244] P. Tirelle, J. Breton, G. Riou, P. Déchelotte, M. Coëffier, and D. Ribet, “Comparison of different modes of antibiotic delivery on gut microbiota depletion efficiency and body composition in mouse,” *BMC Microbiol.*, vol. 20, no. 1, pp. 1–10, 2020.
- [245] Z. L. Lai *et al.*, “Fecal microbiota transplantation confers beneficial metabolic effects of diet and exercise on diet-induced obese mice,” *Sci. Rep.*, vol. 8, no. 1, Dec. 2018.
- [246] C. J. Jin *et al.*, “Aging-related liver degeneration is associated with increased bacterial endotoxin and lipopolysaccharide binding protein levels,” *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.*, vol. 318, no. 4, pp. G736–G747, 2020.
- [247] W. C. Reygaert, “An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria,” *AIMS Microbiol.*, vol. 4, no. 3, p. 482, 2018.
- [248] R. J. van Tatenhove-Pel, E. Zwering, A. Solopova, O. P. Kuipers, and H. Bachmann, “Ampicillin-treated *Lactococcus lactis* MG1363 populations contain persisters as well as viable but non-culturable cells,” *Sci. Reports 2019 91*, vol. 9, no. 1, pp. 1–10, Jul. 2019.
- [249] W. A. D. Kaboré *et al.*, “Characterization and Antimicrobial Susceptibility of *Lactococcus lactis* Isolated from Endodontic Infections in Ouagadougou, Burkina

- Faso,” *Dent. J.*, vol. 6, no. 4, Dec. 2018.
- [250] C. D. Moon, W. Young, P. H. Maclean, A. L. Cookson, and E. N. Bermingham, “Metagenomic insights into the roles of Proteobacteria in the gastrointestinal microbiomes of healthy dogs and cats,” *Microbiologyopen*, vol. 7, no. 5, pp. 1–20, 2018.
- [251] H. Okonta, X. Cheng, R. Chakravarti, and J. Duggan, “Effects of antibiotic treatment on microbiota, viral transmission and viral pathogenesis of MoMuLV ts1 infected BALB/c mice,” *PLoS One*, vol. 17, no. 1, p. e0261689, Jan. 2022.
- [252] F. B. Hertz, A. E. Budding, M. van der Lugt-Degen, P. H. Savelkoul, A. Løbner-Olesen, and N. Frimodt-Møller, “Effects of Antibiotics on the Intestinal Microbiota of Mice,” *Antibiotics*, vol. 9, no. 4, Apr. 2020.
- [253] N. Suárez-Zamorano *et al.*, “Microbiota depletion promotes browning of white adipose tissue and reduces obesity,” *Nat. Med.*, vol. 21, no. 12, pp. 1497–1501, Dec. 2015.
- [254] E. Zagato *et al.*, “Endogenous murine microbiota member *Faecalibaculum* rodentium and its human homologue protect from intestinal tumour growth,” *Nat. Microbiol.*, vol. 5, no. 3, pp. 511–524, Mar. 2020.
- [255] F. Wu, X. Guo, J. Zhang, M. Zhang, Z. Ou, and Y. Peng, “*Phascolarctobacterium faecium* abundant colonization in human gastrointestinal tract,” *Exp. Ther. Med.*, vol. 14, no. 4, p. 3122, Oct. 2017.
- [256] T. Zuo *et al.*, “Alterations in Gut Microbiota of Patients With COVID-19 During Time of Hospitalization,” *Gastroenterology*, vol. 159, no. 3, p. 944, Sep. 2020.
- [257] L. Wang, C. T. Christophersen, M. J. Sorich, J. P. Gerber, M. T. Angley, and M. A. Conlon, “Increased abundance of *Sutterella* spp. and *Ruminococcus torques* in feces of children with autism spectrum disorder,” *Mol. Autism*, vol. 4, no. 1, pp. 1–4, Nov. 2013.
- [258] Z. Ling *et al.*, “Altered fecal microbiota composition associated with food allergy in infants,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 80, no. 8, pp. 2546–2554, 2014.
- [259] G. P. Rodríguez-Castaño, F. E. Rey, A. Caro-Quintero, and A. Acosta-González, “Gut-derived Flavonifractor species variants are differentially enriched during in vitro incubation with quercetin,” *PLoS One*, vol. 15, no. 12, Dec. 2020.
- [260] S. Geerlings, I. Kostopoulos, W. de Vos, and C. Belzer, “*Akkermansia muciniphila* in the Human Gastrointestinal Tract: When, Where, and How?,” *Microorganisms*, vol. 6, no. 3, p. 75, Jul. 2018.
- [261] M. C. Dao *et al.*, “*Akkermansia muciniphila* and improved metabolic health during a dietary intervention in obesity: relationship with gut microbiome richness and ecology.”
- [262] M. J. Claesson *et al.*, “Gut microbiota composition correlates with diet and health in the elderly,” *Nat. 2012 4887410*, vol. 488, no. 7410, pp. 178–184, Jul. 2012.
- [263] C. Kong, R. Gao, X. Yan, L. Huang, and H. Qin, “Probiotics improve gut microbiota dysbiosis in obese mice fed a high-fat or high-sucrose diet,” *Nutrition*, vol. 60, pp. 175–184, Apr. 2019.
- [264] O. M. Moreno-Arrones *et al.*, “Analysis of the gut microbiota in alopecia areata: identification of bacterial biomarkers,” *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.*, vol. 34, no. 2, pp. 400–405, Feb. 2020.
- [265] F. Wu *et al.*, “Gut Microbiota and Subjective Memory Complaints in Older Women,” *J. Alzheimers. Dis.*, vol. 88, no. 1, pp. 1–12, May 2022.
- [266] H. L. Barrett *et al.*, “A Vegetarian Diet Is a Major Determinant of Gut Microbiota Composition in Early Pregnancy,” *Nutrients*, vol. 10, no. 7, Jul. 2018.
- [267] M. Hirayama *et al.*, “Intestinal *Collinsella* may mitigate infection and

- exacerbation of COVID-19 by producing ursodeoxycholate,” *PLoS One*, vol. 16, no. 11, Nov. 2021.
- [268] T. Zuo *et al.*, “Depicting SARS-CoV-2 faecal viral activity in association with gut microbiota composition in patients with COVID-19,” *Gut*, vol. 70, no. 2, pp. 276–284, Feb. 2021.
- [269] R. Hansen, J. M. Thomson, J. G. Fox, E. M. El-Omar, and G. L. Hold, “Could Helicobacter organisms cause inflammatory bowel disease?,” *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, vol. 61, no. 1, pp. 1–14, Feb. 2011.
- [270] E. M. Bik *et al.*, “Molecular analysis of the bacterial microbiota in the human stomach,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 103, no. 3, pp. 732–737, Jan. 2006.
- [271] M. Castellarin *et al.*, “Fusobacterium nucleatum infection is prevalent in human colorectal carcinoma,” *Genome Res.*, vol. 22, no. 2, pp. 299–306, Feb. 2012.
- [272] X. Yuan *et al.*, “Depression and anxiety in patients with active ulcerative colitis: crosstalk of gut microbiota, metabolomics and proteomics,” *Gut Microbes*, vol. 13, no. 1, 2021.
- [273] L. A. David *et al.*, “Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome,” *Nature*, vol. 505, no. 7484, pp. 559–563, 2014.
- [274] S. D. Burz *et al.*, “Fecal Microbiota Transplant from Human to Mice Gives Insights into the Role of the Gut Microbiota in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD),” *Microorganisms*, vol. 9, no. 1, pp. 1–27, Jan. 2021.
- [275] E. Rosenberg, “The family prevotellaceae,” *Prokaryotes Other Major Lineages Bact. Archaea*, pp. 825–827, Jul. 2014.
- [276] X. Gu *et al.*, “Gut Ruminococcaceae Levels Correlate with Risk of Antibiotic-Associated Diarrhea,” *SSRN Electron. J.*, Aug. 2021.
- [277] P. J. Turnbaugh, R. E. Ley, M. A. Mahowald, V. Magrini, E. R. Mardis, and J. I. Gordon, “An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest,” *Nature*, vol. 444, no. 7122, pp. 1027–1031, Dec. 2006.
- [278] V. K. Ridaura *et al.*, “Gut microbiota from twins discordant for obesity modulate metabolism in mice,” *Science*, vol. 341, no. 6150, 2013.
- [279] L. A. David *et al.*, “Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome,” *Nature*, vol. 505, no. 7484, pp. 559–563, 2014.
- [280] J. Walter, A. M. Armet, B. B. Finlay, and F. Shanahan, “Establishing or Exaggerating Causality for the Gut Microbiome: Lessons from Human Microbiota-Associated Rodents,” *Cell*, vol. 180, no. 2, pp. 221–232, Jan. 2020.
- [281] M. Rosenbaum, R. Knight, and R. L. Leibel, “The gut microbiota in human energy homeostasis and obesity,” *Trends Endocrinol. Metab.*, vol. 26, no. 9, pp. 493–501, Sep. 2015.
- [282] J. K. Nicholson *et al.*, “Host-gut microbiota metabolic interactions,” *Science*, vol. 336, no. 6086, pp. 1262–1267, Jun. 2012.
- [283] E. Holmes, J. V. Li, J. R. Marchesi, and J. K. Nicholson, “Gut Microbiota Composition and Activity in Relation to Host Metabolic Phenotype and Disease Risk,” *Cell Metab.*, vol. 16, no. 5, pp. 559–564, Nov. 2012.
- [284] A. Wahlström, S. I. Sayin, H. U. Marschall, and F. Bäckhed, “Intestinal Crosstalk between Bile Acids and Microbiota and Its Impact on Host Metabolism,” *Cell Metab.*, vol. 24, no. 1, pp. 41–50, Jul. 2016.
- [285] J. Alcock and H. C. Lin, “Fatty acids from diet and microbiota regulate energy metabolism,” *F1000Research*, vol. 4, no. F1000 Faculty Rev, Sep. 2015.
- [286] Z. L. Dai, G. Wu, and W. Y. Zhu, “Amino acid metabolism in intestinal bacteria: links between gut ecology and host health,” *Front. Biosci. (Landmark Ed.)*, vol. 16, no. 5, pp. 1768–1786, Jan. 2011.

- [287] P. A. Bron, C. Grangette, A. Mercenier, W. M. De Vos, and M. Kleerebezem, "Identification of *Lactobacillus plantarum* Genes That Are Induced in the Gastrointestinal Tract of Mice," *J. Bacteriol.*, vol. 186, no. 17, p. 5721, Sep. 2004.
- [288] T. J. Wang *et al.*, "Metabolite profiles and the risk of developing diabetes," *Nat. Med.*, vol. 17, no. 4, pp. 448–453, Apr. 2011.
- [289] E. P. J. G. Neis, C. H. C. Dejong, and S. S. Rensen, "The Role of Microbial Amino Acid Metabolism in Host Metabolism," *Nutrients*, vol. 7, no. 4, p. 2930, Apr. 2015.
- [290] S. Shandilya, S. Kumar, N. Kumar Jha, K. Kumar Kesari, and J. Ruokolainen, "Interplay of gut microbiota and oxidative stress: Perspective on neurodegeneration and neuroprotection," *J. Adv. Res.*, vol. 38, pp. 223–244, May 2022.
- [291] P. Louis, P. Young, G. Holtrop, and H. J. Flint, "Diversity of human colonic butyrate-producing bacteria revealed by analysis of the butyryl-CoA:acetate CoA-transferase gene," *Environ. Microbiol.*, 2010.
- [292] D. Ríos-Covián, P. Ruas-Madiedo, A. Margolles, M. Gueimonde, C. G. de Los Reyes-Gavilán, and N. Salazar, "Intestinal Short Chain Fatty Acids and their Link with Diet and Human Health.," *Front. Microbiol.*, vol. 7, p. 185, Jan. 2016.
- [293] D. V. Guzior and R. A. Quinn, "Review: microbial transformations of human bile acids," *Microbiome*, vol. 9, no. 1, pp. 1–13, Dec. 2021.
- [294] M. Knez, J. C. R. Stangoulis, M. Glibetic, and E. Tako, "The Linoleic Acid: Dihomo- γ -Linolenic Acid Ratio (LA:DGLA)-An Emerging Biomarker of Zn Status," *Nutrients*, vol. 9, no. 8, Aug. 2017.
- [295] T. Hussain *et al.*, "Relationship between gut microbiota and host-metabolism: Emphasis on hormones related to reproductive function," *Anim. Nutr.*, vol. 7, no. 1, p. 1, Mar. 2021.
- [296] N. Iyer and S. Vaishnava, "Vitamin A at the interface of host–commensal–pathogen interactions," *PLoS Pathog.*, vol. 15, no. 6, Jun. 2019.
- [297] F. Mengoni *et al.*, "Gut microbiota modulates seizure susceptibility," *Epilepsia*, vol. 62, no. 9, pp. e153–e157, Sep. 2021.
- [298] S. Khadem and R. J. Marles, "Monocyclic Phenolic Acids; Hydroxy- and Polyhydroxybenzoic Acids: Occurrence and Recent Bioactivity Studies," *Molecules*, vol. 15, no. 11, p. 7985, Nov. 2010.
- [299] W. R. Wikoff *et al.*, "Metabolomics analysis reveals large effects of gut microflora on mammalian blood metabolites," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 106, no. 10, pp. 3698–3703, Mar. 2009.
- [300] F. C. Barreto *et al.*, "Serum Indoxyl Sulfate Is Associated with Vascular Disease and Mortality in Chronic Kidney Disease Patients," *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 4, no. 10, pp. 1551–1558, Oct. 2009.
- [301] C. J. Lin, V. Wu, P. C. Wu, and C. J. Wu, "Meta-Analysis of the Associations of p-Cresyl Sulfate (PCS) and Indoxyl Sulfate (IS) with Cardiovascular Events and All-Cause Mortality in Patients with Chronic Renal Failure," *PLoS One*, vol. 10, no. 7, p. e0132589, Jul. 2015.
- [302] B. Opdebeeck, P. C. D'Haese, and A. Verhulst, "Molecular and Cellular Mechanisms that Induce Arterial Calcification by Indoxyl Sulfate and P-Cresyl Sulfate," *Toxins 2020, Vol. 12, Page 58*, vol. 12, no. 1, p. 58, Jan. 2020.
- [303] T. M. Newman *et al.*, "Diet, obesity, and the gut microbiome as determinants modulating metabolic outcomes in a non-human primate model," *Microbiome*, vol. 9, no. 1, Dec. 2021.

- [304] E. T. Cirulli *et al.*, “Profound Perturbation of the Metabolome in Obesity Is Associated with Health Risk,” *Cell Metab.*, vol. 29, no. 2, p. 488, Feb. 2019.

7. ANEXOS

7.1. Resultados intervención metaboloma

En la Figura 69 se pueden observar los resultados generales de la intervención para cada piloto. Los valores de los *global scores* positivos muestran un estado metabólico más alterado, mientras que valores negativos indican una mejora en el rango de los biomarcadores analizados. Tanto para el piloto de Polonia como para el piloto de Reino Unido, se observa una distribución de las muestras V1 hacia valores positivos mientras que las muestras V2 tienden a ser mayoritarias en los valores negativos. Esta distribución no se observa en el caso del piloto de España ya que tanto las muestras V1 como las muestras V2 se distribuyen de una forma similar a lo largo del histograma.

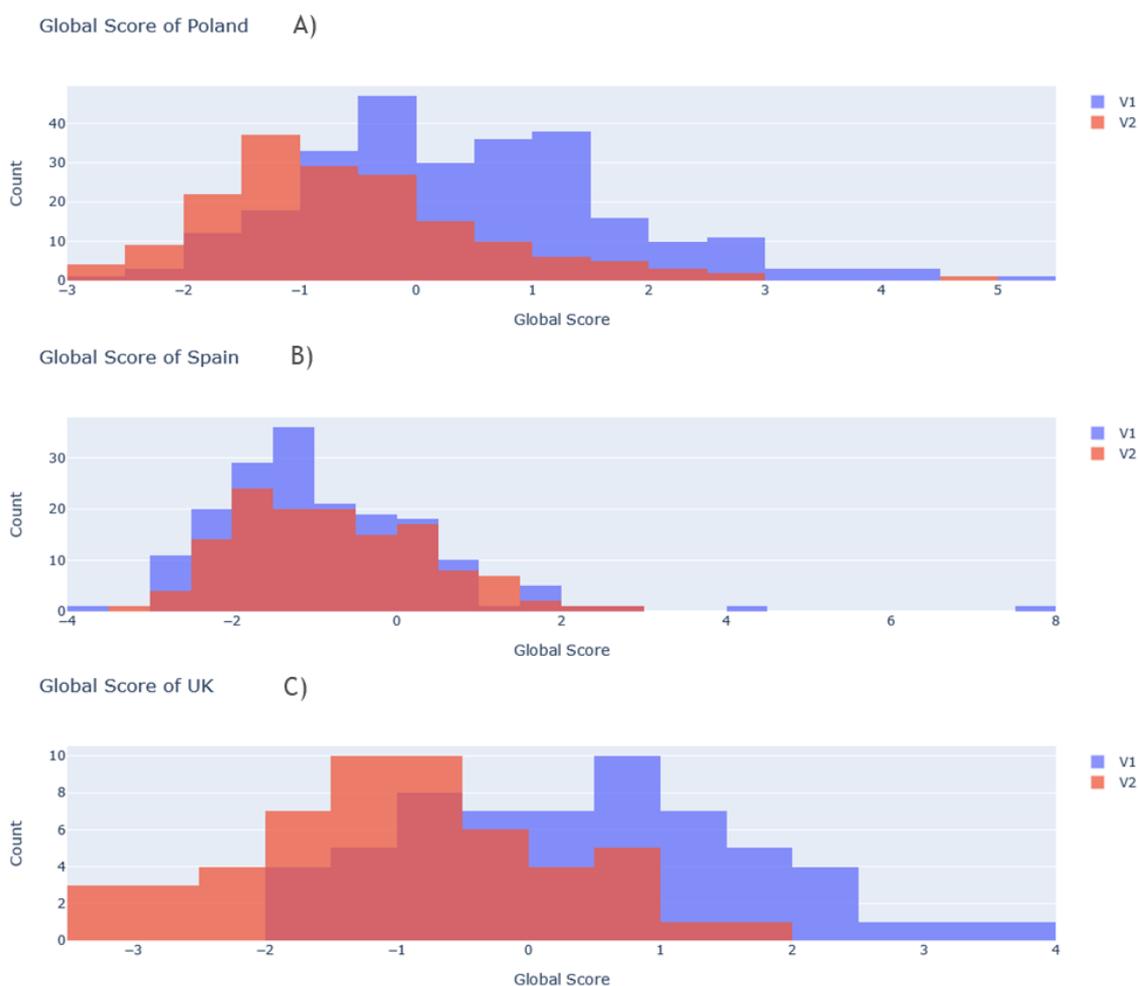


Figura 69 Histograma de los global score por tiempo de intervención. A) Polonia, B) España, C) UK. En azul V1 (visita 1) en Rojo V2 (visita 2) tras los 90 días de intervención. En rojo oscuro los valores sobrepuestos entre V1 y V2.

Estos resultados indican que las intervenciones dietéticas en su conjunto, han tenido un impacto mayor en la modificación del metaboloma hacia un patrón más saludable en los voluntarios de Polonia y Reino Unido y no tanto en la intervención llevada a cabo en España. Estos resultados dispares pueden ser debidos a las diferencias entre los estados basales de los diferentes pilotos. Por ejemplo, en el caso del piloto de España, el IMC para cada grupo oscila de media entre 25,4 y 25,5, siendo normo peso el 58,7% de los voluntarios y obesos tan solo el 14,1%. No obstante, tanto para el piloto de Polonia como Reino Unido, la media del IMC es superior a 30 en ambos casos, siendo obesos más de 65% de los voluntarios. El sobrepeso y la obesidad influye en gran medida en el estado metabólico de las personas [303] [304], en este sentido, es más probable revertir una disbiosis metabólica causada por el sobrepeso mediante una intervención dietética que poder modificar el estado metabólico de un conjunto de personas mayoritariamente saludables. Los valores absolutos de los *global scores* apoyan esta hipótesis. Si nos fijamos en la Figura 69, tanto para las muestras V1 como para las muestras V2, la mayoría de los valores en el piloto de España oscilan entre -2 y 0, mientras que los valores de las muestras V1 para los pilotos de Polonia y Reino Unido oscilan entre 0 y 3-4. Es probable que, por esta razón, las intervenciones dietéticas hayan tenido un impacto modulador superior en las personas con sobrepeso y obesidad inicial en comparación a las personas normo peso.

Las diferencias en las medias de los valores en el tiempo final (V2) con respecto al tiempo inicial (V1) se detallan en la Tabla 21.

En el caso del piloto de Polonia, se obtuvieron valores negativos para los tres grupos de intervención con diferencias significativas para cada grupo ($p < 0,001$), demostrando que las intervenciones han tenido un efecto positivo en la modulación de los *clústeres* de alteración. No obstante, no se observan diferencias significativas entre las diferentes intervenciones nutricionales (Tabla 21). En el caso del piloto polaco, las dietas personalizadas no parecen jugar un rol diferencial en la mejora del estado metabólico de los voluntarios, no obstante, queda de manifiesto la importancia de las intervenciones nutricionales y los cambios en los hábitos de vida saludable para mejorar distintos biomarcadores asociados a la salud.

Para el piloto de España los diferenciales de los *global scores* son más elevados en comparación al piloto polaco. En algún caso como en el grupo control siendo positivos (0,379). Estos resultados indican que las intervenciones dietéticas no han modificado el estado metabólico de los voluntarios hacia un patrón más saludable. La mayor diferencia

se observa entre la intervención PN y la intervención control (-0,139 vs 0,379). Este resultado parece indicar un mejor desempeño en la mejora del estado metabólico asociado a la obesidad de la intervención PN en comparación a la intervención control. En el caso del piloto España, a diferencia del piloto Polonia las diferencias en los global scores entre las 3 intervenciones nutricionales son significativas, indicando un comportamiento diferencial entre las dietas personalizadas y la dieta control, siendo más acentuadas las diferencias en la intervención PN.

Finalmente, las mayores diferencias entre las distintas intervenciones nutricionales se observan en el piloto UK. En este caso, las 3 intervenciones reducen los *global scores* obteniendo así valores negativos. Sin embargo, a diferencia del piloto polaco, las diferencias entre los 3 grupos de intervención son evidentes. El grupo PN es el que obtiene un diferencial más negativo (-2,066). La diferencia respecto a la intervención control es 4 veces superior (-0,539). En este caso, las intervenciones personalizadas tienen un efecto mayor en la modulación de los clústeres metabólicos de afectación. No obstante, hay que tener en cuenta que este piloto es el que tiene un número de voluntarios menor en comparación a los otros dos pilotos. Estas diferencias tan evidentes podrían verse reducidas al incrementar la N de voluntarios.

Tabla 21 Resumen de los global score obtenidos para cada piloto comparando la visita 1 con la visita 2. Un t-test pareado ha sido utilizado para determinar las diferencias significativas de los global scores entre el tiempo inicial (V1) y el tiempo final (V2). Un test ANOVA ha sido utilizado para determinar las diferencias significativas entre el diferencial V2-V1.

Piloto	Grupo	V1	V2	V2-V1	t-test pareado	ANOVA
Polonia	PN	0.442	-0.643	-0.913	p<0,001***	ns
	PP	0.345	-0.740	-0.813	p<0,001***	
	control	0.486	-0.357	-0.986	p<0,001***	
España	PN	-0.855	-0.913	-0.139	Ns	P < 0,01**
	PP	-0.921	-0.838	0.011	Ns	
	control	-0.894	-0.551	0.379	p<0,05*	
UK	PN	0.776	-1.313	-2.066	p<0,001***	P < 0,01**
	PP	0.142	-1.066	-1.226	p<0,001***	
	control	0.410	-0.349	-0.539	p<0,01**	

7.2. Protocolo estudio de intervención UK

PROTOCOL

Version 1 : 13th January 2020

Title of study: Trial of personalised advice to aid weight loss

Study identifiers

REC number: xx/xxx/xxx

R&D number: To be identified

Funder of the study: European Commission

Sponsor of the study: University Hospital Southampton NHS Foundation Trust

Principal investigator: Professor Philip C. Calder, School of Human Development & Health, Faculty of Medicine, University of Southampton, IDS Building. MP887 Southampton General Hospital, Tremona Road, Southampton SO16 6YD

Email: pcc@soton.ac.uk

Phone: 02381205250

Researchers: Dr Ella Baker, Research Fellow, a Research Fellow in Dietetics to be appointed April 2020 and Research Nurses in the NIHR Clinical Research Facility at University Hospital Southampton

Salto de página

1. Introduction & rationale

Obesity is defined as a body mass index $> 30 \text{ kg/m}^2$. Obesity has become a common condition in Western society. Proportions and numbers of both adults and children who are obese are increasing (1,2). Obesity itself has physical, psychological and social penalties. Furthermore, obesity significantly increases the risk of developing several health problems, including heart disease, type 2 diabetes, non-alcoholic fatty liver disease, and several common cancers (3). Obesity results from an intake of energy in excess of energy expenditure. However, in reality obesity is more complex than this and involves the interactions of many different factors, including polymorphisms in many genes, metabolism, eating behavior, physical activity and some non-biological factors. These interactions are involved in both weight gain and weight loss. Therefore to fully understand weight gain and weight loss we need to know about more than just what people eat; we also need to know about their genetics, their eating behavior, their food environment and their physical activity amongst other things. Overweight individuals and those with “modest” obesity are typically advised to change their diet and do more exercise. This can work to some extent especially in more motivated individuals. It is known that weight loss (and fat loss) reduce risk of the co-morbidities, but that bigger gains come from greater weight (and fat) loss. Some individuals become more motivated through more personal and/or technology-based interventions and studies show these can induce bigger improvements in obesity outcomes than the more traditional approach (4). Personalised nutrition (PN) is a relatively new approach which aims to give individual’s unique nutrition advice based on genetic, environmental and lifestyle (including diet related) factors. Personalisation of interventions may be effective in changing behaviour that will affect health outcomes, including weight loss. Individuals may also need prompting to modify their dietary and lifestyle habits for such approaches to be

successful. In this study we plan to compare general advice from a dietitian with more personalised advice in obese individuals to see if the effect on various outcomes is different. The personalised advice will be of two types. Firstly, advice based upon diet, metabolic profile and relevant genetic polymorphisms and secondly that advice coupled with app-based prompts for behaviour change. This project is funded by the European Commission as part of a consortium called “Empower consumers to PREVENT diet-related diseases through OMICS sciences” (acronym PREVENTOMICS). As part of the consortium a mobile app will be developed by software engineers at METADieta in Italy. The app will present individualised information to a dietitian and to the participants allocated to the personalized intervention. This information will be generated by the integration of data on each individual’s diet, metabolic profile and other biomarkers, and 36 genetic polymorphisms. A third group will also receive behavior change prompts through the app. It is hypothesized that the individuals in the personalized nutrition groups will show greater effects on waist circumference, body weight, body fat, body mass index, metabolic profile, inflammatory markers and other outcomes compared to the group receiving standard dietetic advice. It is further hypothesized that those receiving the behaviour change prompts will show the greatest improvements in these outcomes. A parallel study with an identical protocol is being conducted in Krakow, Poland; while it is intended to analyse the findings of each study individually, it is also intended to combine the data from the two studies.

1. **Objective**

The objectives of this study are a) to identify whether delivery of personalized information through an “app” in addition to usual dietetic advice is superior to usual dietetic advice alone in promoting a reduction in waist circumference, weight loss and favourable changes in blood metabolic and inflammatory biomarkers in obese subjects over four months and b) to identify whether delivery of the combination of behavior change prompts and personalized information through an “app” in addition to usual dietetic advice is superior to usual dietetic advice alone and to personalized information alone in promoting a reduction in waist circumference, weight loss and favourable changes in blood metabolic and inflammatory biomarkers in obese subjects over four months.

1. **Inclusion and exclusion criteria**

Inclusion criteria

1. Aged 18-65 years
1. Body mass index 25-40 kg/m²
1. Waist circumference > 94 cm (for men) or > 80 cm (for women), which, according with the International Diabetes Federation, indicates abdominal obesity In Western populations (5)
1. Possess a mobile phone or other device capable of hosting the app
1. Able to provide written informed consent.

Exclusion criteria

1. Diagnosed with diabetes or having a serum glucose ≥ 125 mg/dL (6.9 mmol/l) (at V1 blood sampling), other metabolic and endocrine disorders
1. Presence of chronic disease (cardiovascular disease, kidney disease (or a serum creatinine ≥ 1.7 mg/dl (150 μ mol/l) for men and ≥ 1.5 mg/dl (132 μ mol/l) for women at V1 blood sampling), cancer, pulmonary diseases, coeliac disease, Crohn’s disease, etc.)
1. Body mass index >40 kg/m²
1. Being pregnant or planning to become pregnant within the study period
1. Use of prescribed medicine to control blood glucose, inflammation or dyslipidemia (or LDL-cholesterol ≥ 4.9 mmol/L (> 190 mg/dL) and/or triglycerides ≥ 4.5 mmol/L (≥ 400 mg/dL) at V1 blood sampling)
1. Consumption of more than 14 drinks of alcoholic beverages per week
1. Current smoking
1. Use of dietary supplements
1. Blood donation in the previous 3 months
1. No access to the internet

1. Note: Subjects with hypertension and taking antihypertensive drugs (metabolically neutral) will be not excluded and allowed to continue their prescribed dosage.

1. Study design and participant schedule

All procedures involving human subjects will be approved by a relevant NHS Research Ethics Committee. This study will be conducted according to the guidelines established in the Declaration of Helsinki. The study will be registered at www-controlled-trials.com.

The study will be a single-blind randomized, placebo-controlled trial carried out with clinically healthy class I and II obese adult participants with abdominal obesity. Due to the nature of the study, the participants and the study dietitian cannot be blinded to the intervention, although the investigators who will perform the sample and data analysis will be blinded.

Recruits will be sought through poster advertisements; articles in the media (newsletters, newspapers, radio); email shots within the University of Southampton and University Hospital NHS Foundation Trust; contacting those on a GDPR compliant database held by the University Hospital Southampton; and through local GP surgeries who will act as Participant Identification Centres (these will be identified through a CRN). Individuals who are interested will contact the research team by telephone. They will answer a small number of questions to ascertain whether they are likely to meet the inclusion/exclusion criteria. If so, they will be sent a Participant Information Sheet. After 7 days they will be contacted to see if they remain interested in the study. If they are still interested an appointment will be made for a screening visit (visit 1 (V1)) at the NIHR Clinical Research Facility at Southampton General Hospital.

Visit 1

Subjects will attend the NIHR Clinical Research Facility at Southampton General Hospital in the morning (between 8 and 10 am) in the fasted state (no food or drink apart from water) from 9 pm the night before. Subjects will be given the opportunity to discuss the study and have any questions answered. If they are happy to be enrolled they will be asked to sign an Informed Consent Form. If a subject is female and still having periods or it is less than two years since their menopause they will have a standard urine test to confirm that they are not pregnant. At this visit subject's height, weight, waist and hip circumference will be measured as will their body composition (Tanita bioelectric impedance). Then a saliva swab will be taken from inside the mouth and 20 mL blood will be collected to provide whole blood, serum and plasma. Then subjects will be given breakfast (orange juice, toast and jam, tea or coffee). After they finish their breakfast subjects will complete a food frequency questionnaire, a 3-day diet recall and a behaviour assessment questionnaire. During this visit subjects will be asked to provide a urine sample (20 ml). The duration of visit 1 is likely to be 2 hours. Before leaving, subjects will be given a pot and instructions for collecting a faecal sample immediately prior to visit 2 and visit 3; this is not compulsory.

The samples collected at V1 will be used as follows:

Sample	Measurement	Analysed by	Reason
Blood - Plasma	IL-6 TNF α MCP-1 IL-10 Soluble ICAM-1 Soluble CD14 Oxidised LDL	University of Southampton	Inflammatory marker analysis
	Acylcarnitine profile	Eurcat, Barcelona, Spain	Fatty acid and branched-chain amino acid catabolism analysis
Blood - Serum	Leptin Adiponectin CRP Insulin	University of Southampton	Blood lipid profile Liver and Kidney function analysis

	Total cholesterol HDL- cholesterol LDL- cholesterol Triglycerides Glucose Creatinine ALT GGT Uric acid Food intake biomarkers	Eurcat, Barcelona, Spain	Creation of personalised plan
Urine	Food intake biomarkers Food intake biomarkers 8-iso-PGF2 α 8-OHdG	University of Parma, Parma, Italy Eurcat, Barcelona, Spain Eurcat, Barcelona, Spain	Validation of diet Creation of personalised plan Analysis of oxidative stress
Saliva	36 different single nucleotide polymorphisms (SNPs)	University of Balearic Islands, Palma de Mallorca, Spain	Genetic health status, gene-diet interactions and creation of personalised plan
Faeces	16S rRNA sequencing	LEITAT, Barcelona, Spain	Gut microbiome profile

Volumes of blood to be collected will be as follows:

Matrix	Collection tube	Volume	Analytes
Serum	SST	2 ml	Insulin
Serum	SST	5 ml	CRP, cholesterol, HDL, LDL, triglycerides, creatinine, ALT, GGT, uric acid
Plasma	Fluoride oxalate	5 ml	Glucose
Plasma	EDTA	5 ml	IL-6, TNF α , MCP-1, IL-10, Soluble ICAM-1, Soluble CD14, Oxidised LDL, Acylcarnitine profile

Data on nutrient intake, genotype (35 different single nucleotide polymorphisms (SNPs)), metabolic profile, and other blood biomarkers will be integrated through computational modelling to provide personalized dietetic advice for the Personal Plan intervention group. This advice will be provided to the dietitian and participant via an app.

The gene polymorphisms to be analysed are as follows:

Gene	SNP	Metabolic cluster
ADBR3	rs4994	Carbohydrate; Lipid
ADIPOQ	rs17300539	Carbohydrate; Lipid; Inflammation
ADIPOQ	rs266729	Carbohydrate; Oxidative stress
APOA5	rs662799	Lipid
APOE	rs429358	Lipid
BDNF	rs6265	Lipid; Protein; Carbohydrate
CD36	rs1527479	Lipid; Carbohydrate
CLOCK	rs1801260	Lipid; Carbohydrate
CYP1A2	rs762551	-
CYP2R1	rs10766197	-
FAAH	rs324420	Carbohydrate; Lipid
FADS1	rs174546	Lipid; Inflammation
FADS1	rs174547	Lipid
FTO	rs9930506	Lipid
FTO	rs9939609	Carbohydrate; Lipid; Inflammation
GCKR	rs1260326	Carbohydrate; Lipid; Inflammation
IL6	rs1800795	Inflammation
INSIG2	rs7566605	Lipid
IRS1	rs1801278	Carbohydrate; Inflammation
LEPR	rs1137101	Lipid; Carbohydrate
MC4R	rs17782313	Carbohydrate
MTHFR	rs1801133	Oxidative stress
NPY	rs16147	Lipid; Inflammation
PPARGC1A	rs8192678	Lipid; Carbohydrate
PLIN1	rs894160	Lipid; Carbohydrate
PNPLA3	rs738409	Lipid
PPARG	rs1801282	Lipid
SCARB1	rs5888	Lipid
SIRT1	rs1467568	Lipid
SOD2	rs4880	Oxidative stress; Inflammation
TCF7L2	rs7903146	Lipid; Carbohydrate
TFAP2B	rs987237	Lipid; Carbohydrate
TNF α	rs1800629	Inflammation; Oxidative stress
UCP1	rs1800592	Lipid; Carbohydrate
UCP2	rs659366	Inflammation; Carbohydrate; Lipids

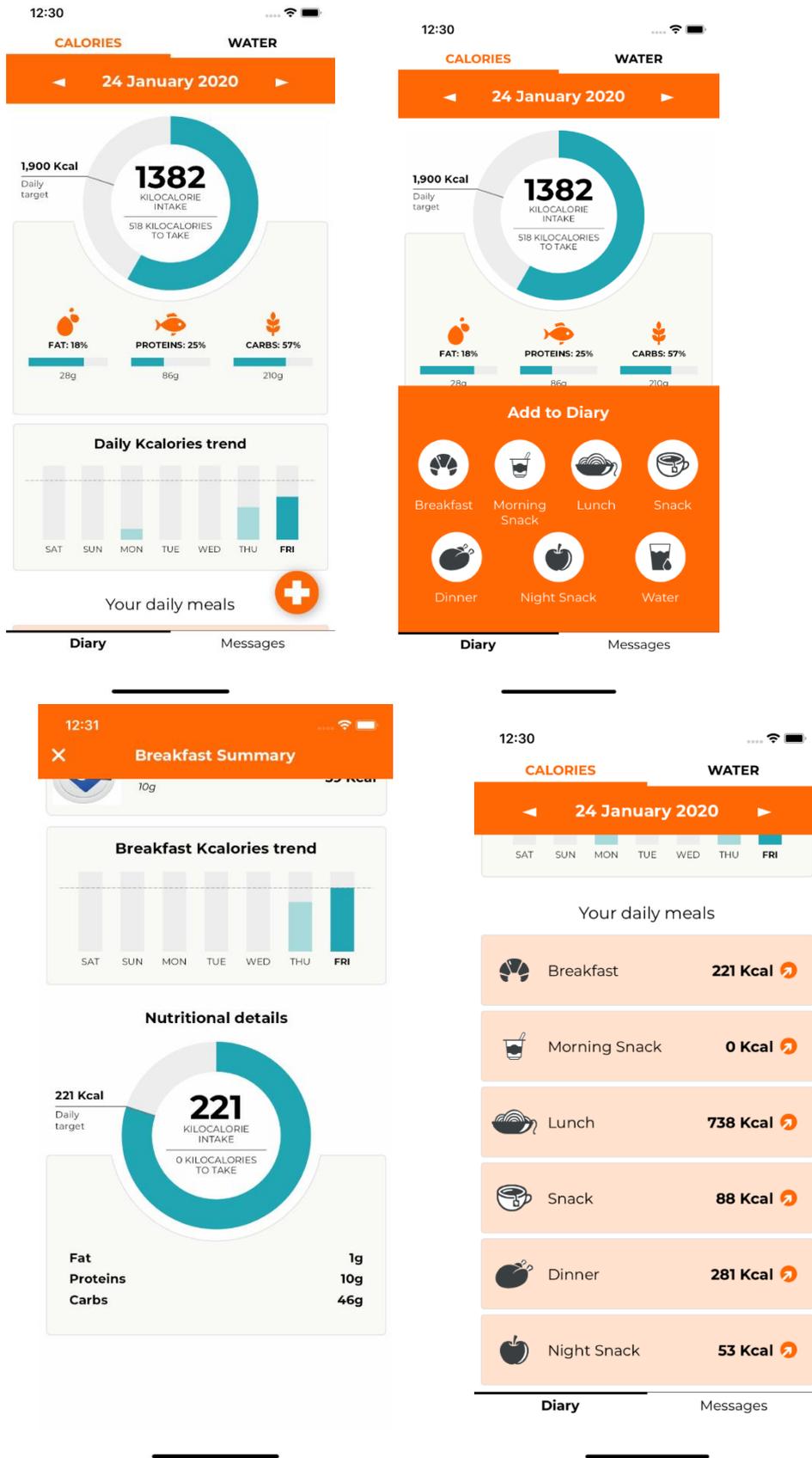
Visit 2

About a month after V1, participants will return to the IDS Building at Southampton General Hospital for visit 2 (V2). Participants may bring a recent faecal sample with them. Prior to V2, participants will have been randomly allocated to receive standard dietetic advice or personalized advice via an app on their mobile phone in addition to dietetic advice or personalized advice and behavior change prompts via an app on their mobile phone in addition to dietetic advice. Allocation will be stratified by age (decades) and sex. Participants will not be required to be in the fasted state for this visit. They will complete quality of life, physical activity, and food and environment questionnaires. They will also have their first consultation with the study dietitian. The dietitian will provide the control group with healthy eating advice based upon the dietary information collected at V1. The dietitian will provide the other two groups with personalized advice provided through the app; this advice will be based upon the dietary information provided at V1 as well as the genetic and metabolic profile determined in the saliva and blood samples collected at V1. The duration of V2 is likely to be 2 hours.

Between Visit 2 and Visit 3

Participants in the control group will have a telephone consultation each month with the study dietitian. Participants in the personalized advice groups will receive regular information about

their diet without or with prompts via the app in addition to the dietitian telephone consultations. All participants will complete an on-line daily food diary. The user face of this diary will appear as follows:



The behaviour change prompts to be used are as follows:

NURTURE THE NEAR AND DEAR. Tell people how special they are. Even if they know, it's heart-warming to hear it spoken or see it written down. Do it often.

WELL DONE FOR BREAKFASTING! It's an important meal. Can you make one change to refresh tomorrow's breakfast? Find ideas <<here>>.

PLAN! You tend to only eat when you're hungry. Good. A weekly menu <<planner>> will ensure you make healthy choices, and save you time and money.

LOVE YOUR LOW ALCOHOL LIFE! Watch for the sugar in soft drinks. Try a new healthy drink, vegetable juice or herbal tea today, and feel extra good.

REFRESH YOUR FRESH! Keep going for your daily quota of fruit and vegetable. Pack more of a nutritional <<punch>> today by adding beets, chard or peas

TIME TO TRY IT. Look up your family tree, try Sudoku, invent a cocktail. <<Here's>> a list of 30 new things to try, choose one and Go Do!

GET ON IT. Sort out any overdue health checks today. Arrange your dental check-up, medical appointment, eye test or health screen. Make that call.

FOOD SWAP DAY. Well done for staying clear of sugar. Is there another switch you could make to stay healthy? Click <<here>> for ideas.

STRESS MANAGEMENT SORTED. Well done. Today reach out to someone who you know is stressed. Offer to help, cook a meal or take time to listen to them.

SLUMBER NUMBER. There are many ways to improve sleep. <<These>> 10 tips can help, make sure you try at least one tonight.

PLASTIC NOT FANTASTIC. Try to cut down your plastic usage today. Get yourself a reusable shopping bag or get a reusable water bottle. Put them in sight so you use them everyday. Easy and effective!

ZERO WASTE KITCHEN. You're a conscious chef, great! Want to challenge yourself? Check out <<this>> website to see if you can run a zero waste kitchen.

SHARED STRATEGY. Think of 3 ways in which you could be more sustainable and discuss them with a colleague. Next week try to change one of them. <<Here>> are some ideas if you need inspiration.

SUNSHINE DAY. Write down 3 things you're looking forward to today, this week, this month. New experiences, someone to see, even small pleasures count. A key to happiness is having something to look forward to!

PEOPLE FIRST. Today make more time for those who matter. Treat a friend, surprise a loved one, take the kids out or just really listen to someone.

MORNING MATTERS. Research shows eating breakfast helps control weight. Rediscover the pleasure, add a healthy twist. Find ideas <<here>>.

PLAN YOUR MEALS. Take 10 minutes to fill out a weekly menu <<planner>>. You'll find it easier to make healthier choices, save time and money.

TIPPLE SWITCH. Find a lower alcohol version of your usual drink today. Low-alcohol beers and wines are tasty and mocktails are cool. Check <<this>> website for ideas.

YOU'RE BODY IS A TEMPLE. Cherish it today. Book a health check, try self-massage, a face mask, meditate, do yoga or get a nice early night.

SHUN SUGAR. Today make a significant health improvement, commit to having less sugar. Opt for a sweeter life instead. Click <<here>> for tips.

BREATHING SPACE DAY. When you feel pressured today, take a 3 minute breathing space. Stop everything and focus just on your breath, let the calm in.

SWEET DREAMS. Come when you avoid screens 2 hours before bed. <<Here>> are some tips: have a bath, wind down, put on calm music, take nice thoughts to bed.

MARKET MANIA. This weekend try to buy most of your food items at the farmers market. Bring your own bag and ask for paper packaging, no plastic allowed!

CONSCIOUS KITCHEN. Check out <<this>> website for tips about smart shopping. What can you do to reduce food waste even more?

OFFICE OPTIONS. Discuss ways to make your office more sustainable with your colleagues. Go paperless, reusable cups, improve recycling, reduce energy? Every little bit helps.

GRATITUDE JOURNAL. Notice good things as they happen today. Write down things that make you feel good and that you're grateful for. Try to add to the list a few times per week. Paying attention to the positive creates a new way of looking at life!

ME TIME. You make time for other people. That's good. Today set aside 20 minutes just for you. Don't apologise or feel guilty. Do what makes you happy.

WHAT ARE YOU EATING FOR? Back off from boredom, address your stress. Get busy, unwind, release your emotions so you only eat when you're hungry today.

BAR CODE. Today plan some alcohol-free fun. Go on a walks with buddies instead of the pub, picnics rather than restaurants, or a movie night.

VEGETABLE POWER UP! Well done for getting your fruit and vegetable quota. Add beets, kale, chard or peas and pack more of a nutritional <<punch>> today.

YOU'RE GREAT AT TRYING NEW THINGS. Can you go further outside your comfort zone today? Pick one new thing from <<this>> list and Go Do!

CELEBRATE! It's great that you take good care of yourself. Today pay attention to a part of your body you love. Hands, legs, feet or back. Stretch it, appreciate it, treat it.

PRIORITISE DAY. Accept you can't do everything today. Separate what's really important from what's not. Focus on the important and let the rest wait.

GREEN CHALLENGE. You're conscious of the environment, great! Challenge yourself and try to find even more ways to be sustainable <<here>>.

CONSCIOUS KITCHEN. Check out <<this>> website for tips to prevent food waste. Start by implementing one and notice the difference. How many of these can you use?

MAKE SOMEONE'S DAY. Find your oldest living relative or friend. Pay them a visit, give them a call or drop them a friendly hello letter with a photo. They'll be happy and you'll be glad you did it.

Visit 3

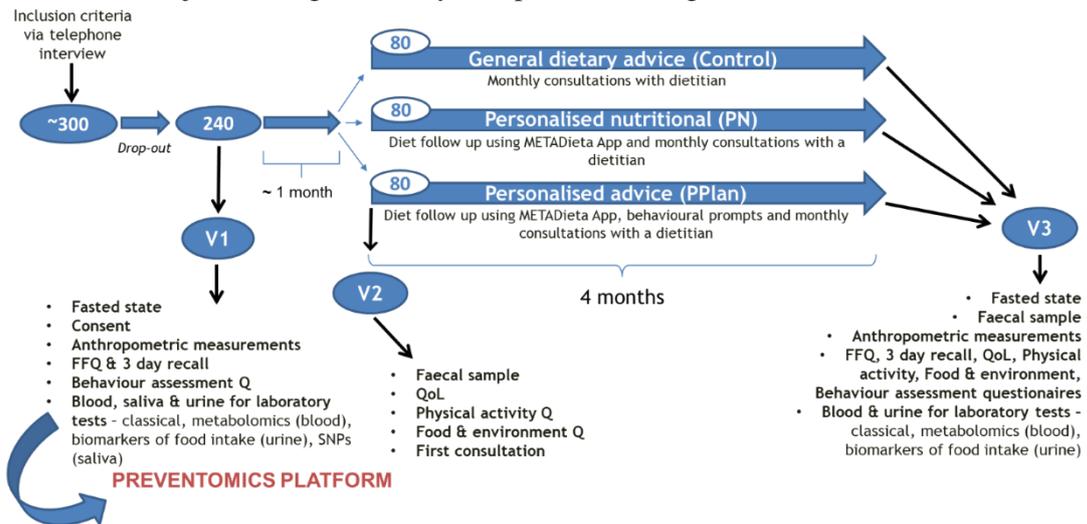
V3 will take place about 4 months after V2. Participants will attend the NIHR Clinical Research Facility at Southampton General Hospital in the morning (between 8 and 10 am) in the fasted state (no food or drink apart from water) from 9 pm the night before. Participants may bring a recent faecal sample with them. Participant's height, weight, waist and hip circumference will be measured as will their body composition (Tania bioelectric impedance). Then a 20 mL blood will be collected to provide whole blood, serum and plasma. Then subjects will be given breakfast (orange juice, toast and jam, tea or coffee). After they finish their breakfast, participants will complete a food frequency questionnaire, a 3-day diet recall and quality of life, physical activity, food and environment and behavior assessment questionnaires. During this visit subjects will be asked to provide a urine sample (20 ml). The duration of visit 3 is likely to be 2 hours.

The samples collected at V3 will be used as follows:

Sample	Measurement	Analysed by	Reason
Blood - Plasma	IL-6 TNF α MCP-1 IL-10 Soluble ICAM-1 Soluble CD14 Oxidised LDL	University of Southampton	Inflammatory marker analysis

	Acylcarnitine profile	Eurcat, Barcelona, Spain	Fatty acid and branched-chain amino acid catabolism analysis
Blood - Serum	Leptin Adiponectin CRP Insulin Total cholesterol HDL- cholesterol LDL- cholesterol Triglycerides Glucose Creatinine ALT GGT Uric acid Food intake biomarkers	University of Southampton Eurcat, Barcelona, Spain	Blood lipid profile Liver and Kidney function analysis Validation of diet
Urine	Food intake biomarkers 8-iso-PGF2 α 8-OHdG	University of Parma, Parma, Italy Eurcat, Barcelona, Spain Eurcat, Barcelona, Spain	Validation of diet Validation of diet Analysis of oxidative stress
Faeces	16S rRNA sequencing	LEITAT, Barcelona, Spain	Gut microbiome profile

Volumes of blood to be collected at V3 will be the same as at V1.
The flow of subjects through the study is depicted in the figure below:



A summary of the questionnaires to be used at each time point is as follows:

Questionnaire	V1	V2	V3
Food frequency	YES		YES
3-day diet recall	YES		YES

Behaviour assessment	YES		YES
Quality of life		YES	YES
Physical activity		YES	YES
Food environment & habits		YES	YES

1. Variables and analyses

The primary outcome measure will be the reduction of waist circumference compared between the three groups.

In addition the following will be measured as outcomes:

1. Weight, body mass index, body fat mass, body lean mass, hip circumference, waist:hip ratio
1. Dietary and nutrient intake (from food frequency questionnaire)
1. Quality of life (questionnaire)
1. Physical activity (questionnaire)
1. Attitude to food (questionnaire)
1. Blood glucose, insulin, HOMA-IR
1. Blood lipids (total, LDL and HDL cholesterol, triglycerides, non-esterified fatty acids)
1. Adipokines (leptin, adiponectin, leptin/adiponectin ratio)
1. Inflammatory biomarkers (CRP, IL-6, MCP-1, IL-10, sICAM-1, sCD14, oxidized LDL)
1. Liver health markers (ALT, GGT)
1. Renal health markers (uric acid, creatinine)

1. Sample size and statistical analysis

The primary outcome of the study is a reduction in waist circumference. A meta-analysis that reviewed 31 randomized controlled trials (8442 participants) identified that traditional interventions such as dietary advice have a very modest effect on waist circumference (a loss of ~0.6 cm) over a period of months (4). In comparison, reduction in waist circumference was greater (a loss of ~3.0 cm) in trials that used internet-based interventions (4). Thus, we hypothesise that the difference in reduction in waist circumference between the control group and the personalized nutrition group will be 2.4 cm with a further difference of 2.4 cm between the personalized nutrition group and the personalized nutrition plus behavior change prompts group. To detect this difference in waist circumference between groups with 80% power with a two-tailed α of 0.05 and assuming a standard deviation (SD) of 5.5 cm, a sample size of 65 per group was calculated (total n for three groups = 195). Thus, to allow for a drop-out rate of about 20%, 240 subjects will be enrolled. Changes between V1 and V3 in all outcomes will be compared between groups by one-way ANOVA; where the ANOVA is significant pairwise comparisons between groups will be performed. Statistical analysis will be conducted using the current version of SPSS.

1. Adverse events

7.1 What is an adverse event?

An adverse event (AE) is defined as any untoward medical occurrence in a patient or clinical study subject administered an investigational product and which does not necessarily have a causal relationship with this treatment. An AE can therefore be any unfavourable and unintended sign (including an abnormal laboratory finding), symptom, or disease temporally associated with the use of an investigational product, whether or not related to the investigational product.

An adverse reaction is defined as all untoward and unintended responses to an investigational product related to any dose administered, i.e. where a causal relationship between the investigational product and an adverse event is at least a reasonable possibility.

An unexpected adverse reaction is an adverse reaction, the nature or severity of which is not consistent with the information about the investigational product or intervention in question set out in the Summary of Product Characteristics or Investigator's Brochure.

An adverse event, adverse reaction, or unexpected adverse reaction, is defined as serious if it:

a) results in death;

b) is life-threatening;

Life threatening in the definition of a serious adverse event (SAE)/serious adverse reaction (SAR) refers to an event in which the subject was at risk of death at the time of the event; it does not refer to an event that hypothetically might have caused death if it were more severe.

c) requires hospitalisation or prolongation of existing hospitalisation;

In general, hospitalisation signifies that the subject has been detained (usually involving an overnight stay) at the hospital or emergency ward for observation and/or treatment which would not have been appropriate at the investigator site. When in doubt as to whether hospitalisation occurred or was necessary, the adverse event should be considered as serious. Hospitalisation for elective surgery or routine clinical procedures, which are not the result of an AE, need not be considered AE and should be recorded on a Clinical Assessment form and added to the study file. If something untoward is reported during the procedure, this must be reported as an AE and either 'serious' or 'non-serious' attributed according to the usual criteria.

d) results in persistent or significant disability or incapacity;

e) consists of a congenital anomaly or birth defect.

Medical judgement should be exercised in deciding whether an SAE/SAR is serious in other situations. Important SAE/SARs that are not immediately life-threatening or do not result in death or prolonged hospitalisation but may jeopardise the subject or may require intervention to prevent one or the other outcomes listed in the definition above, should also be considered serious.

A suspected serious adverse reaction (SSAR), is any serious adverse reaction that is suspected (possibly or probably) to be related to the investigational product.

A suspected unexpected serious adverse reaction (SUSAR) is an SSAR which is also "unexpected", meaning that its nature and severity are not consistent with the information about the investigational product in question set out in the IB.

7.2 Intensity

The assessment of intensity will be based on the investigator's clinical judgement using the following definitions:

- Mild: An event that is easily tolerated by the participant, causing minimal discomfort and not interfering with everyday activities.
- Moderate: An event that is sufficiently discomforting to interfere with normal everyday activities.
- Severe: An event that prevents normal everyday activities.

The term severity is often used to describe the intensity (severity) of a specific event. This is not the same as 'seriousness', which is based on participant/event outcome or action criteria.

7.3 Causality

The relationship between the investigational product/procedure and the occurrence of each AE will be assessed and categorised as below by the investigator. The investigator will use clinical judgement to determine the relationship. Alternative causes, such as natural history of the underlying diseases, concomitant therapy, other risk factors etc. will be considered. The Investigator will also consult the IB or other product information.

- Not related: Temporal relationship of the onset of the event, relative to administration of the product, is not reasonable or another cause can by itself explain the occurrence of the event.
- Unlikely: Temporal relationship of the onset of the event, relative to administration of the product, is likely to have another cause which can by itself explain the occurrence of the event.
- Possibly related: Temporal relationship of the onset of the event, relative to administration of the product, is reasonable but the event could have been due to another, equally likely cause.
- Probably related: Temporal relationship of the onset of the event, relative to administration of the product, is reasonable and the event is more likely explained by the product than any other cause.
- Definitely related: Temporal relationship of the onset of the event, relative to administration of the product, is reasonable and there is no other cause to explain the event, or a re-challenge (if feasible) is positive.
- Where an event is assessed as possibly related, probably related, definitely related the event is an adverse reaction.

7.4 Expectedness

Adverse reactions must be considered as unexpected if they add significant information on the specificity or severity of an expected adverse reaction. The expectedness of an adverse reaction shall be determined according to the reference documents.

- Expected: Reaction previously identified and described in protocol and/or reference documents.
- Unexpected: Reaction not previously described in the protocol or reference documents.

All AEs occurring during the period from screening visit to the trial completion will be registered and reported if applicable.

For all adverse event/reactions the investigator will make an assessment of intensity, causality, expectedness and seriousness.

The PI will keep the Sponsor and the REC informed of any significant findings.

At the end of the study all adverse events recorded during the study will be subject to statistical analysis and analysis and subsequent conclusions will be included in the final study report. All AEs experienced by study subjects will be registered. After trial completion these study subjects will be unblinded and the list of treatment allocation should be transferred to BASF AS.

7.5 Expedited reporting of serious adverse events

All patient safety related incidents will be reported according to University Hospital Southampton NHS Foundation Trust (UHS) Incident Reporting and Management Policy. In addition to the Trust Incident reporting, SAEs are expedited to the people and departments identified below. The PI (or delegated person) will make an initial report, orally or in writing. The initial report will include as much information as is available at the time.

The PI (or delegated person) will report the following:

SUSAR

Immediately report to:

- the PI
- the sponsor
- UHS R&D department
- UHS patient safety team (using Trust incident Reporting form)
- the University of Southampton

UHS will be responsible to further expedite the Reporting of SUSAR to the REC that gave approval as soon as possible but within 7 days. The investigator (or delegated person) will make an initial report, orally or in writing. The initial report will include as much information as is available at the time. Oral reports will be followed up in writing within a further 24 hours of the initial report.

After the initial report the investigator will actively follow up the subject. The Investigator (or delegated person) will provide information missing from the initial report within five working days of the initial report.

Written reports will be made by completing an SAE/SUSAR reporting form provided by University Hospital Southampton R&D.

UHS incident report template available from UHS Staffnet or departmental log books

SAE

Within 24 hours report to:

- the PI
- the Sponsor
- UHS R&D Department
- the University of Southampton

As above; but no expedited reporting to the REC.

Urgent Safety Measures/ Temporary Halt of the Trial

Implement and report immediately as a substantial amendment to:

- the PI
- the Sponsor

The PI

must inform as soon as possible but within 3 days:

- the REC that granted approval
- the University of Southampton

The Sponsor and the PI must be notified of any urgent safety measures/temporary halt of a trial that have had to be taken that are not part of the protocol.

The report must include the reasons for the urgent safety measure and the plan for further action.

1. **Ethical and governance considerations**

The study will be approved by an NHS Ethics Committee; such approval will be sought as soon as the protocol is finalised.

The study will be approved by University Hospital Southampton R&D.

The study will be approved by the University of Southampton Research Governance Office.

The study sponsor will be University Hospital Southampton NHS Foundation Trust.

The study will be registered at a relevant clinical trial registration site.

The study will be conducted in accordance with the recommendations for physicians involved in research on human participants adopted by the 18th World Medical Assembly, Helsinki 1964 as revised and recognized by governing laws and EU Directives; and the principles of GCP and in

accordance with all applicable regulatory requirements including but not limited to the Research Governance Framework and the Medicines for Human Use (Clinical Trial) Regulations 2004, as amended in 2006 and any subsequent amendments.

The PI will submit a final report at conclusion of the trial to the REC within the timelines defined in the Regulations.

1. References

1. NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC). Worldwide trends in body-mass index, underweight, overweight, and obesity from 1975 to 2016: a pooled analysis of 2416 population-based measurement studies in 128.9 million children, adolescents, and adults. *Lancet* 2017, 390, 2627-2642.
2. National Child Measurement Programme. See: https://khub.net/web/phe-national/public-library/-/document_library/v2WsRK3ZIEig/view_file/283231935?_com_liferay_document_library_web_portlet_DLPortlet_INSTANCE_v2WsRK3ZIEig_redirect=https%3A%2F%2Fkhub.net%3A443%2Fweb%2Fphe-national%2Fpublic-library%2F-document_library%2Fv2WsRK3ZIEig%2Fview%2F283231753%3F_com_liferay_document_library_web_portlet_DLPortlet_INSTANCE_v2WsRK3ZIEig_redirect%3Dhttps%253A%252F%252Fkhub.net%253A443%252Fweb%252Fphe-national%252Fpublic-library%252F-document_library%252Fv2WsRK3ZIEig%252Fview%252F283169557x.
3. Haslam DW, James WP. Obesity. *Lancet* 2005, 366, 1197-209.
4. Seo DC, Niu J. Evaluation of internet-based interventions on waist circumference reduction: A meta-analysis. *J Med Internet Res* 2015, 17, e181.
5. International Diabetes Federation. IDF Consensus Worldwide Definition of the Metabolic Syndrome. Brussels, Belgium IDF Commun 2006:1–24. http://www.idf.org/webdata/docs/IDF_Meta_def_final.pdf.1-24.

7.3. Protocolo estudio de intervención SP

EUT_PREVENTOMICS Study

NUTRICIÓN PERSONALIZADA BASADA EN EL PERFIL METABÓLICO Y EN LA EVALUACIÓN DEL COMPORTAMIENTO PARA OPTIMIZAR LOS HÁBITOS DIETÉTICOS Y EL ESTADO METABÓLICO. ESTUDIO ALEATORIZADO, PARALELO, CONTROLADO Y SIMPLE CIEGO (EUT_PREVENTOMICS).

PERSONALIZED NUTRITION ADVICE BASED ON METABOLIC PROFILING AND BEHAVIOUR ASSESSMENT FOR OPTIMIZING DIETARY HABITS AND METABOLIC STATUS. SINGLE BLIND, PARALLEL, RANDOMIZED, CONTROLLED INTERVENTION TRIAL (EUT_PREVENTOMICS).

PROTOCOLO

Principal researcher: Dr. Rosa Solà Alberich
Hospital Universitari Sant Joan de Reus

Product development responsible: Unitat Tecnològica de Nutrició i Salut (UTNS)_Eurecat_Reus

1 of 35

ADMINISTRATIVE INFORMATION	
Title	PERSONALIZED NUTRITION ADVICE BASED ON METABOLIC PROFILING AND BEHAVIOUR ASSESSMENT FOR OPTIMIZING DIETARY HABITS AND METABOLIC STATUS. SINGLE BLIND, PARALLEL, RANDOMIZED, CONTROLLED INTERVENTION TRIAL (EUT_PREVENTOMICS).
Acronym	EUT_PREVENTOMICS
Trial record	To register in clinicaltrials.gov
Protocol version	1
Informed consent version	1
Financing	The present study is funded by Horizon 2020 programme (DT-SFS-142018).
Functions and responsibilities	<p>Principal researcher: Dr. Rosa Solà, HUSJR and Unitat Tecnològica de Nutrició y Salut (UTNS) EURECAT-REUS</p> <p>Study sponsor and coordinating center: UTNS_EURECAT-REUS. Avda. Universitat, 1 43204 Reus Tel. +34 977 300 431</p> <p>Responsible of the coordinating center: Dr. Josep Maria Del Bas Prior. EURECAT-REUS</p> <p>Research team: Dra. Rosa Solà Dra. Rosa M Valls Dra. Anna Pedret Sra. Lorena Calderón Sra. Laura Pla-Paga Sra. Judit Company Sra. Patricia Salamanca Dra. Montse Giralt Dra. Anna Crescenti</p>
INTRODUCTION	

Background and justification	<p>Nowadays, diet is recognized as one of the most important factors in the development of non-communicable diseases. Therefore, nutrition and dietary habits stand out as an invaluable tool for preventing diseases^{1,2}. Among these dietary habits, Mediterranean diet is now recognized as one of the best models of food patterns providing protection against chronic diseases and with beneficial effects on quality of life^{3,4}.</p> <p>The Mediterranean diet has received much attention due to its antiinflammatory and antioxidant effects, with a positive influence on several parameters such as abdominal obesity, elevated blood pressure, dyslipidemia and carbohydrate metabolism⁵. This cluster of health benefits</p>
-------------------------------------	---

has been associated to the low-glycaemic index, the low intake of animal protein, and the high content of food-based plants plenty phytochemicals with anti-inflammatory and antioxidant properties^{4,6}.

During the last years, expectation on precision nutrition beyond personalized diet has been increasing due to the possibility of adapting diet to the actual needs of the person, optimizing the function of the organism.

Currently, diet precision in the context of general population is mainly addressed to heterogeneous groups of population, depending on variables such as age, gender or physical state among others^{7,8}. Beyond this approach, a more accurate personalization strategy is based on adapting some components of the diet to the genetic profile of the subject while considering a limited number of phenotypical traits.

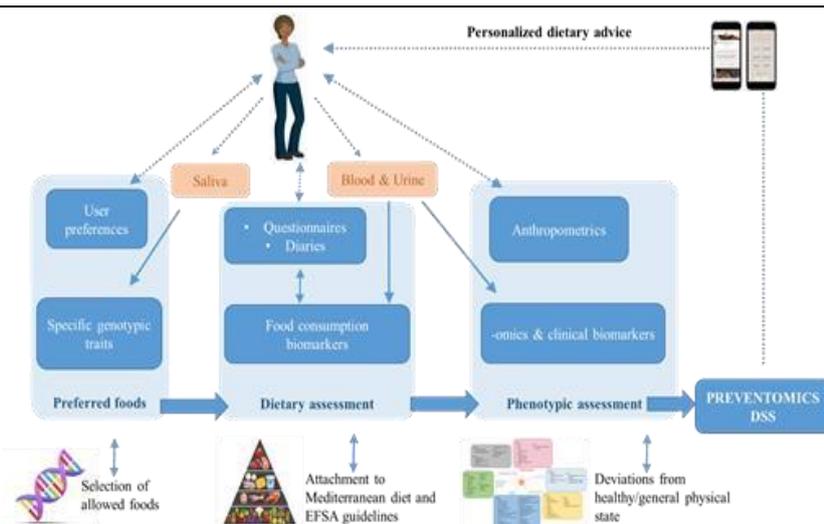
Nevertheless, according to the international society of nutrigenetics and nutrigenomics, this approach has not settled in society because, with the actual tools, the real degree of personalization, understood at an individual level, is still low⁹. Furthermore, although genetic assessment can provide useful information about the genetically programmed response of a subject to a given food or nutrient, phenotypic traits including metabolome, are dynamic markers and, hence, more appropriate for defining the effects of environmental variables, such as diet, physical activity and noncommunicable diseases, on the organism¹⁰.

Some authors have proposed that a wide array of chronic noncommunicable diseases of high prevalence in our society^{11,12} have a multifactorial origin, being the result of a sustained dysregulation of some physiological processes, such as metabolic stress, oxidative stress, chronic systemic low-grade inflammation or psychological stress among others. Since most of these processes can be modulated by diet, optimizing them by means of nutritional interventions could represent an invaluable approach for preventing diseases. Nevertheless, a complete characterization of these physiological processes is needed in order to know their real state in individuals and be able to deliver an adequate intervention for their restoration when required. Currently, -omics technologies provide the necessary tools for accurate assessing the state of these physiological processes.

In this context, **PREVENTOMICS project** financed by the European Research and Innovation programme H2020 (Call H2020-SFS-2018-2020; DT-SFS-14-2018; Project title : Empowering consumers to PREVENT dietrelated diseases through OMICS sciences) and with a consortium of different companies and public entities, including EURECAT, **aims to assess the most relevant metabolic processes which dysregulation leads to the onset of disease and to integrate individual's metabolic signature with genetic, biological, nutritional and psychological aspects through Information and communication Technologies (ICTs) to deliver preventive personalized nutrition tools in order to correct early deviations (see figure 1).**

The main concept behind the PREVENTOMICS project is to provide personalized recommendations based on a multi-level classification after clustering the different users according to their dietary habits and preferences, their levels of physical activity, shopping preferences, possible allergies and phenotypic (i.e. metabolomics and proteomics-based multivariate approach) and genotype characterization.

Figure 1. Overview of the PREVENTOMICS methodology.



To achieve the main objective, the PREVENTOMICS project consortium has developed a **personalized nutrition strategy based on a recommender system in order to provide personalized nutrition tailored to the actual status of the subject.**

To do that, the physiological processes considered in PREVENTOMICS have been selected according to their relevance with health and disease, to nutritional status and, therefore, their ability for being modulated by nutritional interventions.

These processes are:

oxidative stress.

systemic inflammation.

carbohydrate metabolism.

lipid metabolism.

microbiota status has been added through the measurement of microbiota generated metabolites because of the recently recognized role of the microbiota in controlling host metabolism and inflammation^{13,14}.

In order to define the status of these physiological process, classically accepted biomarkers already used in clinical assessment and intervention studies will be determined, including blood triglycerides, cholesterol, Creactive protein, glucose or urine isoprostanes among others. Moreover, the recommender system developed in PREVENTOMICS combines these measurements with other biomarkers that have been sufficiently well characterized as surrogates for studying specific metabolic processes¹⁵ (Annex 1).

With the above information, the PREVENTOMICS recommender system also integrates a panel of single nucleotide polymorphisms (SNPs) selected by ALIMENTOMICA according to the following criteria:

their involvement with the above physiological processes;

their potential modulation of relevant factors such as food preferences, self-control of intake, body composition, among others;

their relevance under nutritional or intervention strategies; and

their nutrigenetic impact and therefore are able to predict a better response associated to specific dietary advice in particular allele carriers.

Besides, behavioural research shows clearly that the provision of knowledge and advice as a means to help people make changes in their

lifestyles does not necessarily result in the desired behavioural change²⁰. Therefore, in order to achieve sustainable long-term lifestyle changes, people need to be prompted to behave in new ways that do not rely on their willpower or conscious thinking²¹.

Therefore, the recommender system will anonymously collect data on analyzed biomarkers, habits, mental wellbeing levels, cognitive health, social inclusion and behaviours and will translate this using behavioural change algorithms along with digital delivery into a series of personalised, goal-orientated, friendly, and achievable actions proposed to the user.

Thus, to achieve PREVENTOMICS project objectives, a consortium of 19 partners was created including:

4 small medium-sized enterprises (Alimentomica, Carinsa, Do

Something Different and Practico);

9 research performing institutions (Eurecat, University of Parma, University of Southampton-Southampton General Hospital, Institute of

Communication and Computer Systems, Maastrich University, Wageningen

University, Leitat, Jagiellonian University Medical College);

3 companies with exploitation interests (SimpleFeast, Meteda and Aldi)

A consumer association OCU;

A standardization body, UNE;

Osteoarthritis Foundation International – OAFI.

This PREVENTOMICS consortium is distributed within 7 different European countries (Spain, United Kingdom, Denmark, Italy, Germany, Netherlands and Poland).

The main outcome of the **PREVENTOMICS project has been a novel recommender system** that can be used in a wide array of applications or business models. Within the **PREVENTOMIC project**, three different applications of the system are evaluated:

- 1) Personalization of weekly menus delivered at home (catering).
- 2) Adaptation of professional tools for nutritionists and dieticians (advanced tools for health professionals).
- 3) Personalized shopping experience in supermarket (retailers).

In PREVENTOMICS project, the UTNS of Eurecat in Reus is focused in personalized shopping experience together with ALDI supermarkets and will conduct the study with clinically healthy adults and using a dedicated ALDI microwebsite to assess application number 3.

The ALDI microsite uses the personalized recommendations generated by the recommender system to provide each user the most appropriate dietbased nutritional and behavioural changes recommendations according to the individual's needs, lifestyle and preferences and personalizing the shopping experience in ALDI's online supermarket.

Importantly, despite the proposed use of such workflow might be demonstration of personalized online shopping, **the pilot carried out in Reus does not support trading**. Therefore, users will use the ALDI microsite to generate a shopping list navigating through a personalized ALDI catalog, but they are free to shop at any retailer other than ALDI.

The improvement in dietary habits will be based on the Mediterranean diet adherence as a reference, as this diet is recognized as one gold standard⁴.

Hypothesis	Some metabolic alterations, such as oxidative stress, chronic low-grade inflammation, dysregulation of carbohydrate and lipid metabolisms and alterations of gut microbiota; can induce diseases if chronified. In turn, these metabolic alterations can be strongly modulated by nutrition and dietary habits.
-------------------	---

Therefore, in the present study we hypothesize that empowering consumers with tools that adapt nutrition recommendations to individual's metabolic state, lifestyle and food preferences through the utilization of the recommender system developed in PREVENTOMICS, with or without the application of behavioral change programs, will promote favorable and sustained changes in personal dietary behavior and food choices at the supermarket, promoting Mediterranean diet and beneficial effects on the health status of individuals.

Objectives	<p>Thus, the main objective of the present study is to assess the soundness of the personalized nutrition advice generated by the recommender system and its combination with a behavioral change intervention, to improve dietary habits of individuals compared to standard and generic nutritional advice, measured through adherence to the Mediterranean diet and delivered through a retailer website (ALDI microsite).</p> <p>Secondary objectives are to evaluate the effects of using the personalized nutrition advice provided by PREVENTOMICS through a retailer website on:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Anthropometric measurements - Blood pressure - Metabolic profile.
-------------------	---

METHODS

Volunteers, interventions and results

Ambit of the study	The visits will be carried out at the Sant Joan University Hospital and the Nutrition and Health Technology Unit (Eurecat-Reus).
---------------------------	--

Study products:	<p>The product is a digital environment which combines biological information, personal habits and preferences to provide nutritional recommendations. This digital environment is composed by two softwares described below.</p> <p>All softwares have been developed under the Regulation (EU) 2016/679 on General Data Protection Regulation (GDPR) according to the requirements of the European commission H2020 program.</p> <p>The system is composed by two main softwares that will be used sequentially in the current study:</p> <p style="text-align: center;">A. The recommender system</p> <p>This software combines the behavioral and biological information about the volunteer and generates personalized nutritional recommendations. Thus, different type of data are introduced anonymously into the recommender system:</p> <ol style="list-style-type: none"> a. metabolic and genetic measurements are introduced by technicians after laboratory analysis of blood, urine and saliva samples of the volunteer. b. anthropometrics data of the volunteer are introduced by the nutritionist.
------------------------	--

- c. behavioral information, dietary habits and food restrictions and preferences are introduced through different questionnaires filled in by the volunteer aided by the nutritionist.

The detailed sequence of events that volunteers will follow when using the recommender system is as follows:

Initially, in the engagement visit volunteers will provide the following biological samples and dietary information:

1. Collection of urine 24 hours previous to the inclusion visit.
2. A sample of feces to be stored for further use Fasted state blood.
3. Oral smear.
4. Blood sample.
5. A 3-days dietary record.

Next, to facilitate the interaction of the volunteer with the recommender system, a graphical user interface has been developed as a simple website.

Therefore, the volunteer will log in the website and, together with a dietician, will fill in different online questionnaires:

6. Preventomics food frequency questionnaire, which is an adapted food questionnaire from The European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study.
7. Questionnaire about food preferences (vegan, vegetarian, no meat consumption and other preferences).
8. Questionnaire about consumption of dietary supplements.
9. A 14-item Mediterranean Diet Adherence Screener (MEDAS) test to determine the adherence to Mediterranean diet.
10. A behavioural change questionnaire designed by the PREVENTOMICS partner company ONMI (<https://www.onmi.design/>).

11. The IPAQ-short for physical activity.
12. Quality of life questionnaires EQ-5D, OWLQOL, DSat-28.

Once the volunteer has provided all these data and samples, biological samples will be subjected to metabolomics, proteomics and genetic analyses. Completion of the analyses will take approximately 1 month. The volunteer will be able to track the status of their analyses through the recommender system website.

Once the laboratory tests have been finished, laboratory technicians will upload the results into the recommender system and volunteers will be notified that they can start the personalized program.

In the recommender system, the information (biological data and dietary habits) is combined, resulting in personalized dietary recommendations that are based in the Mediterranean diet paradigm. These recommendations are generated for each subject in the form of specific food categories that the user should consume or avoid, together with the corresponding servings. This information is stored in the recommender system, and can be requested by other softwares. In this study, the requesting software will be the ALDI microsite.

B. The ALDI microsite

ALDI has developed a microsite to enable navigation through ALDI's catalogue in order to select food products to elaborate a shopping list. This site retrieves the personalized recommendations for the volunteer from the recommender system. Since these personalized recommendations are provided as food categories, the ALDI microsite matches these food categories with products of the ALDI catalogue. Thus, a personalized catalogue is subsequently shown to the volunteer. As a result, the volunteer receives a list of products classified under different food categories that are recommended for him/her. Next to each food category, the number of servings recommended (weekly or daily) is also shown. Therefore, the user can freely choose products that are recommended for him/her depending on the outcome of the recommender system.

The ALDI microsite also facilitates free catalogue navigation, so the volunteer can choose whatever product of the catalogue to complete his/her shopping list. Finally, once the shopping list is completed, it is checked to alert the volunteer if an inappropriate product for him/her has been selected and offer the opportunity to remove it from the list. The ALDI microsite also stores the shopping lists generated throughout the study and requests weekly to the user to check which items of the list have been actually consumed as an accomplishment measure.

Importantly, **the ALDI microsite is not an e-commerce tool**. Volunteers cannot buy from the microsite. The ALDI microsite is a tool only to elaborate a shopping list through personalized recommendations. Therefore, volunteers can choose to buy their food shopping list at wherever store other from ALDI.

Volunteers in the control group will not have personalized recommendations. These volunteers will have access to a restricted version of the ALDI microsite where the list of recommended products correspond to categories that are general recommendations according to Mediterranean diet. Therefore, no personalized recommendations are delivered to control users.

Moreover, a behavioural change program (deployed only in one study group) is conducted. The ALDI microsite includes a system to deliver messages. This system will be available only for those subjects engaged in a program of behavioral change delivered by ONMI. Thus, in one intervention group, volunteers will use the above described softwares

together with a behavioural change program designed and provided by ONMI. The goal of this program is to increase the adherence to the recommendations provided by the ALDI microsite by promoting a proper attitude by means of a series of personalized, goal-orientated, friendly, achievable actions delivered periodically to the volunteer. The ONMI program is fed with the results of behavior questionnaires. The personalized messages are delivered through the ALDI microsite.

The interactions among the recommender system and the ALDI microsite is depicted in figure 2

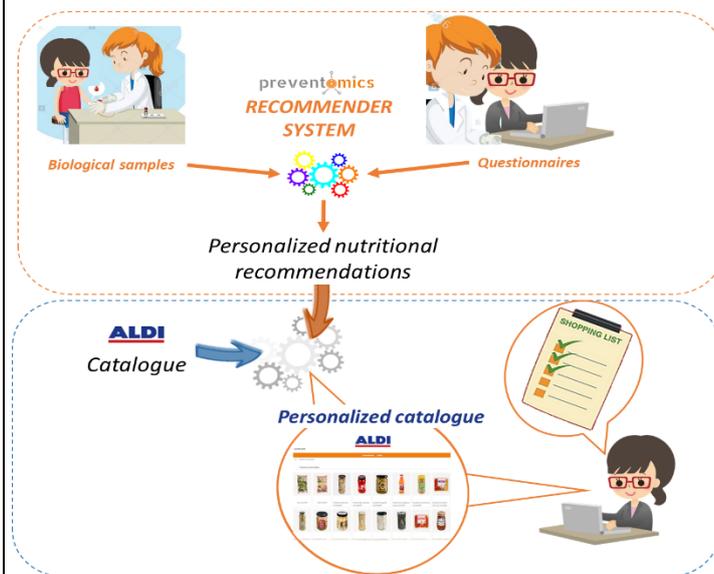


Figure 2: graphical abstract of the interaction between the two softwares of the system. The PREVENTOMICS recommender system generates personalized recommendations that are used by the ALDI microsite to provide a personalized shopping-like experience.

Period of the study	Start of the study: after the favorable report from the CEIm Finish date: May 2021.
Study design	Parallel, randomized, placebo-controlled, and single-blind intervention trial. The 180 volunteers will be randomly divided into three groups of 60 volunteers: a) Personalized nutrition group (PN) that will receive personalized recommendations through the ALDI's catalogue;

- b) Personalized Plan group (PP), that will receive PN advice and behavioural change program; or
- c) Control group, in which general recommendations but not personalization nor behavioural change advice will be implemented.

The duration of the intervention for each group will be 4 months.

In the screening visit (V0), volunteers will sign the informed consent and all the necessary materials and kits for feces, 24 hours urine collection and the template for 3-day food record will be provided.

In the engagement visit (V1), volunteers in fasted stated will provide:

- a) 24-hour urine collection,
- b) Sample of feces
- c) 3-day dietary record.
- d) Oral smear.
- e) blood samples.

Afterwards, the volunteer will go through the different tabs of the recommender system website together with a dietician. The volunteer will log in the recommender system and fill different questionnaires under the supervision of the dietician:

1. A PREVENTOMICS food frequency questionnaire
2. A questionnaire about food preferences.
3. A questionnaire about dietary supplements consumption.
4. The MEDAS test.
5. A behavioural change questionnaire designed by ONMI (<https://www.onmi.design/>).
6. The IPAQ-short for physical activity.
7. Quality of life questionnaires EQ-5D, OWLQOL, DSat-28.

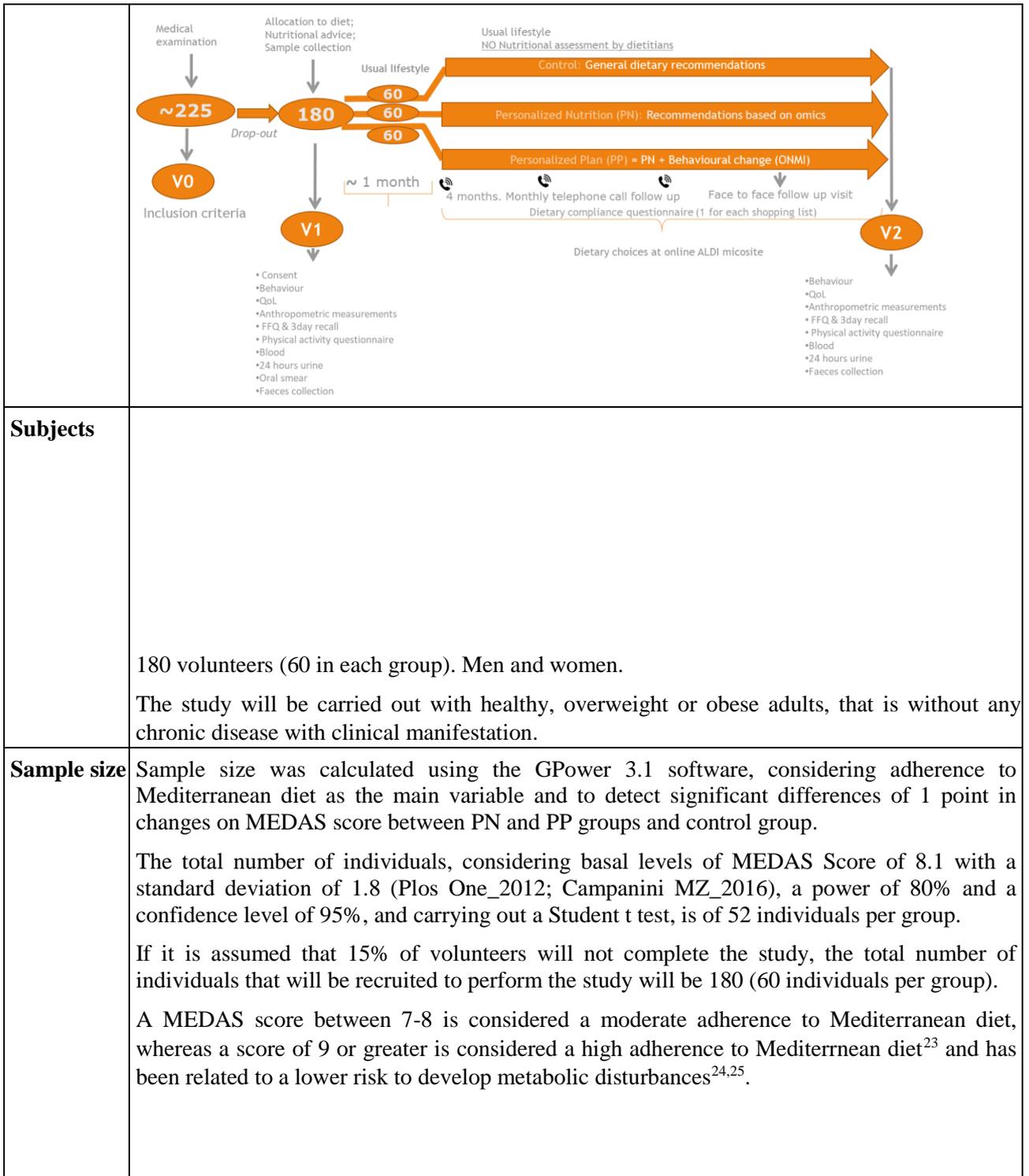
Samples of serum, plasma, urine and oral smear will be sent for analysis to obtain the genetic profile of different SNPs (ALIMENTOMICA, <http://www.alimentomica.com/>) and the metabolic status (EURECAT) of volunteers before the intervention.

This initial metabolic status will be used as a baseline to determine personalized nutrition advice and to assess the changes in the overall health status after using the ALDI microsite by volunteers in the PN, PP and control groups.

The time estimated for having the results of all the required analyses is one month. Therefore, after one month, volunteers will be informed by phone to start using the ALDI microsite. During the study, volunteers in the control, PN and PP groups will use the ALDI microsite themselves to generate their shopping list. Technological support will be provided by Eurecat digital area staff. Volunteer follow up will be done by telephone interview once a month.

The final follow-up visit will be at EURECAT facilities in order to collect the materials and kits for fecal sample and 24-hours urine collection and 3days dietary record.

After 4 months, volunteers will repeat the same process described for the engagement visit (except the oral smear) in order to assess any progression respect the baseline.



Criteria for inclusion and exclusion of volunteers	<p><i>Inclusion criteria:</i></p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Men and women. 2. Signed informed consent. 3. To have internet access. <p><i>Exclusion criteria:</i></p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Diabetes (or glucose ≥ 126 mg/dL or pharmacological treatment). 2. Hypertension (systolic blood pressure ≥ 160 mmHg and/or diastolic blood pressure ≥ 100 mmHg or pharmacological treatment). 3. Dyslipidaemia (cLDL ≥ 4.9 mmol/L and/or triglycerides ≥ 4.5 mmol/L (≥ 400 mg/dL) and/or cHDL < 40 mg/dL (1.03 mmol/L) in men and < 50 mg/dL (1.29 mmol/L) in women) or with pharmacological treatment. 4. Use of prescribed medicine to control acute or chronic inflammation. 5. Anaemia (haemoglobin ≤ 13 g/dL in men and ≤ 12 g/dL in women) 6. BMI (in kg/m²) < 18.5 or > 35. 7. Being pregnant or planning to become pregnant within the study
---	--

	<p>period.</p> <ol style="list-style-type: none"> 8. Be in breastfeeding period. 9. Current smokers. 10. Participate in or have participate in a clinical trial or nutritional intervention study in the last 30 days prior to inclusion in the study. 11. Present some chronic gastrointestinal disease. 12. Present some chronic disease with clinical manifestation, like coronary heart diseases, cardiovascular disease, coeliac disease, Crohn's disease and chronic kidney disease (or serum creatinine ≥ 1.7 mg/dL for men and ≥ 1.5 mg/dL for women). 13. Following a prescribed diet for any reason, including weight loss, in the last 3 months. 14. Following a pharmacological treatment for weight loss or intake of food supplements or medications that could affect body weight. 15. Having allergies or food intolerances. 16. No or limited access to the Internet. 17. Consumption of more than 14 drinks of alcoholic beverages per week. 18. Mediterranean Diet Adherence Score (MEDAS) > 8 of 14 points, which is a food pattern already highly concordant with the Mediterranean Diet¹⁶. 19. Being unable to follow the study guidelines.
--	--

<p>Products of the study: safety, dosage and administration</p>	<p>Safety:</p> <p>In the study, volunteers in the intervention groups PN and PP, will receive nutritional recommendations through ALDI's microsite based on the utilization of foods depending on volunteer's characteristics.</p> <p>Since the nutritional intervention of the study consists in changing the diet for healthy foods included in the catalogue of ALDI, no safety problem is expected on the volunteers during the course of the study.</p> <p>However, during the study, monthly phone calls will allow to control for potential adverse events in volunteers during the study. The EURECAT public phone and the intervention trials e-mail (estudis@eurecat.org) will be available for questions and problems of volunteers.</p>
<p>Recruitment</p>	<p>Recruitment will be carried out using the different routes that UTNS of Eurecat uses:</p> <p>Volunteer databases of previous studies in general.</p> <p>Primary Care Centers with which the UTNS (formerly CTNS) collaborates.</p> <p>Media and social networks where the UTNS has its own profile and experience in the recruitment of volunteers for nutritional intervention studies. The study will be published in:</p> <ul style="list-style-type: none"> • The bulletins (http://www.ctns.cat/bulleti) • UTNS website (http://www.ctns.cat/noticies) • Facebook (https://www.facebook.com/CentreTecnologicNutricioSalut/) • Twitter (https://twitter.com/ctns_info?lang=ca). <p>On the other hand, it is hoped to make use of the scientific contacts networks of the research team and the center for the volunteer's</p>

	<p>recruitment.</p> <p>The information that will appear in these media will refer to the objectives and duration of the study, the inclusion criteria of the volunteers, the participation in the study and contact details, which will be the following:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Contact telephone number: 636 944 723 • Email: estudis@eurecat.org <p>It is not expected that volunteers receive any compensation for their participation.</p>
--	--

<p>Schedule regarding the volunteers</p>	<p>The total duration of the study will be 21 weeks.</p> <p>The study visits are designed as follows:</p> <p>A screening visit (V0) to check inclusion/exclusion criteria and provide materials and kits for fecal samples and 24h-urine collection and the template for the 3-day dietary record.</p> <p>An engagement visit (V1) for sample collection in fasting conditions, signing in the PREVENTOMICS system and filling in questionnaires described above in presence of a dietician to assist the volunteer. Allocation of volunteers will be done in this visit.</p> <p>After this visit, volunteers will wait for one month following their usual lifestyle, including dietary habits. This one-month period is necessary to perform the different analyses (genetic, clinical and metabolic) and to integrate results of metabolic and genetic assessment with those from the questionnaires in order to generate personalized nutritional recommendations.</p> <p>-After 1 month, volunteers will be informed by phone to start using the ALDI microsite for elaborating their shopping list following the corresponding intervention (PN, PP or control Mediterranean-diet base recommendation)</p> <p>Follow up: Monthly phone calls will be used for volunteer follow up. The EURECAT intervention trials public phone will be available for questions and doubts. Technical support will be provided by EURECAT staff.</p> <p>A final follow-up visit (V2): during the last month, volunteers will attend the Eurecat facilities to collect new kits and material for collection of feces, 24hours urine and 3-days dietary record for the final study visit.</p> <p>a final study visit (V3) where same sampling (except oral smear) and questionnaires than in V1 will be applied in order to assess changes respect V1.</p> <p>A questionnaire will be performed at each visit and telephone follow up (except in the case of the V0) to determine the presence / absence of adverse effects.</p> <p>Visit 0 (V0): Screening Recruitment and selection</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Information to the volunteer and signature of the informed consent. ▪ Revision of the inclusion/exclusion criteria. ▪ Revision of clinical history. ▪ Physical exploration (determination for selection). ▪ Vital signs (blood pressure/resting heart rate). ▪ Anthropometry (height/weight/waist perimeter).
---	---

Checking the concomitant medication.
Fasting blood collection.
Schedule the first visit and instructions.
Delivering materials and kits for feces, 24-hours urine collection and 3days food record.

Visit 1 (V1): Assignment, inclusion, randomization and start of the study.

Checking the concomitant medication.
Vital signs (blood pressure/resting heart rate).
Anthropometry (height/weight/waist perimeter). Fasting blood and 24h urine collection.
Oral smear collection.
Faeces collection
Signing in the recommender system.
Physical activity questionnaire. Quality of life questionnaire.
Behavioural questionnaire.
Food frequency AND MEDAS questionnaires.
Schedule the final visit and instructions.

Follw-up by monthly telephone interview Checking the
concomitant medication.
Checking of adverse events
Schedule the next visit and instructions

Final follw-up visit

Checking the concomitant medication.
Checking of adverse events.
Schedule the next visit and instructions
Delivering materials and kits for feces, and 24-hours urine collection and 3-days food record.

Visit 2 (V2): end of the study.

Checking the concomitant medication.
Vital signs (blood pressure/resting heart rate).
Anthropometry (height/weight/waist perimeter).
Fasting blood and 24h urine collection.
Faeces collection
Physical activity questionnaire. Quality of life questionnaire.
Behavioural questionnaire.
Food frequency and MEDAS questionnaires.

Variables	<p>□ Main variable (visits V1 and V2):</p> <p>The main variable will be adherence to Mediterranean diet measured through the Mediterranean Diet Adherence Screener (MEDAS).</p> <p>This score is an extension of a 9-point score developed in the Prevención con Dieta Mediterránea (PREDIMED) trial²⁴. It consists of 2 questions about eating habits, 8 questions about the frequency of consumption of typical foods of the Mediterranean diet, and 4 questions about the consumption of foods not recommended in this diet²⁶.</p> <p>Each question is scored with 0 (non-compliant) or 1 (compliant), and the total score (from a total of 14 questions) ranged from 0 to 14, so a score of</p>
------------------	--

14 points mean maximum adherence²⁶.

□ **Secondary variables** (visits V1 and V2):

Anthropometric measurements:

- Weight.
- Height.
- Waist circumference.
- Waist to hip ratio (WHR).
- Body composition measured using Tanita Body Composition Analyzer.

Blood pressure.

Standard biochemical variables.

- Urinalysis.
- Blood cell count.
- Creatinine.
- Urea.
- Uric acid.
- ALT.
- AST.
- Bilirubin.
- Ions.
- Serum proteins.

Biochemical biomarkers specified in Annex 1 and related with the following metabolic processes:

- Inflammation - Oxidative stress
- Lipid metabolism.
- Carbohydrate metabolism.
- Microbiota.

Genotyping analysis in mouth epithelium (only in visit V1). SNPs to be analyzed by ALIMENTOMICA are specified in Annex 2.

Metabolomics in 24 h urine for health and consumption biomarkers.

Urine samples will be sent to University of Parma (Department of Food & Drugs; Laboratory of Phytochemicals in Physiology of the Human Nutrition Unit) to be subjected to targeted HR-LC-MS/MS metabolomics approaches in order to assess the dietary pattern of each subject through a comprehensive analysis of the main biomarkers of food consumption. Biomarkers will be selected according to the outcomes of the FoodBall project (<https://www.biomedcentral.com/collections/bfnr>). They are compounds derived from the metabolism of main/characteristics components of main dietary food sources and excreted in urine. This investigation will be applied to generate a comprehensive picture of the consumption of food products by each subject and to validate the PREVENTOMICS food frequency questionnaire.

Nutrition habits. Nutritional habits and daily intake will be evaluated through a PREVENTOMICS food frequency questionnaire, a questionnaire

	<p>about food preferences.</p> <p>Behavior change that will be evaluated through a behavioural change questionnaire designed by ONMI (https://www.onmi.design/).</p> <p>Physical activity that will be evaluated through the IPAQ-short for physical activity questionnaire.</p> <p>Quality of life that will be estimated through EQ-5D, OWLQOL, DSat28 questionnaires.</p>
Allocation of interventions	
Sequence generation	<p>A simple randomization will be carried out with volunteers who meet the inclusion and exclusion criteria that will be assigned a code obtained from a randomization list following the chronological order by which they were included in the study.</p> <p>Stratified randomization with sex and BMI as confounding factor will be carried out with volunteers who meet the inclusion and exclusion criteria that will be assigned a code obtained from a randomization sequence for each stratum following the chronological order by which they are included in the study.</p> <p>Randomization will indicate the product that the volunteer will consume in the study. The list of the randomization sequence will be generated by SAS 9.2 (Cary, NC: SAS Institute Inc.) statistical software PROC PLAN with 1:1.</p>
Allocation concealment	<p>Knowledge of the code assigned to patients will be restricted and the list with the assignment will be saved.</p> <p>Researchers that evaluate the results and perform statistical analysis will not know the volunteers' assignment to the PN, PP or control groups.</p> <p>The code will be assigned by an independent researcher not related to the study to guarantee the blinding.</p>
Performance of the sequence	<p>From the sequence of randomization, the assignment will be recorded in a Microsoft Excel list by a researcher not involved in the clinical study.</p>
Collection, management and data analysis	
Methods of data collection	<p>All data will be collected, evaluated and recorded by expert researchers. Questionnaires will be carried out to collect nutritional habits and possible adverse effects.</p> <p>The biochemical, blood pressure and anthropometric parameters will be measured through standardized protocols.</p>
Data management	<p>The data will be entered into a computerized and protected database with limited access. All softwares used are GDPR compliant.</p>

Statistical methods	<p>In order to carry out this task, the data obtained in the study will be used from the volunteers evaluated by intention to treat (ITT) and by the volunteers evaluated by protocol, that is, those volunteers who have completed the treatment plan and who have exactly followed the instructions of the trial protocol.</p> <p>Descriptive data will be expressed as means \pm standard error of the mean (SEM).</p> <p>An ANOVA test will be used to compare the baseline values between the 3 study groups.</p> <p>To determine significant differences in response to the two treatments for the measured parameters it will be used a covariance analysis with treatment effect and potential confounding variables as covariates and using the change from baseline for each measured parameter as independent variable.</p> <p>Furthermore, within each treatment group (PN, PP and control groups) the differences between means before and after treatment will be assessed using a t test for paired samples.</p> <p>All statistical tests will be performed using SPSS version 22 program (SPSS, Inc., Chicago, IL), considering p values <0.05 as statistically significant.</p>
Monitoring	
Data monitoring	The data obtained during the scheduled visits will be recorded in the data collection notebook.
Adverse effects	The registry of adverse effects in each visit will be made in accordance with the Medical Dictionary for Regulatory Activities (MedDra dictionary), MedDRA Version 22.0 (Spanish MedDRA March 2019).
ETHICS AND DISSEMINATION	
Amendments to the protocol	Any amendments made to this protocol will be communicated to the researchers involved and to the ethics committee.
Consent or compliance	<p>According to the attached form.</p> <p>The volunteers fill out and sign the informed consent that is presented in the first visit, together with the information with the volunteer.</p>
Confidentiality and data protection	<p>The treatment, communication and transfer of personal data of all participating subjects will comply with the established in the Organic Law Regulation (EU) RGPD 2016/679, of April 2016, regarding the protection of data of personal nature, and the free circulation of these data, as well as Organic Law 3/2018, of December 5, on Data Protection and Guarantee of digital Rights (LOPD and GDD).</p> <p>This study as well as its development process will be carried out under Law 14/2007 of July 3, of Biomedical Research.</p>
Declaration of interests	The study is funded by Eurecat and is carried out by researchers, belonging to Eurecat and the academic Hospital Sant Joan de Reus.
Access to data	Researchers will have access to the data in a format in which the volunteers identify themselves by a code. Access to volunteer personal data will be restricted to the study doctor / collaborators, health authorities, the Ethical Committee and personnel authorized by the promoter, always maintaining the confidentiality of the data in accordance with current

f

	legislation. These procedures are subject to the established in the Organic Law Regulation (EU) RGPD 2016/679 of May 2018 Protection of Personal Data.
Dissemination policy	EURECAT- Reus will be the last responsible for disseminating the results. The writing of scientific articles will be done by the study's researchers.

PRACTICAL CONSIDERATIONS

SCHEDULE

	2020										2021				
	Mar	Abr	May	Jun	Jul	Aug	Sep	Oct	Nov	Dec	Jan	Feb	Marc	Abr	May
CEIm request															
Recruitment															
Sample and data analysys															
Intervention															
Analysis															
Final report															

STUDY INSURANCE

Insurance will be contracted to HDI HANNOVER International (Spain), Insurance and Reinsurance Company S.A., located in Madrid, c / Luchana, 23, established in accordance with the regulatory requirements of Spain to cover the responsibility of the personnel involved in the study in case of damages and injuries caused by this research project.

STANDARDIZED WORK PROCEDURES

The Technological Unit of Nutrition and Health of Eurecat has standardized work procedures for all its activities and ensures compliance of strict protocols of quality assurance.

ANALYTICAL MEMORY OF THE SAMPLES TO BE ANALYZED

Biological samples will be collected at the Universitary Hospital Sant Joan, which the researcher group of the study will analyze at the facilities of the UTNS, the Faculty of Medicine and Health Sciences of the Rovira i Virgili University. Samples will be stored in the Biobanc of the Pere Virgili Sanitary Research Institute.

REFERENCES

1. Tuttolomondo, A. *et al.* Metabolic and Vascular Effect of the Mediterranean Diet. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 4716 (2019).

2. Kahleova, H. *et al.* Dietary Patterns and Cardiometabolic Outcomes in Diabetes: A Summary of Systematic Reviews and Meta-Analyses. *Nutrients* **11**, 1–28 (2019).
3. Estruch, R. *et al.* Primary prevention of cardiovascular disease with a Mediterranean diet. *N. Engl. J. Med.* **368**, 1279–90 (2013).
4. Sánchez, E. *et al.* Mediterranean diet, physical activity and subcutaneous advanced glycation endproducts' accumulation: a cross-sectional analysis in the ILERVAS project. *Eur. J. Nutr.* (2019) doi:10.1007/s00394-019-01983-w.
5. Castro-Quezada, I., Román-Viñas, B. & Serra-Majem, L. The mediterranean diet and nutritional adequacy: A review. *Nutrients* **6**, 231–248 (2014).
6. Olmedo-Requena, R. *et al.* Agreement among mediterranean diet pattern adherence indexes: MCCSpain study. *Nutrients* **11**, 1–13 (2019).
7. Laddu, D. & Hauser, M. Addressing the Nutritional Phenotype Through Personalized Nutrition for Chronic Disease Prevention and Management. *Prog. Cardiovasc. Dis.* **62**, 9–14 (2019).
8. van Ommen, B. *et al.* Systems biology of personalized nutrition. *Nutr. Rev.* **75**, 579–599 (2017).
9. Kohlmeier, M. *et al.* Guide and Position of the International Society of Nutrigenetics/Nutrigenomics on Personalized Nutrition: Part 2 - Ethics, Challenges and Endeavors of Precision Nutrition. *J. Nutrigenet. Nutrigenomics* **9**, 28–46 (2016).
10. Suárez, M., Caimari, A., del Bas, J. M. & Arola, L. Metabolomics: An emerging tool to evaluate the impact of nutritional and physiological challenges. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **96**, 79–88 (2017).
11. Series, W. T. R. Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases . Report of the joint WHO/FAO expert consultation. <http://www.who.int/dietphysicalactivity/publications/trs916/summary/en/> **TRS916**,.
12. Global Burden of Diseases. <http://www.healthdata.org/gbd>.
13. Kolodziejczyk, A. A., Zheng, D. & Elinav, E. Diet–microbiota interactions and personalized nutrition. *Nat. Rev. Microbiol.* (2019) doi:10.1038/s41579-019-0256-8.
14. Sánchez-Tapia, M., Tovar, A. R. & Torres, N. Diet as Regulator of Gut Microbiota and its Role in Health and Disease. *Arch. Med. Res.* **50**, 259–268 (2019).
15. Dorcely, B. *et al.* Novel biomarkers for prediabetes, diabetes, and associated complications. *Diabetes, Metab. Syndr. Obes. Targets Ther.* **10**, 345–361 (2017).
16. Leblanc, V. *et al.* Effects of a nutritional intervention program based on the self-determination theory and promoting the mediterranean diet. *Heal. Psychol. Open* **3**, (2016).

17. Manach, C. *et al.* Addressing the inter-individual variation in response to consumption of plant food bioactives: Towards a better understanding of their role in healthy aging and cardiometabolic risk reduction. *Mol. Nutr. Food Res.* **61**, 1–16 (2017).
18. Edmands, W. M. B. *et al.* Polyphenol metabolome in human urine and its association with intake of polyphenol-rich foods across European countries. *Am. J. Clin. Nutr.* **102**, 905–913 (2015).
19. Esko, T. *et al.* Metabolomic profiles as reliable biomarkers of dietary composition. *Am. J. Clin. Nutr.* **105**, 547–554 (2017).
20. Pine, K. & Fletcher, B. Time to shift brain channels to bring about effective changes in health behaviour. *Perspect. Public Health* **134**, 16–17 (2014).
21. Fletcher B., P. K. J. Flex: Do Something Different. *Mind, Nat. Emerg. Sci. Chang. An Introd. to Methodol.* 1–184 (2012).
22. Schröder, H. *et al.* A Short Screener Is Valid for Assessing Mediterranean Diet Adherence among Older Spanish Men and Women. *J. Nutr.* **141**, 1140–1145 (2011).
23. Alvarez-Alvarez, I. *et al.* Adherence to a priori dietary indexes and baseline prevalence of cardiovascular risk factors in the PREDIMED-Plus randomised trial. *Eur. J. Nutr.* (2019) doi:10.1007/s00394-019-01982-x.
24. Martínez-González, M. A. *et al.* A 14-item mediterranean diet assessment tool and obesity indexes among high-risk subjects: The PREDIMED trial. *PLoS One* **7**, (2012).
25. Konieczna, J. *et al.* Longitudinal changes in Mediterranean diet and transition between different obesity phenotypes. *Clin. Nutr.* (2019) doi:10.1016/j.clnu.2019.04.002.
26. Quintana-Navarro, G. M. *et al.* Long-term dietary adherence and changes in dietary intake in coronary patients after intervention with a Mediterranean diet or a low-fat diet: the CORDIOPREV randomized trial. *Eur. J. Nutr.* (2019) doi:10.1007/s00394-019-02059-5.
27. Choe, S. S., Huh, J. Y., Hwang, I. J., Kim, J. I. & Kim, J. B. Adipose Tissue Remodeling: Its Role in Energy Metabolism and Metabolic Disorders. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **7**, 30 (2016).
28. Vykoukal, D. & Davies, M. G. Vascular biology of metabolic syndrome. *J. Vasc. Surg.* **54**, 819–831 (2011).
29. Skrypnik, K. *et al.* The genetic basis of obesity complications. *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.* **16**, 83–91 (2017).
30. Liu, C. *et al.* Adiponectin, TNF- α and inflammatory cytokines and risk of type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis. *Cytokine* **86**, 100–109 (2016).
31. Sprague, A. H. & Khalil, R. A. Inflammatory cytokines in vascular dysfunction and vascular disease. *Biochem. Pharmacol.* **78**, 539–552 (2009).

32. de Courten, B. *et al.* Contrasting association of circulating sCD14 with insulin sensitivity in non-obese and morbidly obese subjects. *Mol. Nutr. Food Res.* **60**, 103–9 (2016).
33. Harpole, M., Davis, J. & Espina, V. Current state of the art for enhancing urine biomarker discovery. *Expert Rev. Proteomics* **13**, 609–26 (2016).
34. Arnold, J. N., Saldova, R., Hamid, U. M. A. & Rudd, P. M. Evaluation of the serum N-linked glycome for the diagnosis of cancer and chronic inflammation. *Proteomics* **8**, 3284–93 (2008).
35. Pickard, J. M. & Chervonsky, A. V. Intestinal fucose as a mediator of host-microbe symbiosis. *J. Immunol.* **194**, 5588–93 (2015).
36. Goto, Y., Uematsu, S. & Kiyono, H. Epithelial glycosylation in gut homeostasis and inflammation. *Nat. Immunol.* **17**, 1244–1251 (2016).
37. Gonzalez-Franquesa, A., Burkart, A. M., Isganaitis, E. & Patti, M.-E. What Have Metabolomics Approaches Taught Us About Type 2 Diabetes? *Curr. Diab. Rep.* **16**, 74 (2016).
38. Moreno-Navarrete, J. M. *et al.* Gut Microbiota Interacts with Markers of Adipose Tissue Browning, Insulin Action and Plasma Acetate in Morbid Obesity. *Mol. Nutr. Food Res.* 1700721 (2017) doi:10.1002/mnfr.201700721.
39. Hernández-Alonso, P. *et al.* Effect of pistachio consumption on the modulation of urinary gut microbiota-related metabolites in prediabetic subjects. *J. Nutr. Biochem.* **45**, 48–53 (2017).
40. Sonnenburg, J. L. & Bäckhed, F. Diet-microbiota interactions as moderators of human metabolism. *Nature* **535**, 56–64 (2016).
41. Chhibber-Goel, J., Singhal, V., Parakh, N., Bhargava, B. & Sharma, A. The Metabolite Trimethylamine-N-Oxide is an Emergent Biomarker of Human Health. *Curr. Med. Chem.* **24**, 3942–3953 (2017).
42. Chhibber-Goel, J. *et al.* The complex metabolism of trimethylamine in humans: endogenous and exogenous sources. *Expert Rev. Mol. Med.* **18**, e8 (2016).
43. Reverri, E. J., Slupsky, C. M., Mishchuk, D. O. & Steinberg, F. M. Metabolomics reveals differences between three daidzein metabolizing phenotypes in adults with cardiometabolic risk factors. *Mol. Nutr. Food Res.* **61**, 1600132 (2017).
44. Plovier, H. & Cani, P. D. Microbial Impact on Host Metabolism: Opportunities for Novel Treatments of Nutritional Disorders? *Microbiol. Spectr.* **5**, 131–148 (2017).
45. Aleksandrova, K., Mozaffarian, D. & Pischon, T. Addressing the Perfect Storm: Biomarkers in Obesity and Pathophysiology of Cardiometabolic Risk. *Clin. Chem.* **64**, 142–153 (2018).
46. van der Aa, M. P., Knibbe, C. A. J., Boer, A. de & van der Vorst, M. M. J. Definition of insulin resistance affects prevalence rate in pediatric patients: a

- systematic review and call for consensus. *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.* **30**, 123–131 (2017).
47. Finucane, F. M. *et al.* Correlation of the leptin: Adiponectin ratio with measures of insulin resistance in non-diabetic individuals. *Diabetologia* **52**, 2345–2349 (2009).
 48. López-Jaramillo, P. *et al.* The role of leptin/adiponectin ratio in metabolic syndrome and diabetes. *Horm. Mol. Biol. Clin. Investig.* **18**, 37–45 (2014).
 49. Perla, F., Prelati, M., Lavorato, M., Visicchio, D. & Anania, C. The Role of Lipid and Lipoprotein Metabolism in Non- Alcoholic Fatty Liver Disease. *Children* **4**, 46 (2017).
 50. Klop, B., Elte, J. W. F. & Cabezas, M. C. Dyslipidemia in obesity: mechanisms and potential targets. *Nutrients* **5**, 1218–40 (2013).
 51. Suárez, M. *et al.* Mediterranean diet and multi-ingredient-based interventions for the management of non-alcoholic fatty liver disease. *Nutrients* **9**, (2017).
 52. Niroumand, S. *et al.* Atherogenic Index of Plasma (AIP): A marker of cardiovascular disease. *Med. J. Islam. Repub. Iran* **29**, 240 (2015).
 53. Calder, P. C. Omega-3 fatty acids and inflammatory processes: from molecules to man. *Biochem. Soc. Trans.* **45**, 1105–1115 (2017).
 54. Hammad, S., Pu, S. & Jones, P. J. Current Evidence Supporting the Link Between Dietary Fatty Acids and Cardiovascular Disease. *Lipids* **51**, 507–517 (2016).
 55. Zock, P. L., Blom, W. A. M., Nettleton, J. A. & Hornstra, G. Progressing Insights into the Role of Dietary Fats in the Prevention of Cardiovascular Disease. *Curr. Cardiol. Rep.* **18**, (2016).
 56. Farvid, M. S. *et al.* Dietary Linoleic Acid and Risk of Coronary Heart Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis of Prospective Cohort Studies. *Clinical Perspective. Circulation* **130**, 1568– 1578 (2014).
 57. del Bas, J. M. *et al.* Impairment of lysophospholipid metabolism in obesity: Altered plasma profile and desensitization to the modulatory properties of n-3 polyunsaturated fatty acids in a randomized controlled trial. *Am. J. Clin. Nutr.* **104**, 266–279 (2016).
 58. Guasch-Ferré, M. *et al.* Metabolomics in Prediabetes and Diabetes: A Systematic Review and Metaanalysis. *Diabetes Care* **39**, 833–846 (2016).
 59. Newgard, C. B. Metabolomics and Metabolic Diseases: Where Do We Stand? *Cell Metab.* **25**, 43–56 (2017).
 60. Gannon, N. P., Schnuck, J. K. & Vaughan, R. A. BCAA Metabolism and Insulin Sensitivity - Dysregulated by Metabolic Status? *Mol. Nutr. Food Res.* 1700756 (2018) doi:10.1002/mnfr.201700756.
 61. Friedrich, N. *et al.* Identification of urine metabolites associated with 5-year changes in biomarkers of glucose homeostasis. *Diabetes Metab.* (2017) doi:10.1016/j.diabet.2017.05.007.

62. Di Minno, A. *et al.* 8-Hydroxy-2-Deoxyguanosine Levels and Cardiovascular Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis of the Literature. *Antioxid. Redox Signal.* **24**, 548–55 (2016).
63. Milne, G. L., Musiek, E. S. & Morrow, J. D. F2-isoprostanes as markers of oxidative stress in vivo: an overview. *Biomarkers* **10 Suppl 1**, S10-23 (2005).
64. Thomson, L. 3-nitrotyrosine modified proteins in atherosclerosis. *Dis. Markers* **2015**, 708282 (2015).
65. Zhang, W. & Zhang, X.-A. A Novel Urinary Metabolite Signature for Non-invasive Post-stroke Depression Diagnosis. *Cell Biochem. Biophys.* **72**, 661–7 (2015).
66. Takeuchi, S., Katoh, T., Yamauchi, T. & Kuroda, Y. ADRB3 polymorphism associated with BMI gain in Japanese men. *Exp. Diabetes Res.* **2012**, 973561 (2012).
67. Ryuk, J. A., Zhang, X., Ko, B.-S., Daily, J. W. & Park, S. Association of β 3-adrenergic receptor rs4994 polymorphisms with the risk of type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **129**, 86–96 (2017).
68. Sakane, N. *et al.* Effects of lifestyle intervention on weight and metabolic parameters in patients with impaired glucose tolerance related to beta-3 adrenergic receptor gene polymorphism Trp64Arg(C/T): Results from the Japan Diabetes Prevention Program. *J. Diabetes Investig.* **7**, 338–342 (2016).
69. Hivert, M.-F. *et al.* Common variants in the adiponectin gene (ADIPOQ) associated with plasma adiponectin levels, type 2 diabetes, and diabetes-related quantitative traits: the Framingham Offspring Study. *Diabetes* **57**, 3353–9 (2008).
70. Warodomwicht, D. *et al.* ADIPOQ polymorphisms, monounsaturated fatty acids, and obesity risk: the GOLDN study. *Obesity (Silver Spring)*. **17**, 510–7 (2009).
71. Morandi, A. *et al.* Early detrimental metabolic outcomes of rs17300539-A allele of ADIPOQ gene despite higher adiponectinemia. *Obesity (Silver Spring)*. **18**, 1469–73 (2010).
72. Han, L. Y. *et al.* Associations between single-nucleotide polymorphisms (+45T>G, +276G>T, 11377C>G, -11391G>A) of adiponectin gene and type 2 diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis. *Diabetologia* **54**, 2303–14 (2011).
73. Prior, S. L., Jones, D. A., Gill, G. V, Bain, S. C. & Stephens, J. W. Association of the adiponectin rs266729 C>G variant and coronary heart disease in the low risk ‘Golden Years’ type 1 diabetes cohort. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **91**, e71-4 (2011).
74. Ferguson, J. F. *et al.* Gene-nutrient interactions in the metabolic syndrome: single nucleotide polymorphisms in ADIPOQ and ADIPOR1 interact with plasma saturated fatty acids to modulate insulin resistance. *Am. J. Clin. Nutr.* **91**, 794–801 (2010).

75. Wu, Y. *et al.* Genetic association with lipids in Filipinos: waist circumference modifies an APOA5 effect on triglyceride levels. *J. Lipid Res.* **54**, 3198–205 (2013).
76. Son, K. Y. *et al.* Genetic association of APOA5 and APOE with metabolic syndrome and their interaction with health-related behavior in Korean men. *Lipids Health Dis.* **14**, 105 (2015).
77. Fallaize, R. *et al.* The effect of the apolipoprotein E genotype on response to personalized dietary advice intervention. *Am. J. Clin. Nutr.* **104**, 827–836 (2016).
78. Thorleifsson, G. *et al.* Genome-wide association yields new sequence variants at seven loci that associate with measures of obesity. *Nat. Genet.* **41**, 18–24 (2009).
79. Daily, J. W. & Park, S. Interaction of BDNF rs6265 variants and energy and protein intake in the risk for glucose intolerance and type 2 diabetes in middle-aged adults. *Nutrition* **33**, 187–194 (2017).
80. Lecompte, S. *et al.* Polymorphisms in the CD36/FAT gene are associated with plasma vitamin E concentrations in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* **93**, 644–51 (2011).
81. Corpeleijn, E. *et al.* Direct association of a promoter polymorphism in the CD36/FAT fatty acid transporter gene with Type 2 diabetes mellitus and insulin resistance. *Diabet. Med.* **23**, 907–11 (2006).
82. Jayewardene, A. F., Gwinn, T., Hancock, D. P., Mavros, Y. & Rooney, K. B. The associations between polymorphisms in the CD36 gene, fat oxidation and cardiovascular disease risk factors in a young adult Australian population: a pilot study. *Obes. Res. Clin. Pract.* **8**, e618-21 (2014).
83. Scott, E. M., Carter, A. M. & Grant, P. J. Association between polymorphisms in the Clock gene, obesity and the metabolic syndrome in man. *Int. J. Obes. (Lond)*. **32**, 658–62 (2008).
84. Garaulet, M. *et al.* SIRT1 and CLOCK 3111T>C combined genotype is associated with evening preference and weight loss resistance in a behavioral therapy treatment for obesity. *Int. J. Obes. (Lond)*. **36**, 1436–41 (2012).
85. Nielsen, D. E. & El-Sohemy, A. Disclosure of genetic information and change in dietary intake: A randomized controlled trial. *PLoS One* **9**, (2014).
86. Cornelis, M. C., El-Sohemy, A., Kabagambe, E. K. & Campos, H. Coffee, CYP1A2 genotype, and risk of myocardial infarction. *JAMA* **295**, 1135–41 (2006).
87. Zhang, Y. *et al.* The GC, CYP2R1 and DHCR7 genes are associated with vitamin D levels in northeastern Han Chinese children. *Swiss Med. Wkly.* **142**, w13636 (2012).
88. Zhang, Z., He, J.-W., Fu, W.-Z., Zhang, C.-Q. & Zhang, Z.-L. An analysis of the association between the vitamin D pathway and serum 25-hydroxyvitamin D levels in a healthy Chinese population. *J. Bone Miner. Res.* **28**, 1784–92 (2013).

89. Pu, S. *et al.* Interactions between dietary oil treatments and genetic variants modulate fatty acid ethanolamides in plasma and body weight composition. *Br. J. Nutr.* **115**, 1012–1023 (2016).
90. de Luis, D. A., Gonzalez Sagrado, M., Aller, R., Izaola, O. & Conde, R. Effects of C358A missense polymorphism of the endocannabinoid degrading enzyme fatty acid amide hydrolase on weight loss after a hypocaloric diet. *Metabolism* **60**, 730–734 (2011).
91. Lu, Y. *et al.* Dietary n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acid intake interacts with FADS1 genetic variation to affect total and HDL-cholesterol concentrations in the Doetinchem Cohort Study. *Am. J. Clin. Nutr.* **92**, 258–65 (2010).
92. Cormier, H. *et al.* Association between polymorphisms in the fatty acid desaturase gene cluster and the plasma triacylglycerol response to an n-3 PUFA supplementation. *Nutrients* **4**, 1026–41 (2012).
93. Mathias, R. A. *et al.* FADS genetic variants and omega-6 polyunsaturated fatty acid metabolism in a homogeneous island population. *J. Lipid Res.* **51**, 2766–74 (2010).
94. Nakayama, K. *et al.* A single nucleotide polymorphism in the FADS1/FADS2 gene is associated with plasma lipid profiles in two genetically similar Asian ethnic groups with distinctive differences in lifestyle. *Hum. Genet.* **127**, 685–90 (2010).
95. Scuteri, A. *et al.* Genome-wide association scan shows genetic variants in the FTO gene are associated with obesity-related traits. *PLoS Genet.* **3**, e115 (2007).
96. Coto, E., Tavira, B., Gómez, J., Tranche, S. & Corte, C. D. Effect of the FTO rs9930506 Polymorphism on the Main Comorbidities of the Cardiorenal Metabolic Syndrome in an Elderly Spanish Cohort. *Cardiorenal Med.* **4**, 82–7 (2014).
97. do Nascimento, G. A. *et al.* FTO rs9939609 A allele influences anthropometric outcome in response to dietary intervention, but not in response to physical exercise program. *Eur. J. Nutr.* (2017) doi:10.1007/s00394-017-1596-7.
98. Maia-Landim, A., Ramírez, J. M., Lancho, C., Poblador, M. S. & Lancho, J. L. Long-term effects of Garcinia cambogia/Glucomannan on weight loss in people with obesity, PLIN4, FTO and Trp64Arg polymorphisms. *BMC Complement. Altern. Med.* **18**, 26 (2018).
99. Kozian, D. H. *et al.* Glucokinase-activating GCKR polymorphisms increase plasma levels of triglycerides and free fatty acids, but do not elevate cardiovascular risk in the Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health Study. *Horm. Metab. Res.* **42**, 502–6 (2010).
100. Santoro, N. *et al.* Variant in the glucokinase regulatory protein (GCKR) gene is associated with fatty liver in obese children and adolescents. *Hepatology* **55**, 781–9 (2012).

101. Rousseaux, J. *et al.* The n-3 long-chain PUFAs modulate the impact of the *GCKR* Pro446Leu polymorphism on triglycerides in adolescents. *J. Lipid Res.* **56**, 1774–1780 (2015).
102. Sotos-Prieto, M. *et al.* Relevant associations of the glucokinase regulatory protein/glucokinase gene variation with TAG concentrations in a high-cardiovascular risk population: modulation by the Mediterranean diet. *Br. J. Nutr.* **109**, 193–201 (2013).
103. Barth, S. W. *et al.* Moderate effects of apple juice consumption on obesity-related markers in obese men: impact of diet-gene interaction on body fat content. *Eur. J. Nutr.* **51**, 841–50 (2012).
104. Fishman, D. *et al.* The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *J. Clin. Invest.* **102**, 1369–76 (1998).
105. Pirini, F. *et al.* INSIG2 rs7566605 single nucleotide variant and global DNA methylation index levels are associated with weight loss in a personalized weight reduction program. *Mol. Med. Rep.* **17**, 1699–1709 (2017).
106. Prakash, J. *et al.* Common Genetic Variant of *insig2* Gene rs7566605 Polymorphism Is Associated with Severe Obesity in North India. *Iran. Biomed. J.* **21**, 261–9 (2017).
107. Li, Q. *et al.* Associations between two single-nucleotide polymorphisms (rs1801278 and rs2943641) of insulin receptor substrate 1 gene and type 2 diabetes susceptibility: a meta-analysis. *Endocrine* **51**, 52–62 (2016).
108. Feng, X. *et al.* Insulin receptor substrate 1 (IRS1) variants confer risk of diabetes in the Boston Puerto Rican Health Study. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* **22**, 150–9 (2013).
109. Yang, M. M. *et al.* Variations in the Obesity Gene “LEPR” Contribute to Risk of Type 2 Diabetes Mellitus: Evidence from a Meta-Analysis. *J. Diabetes Res.* **2016**, 5412084 (2016).
110. Phillips, C. M. *et al.* Leptin receptor polymorphisms interact with polyunsaturated fatty acids to augment risk of insulin resistance and metabolic syndrome in adults. *J. Nutr.* **140**, 238–44 (2010).
111. Ben Ali, S. *et al.* LEPR p.Q223R Polymorphism influences plasma leptin levels and body mass index in Tunisian obese patients. *Arch. Med. Res.* **40**, 186–90 (2009).
112. Qi, L., Kraft, P., Hunter, D. J. & Hu, F. B. The common obesity variant near MC4R gene is associated with higher intakes of total energy and dietary fat, weight change and diabetes risk in women. *Hum. Mol. Genet.* **17**, 3502–8 (2008).
113. Kakkoura, M. G. *et al.* Mediterranean diet-gene interactions: A targeted metabolomics study in GreekCypriot women. *Mol. Nutr. Food Res.* **61**, 1600558 (2017).

114. Asefi, M. *et al.* Methyltetrahydrofolatereductase (rs1801133) polymorphism and psoriasis: contribution to oxidative stress, lipid peroxidation and correlation with vascular adhesion protein 1, preliminary report. *J. Eur. Acad. Dermatology Venereol.* **28**, 1192–1198 (2014).
115. Crescenti, A., Solà, R., Valls, R. M., Anguera, A. & Arola, L. Polymorphisms in LEP and NPY genes modify the response to soluble fibre *Plantago ovata* husk intake on cardiovascular risk biomarkers. *Genes Nutr.* **8**, 127–36 (2013).
116. Zhang, X. *et al.* Neuropeptide Y promoter polymorphism modifies effects of a weight-loss diet on 2-year changes of blood pressure: the preventing overweight using novel dietary strategies trial. *Hypertens. (Dallas, Tex. 1979)* **60**, 1169–75 (2012).
117. Lin, Y.-C., Chang, P.-F., Chang, M.-H. & Ni, Y.-H. A common variant in the peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α gene is associated with nonalcoholic fatty liver disease in obese children. *Am. J. Clin. Nutr.* **97**, 326–31 (2013).
118. Franks, P. W. *et al.* PPARGC1A coding variation may initiate impaired NEFA clearance during glucose challenge. *Diabetologia* **50**, 569–73 (2007).
119. Smith, C. E. *et al.* Perilipin polymorphism interacts with dietary carbohydrates to modulate anthropometric traits in hispanics of Caribbean origin. *J. Nutr.* **138**, 1852–8 (2008).
120. Wang, C.-H., Ke, W.-S. & Lin, E. Evaluation of the ENPP1 and PLIN single nucleotide polymorphisms with type 2 diabetes in a Taiwanese population: evidence for replication and gene-gene interaction. *J. Investig. Med.* **60**, 1169–73 (2012).
121. Speliotes, E. K. *et al.* Genome-wide association analysis identifies variants associated with nonalcoholic fatty liver disease that have distinct effects on metabolic traits. *PLoS Genet.* **7**, e1001324 (2011).
122. Stojkovic, I. A. *et al.* The PNPLA3 Ile148Met interacts with overweight and dietary intakes on fasting triglyceride levels. *Genes Nutr.* **9**, 388 (2014).
123. Santoro, N. *et al.* Hepatic Fat Accumulation Is Modulated by the Interaction between the rs738409 Variant in the PNPLA3 Gene and the Dietary Omega6/Omega3 PUFA Intake. *PLoS One* **7**, e37827 (2012).
124. Stumvoll, M. & Häring, H. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 Pro12Ala polymorphism. *Diabetes* **51**, 2341–7 (2002).
125. Regieli, J. J. *et al.* PPAR gamma variant influences angiographic outcome and 10-year cardiovascular risk in male symptomatic coronary artery disease patients. *Diabetes Care* **32**, 839–44 (2009).
126. AlSaleh, A. *et al.* PPAR γ 2 Gene Pro12Ala and PPAR α Gene Leu162Val Single Nucleotide Polymorphisms Interact with Dietary Intake of Fat in Determination of Plasma Lipid Concentrations. *J. Nutrigenet. Nutrigenomics* **4**, 354–366 (2011).

127. Chiba-Falek, O. *et al.* Impact of gene variants on sex-specific regulation of human Scavenger receptor class B type 1 (SR-BI) expression in liver and association with lipid levels in a populationbased study. *BMC Med. Genet.* **11**, 9 (2010).
128. Roberts, C. G. P. *et al.* Variants in scavenger receptor class B type I gene are associated with HDL cholesterol levels in younger women. *Hum. Hered.* **64**, 107–13 (2007).
129. Zillikens, M. C. *et al.* Interactions between dietary vitamin E intake and SIRT1 genetic variation influence body mass index. *Am. J. Clin. Nutr.* **91**, 1387–93 (2010).
130. Bastaki, M. *et al.* Genotype-activity relationship for Mn-superoxide dismutase, glutathione peroxidase 1 and catalase in humans. *Pharmacogenet. Genomics* **16**, 279–86 (2006).
131. Florez, J. C. *et al.* TCF7L2 polymorphisms and progression to diabetes in the Diabetes Prevention Program. *N. Engl. J. Med.* **355**, 241–50 (2006).
132. Corella, D. *et al.* Mediterranean Diet Reduces the Adverse Effect of the TCF7L2-rs7903146 Polymorphism on Cardiovascular Risk Factors and Stroke Incidence: A randomized controlled trial in a high-cardiovascular-risk population. *Diabetes Care* **36**, 3803–3811 (2013).
133. Rangel-Zúñiga, O. A. *et al.* TNFA gene variants related to the inflammatory status and its association with cellular aging: From the CORDIOPREV study. *Exp. Gerontol.* **83**, 56–62 (2016).
134. Nicoletti, C. F. *et al.* UCP1 -3826 A>G polymorphism affects weight, fat mass, and risk of type 2 diabetes mellitus in grade III obese patients. *Nutrition* **32**, 83–7 (2016).
135. Salopuro, T. *et al.* Variation in the UCP2 and UCP3 genes associates with abdominal obesity and serum lipids: the Finnish Diabetes Prevention Study. *BMC Med. Genet.* **10**, 94 (2009).
136. Hsiao, T.-J., Wu, L. S.-H., Hwang, Y., Huang, S.-Y. & Lin, E. Effect of the common -866G/A polymorphism of the uncoupling protein 2 gene on weight loss and body composition under sibutramine therapy in an obese Taiwanese population. *Mol. Diagn. Ther.* **14**, 101–6 (2010)

Table 1. List of biomarkers of health included in the PREVENTOMICS platform.

Biomarker	Metabolic cluster	Source	Scientific substantiation	Technique	References
IL-6 CRP TNF α MCP 1 IL-8	Inflammation	Plasma	The adipose tissues of obese individuals contain increased number of classically activated macrophages (in a pro-inflammatory state). Once activated, these macrophages secrete cytokines such as TNF- α and IL-6. IL-6 strongly stimulates hepatocytes to produce and release CRP. MCP-1 is a potent chemoattractant playing a role in the recruitment of monocytes/macrophages from the blood stream into the adipose tissue. IL-8 is a pro-inflammatory cytokine more secreted in visceral than in subcutaneous adipose tissue. Chronic, low-grade inflammation state associated with visceral obesity induces insulin resistance in the liver. Uncontrolled inflammation generates high levels of free radical production by the immune cells as part of the immune response.	ELISA	27–30
soluble ICAM 1	Inflammation	Plasma	Intercellular Adhesion Molecule 1 (ICAM-1) is an intercellular adhesion molecule continuously present in low concentrations in the membranes of leukocytes and endothelial cells. Upon cytokine stimulation, the concentrations greatly increase. ICAM-1 can be induced by IL-1 and TNF α and is expressed by the vascular endothelium, macrophages and lymphocytes, thereby promoting the vascular adhesion and activation of inflammatory cells.	ELISA	31
soluble CD14	Inflammation	Plasma	Soluble Cluster of Differentiation 14 (sCD14) is expressed as an acute phase protein in response to LPS in other tissues and cells, including liver and adipocytes. It has been shown that non-obese volunteers have lower circulating sCD14 concentrations compared to obese. Circulating sCD14 concentrations have been positively associated with percent body fat, waist circumference and white blood cell count and negatively associated with insulin sensitivity. In contrast, circulating sCD14 has been positively associated with insulin sensitivity in morbidly obese volunteers.	ELISA	32
N-acetylglycoproteins	Inflammation	Urine	Glycosylation is one of the most common PTMs of a secreted protein. Glycoproteins are generally modified by the attachment and processing of a diversity of glycans at each glycosylation site. Several glycosylated markers have been linked to chronic inflammatory diseases, promoting questions about the links between inflammation and cancer.	¹ H-NMR	33,34

Fucose	Inflammation	Urine	Fucose is an L-configuration sugar found abundantly in the mammalian gut. In the mammalian gastrointestinal tract, fucose is an abundant component of glycans decorating proteins and lipids, especially on the epithelial surface facing the lumen and in mucosal secretions. Fucose can have a protective role in both gut centered and systemic infection and inflammation.	1H-NMR	35,36
Acetate	Microbiota	Serum; Urine	Acetate is an end-product of bacterial fermentation. Its levels can be increased in obesity and in type 2 diabetes (T2D). In morbidly obese subjects, Firmicutes relative abundance was negatively correlated with HbA1c and	1H-NMR	37,38

			positively associated with plasma acetate levels, indicating that gut microbiota composition is linked to insulin action in morbidly obese subjects, possibly through circulating acetate.		
Lactate	Microbiota; Carbohydrate	Serum; Urine	Lactic acid plays a role in several biochemical processes and is produced in the muscles during intense activity. It is also an end-product of bacterial fermentation. Elevations in lactate have been consistently associated with T2D and obesity. Changes in plasma lactate during an oral glucose tolerance test (OGTT) are inversely correlated with fasting insulin.	1H-NMR	37
TMAO	Microbiota	Urine	L-Carnitine and choline, compounds that are found in red meat, are metabolized into TMAs that are oxidized further into trimethylamine N-oxide (TMAO) by the enzyme flavin-containing monooxygenase 3 (FMO3) in the liver. Plasma levels of TMAO are strongly correlated with cardiovascular disease (CVD). Chronic consumption of some foods, such as pistachios, are also able to modulate the urinary levels of TMO in prediabetic subjects. TMAO is also associated with microbial dysbiosis.	1H-NMR	37,39-41
TMA	Microbiota	Urine	The microbial metabolism of phosphatidylcholine and of L-carnitine produce high levels of trimethylamine (TMA). Once it has been absorbed from the gut into the bloodstream, TMA circulates to the liver and is enzymatically oxidized to TMAO. A number of other diseases are associated with abnormal levels of TMA, including renal disorders, cancer, obesity, diabetes, cardiovascular diseases and neuropsychiatric disorders.	1H-NMR	40,42
DMA	Microbiota	Urine	The urinary levels of the gut microbial metabolite dimethylamine (DMA) changed in subjects with cardiometabolic risk factors in response to the consumption of soy isoflavones consumption and in pre-diabetic individuals after the intake of pistachios.	1H-NMR	39,43

LPS	Microbiota; Inflammation	Plasma	Lipopolysaccharide (LPS) is a product of gram-negative bacteria that has been described as a key trigger of inflammation and different metabolic disorders, including increased adiposity and insulin resistance. LPS is taken up into chylomicrons that are formed from dietary saturated fats and subsequently they promote inflammation in the host that induces insulin resistance. The presence of metabolic endotoxemia (a mechanism associating the gut microbiota with the onset of insulin resistance and low-grade inflammation) upon HFD or obesity and diabetes has been confirmed in humans.	GC/MS	40,44
Glucose	Carbohydrate	Plasma	Fasting plasma glucose levels is a traditional biomarker used to assess alterations in carbohydrate metabolism and high levels are associated with risk of diabetes and insulin resistance.	Enzymatic methods	45
Insulin	Carbohydrate	Plasma	High fasting and postprandial insulin plasma levels are considered as indirect clinical feature of insulin resistance. Hyperinsulinemia is a key element of the metabolic syndrome and is suggested to mediate the association between visceral obesity and dyslipidemia, hypertension, type 2 diabetes , atherosclerosis and cancer.	ELISA	45
HOMA-IR	Carbohydrate	Plasma	The most frequently used index to determine insulin resistance based on fasting blood levels of glucose and insulin.	-	46
Leptin	Carbohydrate; Lipid	Plasma	Leptin and adiponectin have opposing effects on insulin sensitivity,	ELISA	47,48
Adiponectin	Carbohydrate; Lipid	Plasma	subclinical inflammation, endothelial function and atherosclerosis. Elevated levels of leptin contribute to the development of insulin resistance and chronic inflammation whereas adiponectin exert anti-inflammatory and cardioprotective effects. (L/A) ratio is considered a good risk indicator in obesity. It has been demonstrated that both L/A ratio and HOMA-IR index can be used to identify obese patients with insulin resistance.	ELISA	
Leptin/adiponectin (L/A)	Carbohydrate	Plasma		-	
α -hydroxybutyrate	Carbohydrate	Urine	α -hydroxybutyrate (α -HB) is an organic acid byproduct produced during the synthesis of α -ketobutyrate (α -KB), a product of amino acid metabolism (threonine and methionine) and glutathione anabolism in hepatic tissue. In insulin resistance, increased oxidative stress and lipid oxidation may cause chronic shifts in glutathione synthesis leading to elevated α -HB levels. This is demonstrated by increased urinary α -HB excretion in IR.	1H-NMR	15
α -ketoglutarate	Carbohydrate	Urine	It is a tricarboxylic acid cycle intermediate. Urinary α -ketoglutarate levels are decreased in obese vs. lean individuals.		37
Fumarate	Carbohydrate	Urine		1H-NMR	37

Succinate	Carbohydrate	Urine	They are tricarboxylic acid cycle intermediates. Decreases in urinary fumarate and succinate contribute to the differentiation of patients with T2D from healthy individuals in a principal component analysis		
Malate	Carbohydrate	Urine	It is a tricarboxylic acid cycle intermediate. Elevations in malate have been consistently associated with T2D.	1H-NMR	37
Total cholesterol	Lipid	Plasma	These metabolites are altered in typical dyslipidaemia. Elevated fasting plasma triglycerides, high LDL cholesterol and low HDL cholesterol are risk factors for CDV. In obesity, enhanced lipolysis in adipose tissue, elevated plasma free fatty acids (FFA) levels and high levels of lipids metabolites in non-adipose tissues act as a metabolic mediators of insulin resistance and inflammation, which, in turn, induce altered lipoprotein metabolism in the liver. The catabolism of very low density lipoproteins (VLDL) is diminished, while the catabolism of high density lipoprotein (HDL) increased. Increased accumulation of fat (cholesterol, triglycerides and other lipid metabolites) in the liver is associated with increased lipotoxicity and represents the primary insult in the pathogenesis of hepatic steatosis.	Enzymatic methods	49-51
LDL-cholesterol	Lipid	Plasma		Friedewald formula	
HDL-cholesterol	Lipid	Plasma		Enzymatic methods	
Non-HDL-cholesterol	Lipid	Plasma		Enzymatic methods	
Triglycerides	Lipid	Plasma		Enzymatic methods	
AIP	Lipid	Plasma	Atherogenic index of plasma (AIP) is a strong marker to predict the risk of atherosclerosis and coronary heart disease. AIP is calculated as " $\log(\text{TG}/\text{HDL-C})$ ". It has been suggested that an AIP value of under 0.11 is associated with low risk of CVD; the values between 0.11 to 0.21 and upper than 0.21 are associated with intermediate and increased risks, respectively	-	52
PUFAs (total)	Lipid; Inflammation	Serum	Polyunsaturated fatty acids (PUFAs) are fatty acids that contain more than one double bond in their backbone, and they include some subgroups identified by the position of the last double bond in their structure. PUFA n-3 include alpha linolenic acid (ALA), eicosapentaenoic acid (EPA), docosahexaenoic acid (DHA) and derivatives, while PUFA n-6 include linoleic acid (LA), arachidonic acid (AA) and derivatives. PUFA consumption has shown beneficial effects for human health. For example, PUFA n-3 consumption has been shown to be inversely correlated with coronary heart diseases (CHD) incidence.	1H-NMR	53-55
ARA + EPA	Lipid; Inflammation	Serum	Eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) are n-3 fatty	1H-NMR	53

DHA	Lipid; Inflammation	Serum	acids found in oily fish and fish oil supplements. These fatty acids are capable of partly inhibiting many aspects of inflammation including leucocyte chemotaxis, adhesion molecule expression and leucocyte– endothelial adhesive interactions, production of eicosanoids like prostaglandins and leukotrienes from the n-6 fatty acid arachidonic acid (ARA) and production of pro-inflammatory cytokines.		53
Linoleic acid	Lipid; Inflammation	Serum	It is the predominant n-6 fatty acid. A systematic review and meta-analysis of prospective studies demonstrates that higher intake of n-6 linoleic acid is associated with a lower CHD risk as compared with saturated fatty acids but also independent of what other nutrients it replaces in the diet. Linoleic acid is also the precursor of ARA and recent publications have questioned the evidence and rationale for dietary recommendations of this n-6 fatty acid.	1H-NMR	55,56
MUFAs (total)	Lipid	Serum	Monounsaturated fatty acids (MUFAs) are used as substrates for the synthesis of triglycerides, cholesteryl esters and membrane phospholipids. The saturated to monounsaturated fatty acid ratio affects membrane phospholipid composition and alteration in this ratio has been implicated in a variety of disease states including cardiovascular disease, obesity and diabetes. Numerous beneficial physiologic effects have been attributed to unsaturated fatty acids, including protection from obesity, diabetes, cancer, and atherosclerosis.	1H-NMR	54,55
Oleic acid	Lipid	Serum	Oleic acid (C18:1n-9) is the predominant dietary MUFA, accounting for up to 92 % of dietary MUFA. Dietary MUFA consumption has been suggested as inducing a 20 % reduction in the risk of CVD events, as evidenced by a large body of prospective cohort studies.	1H-NMR	54
Acylcarnitine profile	Lipid, Carbohydrate	Plasma	Acylcarnitines are fatty acid and carnitine esters formed in the cytosol to transport fatty acids into the mitochondrial matrix for β -oxidation. Acetylcarnitine is needed for the carnitine-dependent production of energy from different fatty acids and cell membrane structure maintenance. C3 and C5 acylcarnitines have been positive significantly associated with diabetes risk and insulin resistance. The combination of C3 and C5 acylcarnitines, together with branched-chain amino acids (BCAA) and amino acids methionine, and glutamate/glutamine, was particularly most robust for differentiating lean from obese patients.	LC/MS	15,37

LPCs (total)	Lipid; inflammation	Plasma	In blood plasma significant amounts of lysophosphatidylcholine (LPC) are formed by a specific enzyme system, lecithin:cholesterol acyltransferase (LCAT), which is secreted from the liver. Lysophospholipid metabolism is impaired in obesity, which has been associated with significantly lower concentrations of most of the LPC species. Circulating LPCs have been also related to inflammation, although whether they exert pro- or antiinflammatory actions is still under debate.	1H-NMR	57
Glutamine	Nitrogen/Protein	Serum	Glutamine has been significantly associated with diabetes risk. Glutamine levels are also reduced in insulin resistance. Glycine and glutamine were inversely associated with type 2 diabetes risk.	1H-NMR	37,58
Glycine	Nitrogen/Protein	Serum; Urine	Glycine and glutamine were inversely associated with type 2 diabetes risk. Low glycine is associated with insulin resistance. Glycine levels are		15,37,58,59

			decreased in individuals with prediabetes.		
Tryptophan	Nitrogen/Protein	Serum; Urine	In a Japanese population, alanine, glutamate, tryptophan, tyrosine and BCAA were positively correlated with visceral adiposity, while glycine was inversely correlated.	1H-NMR	37
Leucine	Nitrogen/Protein	Serum	Leucine, isoleucine and valine are BCAAs. High levels of BCAAs have been associated with increased diabetes risk and insulin resistance. Plasma levels of BCAA also predict risk for developing T2D in healthy individuals.	1H-NMR	15,58-60
Isoleucine	Nitrogen/Protein	Serum			
Valine	Nitrogen/Protein	Serum			
Phenylalanine	Nitrogen/Protein	Serum	Phenylalanine and tyrosine are aromatic amino acids. High levels of these amino acids have been significantly associated with increased diabetes risk and insulin resistance. Fasting concentrations of these amino acids were already elevated as early as 12 years before the onset of T2D.	1H-NMR	15,37,58,59
Tyrosine	Nitrogen/Protein	Serum; Urine			
Glutamate	Nitrogen/Protein	Serum	The clustering of glutamate/glutamine, C3 and C5 acylcarnitines with BCAA defined a signature comprising metabolites generated during BCAA catabolism, suggesting fundamental alteration of BCAA metabolism in insulin resistant states. The glutamine-to-glutamate ratio are associated with lower risk of incident diabetes, even after adjustment for BMI and BCAA. In a Japanese population, glutamate was positively correlated with visceral adiposity.	1H-NMR	37,59
Methionine	Nitrogen/Protein	Serum	Methionine is increased in insulin-resistant states. The combination of C3 and C5 acylcarnitines, together with BCAAs and AAAs, methionine, and glutamate/glutamine, was particularly most robust for differentiating lean from obese patients.	1H-NMR	15,37

Alanine	Nitrogen/Protein	Serum; Urine	Blood levels of alanine are elevated in obesity and alanine has also been associated with hyperglycemia and T2D risk.	1H-NMR	37
Betaine	Nitrogen/Protein	Urine	Plasma levels of the methyl donor betaine are reduced in individuals with insulin resistance. Plasma levels of choline, betaine and TMAO are strongly correlated with cardiovascular disease (CVD).	1H-NMR	37
DMG	Nitrogen/Protein	Urine	Higher baseline levels of urinary alanine, betaine, N,N-dimethylglycine (DMG), creatinine and trimethylamine were associated with an increase in HbA1c from baseline to follow-up.	1H-NMR	61
Choline	Nitrogen/Protein	Serum; Urine	Plasma levels of choline, betaine and TMAO are strongly correlated with cardiovascular disease (CVD).	1H-NMR	37
8-OHdG	Oxidative stress	Urine	8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) is a widely-used biomarker of oxidative DNA damages. It is altered in diabetes, hypertension and in patients with CVD.	ELISA	62
8-iso-PGF2 α	Oxidative stress	Urine	F2-isoprostane 8-iso-prostaglandin F2 α . Products of free radical-mediated oxidation of arachidonic acid, mostly in phospholipids. Altered in diabetes, hypercholesterolemia, hypertension and metabolic syndrome.	ELISA	63
3-Nitrotyrosine	Oxidative stress	Plasma	It is the main product of tyrosine oxidation. It has been described as a stable marker of oxidative/nitrative stress in inflammatory diseases	ELISA	64
Pseudouridine	Oxidative stress	Urine	It is an isomer of the nucleoside uridine in which the uracil is attached via a carbon-carbon instead of a nitrogen-carbon glycosidic bond. It is the most prevalent of the over one hundred different modified nucleosides found in RNA. It is a marker of RNA damage.	1H-NMR	65

ANNEX 2

Table 2. List of SNPs included in the PREVENTOMICS platform.

Gene	SNP	Metabolic cluster	Associated risk. Dietary or phenotypic outcome	References
ADBR3	rs4994	Carbohydrate; Lipid	Middle-age adult Asians with the ADRB3 rs4994 minor alleles are at increased risk of type-2 diabetes (T2DM). This SNP is also associated with Body Mass Index (BMI) gain in Japanese men. Non-carriers of this genetic variant showed a greater weight reduction compared with the carriers when a lifestyle intervention addressed to lose weight and improve metabolism was carried out in subjects with impaired glucose tolerance. In addition a greater increase of high-density lipoprotein cholesterol (HDL-c) levels was found in non-carriers than in carriers.	66-68
ADIPOQ	rs17300539	Carbohydrate; Lipid; Inflammation	SNP associated with higher risk of obesity and insulin resistance, T2DM, adiponectin levels, BMI, obesity and weight regain. It has been described an interaction between this SNP and dietary monounsaturated fatty acids (MUFAs) modulating BMI and obesity risk.	69-71

ADIPOQ	rs266729	Carbohydrate; Oxidative stress	SNP associated with T2DM and coronary heart disease. A reduction in plasma saturated fatty acids (SFAs) could be expected to lower insulin resistance in MetS subjects who are minor allele carriers of rs266729. Personalized dietary advice to decrease SFA consumption in these individuals may be recommended as a possible therapeutic measure to improve insulin sensitivity.	72-74
APOA5	rs662799	Lipid	SNP associated with increased risk of MetS, elevated triglycerides (TGs) and low levels of High Density Lipoprotein Cholesterol (HDL-c). Central obesity may accentuate the effect of the TG-increasing allele of the APOA5 signal, emphasizing that CVD risk could be reduced by central obesity control.	75,76
APOE	rs429358	Lipid	The apolipoprotein E (APOE) risk allele (e4) is associated with higher total cholesterol (TC) and Low Density Lipoprotein cholesterol (LDL-c) and increased cardiovascular disease. In addition, e4 carriers might benefit from lower dietary SFAs since displayed amplified response to SFAs reduction.	77
BDNF	rs6265	Lipid; Protein; Carbohydrate	SNP associated with increased risk of obesity, BMI and hip circumference. BDNF Val/Met and Met/Met variants (rs6265) decreased the risk for glucose intolerance and T2DM. BDNF variants interacted with nutrient intake, especially energy and protein intake: Middle-aged individuals with BDNF Val/Val are prone to developing T2DM even with low energy and protein intake.	78,79
CD36	rs1527479	Lipid; Carbohydrate	This genetic variant has been associated with T2DM and insulin resistance. Associations between this CD36 gene polymorphism and fat oxidation have been found. This SNP was associated with lower plasma α -tocopherol concentrations and may be involved in the intestinal absorption or tissue uptake of vitamin E. This association was modulated by concentrations of fasting serum TGs and long-chain polyunsaturated fatty acids (PUFAs).	80-82
CLOCK	rs1801260	Lipid; Carbohydrate	Genetic variation in the Clock gene may play a role in the development of the metabolic syndrome, type 2 diabetes and cardiovascular disease. Genetic variants of SIRT 1 and CLOCK have an additive effect on resistance to weight loss that could be related to the chronotype of the subject, higher plasma levels of ghrelin and less adherence to Mediterranean diet patterns. Subjects carrying minor alleles at SIRT1 and CLOCK loci had a lower intake of total carbohydrates and MUFAs, and a higher intake of SFAs.	83,84
CYP1A2	rs762551	-	SNP associated with caffeine metabolism. Increased risk of myocardial infarction and hypertension has been reported when consuming more than 200 mg of caffeine/day.	85,86
CYP2R1	rs10766197	-	This SNP is associated with lower circulating levels of vitamin D.	87,88

FAAH	rs324420	Carbohydrate; Lipid	In obese subjects, the A allele at rs324420 in the FAAH gene was associated with larger improvements in glucose, total cholesterol, low-density lipoprotein cholesterol, body mass, and waist circumference after 3 months of a hypocaloric diet. Genetic analysis of rs324420 might help identify a sub-population that appears to benefit from increased consumption of DHA and oleic acid.	89,90
FADS1	rs174546	Lipid; Inflammation	Significant associations between rs174546 genotypes and total and non-HDL-cholesterol concentrations were observed in subjects with a high intake of n-3 PUFAs. SNP rs174546 may be an important SNP associated with plasma TG levels and FADS1 gene expression independently of a nutritional intervention with n-3 PUFA. A cluster of SNPs in the FADS1 gene (rs174537, rs174545, rs174546, rs174553, rs174556, rs174561, rs174568, and rs99780) were strongly associated with arachidonic acid (AA), suggesting that variants in this gene regulate the efficiency of conversion of medium-chain PUFAs to potentially inflammatory PUFAs, such as AA.	91–93
FADS1	rs174547	Lipid	The copy number of the rs174547 C allele was significantly associated with increased TG levels and decreased HDL-C levels in a Japanese population. In a Mongolian population, the rs174547 C allele copy number was strongly associated with decreased LDL-C levels but was not associated with triglyceride and HDL-C levels. The variable effects of FADS1 on plasma lipid profiles in Asians may result from differences in the dietary intake of PUFAs, which serve as substrates for enzymes encoded by FADS1.	94
FTO	rs9930506	Lipid	SNP associated with increased BMI, hip circumference, and weigh. The common FTO rs9930506 polymorphism was a risk factor for overweight and obesity in an Elderly Spanish Cohort.	95,96
FTO	rs9939609	Carbohydrate; Lipid; Inflammation	SNP associated with higher food intake and obesity, glucose levels, T2DM, cardiovascular health, blood pressure, triglyceride levels, cholesterol and HDL-c levels. The rs9939609 affected the response to dietary intervention in obese women: A allele carriers reduced 2.7 cm less of abdominal circumference than homozygous TT in response to the hypocaloric dietary intervention. Administration of arcania cambogia/Glucomannan reduced weight and improve lipid and glucose blood profiles in people with overweight or obesity, although the presence of the polymorphism rs9939609 A/T FTO might hinder in some degree these effects.	97,98
GCKR	rs1260326	Carbohydrate; Lipid; Inflammation	It has been associated with increased plasma levels of TG and free fatty acids, but not with elevate cardiovascular risk. This genetic variant have also been associated with fatty liver in obese children and adolescents. The n-3 long-chain PUFAs modulate the impact of the GCKR rs1260326 polymorphism on triglycerides in adolescents. rs1260326 (GCKR) is significantly associated with higher TG concentrations, but is modulated by adherence to the MD in a high-cardiovascular risk population.	99–102

IL6	rs1800795	Inflammation	SNP associated with risk of juvenile rheumatoid arthritis, exercise and polyphenol consumption. This IL-6 polymorphism showed an interaction with body fat reduction induced by polyphenol-rich cloudy apple juice (CloA) consumption for 4 weeks. Solely in C/C, but not in G/C or G/G variants, a significant reduction in body fat after 4 weeks of CloA intervention was detectable.	103,104
INSIG2	rs7566605	Lipid	This SNP has been associated with obesity, subcutaneous fat and body composition. This	105,106

			SNP was associated with weight loss in a personalized weight reduction program.	
IRS1	rs1801278	Carbohydrate; Inflammation	A meta-analysis suggests that rs1801278 may play a role in T2DM risk, especially in Asian. The rs1801278 minor allele was significantly associated with higher urinary 8OHdG concentrations and plasma CRP levels, suggesting a role of this SNP in oxidative DNA damage and inflammation.	107,108
LEPR	rs1137101	Lipid; Carbohydrate	Associated with diabetes by a Meta-Analysis; associated with obesity in Pacific Islanders; there is an interaction with PUFAs to increase the risk to suffer insulin resistance and metabolic syndrome in adults; influences plasma leptin levels and BMI in obese patients.	109–111
MC4R	rs17782313	Carbohydrate	This SNP has been associated with higher intakes of total energy and dietary fat, weight change and diabetes risk in women.	112
MTHFR	rs1801133	Oxidative stress	This SNP is involved in folate metabolism. The MTHFR rs1801133 interacted significantly with Mediterranean diet on 5-methyltetrahydrofolate concentration. It contributes to oxidative stress and lipid peroxidation in psoriasis patients.	113,114
NPY	rs16147	Lipid; Inflammation	A <i>Plantago ovata</i> husk treatment reduced systolic blood pressure (SBP) and hs-CRP in mild-moderate hypercholesterolaemic patients with the AA genotype of the rs16147 polymorphism in the NPY gene. NPY rs16147 may modulate the association between dietary fat intake and changes in BP phenotypes, and the C allele exerts a long-term beneficial effect on lowering BP in response to low-fat diet in obese and hypertensive subjects.	115,116
PPARGC1A	rs8192678	Lipid; Carbohydrate	The PPARGC1A rs8192678 risk A allele is associated with an increased risk of NAFLD in obese children. Implicated in NEFA clearance, risk of insulin resistance and diastolic BP.	117,118
PLIN1	rs894160	Lipid; Carbohydrate	In subjects with higher complex carbohydrate intake, the minor allele was protective against obesity, whereas in subjects with lower carbohydrate intake, the minor allele was associated with increased obesity. The carriers of AA variant in the PLIN rs894160 polymorphism had a higher risk to T2D than those with the combined AG+GG variants	119,120
PNPLA3	rs738409	Lipid	SNP associated with risk of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. Overweight and dietary sucrose may modify the association between rs738409 and fasting triglyceride levels. Hepatic fat accumulation is modulated by the interaction between the rs738409 variant in the PNPLA3 gene and the dietary omega6/omega3 PUFA intake.	121–123

			and serum lipids.	
PPARG	rs1801282	Lipid	SNP associated with reduced weight gain and lower risk for heart disease and diabetes. This SNP interact with dietary intake of fat in determination of plasma lipid concentrations.	124-126
SCARB1	rs5888	Lipid	This SNP is associated with altered cholesterol and other lipid traits. It was significantly associated with higher HDL-C levels in women younger than 50 years.	127,128
SIRT1	rs1467568	Lipid	SNP associated with vitamin E intake and coronary artery disease. Interactions between dietary vitamin E intake and SIRT1 genetic variation influence BMI.	129
SOD2	rs4880	Oxidative stress; Inflammation	This SNP is associated with inflammation, oxidative stress and cardiovascular health.	130
TCF7L2	rs7903146	Lipid; Carbohydrate	This SNP is associated with T2DM. Mediterranean diet reduces the adverse effect of the TCF7L2-rs7903146 polymorphism on cardiovascular risk factors and stroke incidence	131,132
TFAP2B	rs987237	Lipid; Carbohydrate		
TNF α	rs1800629	Inflammation; Oxidative stress	Subjects with cardiovascular disease carrying the GG genotype for the SNP rs1800629 at the TNFA gene show a greater activation of the pro-inflammatory status than A-allele carriers, which is related to ROS formation	133
UCP1	rs1800592	Lipid; Carbohydrate	This SNP affects weight, fat mass, and risk of T2DM in grade III obese patients.	134
UCP2	rs659366	Inflammation; Carbohydrate; Lipids	This variant is associated with inflammatory status, body composition, abdominal obesity	135,136

7.4. Protocolo estudio de intervención PL

PREVENTOMICS in software for professionals

A mobile app will be developed by software engineers of METADIETA to present the information generated by the PREVENTOMICS platform to both European recruitment centers (USOTON and JUMC). Afterwards, the USOTON and JUMC teams will use the resulting app to visualize the metabolic and genetic status of the volunteers and design the personalized diet in consequence, according to the individual's needs, lifestyle and preferences.

BICENTER STUDY WITH ADULTS WITH ABDOMINAL OBESITY (UK and Poland)

Objective

The purpose of this bicenter study is to examine the soundness of the PREVENTOMICS personalized software for professionals to enhance a reduction of weight and waist circumference and favorable changes in the metabolomic profile compared to general dietary recommendations in clinically healthy overweight and obese subjects from UK and Poland over the course of 4 months.

Inclusion criteria

Subjects will be eligible for enrolment into the study if they are men or women aged 18-65 years, have a waist circumference >94 cm (for men) or > 80 cm (for women), which, according with the International Diabetes Federation, indicates abdominal obesity In Europid populations [1], a BMI (in kg/m²) 25-40 (overweight and class I and II obesity) and if they provide written informed consent.

Exclusion criteria

Subjects will be excluded if they meet any of the following criteria: diagnosed with diabetes [or serum glucose ≥ 125 mg/dL (6.9 mmol/l)], other metabolic and endocrine disorders, chronic diseases (cardiovascular disease, kidney disease - or a serum creatinine ≥ 1.7 mg/dl (150 μ mol/l) for men and ≥ 1.5 mg/dl (132 μ mol/l) for women-, cancer, pulmonary diseases, coeliac disease, Crohn's disease, etc.); having a BMI (in kg/m²) >40; being pregnant or planning to become pregnant within the study period; intake of drugs or nutritional supplements; prescribed medicine to control inflammation or dyslipidemia (or cLDL ≥ 4.9 mmol/L and/or triglycerides ≥ 4.5 mmol/L (≥ 400 mg/dL)); consumption of more than 14 drinks of alcoholic beverages per week; current smokers. Subjects with hypertension and taking antihypertensive drugs (metabolically neutral) will be not excluded and allowed to continue their prescribed dosage.

Study design

All procedures involving human subjects will be approved by the relevant Clinical Research Ethical Committee (Jagiellonian University Bioethical Committee for Polish cohort and an NHS Research Ethics Committee for the UK cohort). This study will be conducted according to the guidelines established in the Declaration of Helsinki. The trial will be registered at isrctn.com.

The study will be a single-blind randomized, placebo-controlled trial carried out with clinically healthy overweight, class I and II obese adult participants with abdominal obesity. Due to the nature of the study, the participants cannot be blinded to the intervention, although the investigators who will perform the sample and data analysis will be blinded.

Based on sample size calculations (see below for further details), 528 volunteers from two European countries (UK and Poland) will be recruited for this bicenter study (i.e. 264 participants per country). The Polish subjects will be recruited from the patients of Out-Patient Clinic for Metabolic Disorders, Klinika Krakowska, Poland, Krakow, ul. Mehoffer 6 and through announcement in the local press. The UK subjects will be recruited through advertisement within the university (University of Southampton), hospital (university Hospital Southampton), and the local community. The study will be started after obtaining the approval of the relevant Bioethics Committee and the written informed consent from the subjects.

All volunteers will be examined by a relevant health professional to assess whether they meet the conditions for inclusion and have no contraindications. For this purpose, medical interview,

physical examination and laboratory tests will be performed. Depending on the clinical condition, selected laboratory tests will be carried out in the local laboratory (urinalysis, blood tests – with complete blood count (CBC), lipids profile, creatinine, urea, uric acid, ALT, AST, bilirubin, glucose, ions, and serum protein etc.)

After the confirmation of the inclusion criteria, the 264 individuals that will be recruited in each country will be randomly assigned to one of the two intervention groups. Randomization will be performed according to age, gender and BMI.

Fasting blood samples, saliva samples and morning urine samples will be taken from individuals of both groups. Serum and urine samples will be protected and stored until analysis or until sent to consortium partners; storage will be at - 80 degrees. The samples of saliva will be stored at room temperature.

One group (132 subjects in each center; control group,) will receive general dietary recommendations used to reduce weight in obesity (1200 – 1500 kcal/day) for a period of 3 months. The second group of 132 subjects will receive dietary recommendations based on personalized nutrition (PN group). To do that, METADIETA will process the information generated by the PREVENTOMICS platform (metabolome, genotypes, biometric, clinical and classic biochemical variables) and will present the results to the research group, which will design the PN diet for the 4 month period of intervention according to the individual's needs, lifestyle and preferences. An initial training period in the use of the software will be provide by METADIETA to the dietitians of the research center. In addition, technological support will be provided by the MEDADIETA engineers if the dietitians need to deal with possible technological problems.

All the participants will be evaluated at the beginning of the study (V1) and after 3 (V2) months of PN or general diet. At V1, the subjects will attend the center in the morning after an overnight fasting (> 8 hours without food or drink except water). Saliva, blood and morning urine (PN and control groups) will be collected to perform the analyses of SNPs (ALIMENTOMICA), health biomarkers (UTCO-EURECAT) and food intake biomarkers (UNIPR). The classical biochemical markers will be measured in SOTON and JU.

A detailed food consumption and dietary habits questionnaires as well as physical activity interview will be collected for all study participants (PN and control groups).

All subjects will have anthropometric measurements (body weight, BMI, waist circumference, hip circumference) performed and assessment of the percentage of fat and lean mass in the body.

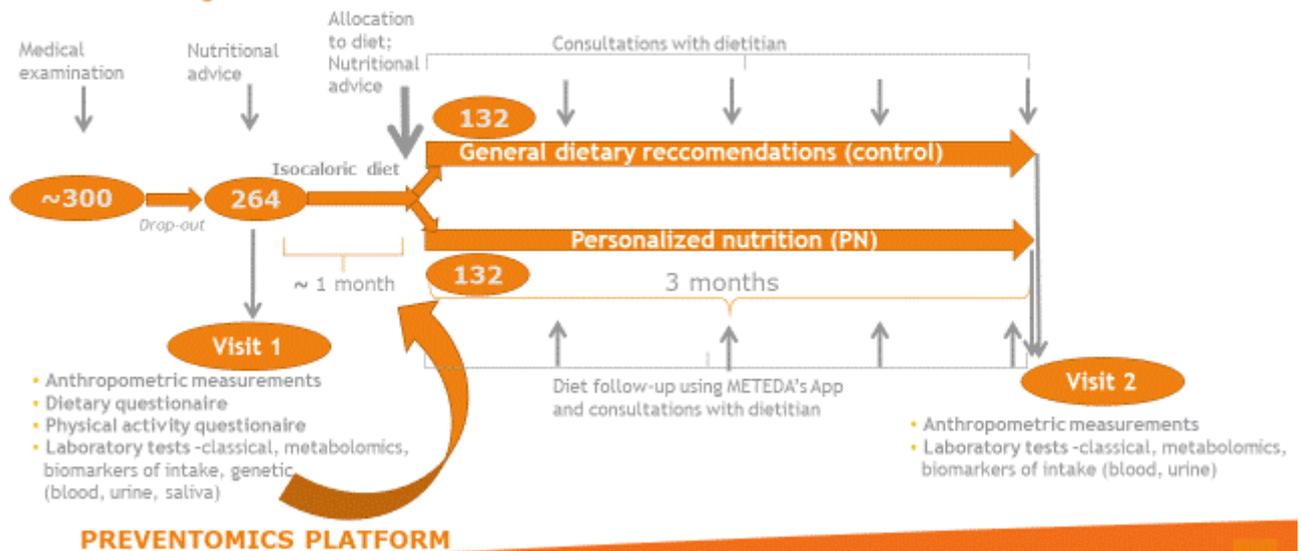
After completing the above measurements and taking samples of biological material, all participants will be asked to use an isocaloric diet for 4 weeks. This period of time is necessary to perform the essential laboratory analyses to develop personalized dietary recommendations.

The results from integrated computational modelling of the lifestyle, metabolome, genotypes, anthropometric, clinical and classic biochemical variables (estimated time, 1 month) will be translated into personalized dietetic advice for the relevant intervention group. After 3 months of personalized dietary intervention, the participants included in the PN group will also attend the center and will be evaluated as commented above. Urine and blood samples will be also collected and the analysis with the PREVENTOMICS platform will be carried out at the end point of the intervention (V2). In the control group, the outcome measurements will be collected in parallel with the PN group. Subjects of both groups will be also advised every month to consult a dietitian to monitor the course of dietary treatment. Additionally each patient will have opportunity to contact nutrition consultant (by phone) to resolve current daily problems. Both groups will be instructed not to change their usual level of physical activity during the study.

The data obtained at V2 will be used to determine whether the use of Preventomics personalized software is more efficient in reducing waist circumference and weight and in improving metabolic status than the implementation of general dietary recommendations in clinically healthy overweight and obese subjects with abdominal obesity.

The outline of the pilot bicenter study:

Task 5.3 Design of the intervention: co-creation



Variables and analyses

The main outcome measure will be the reduction of waist circumference in the PN group compared to the control group.

In addition, all patients qualified for the study will have detailed evaluation of health status (carried out by the Centre in which the recruitment will be performed):

1. Key information from medical history : the presence of hypertension, current smoking status , lactose intolerance, allergy, family history (cardio-vascular diseases, diabetes, obesity in parents and siblings)

1. Blood pressure

1. Anthropometric measurements (weight, height) - BMI, WHR, body composition will be measured using Tanita Body Composition Analyzer.

1. Nutritional assessment - to estimate nutrition habits and daily intake of food components “Food Frequency Questionnaire” and “3-Day Diet History Questionnaire” will be performed in all patients.

1. Physical activity assessment

1. Classic biochemical variables for the integration with lifestyle, anthropometric, metabolomics and genetics variables:

- a/ Biomarkers of glucose-insulin homeostasis – fasting glucose and insulin, HOMA-IR

- b/ Adipokines – Leptin, Adiponectin, Lep/Adip ratio

- c/ Inflammatory biomarkers – hsCRP, IL-6, MCP1, TNF α , IL-8, soluble ICAM1, soluble CD14

- d/ Lipid profile – total cholesterol, LDL-cholesterol, HDL-cholesterol, non-HDL cholesterol, triglycerides, atherogenic index of plasma (AIP).

- e/ Biomarkers for liver health: ALT, GGT

- f) Biomarkers for renal health: uric acid, creatinine, eGFR

During the pilot, PREVENTOMICS software will be evaluated in terms of usability of the system, including particular experience of the dietitians with the system, considering different aspects such as: quality of technology (efficiency, effectiveness, usefulness, completeness and accuracy), reliability of the system (reliability, security, interoperability and ease of repair and maintenance), usability and acceptance (ease of use, graphic design acceptance, user satisfaction, navigation, user control, time, user experience, mental effort, support, learning and acceptance), use of

monitoring (frequency, modus operandi, user profile, context in the platform's use), problem solving and interaction/quality of outcome.

Data handling procedures

The collected data will be used only for analysis and purposes related to the project and will be protected according to the procedures for privacy and intellectual property rights defined in the consortium agreement

Storage: the platform will provide a cloud-based environment, and additionally the data from JU center will be placed on a well-secured server of the Jagiellonian University. Any databases will be encrypted and all personal data will be anonymized upon completion of the project.

All samples of biological material that will be sent to consortium partners will be encrypted.

Sample size

To detect a 2.40 cm difference* in waist circumference between groups with 80% power with a two-tailed α of 0.05 and assuming a standard deviation (SD) of 9 cm, a sample size of 220 per group (i.e. general dietary recommendations vs personalized nutrition) was calculated (total N for two groups, 440; Figure 2). Thus, to allow for a 20% drop out rate, 264 subjects per group will be needed to be recruited (total N, 528).

* Value based on a meta-analysis that reviewed randomized controlled trials (N=31 trials and 8442 participants) and concluded that Internet-based interventions showed a significant reduction in waist circumference (mean change -2.99 cm, 95% CI -3.68 to -2.30, I(2)=93.3%) and significantly better effects on waist circumference loss (mean loss 2.38 cm, 95% CI 1.61-3.25, I(2)=97.2%) than minimal interventions such as information-only groups [2].

References

- [1] International Diabetes Federation. IDF Consensus Worldwide Definition of the Metabolic Syndrome. Brussels, Belgium IDF Commun 2006:1–24. http://www.idf.org/webdata/docs/IDF_Meta_def_final.pdf.1-24.
- [2] Seo DC, Niu J. Evaluation of internet-based interventions on waist circumference reduction: A meta-analysis. J Med Internet Res 2015;17:e181. doi:10.2196/jmir.3921.

PREVENTOMICS in software for professionals

A mobile app will be developed by software engineers of METADIETA to present the information generated by the PREVENTOMICS platform to both European recruitment centers (USOTON and JUMC). Afterwards, the USOTON and JUMC teams will use the resulting app to visualize the metabolic and genetic status of the volunteers and design the personalized diet in consequence, according to the individual's needs, lifestyle and preferences.

BICENTER STUDY WITH ADULTS WITH ABDOMINAL OBESITY (UK and Poland)

Objective

The purpose of this bicenter study is to examine the soundness of the PREVENTOMICS personalized software for professionals to enhance a reduction of weight and waist circumference and favorable changes in the metabolomic profile compared to general dietary recommendations in clinically healthy overweight and obese subjects from UK and Poland over the course of 4 months.

Inclusion criteria

Subjects will be eligible for enrolment into the study if they are men or women aged 18-65 years, have a waist circumference >94 cm (for men) or > 80 cm (for women), which, according with the International Diabetes Federation, indicates abdominal obesity In Europid populations [1], a BMI (in kg/m²) 25-40 (overweight and class I and II obesity) and if they provide written informed consent.

Exclusion criteria

Subjects will be excluded if they meet any of the following criteria: diagnosed with diabetes [or serum glucose ≥ 125 mg/dL (6.9 mmol/l)], other metabolic and endocrine disorders, chronic diseases (cardiovascular disease, kidney disease - or a serum creatinine ≥ 1.7 mg/dl (150 μ mol/l) for men and ≥ 1.5 mg/dl (132 μ mol/l) for women-, cancer, pulmonary diseases, coeliac disease, Crohn's disease, etc.); having a BMI (in kg/m²) >40; being pregnant or planning to become pregnant within the study period; intake of drugs or nutritional supplements; prescribed medicine

to control inflammation or dyslipidemia (or cLDL \geq 4.9 mmol/L and/or triglycerides \geq 4.5 mmol/L (\geq 400 mg/dL); consumption of more than 14 drinks of alcoholic beverages per week; current smokers. Subjects with hypertension and taking antihypertensive drugs (metabolically neutral) will be not excluded and allowed to continue their prescribed dosage.

Study design

All procedures involving human subjects will be approved by the relevant Clinical Research Ethical Committee (Jagiellonian University Bioethical Committee for Polish cohort and an NHS Research Ethics Committee for the UK cohort). This study will be conducted according to the guidelines established in the Declaration of Helsinki. The trial will be registered at isrctn.com.

The study will be a single-blind randomized, placebo-controlled trial carried out with clinically healthy overweight, class I and II obese adult participants with abdominal obesity. Due to the nature of the study, the participants cannot be blinded to the intervention, although the investigators who will perform the sample and data analysis will be blinded.

Based on sample size calculations (see below for further details), 528 volunteers from two European countries (UK and Poland) will be recruited for this bicenter study (i.e. 264 participants per country). The Polish subjects will be recruited from the patients of Out-Patient Clinic for Metabolic Disorders, Klinika Krakowska, Poland, Krakow, ul. Mehoffera 6 and through announcement in the local press. The UK subjects will be recruited through advertisement within the university (University of Southampton), hospital (university Hospital Southampton), and the local community. The study will be started after obtaining the approval of the relevant Bioethics Committee and the written informed consent from the subjects.

All volunteers will be examined by a relevant health professional to assess whether they meet the conditions for inclusion and have no contraindications. For this purpose, medical interview, physical examination and laboratory tests will be performed. Depending on the clinical condition, selected laboratory tests will be carried out in the local laboratory (urinalysis, blood tests – with complete blood count (CBC), lipids profile, creatinine, urea, uric acid, ALT, AST, bilirubin, glucose, ions, and serum protein etc.)

After the confirmation of the inclusion criteria, the 264 individuals that will be recruited in each country will be randomly assigned to one of the two intervention groups. Randomization will be performed according to age, gender and BMI.

Fasting blood samples, saliva samples and morning urine samples will be taken from individuals of both groups. Serum and urine samples will be protected and stored until analysis or until sent to consortium partners; storage will be at - 80 degrees. The samples of saliva will be stored at room temperature.

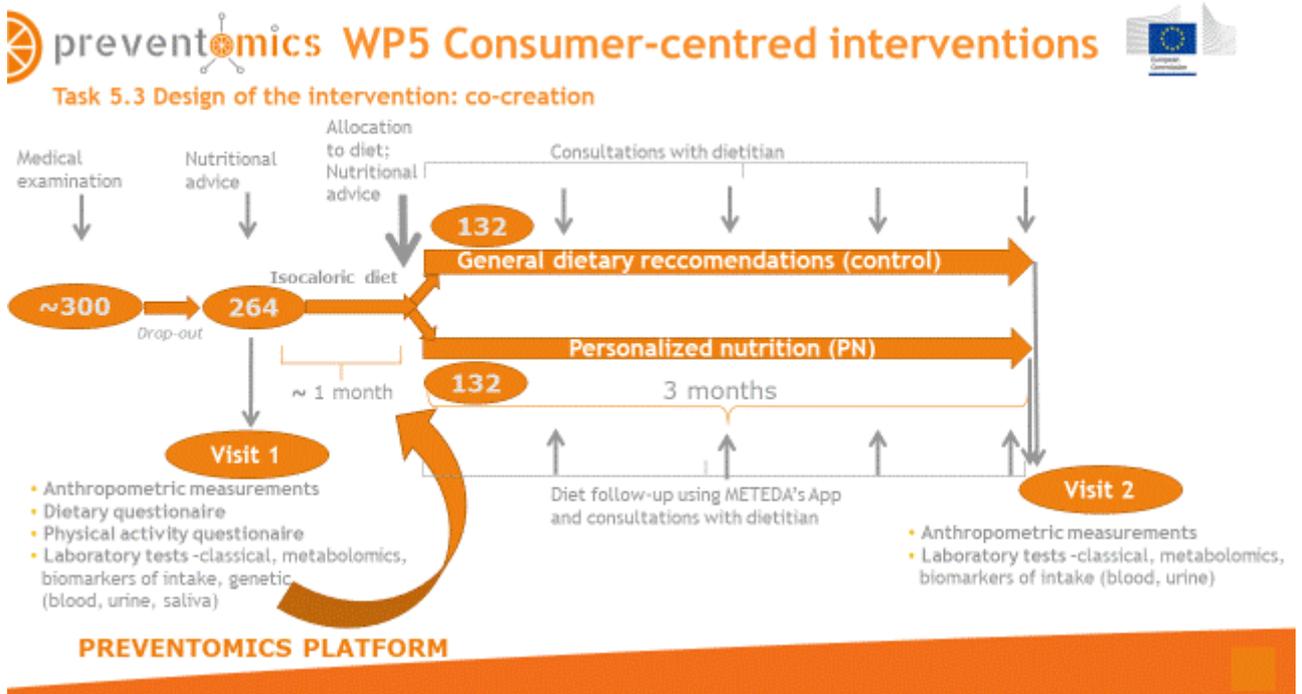
One group (132 subjects in each center; control group,) will receive general dietary recommendations used to reduce weight in obesity (1200 – 1500 kcal/day) for a period of 3 months. The second group of 132 subjects will receive dietary recommendations based on personalized nutrition (PN group). To do that, METADIETA will process the information generated by the PREVENTOMICS platform (metabolome, genotypes, biometric, clinical and classic biochemical variables) and will present the results to the research group, which will design the PN diet for the 4 month period of intervention according to the individual's needs, lifestyle and preferences. An initial training period in the use of the software will be provide by METADIETA to the dietitians of the research center. In addition, technological support will be provided by the MEDADIETA engineers if the dietitians need to deal with possible technological problems.

All the participants will be evaluated at the beginning of the study (V1) and after 3 (V2) months of PN or general diet. At V1, the subjects will attend the center in the morning after an overnight fasting (> 8 hours without food or drink except water). Saliva, blood and morning urine (PN and control groups) will be collected to perform the analyses of SNPs (ALIMENTOMICA), health biomarkers (UTCO-EURECAT) and food intake biomarkers (UNIPR). The classical biochemical markers will be measured in SOTON and JU.

A detailed food consumption and dietary habits questionnaires as well as physical activity interview will be collected for all study participants (PN and control groups).

All subjects will have anthropometric measurements (body weight, BMI, waist circumference, hip circumference) performed and assessment of the percentage of fat and lean mass in the body.

After completing the above measurements and taking samples of biological material, all participants will be asked to use an isocaloric diet for 4 weeks. This period of time is necessary to perform the essential laboratory analyses to develop personalized dietary recommendations. The results from integrated computational modelling of the lifestyle, metabolome, genotypes, anthropometric, clinical and classic biochemical variables (estimated time, 1 month) will be translated into personalized dietetic advice for the relevant intervention group. After 3 months of personalized dietary intervention, the participants included in the PN group will also attend the center and will be evaluated as commented above. Urine and blood samples will be also collected and the analysis with the PREVENTOMICS platform will be carried out at the end point of the intervention (V2). In the control group, the outcome measurements will be collected in parallel with the PN group. Subjects of both groups will be also advised every month to consult a dietitian to monitor the course of dietary treatment. Additionally each patient will have opportunity to contact nutrition consultant (by phone) to resolve current daily problems. Both groups will be instructed not to change their usual level of physical activity during the study. The data obtained at V2 will be used to determine whether the use of Preventomics personalized software is more efficient in reducing waist circumference and weight and in improving metabolic status than the implementation of general dietary recommendations in clinically healthy overweight and obese subjects with abdominal obesity. The outline of the pilot bicenter study:



Variables and analyses

The main outcome measure will be the reduction of waist circumference in the PN group compared to the control group.

In addition, all patients qualified for the study will have detailed evaluation of health status (carried out by the Centre in which the recruitment will be performed):

1. Key information from medical history : the presence of hypertension, current smoking status , lactose intolerance, allergy, family history (cardio-vascular diseases, diabetes, obesity in parents and siblings)
1. Blood pressure
1. Anthropometric measurements (weight, height) - BMI, WHR, body composition will be measured using Tanita Body Composition Analyzer.

1. Nutritional assessment - to estimate nutrition habits and daily intake of food components “Food Frequency Questionnaire” and “3-Day Diet History Questionnaire” will be performed in all patients.

1. Physical activity assessment

1. Classic biochemical variables for the integration with lifestyle, anthropometric, metabolomics and genetics variables:

a/ Biomarkers of glucose-insulin homeostasis – fasting glucose and insulin, HOMA-IR

b/ Adipokines – Leptin, Adiponectin, Lep/Adip ratio

c/ Inflammatory biomarkers – hsCRP, IL-6, MCP1, TNF α , IL-8, soluble ICAM1, soluble CD14

d/ Lipid profile – total cholesterol, LDL-cholesterol, HDL-cholesterol, non-HDL cholesterol, triglycerides, atherogenic index of plasma (AIP).

e/ Biomarkers for liver health: ALT, GGT

f) Biomarkers for renal health: uric acid, creatinine, eGFR

During the pilot, PREVENTOMICS software will be evaluated in terms of usability of the system, including particular experience of the dietitians with the system, considering different aspects such as: quality of technology (efficiency, effectiveness, usefulness, completeness and accuracy), reliability of the system (reliability, security, interoperability and ease of repair and maintenance), usability and acceptance (ease of use, graphic design acceptance, user satisfaction, navigation, user control, time, user experience, mental effort, support, learning and acceptance), use of monitoring (frequency, modus operandi, user profile, context in the platform’s use), problem solving and interaction/quality of outcome.

Data handling procedures

The collected data will be used only for analysis and purposes related to the project and will be protected according to the procedures for privacy and intellectual property rights defined in the consortium agreement

Storage: the platform will provide a cloud-based environment, and additionally the data from JU center will be placed on a well-secured server of the Jagiellonian University. Any databases will be encrypted and all personal data will be anonymized upon completion of the project.

All samples of biological material that will be sent to consortium partners will be encrypted.

Sample size

To detect a 2.40 cm difference* in waist circumference between groups with 80% power with a two-tailed α of 0.05 and assuming a standard deviation (SD) of 9 cm, a sample size of 220 per group (i.e. general dietary recommendations vs personalized nutrition) was calculated (total N for two groups, 440; Figure 2). Thus, to allow for a 20% drop out rate, 264 subjects per group will be needed to be recruited (total N, 528).

* Value based on a meta-analysis that reviewed randomized controlled trials (N=31 trials and 8442 participants) and concluded that Internet-based interventions showed a significant reduction in waist circumference (mean change -2.99 cm, 95% CI -3.68 to -2.30, I(2)=93.3%) and significantly better effects on waist circumference loss (mean loss 2.38 cm, 95% CI 1.61-3.25, I(2)=97.2%) than minimal interventions such as information-only groups [2].

References

- [1] International Diabetes Federation. IDF Consensus Worldwide Definition of the Metabolic Syndrome. Brussels, Belgium IDF Commun 2006:1–24. http://www.idf.org/webdata/docs/IDF_Meta_def_final.pdf.1-24.
- [2] Seo DC, Niu J. Evaluation of internet-based interventions on waist circumference reduction: A meta-analysis. J Med Internet Res 2015;17:e181. doi:10.2196/jmir.3921.