



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PLAN DE ESTUDIOS COMBINADOS EN MEDICINA
FACULTAD DE MEDICINA
CENTRO DE INVESTIGACIÓN SOBRE ENFERMEDADES INFECCIOSAS, INSTITUTO NACIONAL
DE SALUD PÚBLICA

**PREVALENCIA DE ELEMENTOS GENÉTICOS DE PATOGENICIDAD DE LA
MICROBIOTA INTESTINAL ASOCIADOS AL PERFIL DIETARIO Y GRADO DE
ADIPOSIDAD**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORA EN MEDICINA

PRESENTA:

Sofía Magdalena Murga Garrido

TUTOR PRINCIPAL

Alfredo Lagunas Martínez
Instituto Nacional De Salud Pública

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Ana Isabel Burguete García
Jesús Silva Sánchez
Instituto Nacional De Salud Pública

Tanya Plett Torres

Plan De Estudios Combinados En Medicina, Facultad De Medicina

CIUDAD DE MÉXICO, JULIO DE 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

MIEMBROS DEL JURADO

Presidente: Dr. Miguel Cruz López
Secretario: Dr. Alfredo Lagunas Martínez
Vocal: Dr. Jaime García Mena
Vocal: Dr. Adrián Ochoa Leyva
Vocal: Dra. Ana Carolina Ariza Gutiérrez

Dedicatorias

A mi familia, por todos estos años de distancia, las horas y los eventos que no pudimos compartir y los que sí. A Henry por siempre apoyarnos a mí y a mi hermana, llenarnos de metas, creer en nosotros y habernos hecho sentir muy especiales. A Quetita y a Dani por la red de cariño, seguridad y las eternas porras. Juntas nos hemos mantenido dignas, robles, ambiciosas y compasivas. A Pek por su temeridad, persistencia y resiliencia. Por las mil vidas que vivimos durante los años de mi trabajo doctoral y en el que todas ganamos un grado por nuestro crecimiento, nuestra fuerza y las recompensas de nuestra valentía.

A la familia que elegí y en la que fui elegida, mis amigas adoradas que nunca me dejaron rendirme, que me apapacharon y me mantuvieron en el bienestar, las risas y la felicidad. A mi familia Rosita por la inspiración de lucha, por la diversidad de nuestras conversaciones, por las madrugadas de carcajadas y por la creatividad de nuestro Safari. A mi familia Cebolla por haber estado desde las galletas María rellenas de cajeta, pasando por el tiramisú de cumpleaños, los whiskeys, Pearl Jam y los desayunos con pañoleta. A mi familia de biólogas por todo lo que recorrimos y conocimos de este planeta juntas, por acompañarnos hasta las profecías. Esta es una breve dedicatoria a la gran comunidad de mujeres a la que tengo el inmenso orgullo de pertenecer.

A mi familia médica por todos los escalones que subimos juntos a contraviento.

A mi nueva familia, que adquirí recientemente, pero se siente a la que siempre he pertenecido. Gracias por haberme recibido como parte del clan, por la confianza, los abrazos y la apuesta que hicieron a mi nombre para aumentar el patrimonio sentimental de la familia que ahora formamos.

A mi PhD favorito, mi más grande inspiración en la ciencia y en el mundo terrenal. A mi *fellow*, Chap, le quiero dedicar todo el tiempo que me tomó llegar a él, el tiempo que conservamos de la mano y el que tenemos por delante. Esta es una dedicatoria a la integridad, nobleza y generosidad de Ernesto. También es un agradecimiento a la solidaridad, respeto, paciencia, empatía, inimaginable felicidad y fuente inagotable de amor que comparto con mi maravilloso compañero y cómplice de vida. Te dedico un poema de nuestro primer hogar con campanadas dominicales:

*Kushiague
Plátano y filadelfia
Camarón y filadelfia
Cangrejo
-preguntar por salsa agridulce
Yakimeshi new style -verduras
Fujiyama roll
Dragon roll*

Agradecimientos

Plan de Estudios Combinados en Medicina

Un agradecimiento muy especial a las mujeres que dan vida este programa. Tanya y Ana no sólo me dieron la oportunidad de estar en este programa, sino que me mantuvieron en él. Gracias a su ayuda e inspiración este ha sido un camino de éxito, aprendizaje, esfuerzo, paciencia, felicidad y satisfacción. Aprovecho para agradecer a Eric y a Alice por siempre estar pendientes y por tener el don y la paciencia de la soluciones.

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

A CoNaCyT le agradezco el apoyo en forma de beca nacional (número de registro 895733) que me permitió dedicarme a hacer ciencia en México.

Universidad Nacional Autónoma de México

A la gran UNAM un agradecimiento triple por haberme abierto las puertas desde la Facultad de Ciencias hasta el Posgrado, pasando por la Facultad de Medicina.

Por mi raza hablará el espíritu.

Rey Lab - Universidad de Wisconsin-Madison

A Federico un eterno agradecimiento por haber apostado tanto en mí, por la confianza, la paciencia y por haberme devuelto a la vida y a la ciencia. A mis amigos y mentores de la UWM que tanto me enseñaron dentro y fuera del laboratorio otro enorme agradecimiento.

Centro de Investigaciones Sobre Enfermedades Infecciosas (CISEI), Instituto Nacional de Salud Pública (INSP)

Al espectacular Dr. Alfredo Lagunas por haber sido mi tutor, por haberme acompañado todos estos años en el laboratorio y en mi vida personal. Le agradezco especialmente haberme aceptado como doctorante, la paciencia, el entusiasmo, la confianza y todos los consejos que sin duda hicieron de esta travesía una mucho mejor a recorrer. Al laboratorio de Epidemiología Genética le agradezco haberme abierto las puertas para llevar a cabo este trabajo.

Miembros del comité tutor

Al Dr. Jesús Silva, Dra. Tanya Plett y Dra. Ana Burguete muchas gracias por haberme escuchado con atención en cada tutorial y fuera de ellos y por haber mejorado mi trabajo doctoral indudablemente.

Índice General

Dedicatorias	I
Agradecimientos	II
Índice General	III
Índice De Figuras, Tablas Y Suplementos	V
Figuras	V
Tablas	VI
Suplementos	VII
Resumen	VIII
Capítulo 1: Introducción	1
Marco teórico	1
1. Estados de nutrición: malnutrición	1
2. La microbiota intestinal	12
3. Disbiosis e inflamación	17
4. Estrategias de patogenicidad	19
Antecedentes	31
Justificación	32
Pregunta de Investigación	33
Hipótesis	33
Objetivos	33
Capítulo 2: Metodología General	34
Estudio	34
Métodos	35
1. Reclutamiento de los sujetos	35
2. Perfil de dieta	36
3. Evaluación del grado de adiposidad	38
4. Análisis de la microbiota: metagenómica	39

5. Análisis de la microbiota: preprocesamiento bioinformático _____	42
6. Análisis de la microbiota: anotación taxonómica _____	43
7. Análisis de la microbiota: anotación funcional _____	45
8. Análisis de la prevalencia de elementos genéticos de patogenicidad _____	47
9. Análisis de asociación _____	48
Capítulo 3. Resultados _____	50
1. Población infantil de estudio: parámetros antropométricos y metabólicos _____	50
2. Patrones dietarios de la población infantil de la Ciudad de México _____	52
3. Metagenómica: secuenciación <i>shot-gun</i> _____	61
4. Análisis taxonómico, capacidad funcional y factores de virulencia de la microbiota intestinal. _	65
4.1. Alteraciones de la microbiota intestinal asociadas al metabolismo del metano en población infantil mexicana con obesidad _____	65
4.2. Factores de virulencia en la microbiota intestinal asociados al IMC y a los marcadores bioquímicos sanguíneos de la población infantil con obesidad _____	73
Capítulo 4. Discusión, Conclusiones y Perspectivas _____	92
Capítulo 5. Manuscritos Relevantes _____	107
Capítulo 6. Otros Manuscritos _____	125
Suplementos _____	171
CUADRO DE VARIABLES _____	237
DEFINICIONES _____	237
Abreviaciones _____	239
Bibliografía _____	241

Índice De Figuras, Tablas Y Suplementos

Figuras

Figura 1. Factores que contribuyen al sobrepeso y obesidad infantil. _____	2
Figura 2. Comparación de la prevalencia de la obesidad en niñas, niños y adolescentes. _____	3
Figura 3. Comparativo de la prevalencia nacional de sobrepeso y obesidad en población infantil, por sexo. _____	4
Figura 4. El papel de la disfunción del tejido adiposo en la dislipidemia. _____	5
Figura 5. Enfoques de tratamiento para el sobrepeso y obesidad. _____	9
Figura 6. Biogeografía y factores que influyen en el microbioma intestinal. _____	13
Figura 7. Asociación entre la alteración de la microbiota y las consecuencias metabólicas. _____	16
Figura 8. La inmunidad del hospedero y la microbiota residente del intestino. _____	18
Figura 9. Curva básica de la estructura daño-respuesta en la patogénesis microbiana. _____	20
Figura 10. Mecanismos de expansión de patobiontes en el intestino derivados de la inflamación. _____	23
Figura 11. Estructura básica de un lipopolisacárido (endotoxina) de una bacteria Gram-negativa. _____	29
Figura 12. Ubicación de las unidades deportivas (U.D.) del IMSS donde se reclutaron los participantes. _____	36
Figura 13. Cada una de las 11 secciones o grupos de alimentos que conforman el CFCA. _____	36
Figura 14. <i>Diagrama de trabajo en la identificación de patrones dietarios.</i> _____	38
Figura 15. Diagrama de flujo de trabajo metagenómico. _____	40
Figura 16. Distribución del tamaño y concentración de las genotecas analizadas. _____	41
Figura 17. Histograma de frecuencia de la población infantil en este estudio por edad y sexo. _____	50
Figura 18. Gráficos de clasificación de IMC ajustado por edad y sexo. _____	51
Figura 19. Matriz de correlación de los 27 grupos de alimentos. _____	54
Figura 20. Análisis de componentes principales (PCA) de los 27 grupos de alimentos en dos dimensiones. _____	55
Figura 21. Número y longitud de lecturas secuenciadas. _____	62
Figura 22. Calidad (Phred Score) de las lecturas secuenciadas. _____	62
Figura 23. Contenido de bases y secuencias duplicadas en las 48 muestras. _____	63
Figura 24. Secuencias microbianas filtradas de lecturas humanas. _____	64
Figura 25. Datos y calidad del ensamblaje. _____	64
Figura 26. Resumen gráfico 1 _____	65
Figura 27. <i>Abundancia relativa de la microbiota de las 46 muestras.</i> _____	66
Figura 28. Diversidad alfa. _____	66
Figura 29. Abundancia relativa de los taxa. _____	67
Figura 30. Genes anotados (KOs) en 46 muestras y dos grupos de IMC. _____	71
Figura 31. Gráfica MA mostrando la representación diferencial de los genes. _____	71
Figura 32. Vías KEGG sobre-representadas _____	72

Figura 33. Resumen gráfico 2. _____	74
Figura 35. Diversidad alfa. _____	75
Figura 36. NMDS de las distancias wUF. _____	75
Figura 37. Abundancia relativa de los taxa. _____	78
Figura 38. Cladograma y Firmicutes:Bacteroidetes (F/B) entre el grupo NP y SPOB. _____	79
Figura 39. Taxa bacterianos que contribuyen a las diferencias entre grupos de IMC (LEfSe). _____	80
Figura 40. Lista de taxa bacterianos y arqueas que contribuyen a las diferencias (LEfSe). _____	81
Figura 41. Resumen del análisis lineal discriminante de tamaño de efecto (LEfSe). _____	82
Figura 42. Gráfico de barras estratificado. _____	83
Figura 43. Mapa de calor indicando las asociaciones significativas. _____	85
Figura 44. Mapa de calor indicando las asociaciones significativas (dieta). _____	87
Figura 45. Riqueza. _____	89
Figura 46. Gráfica MA. _____	90
Figura 47. Mapa de calor indicando las asociaciones significativas (FV). _____	91
Figura 48. Resumen gráfico 3. _____	104

Tablas

Tabla 1. Características generales, por grupo de IMC, de la población infantil de la Ciudad de México. _____	51
Tabla 2. Agrupación de alimentos del cuestionario de frecuencia de alimentos. _____	52
Tabla 3. Gráficas de codo y dimensiones, eigenvalores, porcentajes de varianzas y porcentajes de varianzas acumuladas de las sub-muestras con n=46 y n=45. _____	56
Tabla 4. Cargas factoriales de cada grupo de alimento en cada factor (patrón 1 y patrón 2) de las sub-muestras de n=46 y n=45. _____	57
Tabla 5. Puntaje de cada participante en cada factor (patrón 1 y patrón 2) de las sub-muestras de n=46 y n=45. _	59
Tabla 6. Análisis de asociación (regresión lineal) entre taxa y consumo de macronutrientes en porcentaje, ajustado por edad, sexo y antecedentes heredofamiliares de sobrepeso y obesidad. _____	68
Tabla 7. Análisis de asociación entre los taxa de interés y el IMC (puntajes z) de acuerdo con el consumo de patrón dietario. El modelo de regresión lineal se ajustó por edad, sexo, antecedentes heredofamiliares de sobrepeso y obesidad y por cada patrón. _____	70
Tabla 8. Géneros que contribuyen mayoritariamente a la variación de la diversidad beta entre NP y SPOB. _____	76
Tabla 9. Especies que contribuyen mayoritariamente a la variación de la diversidad beta entre NP y SPOB. _____	76
Tabla 10. Asociaciones obtenidas a través de MaAsLin2 (modelos lineales de asociaciones multivariadas) entre la capacidad funcional de la microbiota resumida como MetaCyc y la información metabólica y dietaria de la población ajustada por actividad física. _____	88

Tabla 11. Asociaciones obtenidas a través de MaAsLin2 (modelos lineales de asociaciones multivariadas) entre la capacidad funcional de la microbiota resumida como ECs nivel 4 y la información metabólica y dietaria de la población ajustada por edad. _____ 88

Suplementos

<i>Suplemento 1</i>	36
<i>Suplemento 2.</i>	42
<i>Suplemento 3</i>	43
<i>Suplemento 4</i>	44
<i>Suplemento 5</i>	48
<i>Suplemento 6, 7 y 8</i>	48
<i>Suplemento 9 y 10</i>	52
<i>Suplemento 11</i>	64
<i>Suplemento 12</i>	65
<i>Suplemento 13</i>	67
<i>Suplemento 14</i>	70
<i>Suplemento 15</i>	71
<i>Suplemento 16 y 17</i>	83
<i>Suplemento 18</i>	84
<i>Suplemento 19</i>	87
<i>Suplemento 20</i>	89
<i>Suplemento 21</i>	90
<i>Suplemento 22</i>	90

Resumen

El desarrollo de las enfermedades metabólicas está ligado a la microbiota intestinal. Se realizó un estudio transversal que involucró la participación de 48 niños y niñas de entre 6 y 12 años, de quienes se colectaron muestras fecales, cuestionarios de frecuencia de consumo de alimento, datos antropométricos y metabólicos para ahondar en la investigación del microbioma intestinal asociado a la obesidad infantil. Usando los puntajes -z del índice de masa corporal (IMC) se categorizó a cada participante con normopeso (NP) o sobrepeso y obesidad (SPOB). Se determinaron dos perfiles dietarios, uno caracterizado por el consumo de hidratos de carbono complejos y proteínas (patrón 1) y otro por hidratos de carbono simples y grasas saturadas (patrón 2). La diversidad microbiana taxonómica y capacidad metabólica se determinaron usando metagenómica. Se encontraron diferencias entre la diversidad microbiana de ambos grupos de IMC. Los taxa que contribuyeron a esta diferencia incluyen *Eubacterium* sp, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Dialister*, *Monoglobus pectinilyticus*, *Bifidobacterium pseudocatenulatum*, *Intestinibacter bartlettii*, *Bacteroides intestinalis*, *Bacteroides uniformis*, *Bacteroides rodentium*, *B. egerthii*, *Roseburia* sp y *Methanobrevibacter smithii*. Las diferencias metabólicas del microbioma entre NP y SPOB incluyeron el metabolismo del metano y de la energía, las vías de biosíntesis de aminoácidos, vías de biosíntesis de cofactores, transportadores y vitaminas, vías de biosíntesis y degradación de nucleósidos y nucleótidos, vías de degradación de hidratos de carbono-azúcares y vías de biosíntesis de aminas y poliaminas. Además, se encontraron asociaciones significativas entre *B. rodentium*, *Eubacterium* sp, *Roseburia* sp, *Ruminococcus*, *Mitsuokella multiacida*, *Klebsiella variicola*, *Citrobacter* spp y vías metabólicas del microbioma con los datos antropométricos, metabólicos y dietarios. También, se encontró que la categoría de factores de virulencia de lipooligosacáridos (LOS) de la microbiota se encuentra diferencialmente abundante entre los grupos de IMC. Las variaciones metabólicas emergen en la infancia como resultado de la compleja interacción entre la dieta y la microbiota, que deben ser dilucidadas con el objetivo de prevenir las enfermedades metabólicas en la adolescencia y adultez.

Capítulo 1: Introducción

Marco teórico

1. Estados de nutrición: malnutrición

La malnutrición engloba una serie de condiciones que deterioran la salud. Este término se refiere a las deficiencias, excesos y desbalances en el consumo energético y nutricional de un individuo. Estas condiciones suponen una alimentación inadecuada o una absorción deficiente del alimento consumido (1). Las formas de la malnutrición infantil, que incluyen a la desnutrición (emaciación, retraso en el crecimiento y bajo peso), a la ingesta inadecuada de vitaminas y minerales, al sobrepeso y a la obesidad, se encuentran entre los retos de salud más grandes en la población (2,3).

1.1. Sobrepeso y obesidad

El sobrepeso y la obesidad son el aumento de energía almacenada como grasa, generada por la ingesta calórica excesiva. El sobrepeso y la obesidad son problemas de salud multifactoriales (Figura 1); se relacionan directamente con factores de comportamiento, genéticos, hormonales y ambientales (4,5). En los últimos años debido a la globalización (mayor distribución de alimentos procesados, la ideología occidental y la urbanización), la población de muchos países, incluyendo México, ha modificado sus patrones alimentarios hacia el consumo de productos industrializados como el refresco, pan dulce, productos de confitería, alimentos fritos, carnes rojas y embutidos, entre otros (6). Estas preferencias han incrementado el aporte de calorías, azúcares, grasas saturadas, colesterol y sodio, disminuyendo el aporte de fibra y ácidos grasos poliinsaturados (7). Estos cambios en los patrones de alimentación se han asociado al desarrollo de enfermedades crónicas degenerativas relacionadas con el sobrepeso y obesidad (8).

Se estima que si uno de los padres es obeso su descendencia tiene 3 veces mayor probabilidad de ser obesa en la adultez, si ambos los son, el riesgo aumenta a 10 (9,10). Estudios epidemiológicos han reportado que los factores genéticos explican del 40% al 70% de la variación del IMC en la población. Las asociaciones más fuertes se encuentran en síndromes que causan obesidad como son el Prader-Willi, Bardet-Biedl, Alström, Börjeson-Forssman-Lehman, Cohen y Carpenter.

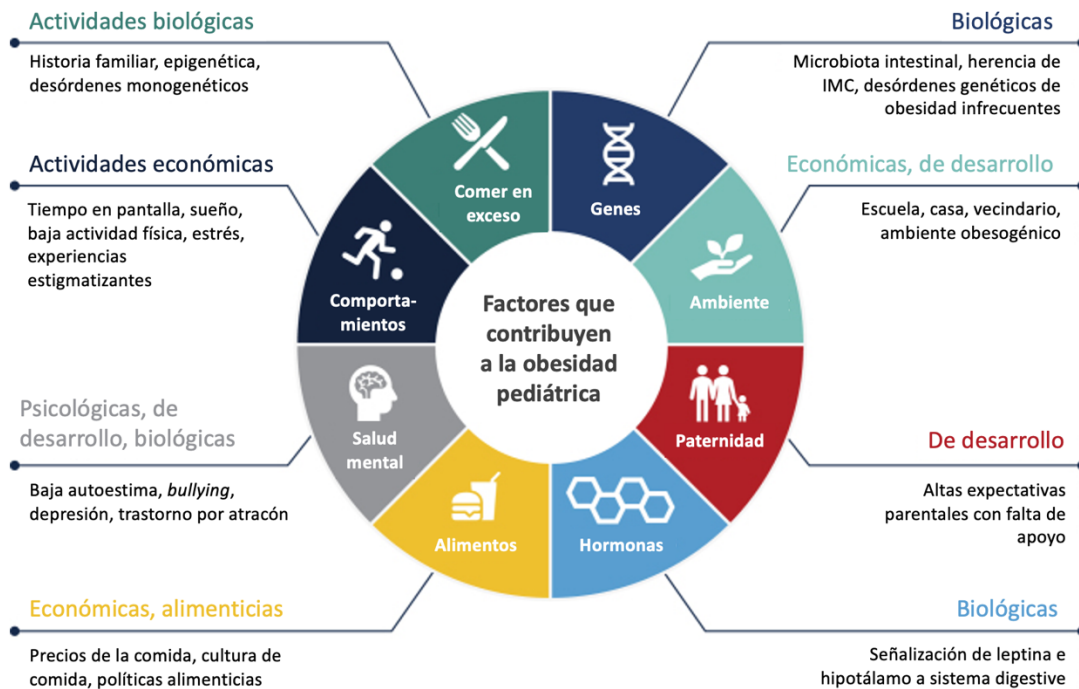


Figura 1. Factores que contribuyen al sobrepeso y obesidad infantil. (Modificado de (5))

Las variantes polimórficas, en general, son genes cercanos que se expresan en el sistema nervioso central, sugiriendo una alteración de las vías reguladoras de la obesidad. Estas variantes comunes se ubican en el cromosoma 16q12 cuyos efectos individuales, así como los combinados, explican del 10 al 20% de la herencia en obesidad. Casi todos los defectos de gen único que causan formas mendelianas de obesidad se encuentran en genes del sistema de leptina-melanocortina que se manifiestan con hipogonadismo hipogonadotrópico, deficiencia hormona adrenocorticotropa, hiperproinsulinemia, hipercortisolismo y retraso mental (11).

1.2. Estadísticas sobre el sobrepeso y la obesidad

El sobrepeso y la obesidad en niños presentan un incremento sostenido, convirtiéndose en problemas de salud al alza. Se ha reportado que los niños que llevan viviendo menos de 1 año en EEUU presentan una frecuencia significativamente más baja de sobrepeso y obesidad (23% y 10.1%, respectivamente) que aquellos nacidos en ese país (31.8% y 22.3%, respectivamente). Sin embargo, pese a que entre 1999 y 2000 la prevalencia de obesidad en los niños y adolescentes nacidos en EEUU presentaron una diferencia significativa con los nacidos en otro país (RM=2.36, 95%CI 1.31–4.24), para el 2012, esta diferencia ya no fue significativa (RM=1.52, 95%CI 0.80–2.88) (12). En diversos países en el mundo se ha encontrado incremento en la prevalencia de sobrepeso y obesidad infantil (Figura 2) (2). México se posiciona actualmente, en

uno de los primeros lugares a nivel mundial en obesidad infantil. Según datos de ENSANUT 2018, casi 4 de cada 10 escolares de entre 5 y 11 años padecen sobrepeso u obesidad (prevalencia combinada de 35.6%). Esta prevalencia combinada fue mayor en localidades urbanas (37.9%) en comparación con las rurales (29.7%). En relación con el sexo, la prevalencia de sobrepeso en niñas fue de 18.4% y de obesidad de 15%; en los niños el sobrepeso representó en un 17.7% y la obesidad a un 20.1% de la población (Figura 3). Estas cifras son de importancia debido a que existe una tendencia de aumento con la edad. Así, para adultos de 20 años y más, la prevalencia combinada de sobrepeso y obesidad es casi el doble (75.2%) (13).

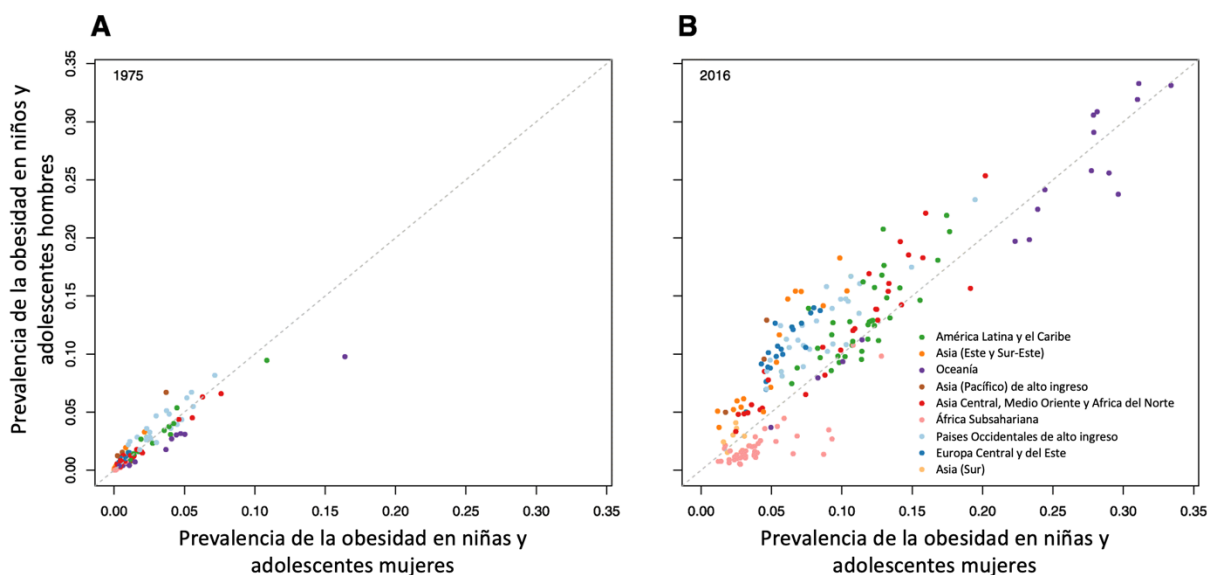


Figura 2. Comparación de la prevalencia de la obesidad en niñas, niños y adolescentes de entre 5 y 19 años en los años **A)** 1975 y **B)** 2016. Las estimaciones de la obesidad durante estos años fueron publicadas por la Colaboración del Factor de Riesgo de Enfermedades No Transmisibles (NCD-RisC, por sus siglas en inglés Non-Communicable Diseases Risk Factor Collaboration) usando las referencias de crecimiento de la Organización Mundial de la Salud (OMS). (Modificado de (14))

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha calculado valores de referencia para determinar el estado de nutrición en la población de acuerdo con la edad y el sexo. Para sujetos de 5 a 19 años (de acuerdo con su edad y sexo), el sobrepeso se calcula con base a la mediana del IMC más 1 desviación estándar y la obesidad con base a la mediana del IMC más 2 desviaciones estándar. De esta forma, IMC debajo del percentil 5 se interpreta como peso debajo del normal, del 5-85 será catalogado como normal, del 85-95 como sobrepeso, igual o mayor a 95 como obesidad y >99 como gravemente obeso. Siendo la obesidad infantil un problema de salud frecuente, las complicaciones de crecimiento en esta población también se hacen más

frecuentes, entre las que se encuentran la edad ósea avanzada, talla aumentada y menarquia precoz (10).

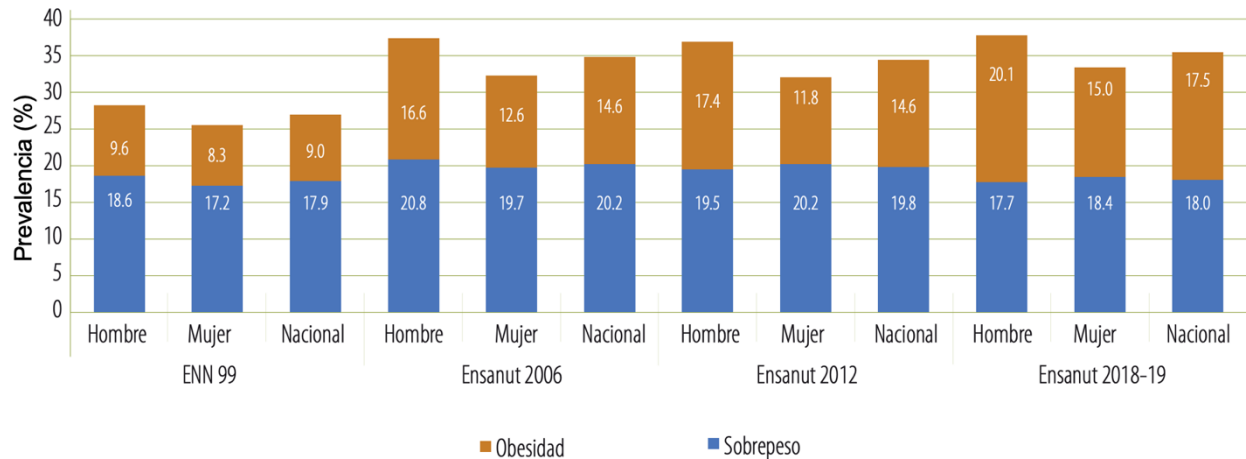


Figura 3. Comparativo de la prevalencia nacional de sobrepeso y obesidad en población de 5 a 11 años, por sexo. (México, ENN 1999, Ensanut 2006, 2012 y 2018-19 (13))

1.3. Consecuencias de padecer sobrepeso u obesidad

El exceso de tejido adiposo por mucho tiempo (desde la infancia) que se manifiesta como sobrepeso u obesidad, tiene consecuencias relevantes en la salud del sujeto, que pueden ser psicológicas, psicosociales, conductuales y médicas (complicaciones). Los efectos psicosociales se relacionan con la discriminación de los compañeros, burlas, aislamiento y bajo rendimiento académico (10). Por otro lado, dentro de las complicaciones metabólicas de la obesidad se encuentra la resistencia a la insulina debido al bloqueo de la cascada de señalización de la hormona (por fosforilación principalmente en Serinas y Treoninas de IRS-1) por el exceso de segundos mensajeros (Diacilglicerol). Este efecto evita la translocación del transportador de la glucosa (por ejemplo, Glut 4) a la membrana de la célula que la requiere para su metabolismo energético (15). De esta forma, la glucosa en sangre no penetra a la célula, permaneciendo en la circulación, estimulando la secreción de la hormona de manera constante. Así, los individuos obesos pueden secretar suficiente insulina para adaptarse a este estado de resistencia. Sin embargo, al existir este estímulo de manera crónica, se desarrolla el aumento en la carga sobre las células beta pancreáticas resultando en diabetes tipo 2 (DT2); el 80% de los pacientes con DT2 es obesa. Se estima que 44% de la carga de diabetes, 23% de la enfermedad coronaria sistémica y entre 7 y 41% de ciertos tipos de cáncer son atribuidos a la obesidad (16). Al respecto, comparando el sexo, los hombres con obesidad III tienen 18.1 veces y las mujeres 12.9 veces

mayor riesgo de tener DT2. Asimismo, los niños con obesidad presentan un riesgo cuatro veces mayor de ser diagnosticados con DT2 a la edad de 25 años (17).

Las dislipidemias son comunes en sujetos con sobrepeso u obesidad y DT2 (Figura 4). Al respecto, se estima que cada cambio de unidad en el IMC se relaciona significativamente con un decremento de las lipoproteínas de alta densidad (HDL del inglés *High Density Lipoproteins*) de 1.1 mg/dl en hombres y de 0.7 mg/dl en mujeres. Además, la obesidad se relaciona con concentraciones aumentadas de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL, del inglés *Very Low Density Lipoproteins*), de baja densidad (LDL, del inglés *Low Density Lipoproteins*), triglicéridos y colesterol total. Respecto al sexo, la diferencia de la concentración sérica en triglicéridos de mujeres con IMC menor a 21 y aquellas con más de 30 es de 65 mg/dl. Por otra parte, en hombres el promedio es de 118 mg/dl. La adiposidad visceral se ha asociado a la resistencia a la insulina y diabetes, siendo la hiperinsulinemia y la fibrinólisis marcadores de la relación entre la grasa visceral, DT2 y riesgo de enfermedad cardiovascular (11).

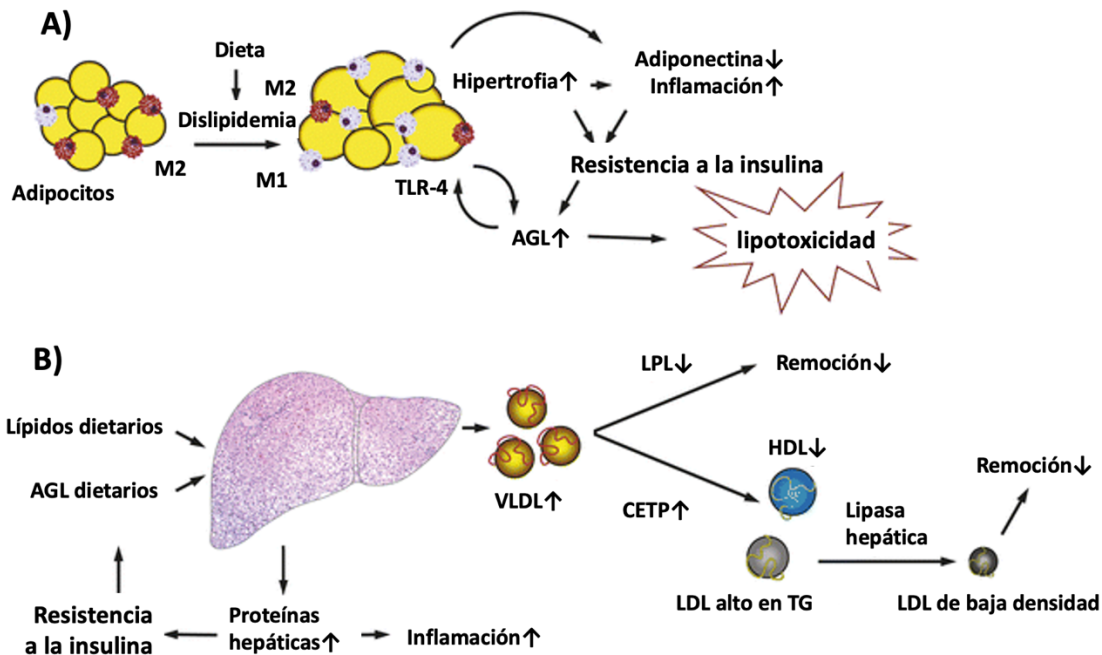


Figura 4. El papel de la disfunción del tejido adiposo en la dislipidemia. **A)** Una dieta alta en grasas y colesterol resulta en la hipertrofia de los adipocitos. Adicionalmente, este fenotipo induce un cambio de macrófagos anti-inflamatorios (M2) a pro-inflamatorios (M1), elevación de citocinas inflamatorias y decremento de la adiponectina que en conjunto promueven la resistencia a la insulina. A su vez, derivado de la hipertrofia de los adipocitos y la resistencia a la insulina, la lipólisis aumenta liberando ácidos grasos libres (AGL). Los AGL inducen más inflamación a través de su unión con los receptores parecidos a Toll 4 (TLR4, por sus siglas en inglés Toll-Like Receptor), estableciendo un ciclo vicioso promotor de dislipidemia y deterioro metabólico. **B)** El excesivo consumo de lípidos junto con los AGL sistémicos se acumulan en forma de triglicéridos en el hígado, resultando eventualmente en hipertrigliceridemia. Concomitantemente, la incrementada actividad de la proteína transportadora de

ésteres de colesterol (CETP por sus siglas en inglés cholesterylester transfer protein) y de la lipasa hepática, disminuyen los niveles de HDL e incrementan los de las partículas LDL de baja densidad. La acumulación de grasa hepática altera la secreción de las proteínas hepáticas (hepatocinas) que inducen resistencia a la insulina e incremento de AGL. (Modificado de (18))

Las células adiposas secretan adipocinas que participan en la fisiopatología de la obesidad y sus complicaciones. La adiponectina es una proteína plasmática relacionada estructuralmente con la familia de complemento 1q que circula en el suero como una gama de multímeros. Entre sus efectos metabólicos están el aumento de la sensibilidad a la insulina, la estimulación de la oxidación de ácidos grasos, la captación de glucosa en el músculo esquelético y supresión de la producción de glucosa en el hígado. Su relación con el sobrepeso u obesidad es que la concentración plasmática de esta adipocina disminuye al aumentar la masa grasa, promoviendo la resistencia a la insulina. Otras moléculas secretadas por el tejido adiposo son citocinas proinflamatorias y ejercen sus efectos mediante vías parácrinas y endócrinas. Muchos de estos factores se secretan por macrófagos que infiltran el tejido adiposo. Es el caso del factor de necrosis tumoral α (TNF- α , del inglés *Tumor Necrosis Factor*) relacionado con la DT2. Otras adipocinas son la interleucina-6 (IL-6), la proteína quimioatrayente de monocitos-1 (MCP-1, del inglés *Monocyte Chemoattractant Protein 1*), el inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1, del inglés *Plasminogen Activator Inhibitor-1*) y factores estimulantes de colonias (CSFs, del inglés *Colony Stimulating Factors*) (11).

Inicialmente, la Organización Mundial de la Salud (OMS) definió el síndrome metabólico como la presencia de alguno de los siguientes factores: diabetes, la disfunción de la tolerancia a la glucosa, la glucosa elevada en ayuno o resistencia al insulina; aunado a por lo menos dos de los siguientes factores: la acumulación de grasa visceral, trigliceridemia, tensión arterial elevada o microalbuminuria (19). En 2001, el NCEP-Adult Treatment Panel III definió la clínica del síndrome metabólico con mínimo 3 criterios que incluyen glucemia alta en ayuno, triglicéridos altos, HDL baja, presión arterial alta o circunferencia de la cintura mayor a la recomendada. Posteriormente, la International Diabetes Federation (IDF) propuso el requisito de obesidad abdominal central más dos de los criterios anteriores; esta propuesta toma en cuenta la heterogeneidad corporal de diferentes grupos étnicos (20). En general, el concepto de síndrome metabólico se enfoca en la complejidad multifactorial de los problemas de salud; creando una herramienta de predicción ante la diabetes y la enfermedad cardiovascular (21). Sin embargo, no se ha dilucidado un mecanismo patofisiológico central para los factores de riesgo que constituyen el síndrome metabólico, así como tampoco se ha establecido una definición, umbral ni equivalencias entre poblaciones (21). La eliminación de glucosa, mediada por la insulina, varía enormemente entre

la población aparentemente sana y las personas con resistencia a la insulina debido a diferencias de adiposidad, adecuación y genéticas (19). La resistencia a la insulina aumenta el riesgo de desarrollar intolerancia a la glucosa, trigliceridemia, disminución de HDL, hipertensión y estados procoagulantes e inflamatorios, que a su vez incrementan el riesgo de enfermedad cardiovascular. De manera que las estimaciones de riesgo relativo que provee el diagnóstico de síndrome metabólico difiere de acuerdo con la definición usada y con el subgrupo poblacional al que se le aplicó dicha definición, dado que las definiciones no incluyen factores de riesgo importantes como sociodemográficos, historial médico y de comportamiento (21). Es importante mencionar que existen mejores herramientas clínicas para la predicción de riesgo absoluto de enfermedad cardiovascular y diabetes en poblaciones definidas y, que la reducción del riesgo debe ser dependiente de la subpoblación.

La obesidad favorece diversas alteraciones, como son:

- a) Efectos cardiovasculares: La adiposidad visceral se ha relacionado con las complicaciones cardiovasculares ocasionadas por la inflamación, trombosis, hiperglucemia, dislipidemia aterogénica y adipocitocinas. La obesidad promueve alteración hemodinámica debido al incremento del volumen sanguíneo total, de la presión arterial sistémica y del gasto cardiaco que supone mayor carga de trabajo del corazón. Por ello, comparado con los sujetos sin obesidad, los individuos obesos presentan más frecuentemente dilatación e hipertrofia ventricular izquierda y agrandamiento auricular izquierdo. La obesidad es un factor de riesgo para desarrollar hipertensión, insuficiencia cardiaca, cardiopatía coronaria, arteriopatía periférica y fibrilación auricular. Existen también complicaciones pulmonares como son la hipoventilación alveolar, aumento del volumen sanguíneo pulmonar y efectos mecánicos sobre el sistema respiratorio (11). La prevalencia de prehipertensión/hipertensión en sujetos de 8 a 17 años es aproximadamente del 10% de acuerdo a NHANES (del inglés *National Health and Nutrition Examination Survey*) pero la prevalencia mundial exacta no se conoce. Se ha estimado que la trayectoria del aumento en la presión arterial mundial está atrasada 10 años al incremento del IMC. En niños, la prehipertensión se relaciona a la hipertensión en adultos. También la prehipertensión en adolescentes obesos se relaciona al desarrollo de hipertensión 2 años después, siendo los niños con mayor frecuencia (68%) que las niñas (43%) (22).
- b) Efectos gastrointestinales: La complicación gastrointestinal observada de manera más frecuente con la resistencia a la insulina y la obesidad es la enfermedad de hígado graso

no alcohólica (NAFLD del inglés *Nonalcoholic Fatty Liver Disease*) 1 para adultos y 2 para niños. Esta complicación incluye desde la esteatosis hasta la esteatohepatitis no alcohólica, fibrosis avanzada y cirrosis. La prevalencia estimada de NAFLD en la obesidad es del 50% al 85%. Esta complicación en población pediátrica (NAFLD tipo 2), se ha observado en niños y adolescentes con sobrepeso con una prevalencia del 6% al 23%, respectivamente, con predominio en hombres. Otras complicaciones gastrointestinales incluyen a la enfermedad por reflujo gastroesofágico, hernia hiatal y esófago de Barrett (11).

- c) Efectos ginecológicos y cáncer: Existen complicaciones ginecológicas y en sistema reproductivo asociadas a la obesidad tales como el síndrome de ovario poliquístico, caracterizado por disfunción ovulatoria e hiperandrogenemia. En hombres, la obesidad puede causar recuento y motilidad espermática reducida. Asimismo, también se ha documentado relación con la disfunción eréctil por mecanismos proinflamatorios y decremento de la concentración de testosterona. También el cáncer y la obesidad se encuentran relacionados. La relación ha sido con carcinomas mamarios, endometrial, colorrectal, prostático y de células renales (11).

1.4. Manejo del sobrepeso u obesidad

La terapia para la pérdida de peso incluye fármacos e intervenciones conductuales con cambios del estilo de vida, dieta y ejercicio, así como la cirugía bariátrica para obesidad más grave (Figura 5). Se estima que alrededor de un 20% de los individuos con sobrepeso pierden al menos 10% del corporal inicial seguido de su mantenimiento durante 1 año gracias a medidas dietéticas y ejercicio, siendo el apego a la dieta el factor que dicta la mayor pérdida de peso. Sin embargo, hay ciertas dietas que no han presentado apego de manera satisfactoria (Ornish, muy baja en grasa y Atkins, baja en carbohidratos). Para el manejo del paciente con sobrepeso u obesidad, se recomienda que se verifique la presión arterial, glucosa en ayuno y concentraciones de lipoproteínas a lo largo del tratamiento (11).

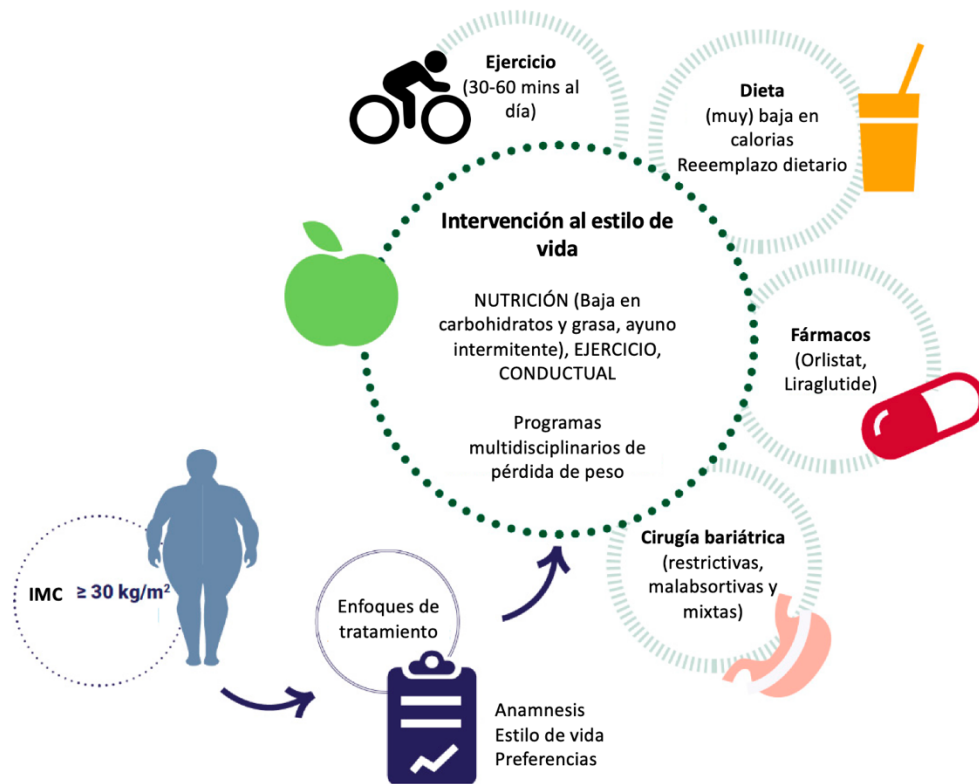


Figura 5. Enfoques de tratamiento para el sobrepeso y obesidad. Diferentes enfoques basados en evidencia que consideran el antecedente personal de peso, índice de masa corporal (IMC), comorbilidades, intervenciones al estilo de vida, componentes dietarios, fármacos e intervenciones quirúrgicas. (Modificado de (23))

La obesidad podría contrarrestarse a través de diversas alternativas como:

- a) Ejercicio: El ejercicio tiene efectos positivos al aumentar la sensibilidad a la insulina por favorecer fibras musculares tipo 1 sobre las tipo 2 en sujetos con sobrepeso/obesidad (15). Por ello, la recomendación de actividad física para perder y/o controlar peso es de 60 minutos al día, los 7 días de la semana (11), actividad que además promueve el fortalecimiento de músculos y huesos según la OMS (24). El ejercicio también muestra beneficios al sistema cardiovascular en estos sujetos; la recomendación para prevenir enfermedad cardíaca es de 30 minutos diarios de actividad intensa o moderada la mayoría de los días de la semana, o al menos 150 minutos semanales. Asimismo, la pérdida de peso y el ejercicio son las medidas iniciales para corregir la dislipidemia asociada a obesidad (11).
- b) Fármacos: El tratamiento con fármacos ha mostrado resultados modestos a corto plazo, aunque se relaciona frecuentemente con efectos secundarios indeseables. La mayor parte de los tratamientos funcionan al suprimir el apetito centralmente. Existen agentes

adrenérgicos (Fentermina y el Dietilpropión), inhibidores de la lipasa (Orlistat), inhibidores de la recaptación de noradrenalina/serotonina (Sibutramina) y agonistas del receptor del péptido de tipo 1 similar al glucagón (Liraglutida) que son utilizados en la terapia. De manera menos frecuente, también se usan antidepresivos (Bupropión), inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (Fluoxetina) y anticonvulsivos (Topiramato y Zonisamida) (11,23).

- c) Cirugía: Existen 3 tipos de cirugía bariátrica que han adquirido popularidad en los últimos 50 años: restrictivas, malabsortivas y mixtas. Las restrictivas comprenden la gastroplastía horizontal, vertical con banda, vertical con anillo de silastic y banda gástrica ajustable. La pérdida del exceso de grasa, a través de la cirugía bariátrica restrictiva, es de alrededor del 50% a los 3 años (25). Las intervenciones malabsortivas son la derivación yeyunoileal, biliopancreática, de extremidad larga y el cruce duodenal, de hecho, la derivación gástrica en Y de Roux es el método mixto más común en el mundo. El porcentaje de pérdida del exceso de peso a los 2 años es del 70% (26). El panel del National Coverage Advisory Committee concluyó en 2004 que la cirugía bariátrica es eficaz para la pérdida de peso y del control de comorbilidades en sujetos con IMC iguales o mayores a 35 kg/m² (12).
- d) Atención integral en población infantil: En la población infantil se han encontrado efectos positivos en la pérdida de peso, pequeños y moderados, mediante las intervenciones en el estilo de vida. Los programas de pérdida de peso conductuales basados en la familia son los que tienen efectos más prolongados (11). Se trata de una población importante por el mayor riesgo de convertirse en adulto obeso, con DT2 e hipertenso, si el sobrepeso u obesidad se presenta a temprana edad (22,27,28). Se ha reportado que además de practicar ejercicio (que incluye la reducción del uso de pantallas), el tipo y horas de actividad física, otras intervenciones como la creación de centros de salud escolares, campañas de consumo de comida saludable y normas para el empaque de alimentos (etiquetado y porciones adecuadas), han sido benéficos para prevenir y tratar el sobrepeso y obesidad en escolares (11,29–31).

1.5. La alimentación

La dieta es de los factores ambientales más importantemente asociados a la obesidad (4). El sistema fisiológico que controla la ingestión de alimento y el gasto de energía se compone de señales aferentes como centros cerebrales integradores (el hipotálamo) que a corto y largo plazo

detectan el estado de energía, y señales eferentes (como la leptina, colecistocinina, hormonas tiroideas, etc.) que regulan la intensidad del hambre y la magnitud del gasto energético. Es de importancia recalcar que este sistema está sesgado hacia la prevención de la deficiencia de energía, de manera que previene la inanición. La principal señal aferente está dada por la leptina cuya concentración decreciente informa al cerebro disminuir el almacén de grasa lo que lleva a efectos compensadores sobre el apetito y el gasto energético. Las señales provenientes del tubo digestivo regulan el apetito a corto plazo, actúan sobre la sensación de estar lleno que contribuye a la decisión de dejar de comer (colecistocinina, péptido glucagón 1, PYY, polipéptido pancreático) o comer cuando se requiere (grelina) (11).

1.6. El ambiente de la alimentación

El componente ambiental en el metabolismo y las reservas de grasa se componen por la actividad física, cantidad y calidad de la dieta, escolaridad y nivel socioeconómico y percepción del sujeto mismo (32).

- a) Actividad física en niños: La OMS en el 2017 reportó que la inactividad física es uno de los principales factores de riesgo para padecer enfermedades cardiovasculares, cáncer y DT2. Este organismo, definió a la actividad física como cualquier movimiento corporal producido por los músculos esqueléticos, con el consiguiente consumo de energía, de tal manera que se diferencia del ejercicio ya que éste último implica una subcategoría de la actividad física que se planea, está estructurado, repetitivo y tiene un objetivo de beneficio del estado físico. Así, la OMS categoriza a los niños como activos cuando realizan al menos 60 minutos de actividad física moderada a vigorosa los 7 días de la semana. La actividad física moderada es en la que se presenta una aceleración de forma perceptible del ritmo cardiaco, como es el caminar a paso rápido, bailar, y la participación activa en juegos, deporte y paseos con animales domésticos. La actividad física intensa es la que provoca una respiración rápida y un aumento sustancial de la frecuencia cardiaca, ejemplos de estos son la natación rápida, los deportes y juegos competitivos. Es también posible usar los equivalentes metabólicos para expresar la intensidad de las actividades físicas, estos son la razón entre el metabolismo de una persona durante la realización de un trabajo y su metabolismo basal. Se define como el costo energético de estar tranquilamente sentado, equivale a un consumo de 1 kcal/kg/h. El consumo calórico es de 3 a 6 veces mayor cuando se realiza una actividad de intensidad moderada y de más de 6 veces mayor cuando se realiza una de intensidad vigorosa (24).

- b) Dieta: La diversidad de la dieta de los escolares se caracteriza por ser pobre en los grupos de alimentos asociados con mejores niveles de salud y es rica en alimentos asociados a la obesidad o enfermedades crónicas. De acuerdo con la ENSANUT 2018-19, 85.7% de los escolares consumen regularmente bebidas azucaradas no lácteas, 64.6% botanas, dulces y postres y 52.9% cereales dulces. En los resultados de la ENSANUT de medio camino 2016, el 50.4% de los encuestados respondieron no poseer la cantidad suficiente de dinero para comprar frutas y verduras, al 38.4% le faltaba conocimiento para preparar alimentos saludables y el 76.3% de la población no sabe cuántas calorías debería consumir al día (13,32).

2. La microbiota intestinal

Como se mencionó con anterioridad, entre las principales causas de la obesidad se han descrito factores genéticos, factores ambientales y fisiológicos, sin embargo, ninguno ha logrado dar explicación ni tratamiento eficiente o convincente. Distintos estudios de asociación entre macro y micronutrientes o calorías totales y el IMC han reportado resultados inconsistentes, ya que los participantes obtienen resultados diferentes al mismo régimen dietario (33,34). De manera que distintos grupos se han enfocado en el estudio de la microbiota intestinal como posible causa, mediador y tratamiento del sobrepeso y obesidad. Las asociaciones microbianas de bacterias, eucariotas, virus y arqueas que residen dentro y sobre el cuerpo humano constituyen la microbiota, y el conjunto de genes que la codifica es el microbioma.

En el humano se albergan por lo menos 10^{14} células microbianas (37,38). El número de bacterias varía conforme a la locación del tracto gastrointestinal, desde menos de 10^3 bacterias/ml en estómago y duodeno, 10^4 - 10^7 bacterias/ml en yeyuno e íleon y hasta 10^{11} - 10^{12} bacterias/ml en colon (Figura 6) (39). La microbiota intestinal se compone principalmente por bacterias anaerobias, son 6 los filo predominantes: *Firmicutes*, *Bacteroidetes* (estas dos los más frecuentes), *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Fusobacteria* y *Verrucomicrobia*. En colon descendente, cerca del 90% de la microbiota la compone el filo *Firmicutes*, con representantes como *Eubacterium*, *Clostridium*, y *Lactobacillus*; así como el filo *Bacteroidetes*, representado por *Bacteroides*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Fusobacteria* y *Verrucomicrobia*, estos últimos 4 en menos cantidad (40).

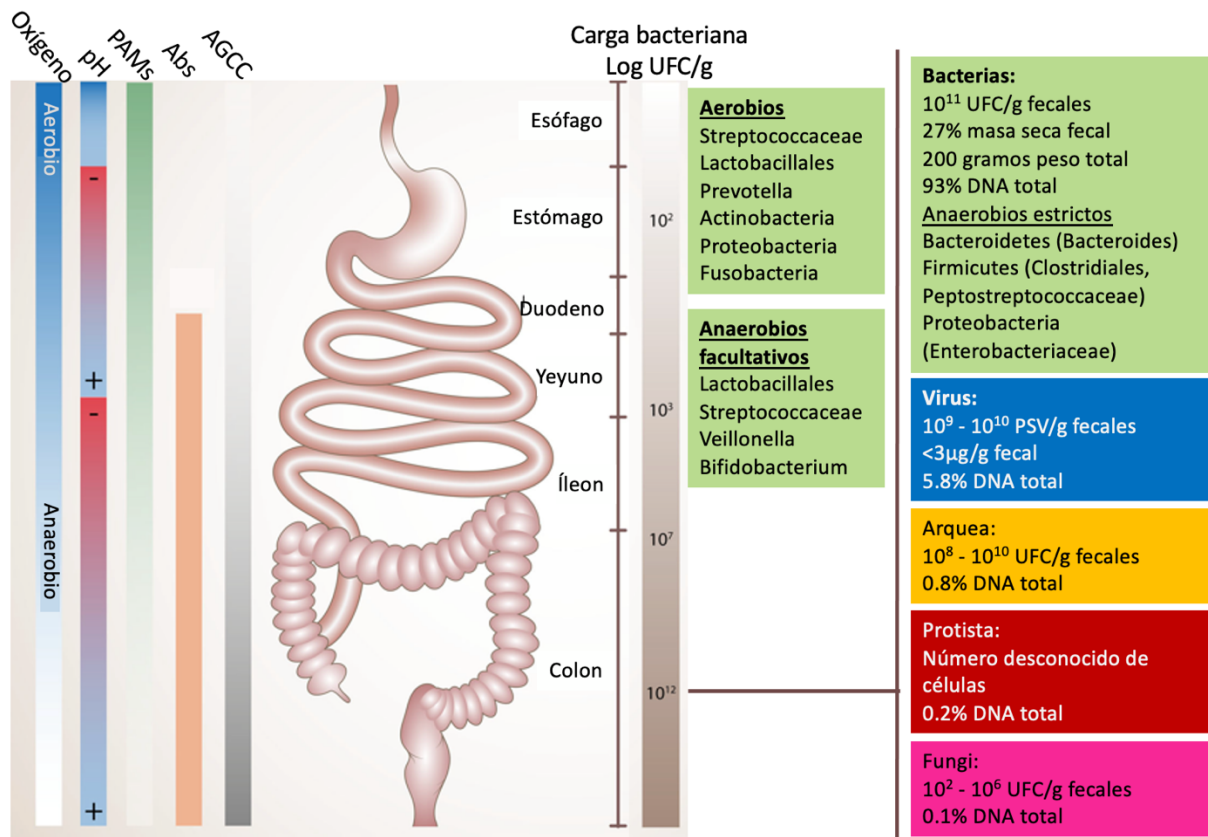


Figura 6. Biogeografía y factores que influyen en el microbioma intestinal. Los factores que determinan la composición y carga bacteriana por segmento del tracto gastrointestinal del microbioma incluyen la concentración de oxígeno, el pH, los péptidos antimicrobianos (PAMs), los ácidos biliares (ABs) y los ácidos grasos de cadena corta (AGCC). A la derecha se muestran los grupos taxonómicos principales de la microbiota del intestino grueso, sus aportaciones en Unidades Formadoras de Colonias (UFC) o Partículas Similares a Virus (VLP) por gramos de materia fecal, aportación de peso, porcentaje de materia fecal seca y de DNA. (Modificado de (35,36))

Las asociaciones microbianas de bacterias, eucariotas, virus y arqueas que residen dentro y sobre el cuerpo humano constituyen la microbiota, y el conjunto de genes que la codifica es el microbioma (Figura 6). Las comunidades bacterianas se parecen más entre sí cuando ocupan las mismas localizaciones corporales, inclusive en el mismo individuo, aunque es posible que en el mismo sitio corporal haya variabilidad interindividual. De las variaciones interindividuales que dependen de la dieta, se han usado distintas categorías, incluidas tres variantes de enterotipos con base en el género dominante o en la relación entre las abundancias: *Bacteroides*, *Prevotella* o *Ruminococcus* (41): la dieta alta en grasa animal promueve un enterotipo dominado por *Bacteroides* y la dieta rica en carbohidratos se asocia con un dominio de *Prevotella* (42). Asimismo, la microbiota es particular a la población en la que se describe, por

ejemplo, en la población japonesa se ha descrito una enzima única perteneciente a una bacteria marina que les ayuda a digerir el alga que prevalece en su particular dieta. Por otro lado, la dieta occidentalizada ha homogeneizado la comunidad microbiana de distintas poblaciones que la han aceptado, quizá haya especies que se estén perdiendo y que tengan un rol de importancia médica y ecológica. Así, es importante caracterizar la microbiota completa de diversas poblaciones geográfica y socioeconómicamente distintas para establecer la normalidad (41).

2.1 La microbiota intestinal y la salud

O'Hara en 2006 se refirió a la microbiota intestinal como el órgano olvidado que se involucra con la obtención y almacenamiento de energía, fermentación y absorción de carbohidratos no digeribles por el ser humano (43). Esta característica promueve la fuerza evolutiva hacia el desarrollo de simbiosis. La microbiota intestinal, también, interactúa con el sistema inmune al proveer señales para la maduración de las células inmunes y la tolerancia (41). Estas funciones son posibles dada una microbiota saludable, y es aquí donde se presenta el problema de determinar qué constituye esta entidad en la población. Se sabe que la microbiota es relativamente estable en una persona sana con el paso del tiempo, y el describir la estabilidad de la microbiota y la disbiosis (desbalance en la microbiota) en un individuo puede ser útil para la predicción de la enfermedad y el desarrollo de terapias (41). En este sentido, distintos estudios en ratones y en humanos, han mostrado que el cambio de una dieta baja en grasas y rica en polisacáridos vegetales a una con composición opuesta (occidentalizada) repercute en la composición de la microbiota en 24 horas (42,44). Estos cambios tempranos se encuentran, principalmente, a nivel de especie, géneros y familias, no en filos (45). En un estudio longitudinal se encontró que los cambios en el consumo de fibra se correlacionan con 15% de los cambios en la abundancia de la microbiota a las 24 horas (46). Este cambio, probablemente sea una reacción al flujo de nuevos nutrientes que ocasiona una disrupción transitoria de la microbiota basal ya que este cambio es usualmente transitorio en la comunidad. La microbiota se desarrolla y cambia desde antes de nuestro nacimiento hasta la senectud. En el meconio se ha encontrado una diversidad bacteriana baja y ausencia de partículas virales y existe evidencia, aunque controvertida, de bacterias en líquido amniótico *in utero* en neonatos sanos (47–49). Posteriormente, aquellos nacidos por vía vaginal, poseen una comunidad microbiana que se asemeja a la del canal de parto, mientras que los que han nacido por cesárea, poseen microbiota característica de la piel (dominada por *Staphylococcus* y *Propionibacterium*). Esta diferencia parece influenciar a la respuesta inmune ya que se han descrito cuentas bacterianas reducidas

y mayor número de células secretoras de anticuerpos en heces de neonatos nacidos por cesárea (41), lo cual ha sido asociado con la aparición de desórdenes metabólicos e inmunológicos (50–52).

La respuesta gastrointestinal a la colonización es la producción de IgA, el desarrollo del tejido linfoide asociado a intestino (GALT *del inglés Gut-associated Lymphoid Tissue*), placas de Peyer y ganglios linfáticos mesentéricos (41). Las bacterias comensales son importantes en la supresión de la respuesta inflamatoria y la promoción de tolerancia inmunológica a través de los TLRs (*del inglés Toll-like Receptors*). La diversidad bacteriana del intestino infantil se desarrolla a partir de colonizadores aerotolerantes que posteriormente se reemplazan por anaerobios. Se estima que alrededor de los 11 meses de edad, los filotipos en los infantes son específicos y diferentes a los de su madre. Así, la diversidad filogenética incrementa con el tiempo y los cambios más pronunciados se asocian a eventos como el uso de antibióticos y la introducción de comida sólida. En ausencia de las señales microbianas apropiadas por la pérdida de diversidad, el sistema inmune no se desarrolla de manera normal; a falta de exposición ante productos microbianos en las primeras etapas de la vida resultan en un daño en el desarrollo del sistema inmune (53). Por ejemplo, se ha observado que la presencia de IL-10 inducida por la microbiota intestinal suprime la inflamación y la predisposición a las alergias (41). Asimismo, la microbiota de la piel promueve la presencia de células T reguladoras (Treg) y la cicatrización (54). Se ha documentado en ratones que la infección latente por Herpesvirus protege contra *Listeria monocytogenes* y *Yersinia pestis* al aumentar las concentraciones de INF- γ y TNF- α ; también se ha estudiado la relación protectora de la infección por *Helicobacter pylori* y la respuesta Th1 y las enfermedades respiratorias (55,56). En este contexto, parece existir un vínculo entre la decreciente prevalencia de *H. pylori* por el uso de antibióticos y el aumento de desórdenes alérgicos en la población occidental. De esta forma, la máxima “un microbio: una enfermedad”, muy similar al dogma biológico (ya en desuso) de “un gen: una enzima” no es integral, ya que la disbiosis se asocia a distintas enfermedades tales como las autoinmunes, alérgicas, obesidad, enfermedad intestinal inflamatoria y DT2 (41,53).

2.2. La microbiota intestinal asociada al sobrepeso y obesidad

Se han descrito perturbaciones en el patrón que compone al microbioma intestinal en humanos con malnutrición (3,57). La combinación de la calidad y contenido de la dieta junto con el patrón de disbiosis intestinal activa distintas vías metabólicas, así como la producción de compuestos bioactivos que participan en el mantenimiento de patrones aberrantes (Figura 7) (58). Las

alteraciones en el consumo de carbohidratos, proteínas y grasas afectan la composición de la microbiota fomentando la prevalencia de bacterias patógenas o benéficas (59,60). En gemelos humanos se ha descrito una disminución en el filo Bacteroidetes y un incremento en los filos Actinobacteria y Firmicutes en aquellos obesos. La diversidad de la microbiota intestinal se correlaciona negativamente con el índice de masa corporal (61). Este cambio incrementa la capacidad de recolección de energía (mediante la transferencia de hidrógeno por Prevotellaceae y Archaea) a partir de la comida y produce un estado de inflamación de bajo nivel crónica (distinta a la inflamación clásica), que se puede trasplantar al sujeto sano delgado al trasplantar microbiota del obeso (41). La obesidad presenta un estado crónico de inflamación de bajo grado con la producción de citocinas inflamatorias como TNF- α , IL-1 β y CCL2, un incremento de células cebadas, células T y macrófagos. Se ha observado en ratones obesos que el incremento en *Bifidobacterium spp.* ha sido relacionado con la reducción de la inflamación mediante el incremento de la producción del péptido-2 parecido al glucagón (GLP 2, por sus siglas en inglés) que, a su vez, reduce la permeabilidad intestinal y evita la translocación de lipopolisacárido. La importancia de la interacción entre la microbiota y el sistema inmune en contexto de la obesidad se demostró en ratones *knockout* para TLR5 que reconoce flagelina; esta población desarrolló características compatibles con síndrome metabólico en conjunto con diferencias significativas en la microbiota intestinal que parece promover la señalización de inflamación de bajo grado (41).

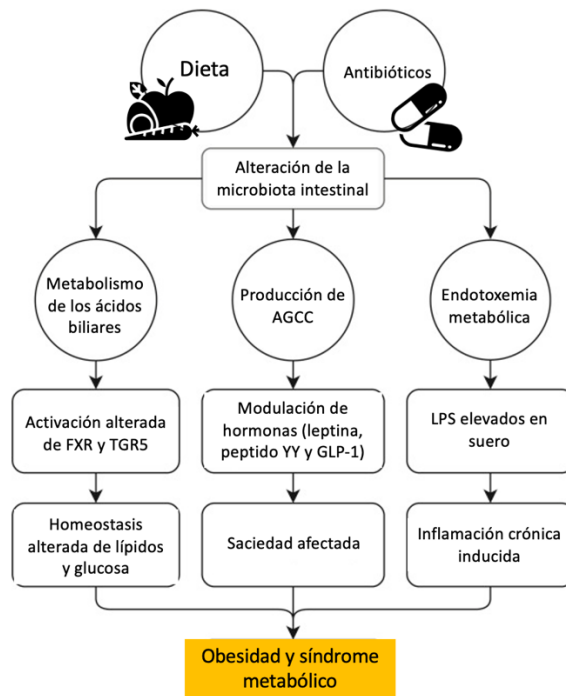


Figura 7. Asociación entre la alteración de la microbiota y las consecuencias metabólicas que median el desarrollo de la obesidad y el síndrome metabólico. FXR: receptor farnesoide X; GLP-1: péptido similar al

glucagón; LPS: lipopolisacárido; AGCC: ácidos grasos de cadena corta; TGR5: receptor 1 de ácidos biliares acoplado a proteína G. (Modificado de (62))

Debido a que la microbiota es particular a cada población, es importante caracterizarla de manera completa a través de distintas áreas geográficas y socioeconómicas para establecer la normobiosis y, consecuentemente, la disbiosis (41). Más aún, la información respecto a la estructura, función y maduración de la microbiota intestinal durante la infancia es limitada (61,63). Es por esto que la infancia parece ser el mejor momento para la intervención oportuna para promover la salud y prevenir el fenotipo recolector e inflamatorio a través del tratamiento de la alteración de la microbiota intestinal (61).

3. Disbiosis e inflamación

La disbiosis intestinal es un término amplio, definido por la pérdida del balance de la microbiota intestinal asociada a un resultado que perjudica la salud del hospedero y que implica la pérdida del aporte benéfico de los microorganismos paralelo a la expansión de los patobiontes (64). La disbiosis intestinal parece originarse a través de cambios en las abundancias relativas microbianas ocasionadas por cambios en la dieta, inflamación, inmunodeficiencias, infecciones y/o exposiciones a antibióticos o toxinas (65). Se ha propuesto que el ambiente inflamatorio conduce a perturbaciones en la microbiota intestinal que se caracteriza por la proliferación de ciertas especies que poseen la capacidad de aprovechar y beneficiarse de los metabolitos encontrados con mayor frecuencia en el intestino inflamado (65).

Un ejemplo sobre disbiosis e inflamación bien caracterizado es el proceso infeccioso. La patogénesis es la capacidad de los microorganismos para causar enfermedades; esta empieza por la adherencia a la célula blanco, seguida por la colonización y crecimiento (66) (Figura 8). Durante estos procesos las bacterias patógenas pueden utilizar diversas estrategias para provocar virulencia y así producir y mantener la enfermedad, en este caso, la inflamación del ambiente intestinal. Este grupo de bacterias logra proliferar de forma abundante, ya que propicia un cambio en el microambiente que le provee de nutrientes y condiciones que la benefician en comparación con las bacterias comensales (66). A partir de la inducción de la inflamación se produce disbiosis. Aunque estos procesos han sido descritos a partir de modelos inflamatorios infecciosos en su gran mayoría, es importante recalcar que la obesidad resulta en un estado

crónico de inflamación de bajo grado que incluye el aumento de los niveles de citocinas y células inflamatorias (41).

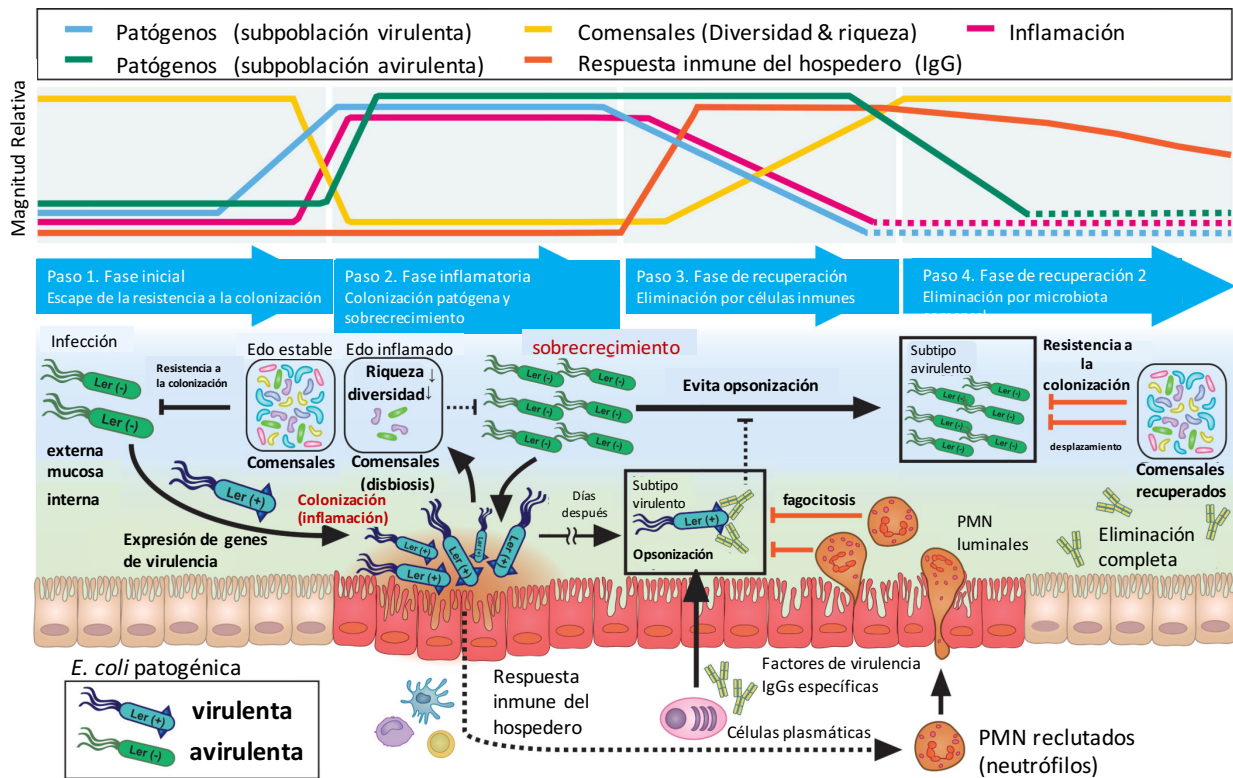


Figura 8. La inmunidad del hospedero y la microbiota residente del intestino, de manera cooperativa, controlan la eliminación de patógenos enterales. Paso 1: los patógenos evaden la resistencia a la colonización, mediada por microorganismos comensales, a través de la expresión de genes de virulencia que resultan en el aumento de la subpoblación virulenta. Paso 2: la subpoblación virulenta induce inflamación, que a su vez, lleva al apogeo de la subpoblación avirulenta en el lumen intestinal como consecuencia de la disrupción de la resistencia ante la colonización. Paso 3: los IgGs específicos al factor de virulencia marcan a la subpoblación virulenta. La subpoblación virulenta opsonizada con IgG es blanco de eliminación por los neutrófilos intraluminales. La eliminación de los patógenos virulentos resulta en la recuperación de la inflamación y la restauración de la resistencia a la colonización mediada por la microbiota. Paso 4: la población avirulenta remanente se elimina por competencia de la microbiota comensal y la resistencia a la colonización se restablece por completo. (Modificado de (66))

La descripción de los sucesos que ocurren durante una infección intestinal tiene una amplia similitud con los hallazgos reportados durante el sobrepeso y la obesidad. Como se puede apreciar en la imagen, la abundancia de los grupos comensales se altera durante la fase inflamatoria (paso 2), caracterizada por colonización patógena y el incremento en la proliferación de estos últimos. La abundancia de las bacterias colonizadoras patógenas es indirectamente

proporcional al de la microbiota comensal, de manera que se produce disbiosis. Finalmente, se produce el aumento de la respuesta inmune del hospedero (paso 3) e inicia el proceso inflamatorio que permanece constante durante las fases de recuperación (paso 4). Es importante recordar que en los individuos con sobrepeso y obesidad se ha detectado respuesta del sistema inmune que involucra la producción de TNF- α e IL-6 así como un estado proinflamatorio de bajo grado y estrés oxidativo (67).

En el caso de la infección, el sistema inmune y la microbiota comensal (en fase de recuperación, paso 3 y 4) se encargarán de eliminar las especies virulentas y avirulentas reestableciendo la homeostasis o normobiosis. En el caso del proceso inflamatorio asociado al sobrepeso y la obesidad es posible que los patógenos no expresan de forma constante los factores de virulencia ya que su expresión representa un gran costo de adecuación para las bacterias, de manera que pueden mantener el ambiente inflamatorio con una expresión intermitente o no completa.

4. Estrategias de patogenicidad

Un parásito es un organismo que vive sobre o en un hospedero, cuando son dañinos se les llama patógenos (68). El resultado de la relación hospedero-parásito depende de la patogenicidad del parásito; o sea, de la capacidad del parásito para causar daño al hospedero y de la resistencia o susceptibilidad del mismo. La patogénesis, es la capacidad de los microorganismos para causar enfermedades; esta empieza por la adherencia seguida por la colonización y crecimiento, procesos durante los cuales pueden utilizar varias estrategias para provocar virulencia (68). Los factores de virulencia son los componentes microbianos para ocasionar daño al hospedero y la virulencia se utiliza para señalar el grado de patogenicidad del parásito y es una cualidad relativa que define la capacidad de un microorganismo para dañar al hospedero (69). La particularidad relativa de la virulencia viene a colación ya que puede ser atenuada o puede aumentar en un microorganismo, en función de la respuesta del hospedero, sugiriendo el potencial de todos los microorganismos a ser patógenos (Figura 9). Así mismo, la virulencia y los factores de virulencia, en el marco del daño y respuesta, se basa en principios que incluyen a la patogénesis como el resultado de una interacción entre el hospedero y el microbio, el resultado dañino en el hospedero derivado de esta interacción y el reflejo del daño ante los factores microbianos, la respuesta o ambas dado que fluctúa en función de la respuesta inmune y del tiempo (69).

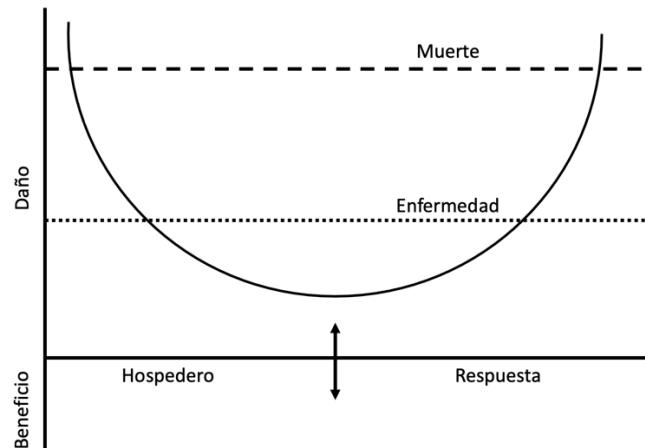


Figura 9. Curva básica de la estructura daño-respuesta en la patogénesis microbiana. El resultado de la interacción entre el hospedero y los microbios depende de la extensión del daño o beneficio sostenido por el hospedero. La estructura de daño-respuesta propone que la curva básica es una parábola donde el daño al hospedero se maximiza en los extremos de la respuesta. (Modificado de (69))

El daño al hospedero en función del tiempo de patogénesis por el microbio resulta en comensalismo, colonización, persistencia y enfermedad, en el que los estados de comensalismo y colonización – propios de la adquisición y desarrollo de la microbiota- se vuelven indistinguibles mientras el daño al hospedero tiende al cero (69,70). En este contexto, los factores de virulencia se pueden definir como componentes microbianos que alteran la interacción entre hospedero-microbio mediante el incremento del grado de daño relativo y el grado de la repuesta del hospedero y la duración.

Los patógenos utilizan una amplia variedad de elementos de patogenicidad que confieren el potencial virulento para causar daño al hospedero y vencer a sus rivales comensales en el intestino; en estos se incluye la producción de toxinas y moléculas asociadas a adhesión e invasión, la habilidad de evadir y contraatacar las defensas del hospedero, la habilidad de crecer en el ambiente del hospedero, la habilidad de adquirir nutrientes del ambiente y la producción de factores que censan y modulan el ambiente como las variaciones de pH, osmolaridad, inflamación y dinámica poblacional (66). Es importante mencionar que los factores de virulencia no son caracterizados por una única categoría, sino que se sobreponen en la mayor parte de los casos (69). Adicionalmente, los factores de virulencia bacterianos se encuentran codificados en cromosomas, plásmidos, transposones y en DNA de bacteriófagos. A continuación, se muestran las funciones en las que se han caracterizado algunos factores de virulencia (Figura 10).

Invasión y Adhesión

Las enzimas que son consideradas factores de virulencia, generalmente, son activadas para ocasionar daño a los tejidos del hospedero haciéndolo más permisivo ante la infección microbiana. Algunas enzimas que producen daño tisular incluyen a las proteasas, las neuraminidasas y fosfolipasas. Estas enzimas, como consecuencia del daño celular y la digestión de sustratos, promueven la disponibilidad de nutrientes que pueden ser asimilados por otros miembros de la comunidad microbiana. Así mismo, pueden alterar los receptores celulares del hospedero de manera que alteran los ligandos usuales (como los del complemento), ocasionando un cambio en la dinámica de invasión y resistencia de la comunidad microbiana y el hospedero (69,71).

La adherencia puede efectuarse mediante interacciones proteína-proteína entre el patógeno y las células del hospedero (66). Las adhesinas son diversos componentes microbianos que habilitan esta unión y que incluyen proteínas, polisacáridos y componentes de la pared celular bacteriana. En ocasiones, esta interacción es selectiva a las células en zonas particulares, como es el caso de *Neisseria gonorrhoeae* que se adhiere al epitelio urogenital usando la proteína Opa que se une a la proteína humana CD66 (72). También, la proteína M en la superficie de *Streptococcus pyogenes*, junto con el ácido lipoteicoico, promueve la unión al receptor de la mucosa respiratoria y la unión de *Entamoeba histolytica* con las células del colon esta mediada por Gal/GalNAc lectina (69).

Algunas moléculas de adhesión no se encuentran unidas covalentemente a la bacteria como es el caso de los polisacáridos que forman el glucocálix y las capas viscosas (que no se encuentran directamente unidas a las células) y que sirven para adherirse a las células del hospedero y a otras bacterias. Las moléculas adhesivas de matriz reconocedoras de componentes de superficie microbianas (MSCRAMM, por sus siglas en inglés: Microbial Surface-Component-Recognizing Adhesive Matrix Molecules) son una familia diversa de proteínas que median la adhesión a las superficies del hospedero (69). Bacterias como *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans* usan complejos sistemas de adhesión que incluyen el uso de polisacáridos, glicoproteínas de adhesión de superficie (ALS), proteínas de superficie específicas de hifas y proteínas parecidas a integrinas (73–75).

Las fimbrias y los pili también interactúan en el proceso de anclaje para diversas bacterias, como por ejemplo *Aeromonas* spp. (69). Las enterobacterias (*Escherichia*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Shigella*) usan fimbrias de tipo I, de unión a manosa, que miden 0.21µm de longitud y 7nm de ancho (76). Tanto los pili como las fimbrias se unen a glicoproteínas. Algunas cepas de *E.coli* poseen estructuras fímbricas denominadas antígenos del factor de colonización (CFA) para la fijación específica a la mucosa de intestino delgado (76).

Formación de biofilms

Los biofilms son agregados densos de microorganismos embebidos en una matriz de exopolisacáridos. Los microbios en biofilms manifiestan diferentes expresiones genéticas comparado con los microorganismos suspendidos en soluciones, lo que se traduce en diferencias en las propiedades y capacidades biosintéticas de la superficie de la célula. La formación de biofilms se encuentra relacionada con otros procesos como el *quorum sensing*, la señalización y adhesión (69).

Motilidad

La motilidad es manifestada por alrededor del 80% de las bacterias y es clave para la adaptación de los microorganismos a los nuevos ambientes (77). Las bacterias se pueden mover en su ambiente usando flagelos o de manera intracelular a través de la actina del hospedero (78). Los flagelos también se encuentran involucrados en otras funciones de acoplamiento, formación de biofilms, colonización de tejidos y exportación de sustancias asociadas con virulencia (77). Los flagelos inducen frecuentemente respuestas inmunes robustas que en ocasiones contribuyen a la capacidad de virulencia facilitando la capacidad de invasión, como es el caso de *Legionella pneumophila* y *Yersinia enterocolica*. La habilidad de movimiento es dependiente de múltiples genes bajo un complejo control regulatorio, de manera que las mutaciones en estos sitios frecuentemente resultan en atenuación de la virulencia (69).

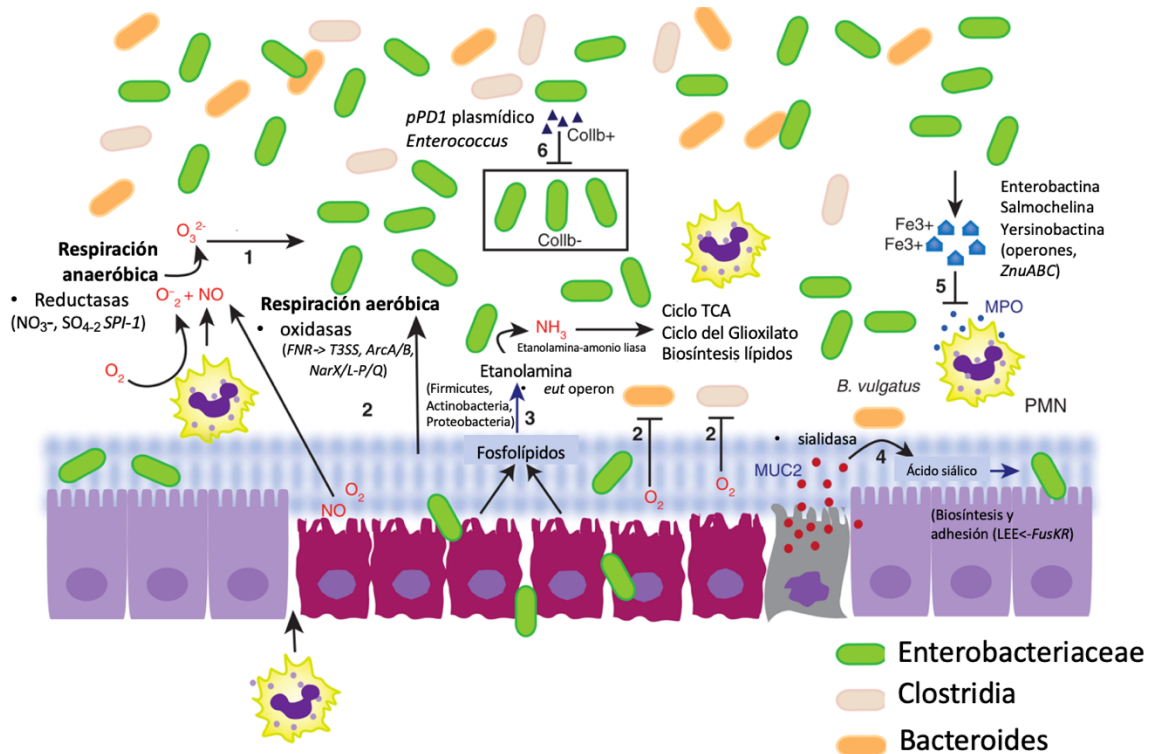


Figura 10. Mecanismos de expansión de patobiontes en el intestino derivados de la inflamación.

1) Expresión de reductasas de nitrato (NO_3^-) o sulfato (SO_4^{2-}) para efectuar respiración anaeróbica a través de las especies reactivas de oxígeno y nitrato producidas durante la inflamación (SPI-1: Isla de Patogenicidad de Salmonella 1); **2)** genes que regulan la flexibilidad respiratoria (oxidasas) y así permiten el crecimiento de Enterobacteriaceae mientras se inhibe el crecimiento de anaerobios estrictos durante el incremento de los niveles de oxígeno en el intestino inflamado. Reguladores: FNR (que activa T3SS), ArcA/B, NarX/L, NarP/Q; **3)** expresión de etanolamin-amonio liasa (eut operon) permitiendo el uso de etanolamina, derivada de células epiteliales dañadas, como fuente de carbono y nitrógeno (Firmicutes, Actinobacteria y Proteobacteria); **4)** expresión de sialidasa resultando en la liberación del ácido siálico de la mucina (glicoproteína 2 (MUC2), aumentada en la inflamación, para biosíntesis de la cápsula bacteriana, lipooligosacáridos (*Bacteroides vulgatus* and Enterobacteriaceae) y adhesión (LEE activado mediante el sistema FusKR) (Mucispirillum, Akkermansia); **5)** la expresión de sideróforos (enterobactina, salmochelina, yersinobactina) que secuestran Fe (operones) y ZnuABC (transportador de zinc) para el zinc y el manganeso (*Salmonella*, *Campylobacter*), PMN: polimorfonucleares; **6)** expresión de genes que codifican defensinas como colicina Ib en Enterobacteriaceae, afectando la síntesis de la pared celular de otras bacterias. *Enterococcus faecalis* produce bacteriocinas a través de pPD1 plasmídico. (Modificado de (65))

Respiración anaeróbica

La respuesta inflamatoria del hospedero confiere electrones aceptores respiratorios que favorecen el crecimiento bacteriano por respiración anaerobia, como nitrato y sulfuro, así como la flexibilidad respiratoria (Figura 10) (65).

Ante las condiciones inflamatorias, los niveles de oxígeno luminal se elevan; mayoritariamente por el aumento del flujo sanguíneo y de hemoglobina (65). Esto produce

un ambiente inhóspito para las bacterias anaerobias comensales del intestino. La señalización de citocinas proinflamatorias del hospedero lleva a la activación de enzimas (Nox-1 y Duox2) generadoras de especies reactivas de oxígeno (ROS) en el epitelio intestinal. De manera concomitante, los neutrófilos transmigran al lumen para generar más ROS vía fagocítica NADPH oxidasa (65). Dadas las ROS que la respuesta inflamatoria induce, se promueve la producción de aceptores de electrones respiratorios que favorecen el crecimiento de bacterias anaeróbicas (65). Los niveles de nitrato en el intestino inflamado aumentan y forman peroxinitrato (ONOO⁻), un antimicrobiano potente que se convierte en nitrato (NO₃⁻). El ambiente del tejido rico en nitrato confiere una ventaja de crecimiento para las Enterobacterias a través de la respiración con nitrato (65). Un ejemplo de esto último es la infección por *Salmonella entérica* que promueve la generación de nitratos en el intestino inflamado. Además, la respiración de los neutrófilos lleva a la oxidación de tiosulfato de tetrionato (S₄O₆²⁻), que también usa *Salmonella* como aceptor de electrones promoviendo su crecimiento (65).

Más aún, las ROS y las especies reactivas de nitrógeno pueden oxidar sulfidas orgánicas (metionina, trimetilamina) para formar S-óxidos y N-óxidos, que también se pueden usar como aceptores de electrones para la respiración anaeróbica (65). *E.coli* puede recurrir a la respiración anaeróbica usando nitrato, nitrito, TMAO (N-óxido de trimetilamina), DMSO (dimetil sulfóxido) y fumarato como aceptores de electrones (65).

Respiración aeróbica

La colonización exitosa de las Enterobacterias se atribuye a su flexibilidad respiratoria (65). El aumento del flujo sanguíneo y de hemoglobina en el ambiente luminal del intestino inflamado parece resultar un microambiente aeróbico que favorece el crecimiento de anaerobios facultativos como las enterobacterias e inhibe el crecimiento de anaerobios obligados como especies de las clases Bacteroidia y Clostridia ((65). *E.coli* expresa oxidasas terminales reguladas a nivel transcripcional por reguladores que sensan los niveles de O₂ y NO₃⁻ (FNR, ArcA/B, NarX/L, NarP/Q) (65). La respiración oxidativa, aeróbica, es termodinámicamente más favorable que la fermentativa, anaeróbica (65). Cuando la producción de butirato por *Clostridia* se agota por tratamiento con estreptomycin, la oxigenación epitelial se eleva llevando a la expansión de *Salmonella* vía crecimiento aeróbico (65). Un umbral bajo de oxígeno en el tejido intestinal puede ser clave para la colonización estable de las Enterobacterias (Figura 10) (65).

Cambios nutricionales

Algunas propuestas sobre los mecanismos que confieren ventaja proliferativa en ambientes inflamatorios son los cambios en la nutrición de las bacterias, como es la habilidad por el uso de etanolamina y tetrionato (Figura 10) (79,80).

En el intestino inflamado, el daño colateral del epitelio de la mucosa debido a la respuesta inflamatoria y el incrementado recambio de las células epiteliales, promueven la elevación de fosfolípidos (fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina) derivados de la membrana celular epitelial (65). La etanolamina es una fuente de carbón y nitrógeno de Firmicutes, Actinobacterias y Proteobacterias, así como de especies patógenas como *Salmonella* y *Pseudomonas* (65). Su metabolismo incluye la producción de amonio y acetaldehído por una liasa dependiente de vitamina B12 (65). El amonio se usa como un suplemento celular de nitrógeno reducido y el acetaldehído se convierte en acetil-CoA, que, a su vez, es utilizado en numerosas vías metabólicas (ciclo del ácido tricarboxílico, ciclo del glioxilato, biosíntesis lipídica) (65).

Utilización de mucinas

La capa mucosa es la primera línea de defensa del hospedero. La colonización de las bacterias comensales se limita a la capa externa de la mucosa (65). La mucina secretora glicoprotéica (MUC2) y las mucinas unidas a la membrana epitelial bioactivas (MUC1, MUC3 y MUC17) son producidas por las células caliciformes del intestino y evitan la adhesión y permeabilidad bacteriana (Figura 10) (65).

Algunos azúcares derivados de mucinas (N-acetil-D-galactosamina, N-acetil-D-glucosamina, ácido siálico, L-fructosa y D-galactosa) pueden ser usados como nutrientes bacterianos (65). La producción incrementada y la secreción de mucinas es un sello de calidad de la inflamación causada por infección entérica (65). La expresión de MUC2 está regulada por el factor de transcripción NF- κ B (65).

El ácido siálico es utilizado por bacterias que carecen de vías biosintéticas *de novo* y lo incorporan a la cápsula bacteriana y a lipooligosacáridos (65). Los niveles elevados de ácido siálico contribuyen a la expansión de *S.typhimurium* y *C. difficile* (65).

Las bacterias degradadoras de mucina (*Mucispirillum schaedleri*, *Akkermansiamusiphila* y *B. acidifaciens*) proliferan durante la inflamación intestinal y median la liberación de azúcares menos complejos provenientes de mucinas (65). La

acumulación de estos azúcares promueve la depleción de especies del filo Bacteroidetes y la clase Clostridia; así como confiere ventajas de crecimiento para Enterobacterias y patógenos como *S. typhimurium* y *C. difficile* (65).

Adquisición de metales

El hierro es un nutriente vital para las células hospedadas y patógenas (65). La disponibilidad del hierro se encuentra limitada en los humanos mediante proteínas de unión de hierro como transferrina, lactoferrina y ferritina. En los vertebrados se secuestra intracelularmente mediante ferritina o por un hemo (como cofactor de la hemoglobina o mioglobina) (65). El hierro es insoluble en el pH extracelular neutral, de manera que el hierro libre es limitado a una baja concentración (10^{-24} M) (65). Existen distintos mecanismos mediante los cuales las bacterias adquieren hierro de los tejidos humanos; algunas bacterias producen y liberan moléculas quelantes de hierro (sideróforos), con alta afinidad por Fe^{3+} (65). También existen proteínas receptoras en la superficie de las bacterias que se unen a transferrina, lactoferrina, ferritina, hemoglobina, transportadores de hierro ferroso y a complejos de grupos hemo o haptoglobinas (69). Las enterobacterias están equipadas por sideróforos tipo catecolato e hidroxamato (Figura 10) (65).

En el intestino inflamado, proteínas antimicrobianas limitan la disponibilidad de hierro (65). La lipocalina-2 se produce en las células epiteliales de la mucosa y en los neutrófilos infiltrantes (65). Por otro lado, se ha demostrado que la enterobactina, un sideróforo catecolato liberado por *E. coli*, inhibe la actividad de la enzima mieloperoxidasa bacteriocida del neutrófilo (65). Así mismo, se ha encontrado sobreexpresión de genes que codifican sideróforos para adquisición de hierro (yersiniabactina, operón *chu*) en bacterias más virulentas (65). La expresión de sideróforos esta transcripcionalmente regulada por el nivel de hierro en las células bacterianas y por represores moleculares como Fur (ferric uptake regulation).

El zinc es un elemento esencial para el crecimiento, sin embargo, es de importancia recalcar que poco zinc no promueve crecimiento y en exceso resulta tóxico (65). La calprotectina es un heterodímero compuesto por S100A8 y S100A, y es una proteína antimicrobiana quelante de zinc o manganeso y se regula mediante IL-17 e IL-22 en respuesta a la infección (65). De manera que la calprotectina es un marcador de inflamación (65). Los neutrófilos muertos liberan grandes cantidades de calprotectina (65). *Salmonella* supera la acción de la calprotectina mediante la expresión del transportador

de alta afinidad al zinc (ZnuABC), de una manera muy similar a la que ejecuta *Campylobacter jejuni* (65).

Sistemas de dos componentes y *quorum sensing*

Los microorganismos censan el ambiente y responden a los estímulos mediante la iniciación de señalización. El *quorum sensing* es el mecanismo de comunicación célula-célula por el que las bacterias sensan la densidad poblacional a través de la producción de moléculas. La regulación tiene tres fases, producción de moléculas de señalización, la acumulación de las moléculas de señalización como función de la densidad bacteriana y la respuesta por las bacterias una vez que el umbral de concentración se alcanza. Las respuestas de las bacterias al quorum sensing tienen cambios regulatorios globales en la fisiología microbiana y afecta la virulencia a través de la regulación de la formación del biofilm, producción de toxinas, regulación de la apoptosis (69).

Las bacterias tienen distintos sistemas de dos componentes con el que señalizan a través de la transferencia de grupos fosforil de una estructura de fosfohistidina en el componente cinasa del sensor a un aspartato en el regulador de respuesta. Distintos sistemas de dos componentes se han asociado a la virulencia como la regulación de la expresión del filamento de hemaglutinina, fimbrias, toxinas y las proteínas del sistema de secreción tipo tres de *Bordetella pertussis* (81).

Sistemas de inducción de inflamación y transferencia horizontal de genes

Los sistemas de secreción bacteriano exportan proteínas efectoras que son esenciales para la virulencia. Existen por lo menos cuatro tipos de sistemas de secreción, tipo I-IV. El sistema de secreción tipo I es un sistema mediado por proteínas que se usa en el transporte de ciertas toxinas y flujo de drogas. El sistema tipo II, conocido como sistema de secreción general, es ampliamente distribuido en las bacterias y es responsable por el transporte de toxinas y enzimas. Este sistema de secreción se compone de múltiples subunidades proteicas que se ensamblan en el espacio peri plasmático y funciona como transportador de proteínas al espacio extracelular (69,82,83). Distintas bacterias Gram negativas usan sistemas de secreción tipo III, que consiste en una estructura tipo jeringa para inyectar proteínas efectoras directamente a la célula hospedera. *Salmonella* usa dos sistemas de secreción tipo III (T3SSs) y algunos efectores codificados dentro de las islas de patogenicidad 1 y 2 (SPI-1 y SPI-2) para inducir inflamación en el hospedero (84).

Estos mismos sistemas de secreción, T3SS, son usados por *Escherichia coli* enterohemorrágica junto con otros efectores codificados en el locus de borramiento enterocítico (LEE) para adherirse y ocasionar lesiones de borramiento y adherencia (84). Especies de *Enterococcus* usan señales autoinducidas (AI-2) como señal para inducir expresión de genes de virulencia e iniciar la formación de biofilm para diseminarse (84). El sistema de secreción tipo IV constituye otro sistema de transporte de proteínas relacionado evolutivamente al sistema de conjugación bacteriana (85).

La transferencia horizontal de genes mediante el cual se adquieren factores de virulencia y se incrementa la adecuación biológica, se facilita en ambientes disbióticos (65). Los genomas de las Enterobacterias, en general, contienen una gran proporción de DNA adquirido horizontalmente (+/- 20% en *E.coli*) (65). Es entonces posible que la inflamación inducida por disbiosis promueva la transferencia horizontal de genes dadas las altas densidades de bacterias patógenas y la creación de patobiontes (65,68).

Producción de antimicrobianos impulsada por inflamación

Los antimicrobianos producidos por bacterias se conocen como bacteriocinas; los antimicrobianos producidos específicamente por Enterobacterias se han nombrado colicina. Estos antimicrobianos eliminan a bacterias filogenéticamente cercanas mediante la formación de un poro en la membrana, actividad de nucleasa o mediante la disrupción sintética de la pared celular (65). Un ejemplo de esto es la producción de colicina Ib (Collb) por el género *Salmonella* que le confiere ventaja de crecimiento sobre *E.coli* (65).

El ambiente inflamatorio crea condiciones únicas que potencian el efecto de las colicinas, como es la respuesta SOS por daño al DNA por estrés oxidativo (65).

El uso de bacteriocinas, péptidos sintetizados activos contra otras bacterias, se encuentra particularmente aumentado en los Firmicutes, uno de los Filos más aumentado en el fenotipo con sobrepeso y obesidad (84).

Exotoxinas

Las toxinas son reconocidas como factores de virulencia por interferir en la homeostasis celular del hospedero. Las toxinas de *Bacillus anthracis*, factor de edema y letal, son enzimas que inactivan las ciclasas de adenilato dependientes de calmodulina y calcio y la proteína cinasa activada por mitógeno, respectivamente, interfiriendo en las funciones de los macrófagos (86). Las exotoxinas, en general, son necesarias para causar

enfermedad sin embargo, no son requeridas para la viabilidad de la célula microbiana. Los genes que codifican estas toxinas se encuentran en fagos, plásmidos o islas de patogenicidad, cuya remoción abroga la capacidad de virulencia.

Las toxinas de *Clostridium diphtheriae* y *C. tetani* han sido desnaturalizadas para producir toxoides que inducen respuestas inmunes de protección al neutralizar las toxinas y prevenir la enfermedad (69).

Modulinas

Las modulinas engloban un grupo de compuestos microbianos que dañan al hospedero a través de la inducción de respuestas inflamatorias. Estos compuestos suelen ser componentes de las paredes celulares de las bacterias. Los lipopolisacáridos (LPS, por sus siglas en inglés) ocasionan daño al hospedero a través de su interacción con los receptores Toll-like (TLR) dando pie a la cascada inflamatoria (69). Los LPS son complejos moleculares de lípidos y polisacáridos con funciones de endotoxinas (87). Estos complejos moleculares se dividen en tres regiones: las cadenas O-específicas (residuos de oligosacáridos repetidos), el centro de polisacáridos, y el lípido A (usualmente disacárido de glucosamina con ácidos grasos de cadena larga y fosfato) (Figura 11). El polisacárido es la porción de diversidad antigénica y el lípido A es el que confiere toxicidad, incluida (87).

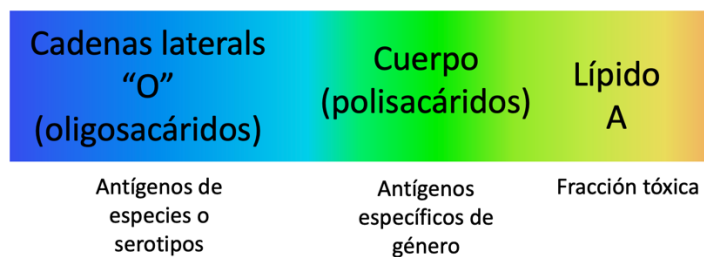


Figura 11. Estructura básica de un lipopolisacárido (endotoxina) de una bacteria Gram-negativa. (Modificado de (87))

Adicionalmente, hay toxinas y adhesinas que también generan respuestas de citocinas generando daño al hospedero que también se consideran modulinas (88).

Cápsulas

Muchas bacterias patógenas, como *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* y *Haemophilus influenzae*, poseen cápsulas de polisacáridos. La función principal de la cápsula es proteger al microorganismo ante los mecanismos inmunes del hospedero ya que suelen ser levemente inmunogénicas y antifagocíticas, así como también puede tener función de adhesinas (69). A parte de las cápsulas de polisacáridos también existen cápsulas de aminoácidos reticulados.

Pigmentos

La producción de pigmentos, especialmente los pigmentos similares a la melanina, han sido asociados con la virulencia de distintos microbios. La melanina protege a los organismos ante distintos mecanismos de defensa del hospedero como el flujo de radicales libres, las defensinas y la fagocitosis. Otros pigmentos asociados a la virulencia incluyen la pyocyanina y el pigmento malarial (89,90).

Evasión del complemento

El sistema de complemento es central para el sistema inmune innato y para defender al hospedero de los microorganismos. Las proteínas del complemento median la opsonización, promueven la fagocitosis y la producción de mediadores inflamatorios. Algunos microorganismos expresan determinantes como la resistencia en suero de las bacterias Gram-negativas, la inhibición de la opsonofagocitosis y la quimiotaxis leucocitaria, que les permiten evadir los efectos deletéreos de la activación del complemento en el hospedero (69). Uno de los mecanismos más importantes de la resistencia en suero involucra la habilidad de las cadenas de O-polisacáridos (LOS), de los lipopolisacáridos de las bacterias Gram negativas, para unirse con los componentes del complemento evitando la unión con la membrana e inhibiendo la lisis celular mediada por el complemento (69,91). Algunos ejemplos de componentes bacterianos que afectan la activación y regulación del complemento incluyen los residuos de ácido siálico que promueven la activación del factor H que inactiva a C3b, la proteína C de superficie (PspC) que se une al factor H, la proteína de superficie A (PspA) que inhibe la activación de la vía alternativa del complemento, y la proteína M que se une a C4 bp -un factor que acelera la degradación del factor (69,92,93). Como una estrategia de virulencia, la inhibición del complemento altera la interacción hospedero-microbio de manera que el

potencial de daño por la respuesta inflamatoria del hospedero se reduce dando lugar a la invasión y resistencia de los microbios.

Sobrevivencia intracelular

Algunos microorganismos patogénicos tienen la capacidad de sobrevivir dentro de células fagocíticas, inclusive hay bacterias que son patógenos intracelulares obligados. Los mecanismos para sobrevivir intracelularmente funcionan evitando los mecanismos de formación, maduración y acidificación de los fagosomas (69).

Mecanismos pro-apoptóticos

Los efectos de los mecanismos pro-apoptóticos en la interacción hospedero-microbio es compleja y no se ha dilucidado por completo. La apoptosis de neutrófilos mediada por exotoxinas se ha asociado con la persistencia de infección por *Pseudomonas* para evadir la acción de los neutrófilos. La inhibición microbiana de la apoptosis tiene el potencial de aumentar la virulencia a través de la regulación de la respuesta inflamatoria (69). Los efectos pro-apotóticos han sido demostrados en toxinas como la alfa de *S. aureus*, la listolisina O de *L. monocytogenes*, la hemolisina alfa de *E. coli*, la toxina de la difteria, la exotoxina A de *P. aeruginosa*, las toxina parecida a shiga, las exotoxinas de *B. pertussis* y *H. pylori* y las proteínas producidas por los sistemas de secreción tipo 3 (69).

En el contexto de la inflamación de bajo grado, característica de la obesidad, los grupos patogénicos podrían estar perpetuando las características microambientales de su nicho sin ser eliminados por mantener un umbral de daño que no promueve eficazmente la respuesta inmune.

Antecedentes

Se ha demostrado que la obesidad está asociada a la disbiosis de la microbiota intestinal, a la dieta y a la inflamación. A través del estudio de Estrada VBI, Burguete AI. *et al.* publicado en la revista de *Nutrición Hospitalaria* (2015) se demostró que la dieta alta en grasas y carbohidratos se asocia significativamente con una abundancia relativa mayor de Firmicutes y una menor de Bacteroidetes, y esto en conjunto aumenta el riesgo relativo de desarrollar obesidad (94). También, se ha descrito por Lagunas MA, Burguete AI. *et al.* que existe una asociación entre el aumento de citocinas inflamatorias (TNF- α) en niños obesos y la elevada abundancia relativa de Firmicutes publicado en la revista de *Salud Pública de México* (2018) (95).

Por otro lado, existen múltiples estudios que analizan y comprueban la existencia de factores de patogenicidad asociados a la inflamación. Ejemplos de ello son el del Dr. Winter SE. *et al.* publicado en la revista *Nature* (2010) y el del Dr. Stecher B. *et al.* publicado en la revista *Proc Natl Acad Sci* (2012). La combinación de la calidad y contenido de la dieta junto con el patrón de disbiosis en el microbioma intestinal resulta en la activación metabólica de distintas vías y la producción de compuestos bioactivos que juegan un papel importante en el mantenimiento de estos patrones aberrantes (96–98). El equipo de Guojun Wu, 2016, demostró que existe asociación entre las características del cuerpo genético bacteriano y la dieta mediante un estudio longitudinal del resistoma a través de su estudio publicado en la revista *Nature* (2016) (60).

De manera interesante, la diversidad, abundancia y cantidad de genes asociados a virulencia puede ser parte de una batería de marcadores relacionados con el grado de disbiosis, inflamación, acumulación de macronutrientes, obesidad y síndrome metabólico. Por ende, en este trabajo se buscaron las diferencias en los patrones de la dieta, las diferencias taxonómicas y funcionales en el microbioma, y las diferencias en la diversidad de los factores de virulencia y su asociación con el índice de masa corporal, los parámetros antropométricos y metabólicos.

Justificación

El sobrepeso y la obesidad son de los principales problemas de salud pública a nivel mundial. Se ha demostrado que la microbiota intestinal juega un papel en el control del peso corporal, la homeostasis de energía y de la inflamación. Así mismo, también se ha demostrado que la dieta moldea la composición de los microorganismos intestinales y que existe una asociación entre la patogenicidad de las bacterias y la inflamación. De manera que este trabajo pretende evaluar la prevalencia de los factores de virulencia en la microbiota intestinal y su asociación con el sobrepeso/obesidad, así como con el perfil dietario. Esta tesis aportará evidencia científica para el desarrollo de potenciales métodos para su posible utilización como objetivo de terapia y restablecer la homeostasis de la microbiota intestinal, así como para generar información que apoye a los tomadores de decisiones en la generación de políticas públicas en contra de la obesidad infantil.

Pregunta de Investigación

¿La prevalencia de los factores de virulencia en la microbiota intestinal se asocian al grado de adiposidad y perfil de dieta?

Hipótesis

La prevalencia de los factores de virulencia presentes en la microbiota intestinal están asociados al tipo de dieta y grado de adiposidad.

Objetivos

Objetivo General

Evaluar si la prevalencia y abundancia de los factores de virulencia presentes en la microbiota intestinal se asocian al tipo de dieta y grado de adiposidad.

Objetivos Particulares

1. Determinar el grado de adiposidad en la población de estudio.
2. Determinar los perfiles de dieta en la población de estudio.
3. Caracterizar la diversidad taxonómica y capacidad funcional de la microbiota intestinal en la población de estudio.
4. Identificar elementos genéticos de patogenicidad presentes (factores de virulencia) en la microbiota intestinal.
5. Evaluar la asociación de los factores de virulencia con perfil de dieta y grado de adiposidad.

Capítulo 2: Metodología General

Estudio

Tipo de estudio: transversal

Población: Población infantil escolar (de 6 a 12 años de edad).

Tamaño de muestra: El tamaño de la muestra se definió a partir de la prevalencia de sobrepeso y obesidad en escolares de 5 a 11 años de edad (33.2%) según ENSANUT 2018-2019 (13) usando la siguiente fórmula:

$$N = \frac{Z\alpha^2 p(1-p)}{I^2}$$

Donde $Z\alpha^2$ ($Z\alpha = 0.05$) es igual a 1.96 e I^2 es igual a 0.035. Sustituyendo en la fórmula para sobrepeso/obesidad:

$$N = \frac{(1.96)^2 0.332(1-0.332)}{0.035^2}$$

De tal manera que se necesitan 46 niños para evaluar la presencia de sobrepeso/obesidad.

El ajuste por pérdidas para sobrepeso/obesidad ($R=15\%$) se realizó con la fórmula:

$$Na = N [1/(1-R)]$$

Siendo Na el número ajustado por pérdidas, N el número calculado (46 sujetos para evaluar la presencia de sobrepeso/obesidad), el número de sujetos propuesto a evaluar es de hasta 54 niños.

Criterios de selección

Criterios de inclusión:

- Los padres del menor aceptaron la participación de su hijo en el estudio y firmaron el consentimiento informado.
- El menor asintió participar en el estudio.
- Niños de entre 6 y 12 años de edad residentes de la Ciudad de México.

Criterios de exclusión:

- Parentesco (1 por familia).

- Exposición a antibióticos en los últimos 3 meses.
- Diagnóstico de enfermedad crónica no transmisible, enfermedad autoinmune o alergias, enfermedad congénita y síndromes genéticos.
- Usuario recurrente de analgésicos, antiinflamatorios, inmunomoduladores o esteroides.
- Enfermedades infecciosas al momento de la toma de muestra, diarrea en los últimos 3 meses.

Criterios de eliminación:

- Retiro del consentimiento informado.
- Datos incompletos.
- Secuenciación y anotación deficiente

Métodos

1. Reclutamiento de los sujetos

Se obtuvieron 48 folios de identificación, datos clínicos y muestras biológicas al azar del banco biológico compuesto por 2117 muestras de niños de entre 6 y 12 años reclutadas como parte del proyecto de “Evaluación de la Interacción entre el consumo de macronutrientes y el perfil de la microbiota del colon distal y su asociación con obesidad infantil” llevado a cabo del 2011 al 2013.

Se cuentan con los datos de la historia clínica, del cuestionario de consumo de frecuencia de alimentos y medidas antropométricas con los que clasificaron de acuerdo con su grado de adiposidad usando el valor de Índice de Masa Corporal. Así mismo se obtuvieron 200 mg de materia fecal y muestras séricas por cada participante. Las muestras fecales se almacenaron a -80°C para su posterior procesamiento y extracción de DNA total. La secuenciación del DNA total se realizó mediante la técnica masiva tipo *shotgun* usando la tecnología HiSeq de *Illumina*.

El proyecto se presentó a las autoridades de las unidades deportivas del IMSS Cuauhtémoc, Morelos, Independencia y Nezahualcóyotl en donde se reclutaron a los participantes (Figura 12). Se reclutaron a los individuos que cumplían con los criterios

de selección, se explicó el proyecto y aplicó la carta de consentimiento y asentimiento informado.

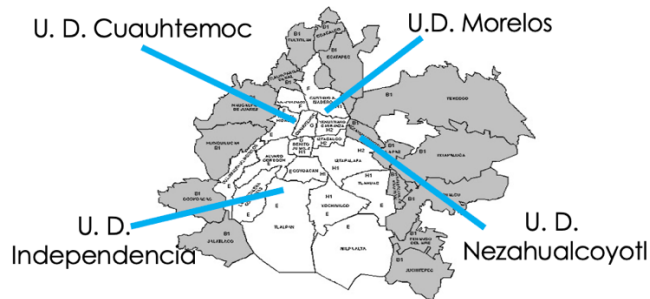


Figura 12. Ubicación de las unidades deportivas (U.D.) del IMSS donde se reclutaron los participantes.

2. Perfil de dieta

Los perfiles dietarios de los sujetos se evaluaron mediante un cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos (CFCA o CFCA por sus siglas en inglés). El CFCA es un método semi-cuantitativo, validado, que provee de información sobre la alimentación habitual de nuestra población de estudio. Se conforma por 11 secciones o grupos de alimentos incluyendo productos lácteos, frutas, verduras, leguminosas, huevos/carnes/embutidos, platillos típicos, cereales, bebidas, golosinas/postres, grasas y suplementos (Figura 13). En total son 107 preguntas con 10 opciones como respuesta que van desde nunca a 6 o más veces al día (cuestionario anexo como suplemento 1).



Figura 13. Cada una de las 11 secciones o grupos de alimentos que conforman el CFCA.

A continuación se definieron los patrones dietarios a través del método del análisis de factores (Figura 14) (99). Usamos el análisis de componentes principales (PCA, por sus siglas en inglés) para definir las variables observadas haciendo uso de técnicas estadísticas multivariadas para identificar dimensiones, factores o patrones basales y comunes en el universo de la información del consumo de alimentos obtenido del CFCA. Los alimentos o grupos de alimentos se analizan de acuerdo con su grado de correlación y se forman puntajes que resumen los patrones para cada individuo (100). Para el análisis dietario, de acuerdo con la frecuencia que se reportó, se hizo el cálculo del promedio de consumo de alimentos al día. El promedio obtenido se multiplicó por los gramos que contiene cada porción de alimento (Encuesta Nacional de Nutrición y Salud (Base de datos de alimentos ENSANUT 2012), para de esta manera obtener la cantidad de gramos de alimento que se consume al día por cada participante. Se definieron 27 grupos de alimentos con base a sus características composicionales y se calculó la cantidad de gramos de consumo de cada grupo de alimentos por cada participante. Posteriormente se calculó el total de gramos consumidos en todos los grupos y se obtuvo el porcentaje de cada grupo por cada participante. Los porcentajes de cada alimento se transformaron a puntajes z para estimar la variación con respecto a la media. Después de comprobar que las variables cuantitativas obtenidas estaban correlacionadas, los patrones dietarios se caracterizaron a través de un análisis factorial de componentes principales (PCA) usando rotación ortogonal (varimax para factores independientes). Los componentes principales son la estructura base de los datos y marcan la dirección donde la varianza es mayor a través de una transformación lineal. Cada componente principal adiciona un porcentaje de la varianza total de la base de datos. Se extrajeron 2 componentes (eigenvalor de 2.672128) para representar los datos ya que fue el número en el que las variables contaban con cargas coherentes, es decir valores altos en un factor y bajo en el otro. Usando 2 componentes que explican el 23.57% de la varianza total, se hizo un análisis para obtener las cargas que indican el peso de cada variable en cada factor. Para interpretar cada uno de los dos factores se seleccionaron las variables con cargas iguales o mayores a 0.4 e iguales o menores de -0.4. Finalmente se calculó el puntaje de cada uno de los factores para cada participante, de manera que todos los sujetos del estudio contaban con un valor para cada uno de los patrones dietarios. Los puntajes más altos indican más apego a determinado factor o patrón dietario (Figura 14).

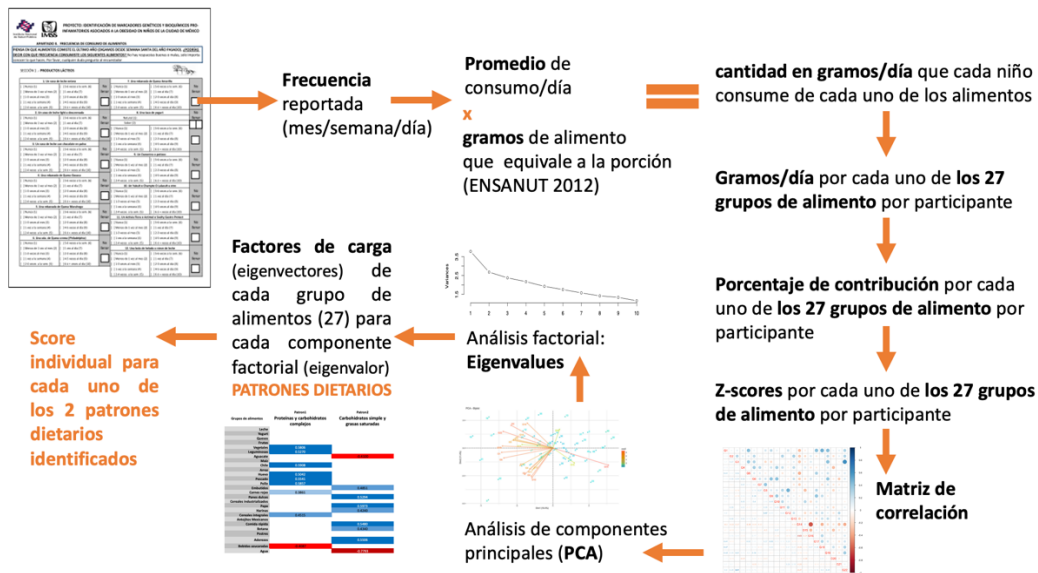


Figura 14. Diagrama de trabajo en la identificación de patrones dietarios.

El cálculo de consumo diario de nutrientes por participante se obtuvo previamente mediante un programa diseñado especialmente para ello, Microsoft Visual FoxPro. En seguida, se multiplican los gramos de consumo de alimentos por la información del contenido de nutrientes de la tabla de composición de alimentos (cantidad de gramos de nutriente por 100 gramos de alimento) del software FoodProcesor, el cual contiene información nutricional de alimentos típicos mexicanos y permite agregar recetas para obtener su contenido nutricional. A la par, con el programa Microsoft Visual FoxPro se obtuvo el porcentaje de energía que aporta cada alimento al consumo total de energía.

3. Evaluación del grado de adiposidad

Se realizaron mediciones antropométricas utilizando protocolos internacionalmente aceptados por la Organización Mundial de la Salud y la CDC (10). Las mediciones que se utilizarán para esta evaluación son el peso y talla para obtener el IMC. De acuerdo con el patrón de referencia de Krebs (2011) con base en la CDC los escolares se clasificaron de acuerdo con su grado de adiposidad usando el valor de IMC. Se utilizó la función *who2007* en el programa *RStudio* para calcular los puntajes z del IMC ajustado por edad y sexo en población infantil de entre 5 y 19 años (101). La clasificación es la siguiente:

Sobrepeso Infantil: Índice de masa corporal de acuerdo al percentil de edad entre el 85 – 95 (10).

Obesidad Infantil: Índice de masa corporal de acuerdo al percentil de edad igual o por encima de 95 (10).

Obesidad Grave Infantil: Índice de masa corporal de acuerdo al percentil de edad por encima de 99 (10).

4. Análisis de la microbiota: metagenómica

Para estudiar a las bacterias del intestino humano se pueden utilizar cultivos para posteriormente caracterizar las cepas aisladas, sin embargo, resulta prácticamente imposible hacerlo para cada especie. Existen métodos bioquímicos como la secuenciación en la que se determina el orden de los nucleótidos en una secuencia de DNA. Para este método se puede usar el gen 16S RNA ribosomal bacteriano, que contiene de manera general 9 regiones hipervariables mediante las cuales se identifican las distintas especies bacterianas. Estas regiones hipervariables están flanqueadas por secuencias de DNA conservadas lo que las hace amplificables mediante PCR (102). Por otro lado, existen métodos de secuenciación del genoma completo de la comunidad bacteriana mediante la metagenómica. Ésta incluye el uso de técnicas genómicas y bioinformáticas (103). La secuenciación masiva tipo *shotgun* se utiliza para estudiar la microbiota no cultivable, para lo que requiere la extracción de DNA y generación de genotecas. En este método, las genotecas se forman mediante DNA fragmentado en piezas cortas que son etiquetadas por muestra mediante distintas combinaciones de oligonucleótidos; éstas son secuenciadas de manera independiente y se alinean para dar información taxonómica y funcional (104) (Figura 15).

Esta parte de la metodología se financió a través del proyecto “Correlación de la diversidad genética de la microbiota intestinal dependiente de patrones de alimentación y la prevalencia de genes de resistencia antimicrobiana y elementos co-seleccionados en población infantil”.

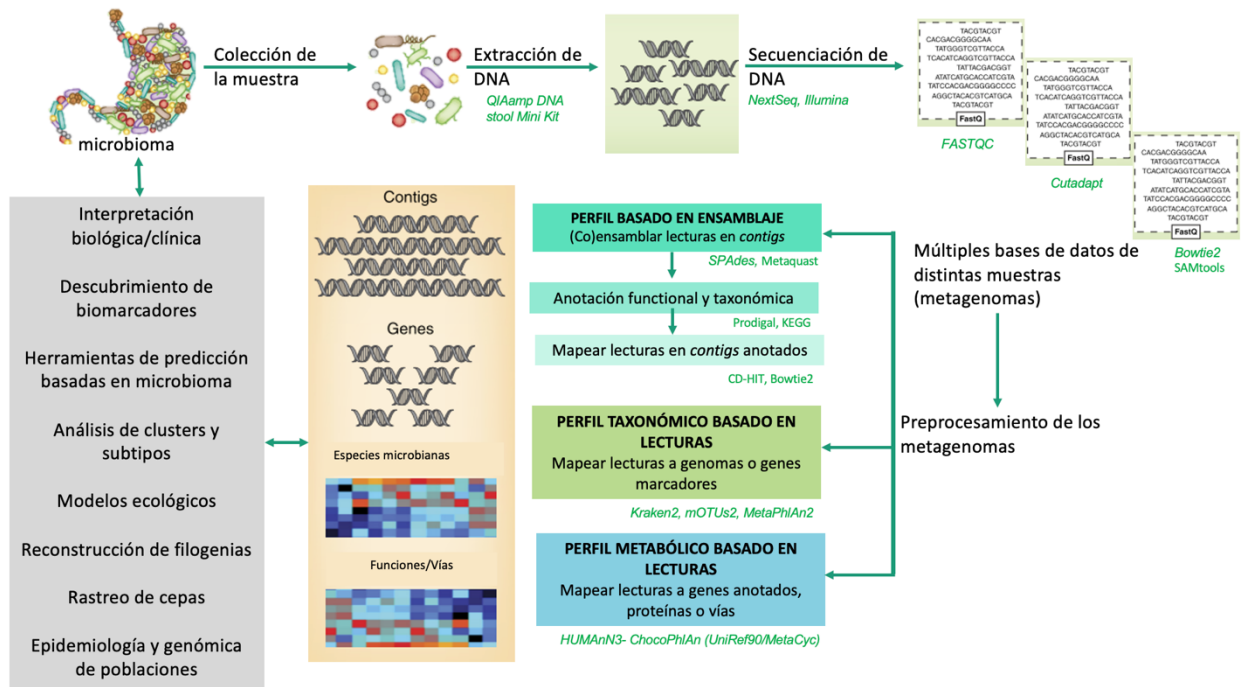


Figura 15. Diagrama de flujo de trabajo metagenómico. (Modificado de (105))

Se utilizaron 200 mg de materia fecal de cada participante. A continuación, se extrajo el DNA usando el *QIAamp DNA stool Mini Kit* (Cart.No. 51504). El procesamiento de las muestras se basa en la lisis celular a través del buffer ASL e incubación de la muestra entre 80 y 85°C, limpieza de partículas usando tabletas Inhibitex, catálisis peptídica a través de proteinasa K y buffer AL, y lavado con alcohol absoluto, purificación mediante el uso de columnas y buffers de lavado y recuperación del DNA con H₂O templada. Se corroboró la presencia de DNA a través de electroforesis en gel de agarosa al 1.5% (100 volts; transiluminador de UV *MultiDoc-It Digital Imaging System*). A continuación, se cuantificó y se evaluó la calidad del DNA extraído de cada muestra usando un *NanoDrop One* de *Thermo Scientific*. Se seleccionaron las muestras con una concentración mínima de 50 ng/μl y que cumplieran el criterio de pureza nucleotídica 260/280 igual o mayor a 1.8 y 260/230 igual o mayor a 2.0.

Para la técnica de secuenciación tipo *shotgun* de la marca *Illumina*, se prepararon en genotecas de entre 300 y 500 pares de bases que se amplifican mediante la formación de puentes. Las genotecas metagenómicas correspondientes a cada muestra se elaboraron a partir de 5 μl DNA con una concentración de 0.2ng/μl. Las cadenas de DNA se fragmentaron enzimáticamente a 300pb-600pb, cada uno de los 2 grupos de 24

muestras se complementaron con combinaciones únicas de índices *Nextera XT* y se recuperó el amplificado resultante mediante el uso de bandas magnéticas. Mediante electroforesis se evaluó la presencia de los fragmentos de DNA en geles de agarosa 2%. Se usaron dos controles de calidad para cada librería; se analizó el tamaño molecular de los fragmentos a través del *Bioanalyzer Agilent Technology* y se cuantificó la concentración de DNA mediante el uso del *Qubit Fluorometer* de *Invitrogen* (Figura 16).

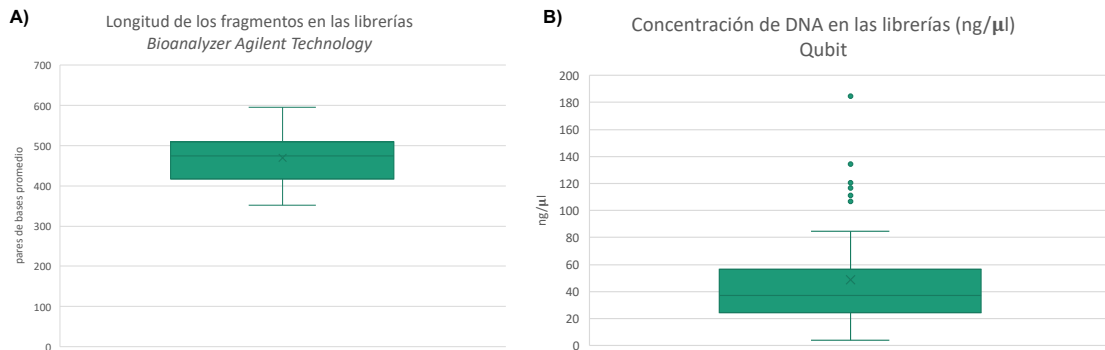


Figura 16. Distribución del tamaño y concentración de las genotecas analizadas. A) El tamaño molecular de los fragmentos de DNA se midieron a través del Bioanalyzer Agilent Technology. El 50% de los fragmentos tuvieron una longitud promedio de entre cerca de 400 y 500 pares de bases. B) La cuantificación de la concentración de DNA se realizó mediante el uso del Qubit Fluorometer de Invitrogen.

La secuenciación masiva tipo *shotgun* se realizó mediante el uso de la tecnología *NextSeq* de *Illumina*. Cada una de las 48 genotecas de DNA de material fecal se llevaron a una concentración de 10 nano Molar y, posteriormente a 4 nano Molar. Se formaron 2 diluciones con el objetivo de realizar 2 corridas de secuenciación, cada una con 24 genotecas con combinaciones únicas de índices *Nextera*, con concentración de 4,620 pico Molar y 5,856 pico Molar, respectivamente. De cada dilución se combinaron 5 μ l con 5 μ l de NaOH [0.2molar]. Esta mezcla se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente para asegurar la desnaturalización de las dobles hebras de DNA. La reacción se neutralizó con 5 μ l de buffer TRIS. A continuación, se agregó 985 μ l de buffer de hibridación, se mezcló y se combinaron 495 μ l de este stock con 5 μ l de la librería del fago *PhiX*, que funge como control para el proceso de secuenciación. Finalmente, se tomaron 117 μ l del stock combinado y se mezclaron con 1,183 μ l del buffer de hibridación resultando en un volumen final de 1,300 μ l a una concentración de 1.8 molar que fue secuenciada. Este fue un tipo de secuenciación por síntesis *pair-end* mediante la cual se obtuvieron lecturas de 150 bases. Los secuenciadores *NextSeq* generan 400×10^6

lecturas pareadas a partir de los fragmentos, de manera que para este proyecto se generaron un total de 1,624,041,934 lecturas correspondientes a 243,606,290,100 nucleótidos. El flujo de trabajo de la secuenciación de *Illumina* conlleva cuatro fases: 1) la preparación de las muestras, 2) generación de *clusters*, 3) secuenciación y 4) análisis. Las plataformas de secuenciación de *Illumina* son las que menos proporción de error reportan (~0.1%).

5. Análisis de la microbiota: preprocesamiento bioinformático

Las secuencias se entregaron en ocho archivos por muestra, cuatro correspondientes a las lecturas sentido y cuatro correspondientes a las lecturas anti-sentido. Después de concatenados los archivos pertenecientes a un sentido dentro una muestra, se procedió a analizar la calidad de las lecturas. Se utilizó el programa, escrito en lenguaje JAVA, FASTQC (versión 0.11.8) (106).

Para el procesamiento de limpieza de adaptadores y de bases de mala calidad se utilizó el programa, escrito en Python, Cutadapt (versión 1.18) en modo pareado (107). Se removieron los adaptadores en los extremos 3' y 5', así como también se usaron los parámetros de calidad con un umbral de 20 puntuaciones de calidad y longitud mínima de 20 bases. El 99.6% de todos los pares de lecturas en las muestras resultaron del procesamiento de remoción de adaptadores, y pasaron el umbral de calidad y longitud mínima.

Las 1 618 036 578 lecturas de calidad fueron alineadas contra el genoma humano usando el programa Bowtie2 (versión 2.3.4.3) (108). Durante este proceso se eliminaron las lecturas pertenecientes al genoma del hospedero (Ensembl versión 95, GRCh38.dna.alt). El porcentaje de lecturas alineadas 1 o más veces al índice para *Homo sapiens* en las genotecas fue de entre 0.1% y 0.6%. Los mapas creados para las secuencias alineadas se transformaron a archivos binarios mediante el programa *SAMtools* (versión 1.9) (109). Posteriormente, se filtraron las secuencias pertenecientes al genoma humano y se separaron de las pertenecientes a los microorganismos a través de un script generado en *perl* (código anexado como suplemento 2). Las secuencias

microbianas de alta calidad se pueden encontrar en NCBI Short Read Archive (SRA) bajo el ID PRJNA721692.

Las lecturas pertenecientes a la microbiota intestinal de cada muestra se ensamblaron en *contigs* usando la opción `-meta` del programa *SPAdes* (versión 3.13.0) (110). Se usaron las longitudes de k-meros que sugieren los desarrolladores del programa (`-k 21, 33, 55, 77`). La calidad de los ensamblajes se evaluó a través de la herramienta *Quast* (versión 5.0.2 *Metaquast*) (111,112). Se eliminaron los *contigs* con longitudes menores a 500 bases.

6. Análisis de la microbiota: anotación taxonómica

Los diferentes métodos de anotación taxonómica tienden a dar resultados distintos (113). Inicialmente, analizamos el perfil taxonómico de nuestras secuencias microbianas de alta calidad y *contigs* usando el método de clasificador de k-meros con el ancestro común más bajo (LCA: lowest common ancestor) de todos los genomas conocidos que contienen ese k-mero a través del programa *Kraken 2* (114). Se aplicó el algoritmo Bayesiano de *Bracken* a los resultados de *Kraken 2* para estimar la abundancia de las secuencias a nivel de género y especie (resultados anexados como suplemento 3). *Kraken* y *MetaPhlan* son clasificadores con alta cobertura y especificidad taxonómica (115).

También usamos el método de anotación basado en genes marcadores de copia única (SCMG: single copy marker genes) a través del programa *mOTUs2* y del *pipeline* de *HUMAnN3* que, a su vez, usa el programa *MetaPhlAn2* (116,117). *mOTUs2* (versión 2.5.1) es una herramienta que usa exoma ubicuo en genes marcadores de copia única filogenéticos basados en unidades operacionales taxonómicas (OTUs) como aproximación para capturar y cuantificar los taxas microbianos a nivel resolutivo de especies en las muestras metagenómicas (117,118). Esta versión consolida más de 3,100 muestras metagenómicas en una base de datos que mejora sustancialmente la representación de especies asociadas a humanos. Por otro lado, el perfil taxonómico obtenido a través de *MetaPhlan* se basa en el uso de SCMG y la base de datos *ChocoPhlAn* que contiene genomas y clústeres de familias de genes derivados de UniProt/UniRef y NCBI anotados y organizados sistemáticamente (116). La base de datos de *ChocoPhlAn* (versión 3) se compone de un repositorio de 99,200 genomas microbianos anotados de alta calidad de referencia pertenecientes a 16,800 especies disponibles en el portal de Proteomas de UniProt (enero 2019) y 87,300,000 familias de

genes funcionalmente anotadas de UniRef90. Esta base de datos, inicialmente genera pangenomas anotadas a nivel de especies asociando cada especie microbiana con su secuencia genómica y el repertorio basado en UniRef. Los pangenomas se usan, a continuación, para hacer el perfil funcional y taxonómico. MetaPhlAn estima la abundancia relativa de los taxa en un metagenoma usando la cobertura de genes marcadores clado-específicos. Los genes marcadores son elegidos para que todas las cepas de un clado contengan los mismos genes y que paralelamente ningún otro clado contenga homólogos lo suficientemente cercanos para que sean incorrectamente mapeados. La versión 3 de MetaPhlAn contiene 13,500 especies con 1,100,000 genes marcadores seleccionados de los pangenomas de ChocoPhlAn 3.

MetaPhlAn, mOTUs y Bracken son herramientas de perfil taxonómico que de manera consistente han superado en rendimiento a otros métodos en múltiples evaluaciones (116,117,119–123).

6.1. Análisis de la microbiota: análisis de diversidad taxonómica

Para el análisis de los resultados de las anotaciones taxonómicas usamos scripts y paqueterías de R (código anexado como suplemento 4). Inicialmente, filtramos las *taxa* que no tuvieran más de 10 lecturas en por lo menos una muestra. Fijamos el umbral de abundancia relativa mínima en 0.001%.

Evaluamos la normalidad de la distribución de los datos a través de la prueba de Shapiro-Wilk. Usamos la paquetería de Phyloseq (versión 1.30.0) y Vegan (versión 2.5-6) para analizar las diversidades alfa y beta (124,125). Posteriormente, comparamos el resultado del grupo de peso normal contra el que presenta sobrepeso y obesidad usando las pruebas de Suma de Rangos de Wilcoxon (WRST) y T. La distancia entre los índices de diversidad beta de las muestras fue analizada a través de escalas no métricas multidimensionales (NMDS). Los valores de estrés resultantes del NMDS para la diversidad beta Jaccard y Bray Curtis fue menor a 0.2. La diversidad alfa describe la diversidad de una sola muestra. La riqueza describe el número de especies en un determinado ambiente y los índices de diversidad la consideran junto con la homogeneidad de la muestra. El índice de diversidad alfa de Shannon y de Dominancia de Simpson son de los más usados. Los valores altos del índice de Shannon y el inverso de Simpson indican mayor diversidad dentro de una muestra. Por otro lado, la diversidad beta describe qué tan diferente es una muestra con respecto a las demás a través de

distancias. Algunas métricas de la diversidad beta toman en cuenta la abundancia (Bray-Curtis), otras sólo presencia-ausencia (Jaccard) y filogenia (UniFrac).

Para obtener la lista acumulativa de taxas que contribuyen con más del 70% de la variación entre grupos usamos la función *simper* con 999 permutaciones de la paquetería Vegan en R (125). Usamos pruebas comparativas (WRST) para evaluar cada uno de los taxas resultantes del análisis de *simper*.

Ajustamos las distintas variables continuas como vectores en el análisis NMDS usando la función *envfit* de la paquetería Vegan (125).

Así mismo, usamos el tamaño de efecto del análisis de discriminación lineal (linear discriminant analysis (LDA) effect size (LEfSe Galaxy Version 1.0) para estudiar las diferencias entre los dos grupos, NW y OWOB. Los parámetros usados para este análisis se fijaron en un valor de p ($\alpha = 0.05$) y un puntaje (LDA score) de 2.0. LEfSe determina las características (abundancias de taxa, clados, genes y capacidad funcional) que con más probabilidad explican las diferencias entre clases usando análisis estadísticos, pruebas de consistencia biológica y efectos de relevancia o efectos de tamaño. De esta manera, este análisis encuentra organismos, genes o vías metabólicas que consistentemente explican las diferencias entre dos o más comunidades microbianas. El efecto de tamaño es un puntaje que refleja una estimación de la magnitud del fenómeno observado dada cada característica (126).

7. Análisis de la microbiota: anotación funcional

La predicción de genes codificantes de proteínas se realizó a través del algoritmo de programación dinámica para encontrar genes de procariontes (Prodigal, versión 2.6.3) en la opción meta y con terminaciones cerradas, a partir de los *contigs* filtrados (>500pb). Seguimos los pasos de ensamblaje y anotación de metagenomas elaborado y publicado en https://github.com/qijunz/DO_metagenomics/tree/master/pipeline. El resultado de la anotación se concatenó en un solo archivo de marcos abiertos de lectura (ORFs, por sus siglas en inglés) predichos y se compararon entre muestras para formar una biblioteca de genes no redundantes usando CD-HIT, -EST (versión 4.8.1) (127). El umbral de identidad de las secuencias se fijó en 95% con una longitud de 8 y la cobertura de alineamiento para la secuencia más corta se fijó en 90%. La biblioteca de genes no redundantes se usó para construir un índice de mapeo usando Bowtie2 (version 2.3.4.3) (108) para alinear

cada muestra y obtener el número de genes en cada librería. Por otro lado, los genes (ORFs) predichos se anotaron contra la base de datos KEGG. Para la anotación se usó Kofam y HMMER/HMMSEARCH contra la base de datos de procariontes KOs usando modelos ocultos de Markov (HMM) (128). La abundancia de genes se obtuvo a través de RSEM, los valores se normalizaron usando transcritos por millón (TMP) y se analizaron los resultados usando la prueba Qlf (quasi-likelihoodF-test) del programa edgeR (versión 3.28.1) para obtener la presencia diferencial de genes entre los grupos NW y OWOB (logarithmic fold change $-1 \geq$ y ≥ 1 , *p-value* y FDR < 0.05) (129,130). Realizamos un análisis de enriquecimiento usando la prueba de Fisher para la presencia de los genes con diferencias significativas entre los grupos fijando un *p-value* y FDR < 0.05.

HUMAnN3 perfila funcionalmente genes, vías y módulos de metagenomas usando las anotaciones de UniRef90 a través de los pangenomas de las especies de ChocoPhlAn. HUMAnN3 produce estimaciones altamente precisas de la abundancia de enzimas en los metagenomas ya que usa filtros de cobertura de bases de datos de secuencias para reducir falsos positivos (116). Así mismo, HUMAnN3 estratifica los perfiles comunitarios funcionales con base en la contribución por especies. De manera que, también se realizó el perfil taxonómico y funcional de las genotecas secuenciadas usando el programa HUMAnN3 (<https://github.com/sofiamurga/Microbiome-Taxa-FC-VF>).

HUMAnN3 un programa en Python, que requiere de la instalación de las dependencias de MetaPhlAn, Bowtie2 para realizar el mapeo de las secuencias a los pangenomas de las comunidades, DIAMOND para alinear secuencias no mapeadas a las bases de datos de proteínas y MinPath. HUMAnN3 mapea y anota la búsqueda de nucleótidos para obtener genes específicos de organismos y perfiles de abundancia de vías de un solo metagenoma. De base, las familias de genes se anotan usando las definiciones de UniRef90 y las vías a través de las definiciones de MetaCyc (131). En general, el algoritmo implementa una búsqueda por etapas en la que inicialmente se identifican las especies microbianas conocidas a través del uso de MetaPhlAn y se construye una base de datos específica para cada muestra que incluye los pangenomas funcionalmente anotados y preconstruidos de las especies identificadas. En la siguiente etapa se realiza un mapeo a nivel de nucleótidos de todas las secuencias en las muestras comparadas con el pangenoma por muestra, haciendo el alineamiento más específico. Finalmente, con las secuencias no alineadas se realiza una búsqueda en la base de datos de UniRef. La búsqueda por etapas genera mapas de las secuencias metagenómicas comparadas con

las secuencias genéticas con taxonomía conocida o ambigua. Estos mapas son ponderados por calidad y longitud de la secuencia para estimar la abundancia de genes por organismo y comunidad. Las familias de genes anotadas a enzimas metabólicas son analizadas para reconstruir y cuantificar vías metabólicas completas, usando MetaCyc, a nivel de organismo y comunidad (131).

La cobertura de vías detalla la riqueza (presencia/ausencia) de las vías de una comunidad. A las reacciones detectadas en la comunidad se les asigna un puntaje de confianza basado en si la abundancia es mayor o menor a la mediana de la abundancia. La abundancia de vías detalla las abundancias de las vías metabólicas, que es el resultado de las sumas de las abundancias de los genes que catalizan una reacción. La identificación parsimoniosa de vías que explican las reacciones observadas en una comunidad se realiza usando las definiciones de MetaCyc y MinPath. Las familias de genes detallan la abundancia de cada grupo de secuencias de proteínas evolutivamente relacionadas con funciones similares en la comunidad. La abundancia de la familia de genes se estratifica para mostrar las contribuciones de las especies como resultado de la transposición entre las bases de datos de MetaPhlAn y ChocoPhlAn. La abundancia de familia de genes se reporta como secuencias por kilobase (RPK) para normalizar por longitud del gen que refleja el número de copias del gen en la comunidad.

A través del análisis de tamaño de efecto LDA, caracterizamos las abundancias diferenciales entre las vías metabólicas de los niños clasificados con normopeso (NP) y sobrepeso o obesidad (SPOB).

8. Análisis de la prevalencia de elementos genéticos de patogenicidad

Para la identificación de los elementos genéticos de patogenicidad, se usó ABRicate (v1.0.1, <https://github.com/tseemann/abricate>), una herramienta bioinformática para buscar masivamente factores de virulencia en los ensamblajes metagenómicos de cada muestra a través de la base de datos de factores de virulencia (VFDB, <http://www.mgc.ac.cn/VFs/>, octubre, 2020). La patogenicidad bacteriana depende de la presencia de factores de virulencia y representa una amenaza a la salud pública (132). La base de datos de factores de virulencia (VFDB) es un recurso en línea que cuenta con repositorio curado, no redundante y actualizado de patógenos de importancia médica (132). La caracterización de los tipos patógenos emergentes, resultado de la potencial transferencia horizontal de genes de virulencia entre especies bacterianas es posible a

mayor resolución usando secuenciación de genoma completo (WGS, por sus siglas en inglés whole-genome sequencing) y bases de datos actualizadas como VFDB (133). Las secuencias microbianas se alinearon al repositorio de factores de virulencia ajustando por cobertura mínima (-mincov) del $\geq 75\%$ y de identidad (-minid) del $\geq 50\%$.

La riqueza y la diversidad entre las muestras de niños clasificados como NP y SPOB se analizó usando Phyloseq v1.30.0. El conteo de las secuencias se analizó para buscar abundancias diferenciales usando la paquetería de Bioconductor edgeR (48ersión 3.28.0) a través de los métodos lineales generalizados (glmFit y glmLRT) desarrollados por McCarthy et al (2012) (129). La normalización de las anotaciones, para comparar los cambios relativos entre las abundancias de los grupos, se realizó mediante la media de los valores M (trimmed mean of M -values (TMM)). Usamos modelos lineales generalizados binomiales negativos y estimaciones de dispersión a través del método de Cox-Reid para determinar la anotación diferencial (quasi-likelihoodF-test (Qlf)). Las diferencias entre abundancias se obtuvieron después de filtrar por *fold-change* 1 y -1, valor de P 0.05 y FDR (P -ajustada) de 0.05 (código anexado como suplemento 5).

9. Análisis de asociación

Se realizaron regresiones lineales de variables continuas usando el modelo linear general (función *glm* en R) ajustando por covariables o variables confusoras como son la edad, sexo, antecedentes familiares de obesidad y actividad física. Las variables de ajuste se identificaron cuando, de manera individual, modificaban el coeficiente de regresión más de un 10%.

El análisis de asociación entre los valores z de IMC y taxa se estratificaron por cada perfil de dieta por consumo bajo y alto.

Para identificar las características (taxa, funciones y factores de virulencia) de la microbiota asociadas con los datos antropométricos, metabólicos y las variables de dieta, analizamos la abundancia de cada característica usando el modelo lineal multivariado implementado por MaAsLin2, ajustando por las variables confusoras edad, sexo, actividad física y antecedentes familiares de sobrepeso y obesidad (código anexado como suplemento 6, suplemento 7 y suplemento 8) (134). Para estos análisis usamos los datos transformados de abundancia relativa y se implementaron modelos para bases de datos con alto número de ceros (zero-inflated) para obtener los datos corregidos de la

composición microbiana. Filtramos los resultados por abundancia relativa mínima de 0.01%. Usamos los parámetros establecidos de MaAsLin2 que incluye el modelo compuesto lineal de Poisson (CPLM). Este análisis toma en cuenta abundancias relativas distribuidas de manera continua con frecuentes ceros.

Capítulo 3. Resultados

1. Población infantil de estudio: parámetros antropométricos y metabólicos

La primera y la segunda parte del proyecto de tesis incluyó una sub-muestra de 46 y 45 participantes de entre 6 y 12 años cumplidos, respectivamente (Figura 17). De las 48 muestras secuenciadas originalmente y obtenidas al azar del banco biológico compuesto por 2117 muestras de niños entre 6 y 12 años, dos fallaron en ser anotadas correctamente en todos los análisis realizados en este trabajo (n=46) y una tercera librería no fue anotada a través del programa HUMAnN3 (n=45).

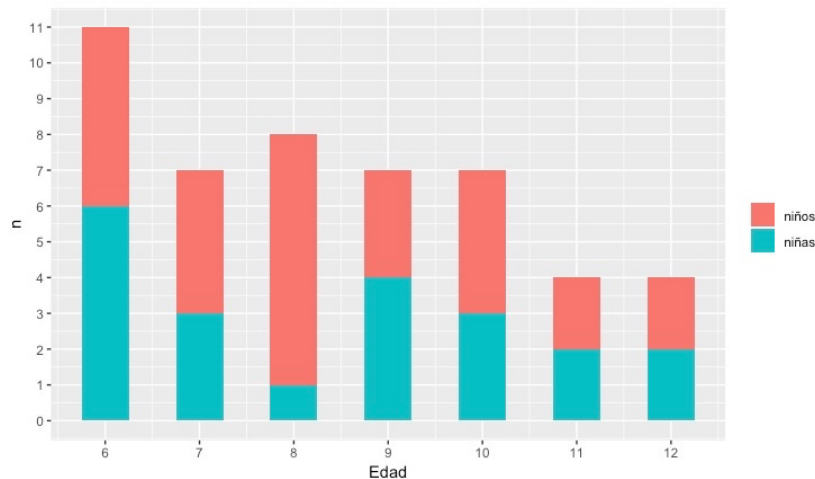


Figura 17. Histograma de frecuencia de la población infantil incluida en este estudio por edad y sexo (niños: color coral, niñas: color turquesa).

Se utilizó la función *who2007* en el programa RStudio para calcular los *puntajes z* del indicador antropométrico de Índice de Masa Corporal ajustado por edad y sexo en niños de entre 5 y 19 años (101). Se utilizaron las tablas de referencia de peso, talla e IMC ajustadas por edad de la misma paquetería en R. De las 21 niñas participantes, 12 se clasificaron con normopeso (NP) y 9 con sobrepeso/obesidad (SPOB) (Figura 18A). Mientras que, de los 27 niños, 15 resultaron con normopeso (NP) y 12 con sobrepeso/obesidad (SPOB) (Figura 18B).

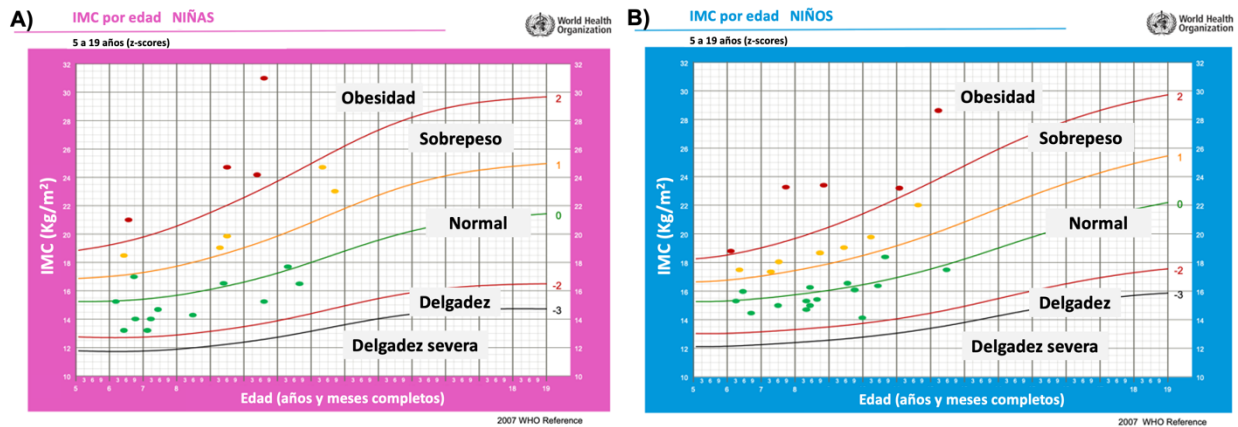


Figura 18. Gráficos de clasificación de IMC ajustado por edad y sexo. **A)** niñas y **B)** niños de entre 5 y 19 años. Los óvalos rojos representan a la población clasificada con obesidad, los amarillos con sobrepeso y los verdes con normopeso.

Las características generales de la población de estudio son mostradas en la Tabla 1. La edad promedio para el grupo de normopeso fue de 8 años y casi 9 para el grupo de SPOB. El peso ($p = 9.8 \times 10^{-6}$), la talla ($p = 0.02$) y el índice cintura-cadera (W:H) ($p = 0.0022$) fueron diferentes significativamente entre ambos grupos de IMC. Los niveles de glucosa, triglicéridos, colesterol, y tensión arterial no fueron diferentes estadísticamente entre ambos grupos, aunque en el grupo de SPOB fueron consistentemente más elevados.

Tabla 1. Características generales, por grupo de IMC, de la población infantil de la Ciudad de México.

		n=46		n=45	
Características		NP (n=26)	SPOB (n=20)	NP (n=26)	SPOB (n=19)
Sexo	Mujeres	12 (57%)	9 (43%)	12 (57%)	9 (43%)
	Hombres	15 (60%)	10 (40%)	14 (58%)	10 (42%)
Antecedentes heredofamiliares de SPOB		50%	70%	50%	68%
		Average (95% IC)		Average (95% IC)	
Edad (años cumplidos)		8.04 (7.35, 8.73)	8.9 (7.98, 9.82)	8.04 (7.35, 8.73)	9.05 (8.14, 9.97)
Peso (kg)****		25.47 (22.66, 28.27)	40.91 (35.34, 46.49)	25.47 (22.66, 28.27)	41.77 (36.17, 47.37)
Talla (m)*		1.28 (1.23, 1.33)	1.35 (1.3, 1.41)	1.28 (1.23, 1.33)	1.36 (1.31, 1.42)
W:H**		0.82 (0.81, 0.84)	0.86 (0.85, 0.88)	0.82 (0.81, 0.84)	0.86 (0.84, 0.88)

Glucosa (mg/dl)		81.15 (76.46, 85.84)	81.85 (78.14, 85.56)	81.15 (76.46, 85.84)	81.84 (77.94, 85.75)
Triglicéridos (mg/dl)		75.23 (65.16, 85.31)	103.75 (83.4, 124.1)	75.23 (65.16, 85.31)	105.68 (84.61, 126.76)
Colesterol (mg/dl)	HDL	50.85 (46.98, 54.71)	50.85 (45.43, 56.27)	50.85 (46.98, 54.71)	49.89 (44.54, 55.25)
	LDL	100.88 (89.86, 111.91)	110.55 (96.38, 124.72)	100.88 (89.86, 111.91)	109.89 (95.02, 124.77)
	Total	152.96 (138.37, 167.55)	168.15 (149.67, 186.63)	152.96 (138.37, 167.55)	168.05 (148.58, 187.53)
TA (mmHg)	Sistólica (media)	93.85 (89.9, 97.79)	98.85 (94.28, 103.42)	93.85 (89.9, 97.79)	99.84 (95.49, 104.2)
	Diastólica (media)	64.38 (60.86, 67.9)	65.12 (61.84, 68.41)	64.38 (60.86, 67.9)	65.39 (61.97, 68.81)
Actividad Física (Mets)		348.2 (233.62, 462.78)	409.58 (211.46, 607.71)	348.2 (233.62, 462.78)	387.79 (182.69, 592.9)
Energía Total (Kcal)		3032.89 (2661.05, 3404.7)	2790.71 (2447.63, 3133.8)	3032.89 (2661.05, 3404.74)	2768.62 (2409.88, 3127.36)

ns: p > 0.05, *: p <= 0.05, **: p <= 0.01, ***: p <= 0.001, ****: p <= 0.0001. La información se resume como promedio e intervalos de confianza (95%) para variables continuas o como porcentajes para las variables categóricas.

2. Patrones dietarios de la población infantil de la Ciudad de México

A través de un cuestionario de frecuencia alimentaria se calcularon los promedios diarios de cada alimento consumido y el gramaje de los mismos para obtener la cantidad en gramos al día por alimento. Con esta información se sumaron los gramos consumidos en cada uno de los 27 grupos de alimentos formados (Tabla 2) y se obtuvieron porcentajes de contribución por grupo alimentario de cada participante y, posteriormente, se normalizaron los datos con z-scores (tablas de porcentajes y z-scores anexadas como suplemento 9 y suplemento 10).

Tabla 2. Agrupación de alimentos del cuestionario de frecuencia de alimentos.

Grupos de alimentos	Alimentos
1. Leche	Leche light, Leche entera
2. Yogurt	Yogurt saborizado, Yakult, yogurt actiregularis®, Yogurt natural
3. Quesos	Queso Oaxaca, Queso manchego, Queso amarillo, Queso crema
4. Frutas	Fresa, Mandarina, Naranja, Plátano, Durazno, Manzana, Pera, Uvas, Mango, Ciruelas, Piña, Papaya, Melón, Sandía, Jugo de naranja

5. Vegetales	Jitomate, Zanahoria, Pepino, Jícama, Lechuga, Calabacita, Nopal, Brócoli
6. Leguminosas	Frijoles, Chicharos, Lentejas
7. Aguacate	Aguacate
8. Maíz	Tortilla de maíz, maíz
9. Chile	Chile en lata, Salsa picante
10. Arroz	Arroz
11. Huevo	Huevo
12. Pescado	Pescado, Sardina, Atún
13. Pollo	Pollo, Hígado de pollo
14. Embutidos	Salchicha de pavo, Jamón de pavo, Salchicha de cerdo, Jamón de cerdo, chorizo
15. Carnes rojas	Barbacoa, Carne de res, Carne de cerdo, chicharron, tocino
16. Panes dulces	Pastel, Galletas dulces, Pan dulce, Pastelillo relleno, Hot cake,
17. Cereales industrializados	Cereal dulce, Barras de cereal, Cereal sin azúcar
18. Papa	Papa
19. Harinas	Bolillo, Pan blanco, Pastas
20. Cereales integrales	Pan integral, Cereal de fibra, Avena
21. Antojitos Mexicanos	Torta, Tamal, Pozole, Tacos al pastor, Sopes, Carnitas
22. Comida rápida	Hamburguesa, Hot dog, Pizza, Nuggets de pollo, Sándwich,
23. Botanas saladas	Cacahuates, , Galletas botaneras, frituras, papas a la francesa, palomitas,
24. Postres	Malteada, Leche con chocolate, Danonino, Helado o nieve, Chocolate, mermelada, dulce de chamoy
25. Aderezos	Aderezo, Mayonesa, mantequilla

26. Bebidas azucaradas	Refresco de cola, Refresco de frutas, Jugos industrializados, Bebidas hidratantes, Agua con saborizante artificial, Agua de frutas
27. Agua	Agua

Usando los z-scores se evaluó la correlación de los grupos de alimentos (Figura 19). El grupo 27, correspondiente al agua simple se correlacionó negativamente con la gran mayoría de los demás grupos. Encontramos fuertes correlaciones positivas entre las frutas y las verduras, carnes rojas y papa; las leguminosas y los chiles, pollo, papa, harinas, cereales integrales y aderezos; aguacate y carnes rojas; maíz y aderezos; chile y arroz y huevo; huevo, embutidos y carnes rojas y botanas saladas; panes dulces, cereales industrializados, papa y comida rápida con aderezos.

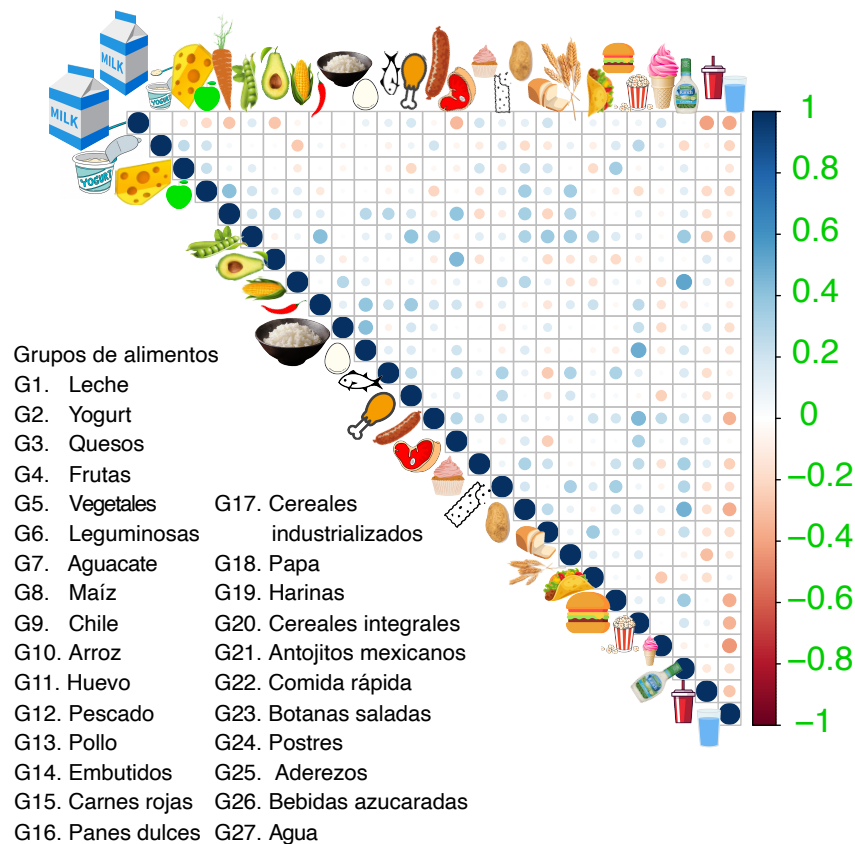


Figura 19. Matriz de correlación de los 27 grupos de alimentos.

A través del método de componentes principales encontramos combinaciones lineales que explican la mayor parte de la variación total de los datos (Figura 20). Para este análisis, se identifica un número reducido de factores que representan a las variables originales, buscando factores que expliquen la mayor parte de la varianza común. El primer componente (Dim1) explica el mayor porcentaje de la varianza total (14%) y así, sucesivamente los siguientes componentes explican porcentajes decrecientes de la varianza. De manera que los dos primeros componentes, de los 27 en total, explican el 23.89% de la varianza total, es decir que poco más de 1/5 de la información esta encapsulada en dos componentes. El método de los componentes principales son la combinación lineal que explica la mayor parte de la variación total. A continuación, se encuentra un *biplot* que incluye la posición de cada grupo de alimentos en función de dos componentes principales. En la gráfica se muestran las variables, su contribución y la magnitud en cada componente principal, también se pueden ver las distribuciones que son similares entre ellas.

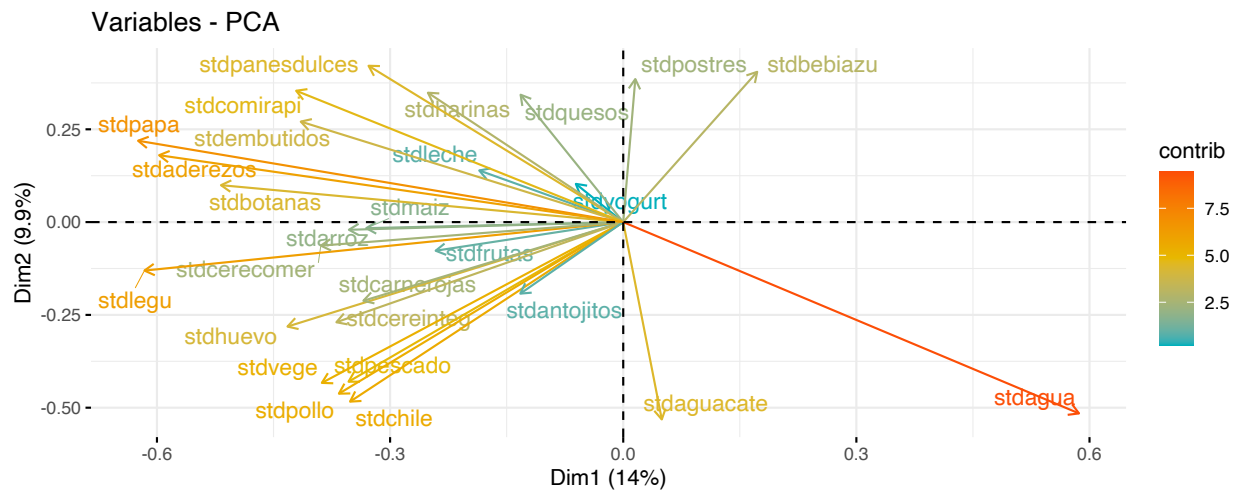


Figura 20. Análisis de componentes principales (PCA) de los 27 grupos de alimentos en dos dimensiones.

Analizamos la extracción de los factores, o componentes, necesarios para representar los datos a través de la matriz de cargas factoriales (Tabla 3). Para determinar el número de factores usamos el gráfico de codo (*Scree plot*) presentado a continuación para ambos proyectos (donde $n=46$ y $n=45$) en donde se usa como parámetro el punto de inflexión en la gráfica. En ambos casos se usaron dos dimensiones para representar los datos dietarios de las sub-poblaciones

que explican el 23.89% y el 23.73% de la varianza total y los valores de corte del eigenvalor de 2.68 y 2.83, respectivamente.

Tabla 3. Gráficas de codo y dimensiones, eigenvalores, porcentajes de varianzas y porcentajes de varianzas acumuladas de las sub-muestras con n=46 y n=45.

	n=46			n=45		
Dimensión PCA	Eigenvalor	Varianza %	Varianza acumulada %	Eigenvalor	Varianza %	Varianza acumulada %
Dim.1	3.77E+00	1.40E+01	13.97991	3.58E+00	1.33E+01	13.27274
Dim.2	2.68E+00	9.92E+00	23.89821	2.83E+00	1.05E+01	23.73704
Dim.3	2.37E+00	8.79E+00	32.68832	2.47E+00	9.15E+00	32.88693
Dim.4	2.17E+00	8.04E+00	40.72803	2.26E+00	8.38E+00	41.26575
Dim.5	1.92E+00	7.13E+00	47.85439	1.99E+00	7.38E+00	48.64845
Dim.6	1.75E+00	6.49E+00	54.34089	1.67E+00	6.18E+00	54.82633
Dim.7	1.58E+00	5.84E+00	60.18121	1.59E+00	5.87E+00	60.69937
Dim.8	1.42E+00	5.25E+00	65.42839	1.43E+00	5.28E+00	65.97845
Dim.9	1.34E+00	4.96E+00	70.38959	1.38E+00	5.09E+00	71.07118
Dim.10	1.16E+00	4.28E+00	74.67242	1.06E+00	3.91E+00	74.98297
Dim.11	1.00E+00	3.71E+00	78.38502	9.72E-01	3.60E+00	78.58318
Dim.12	8.74E-01	3.24E+00	81.62379	8.65E-01	3.20E+00	81.78749
Dim.13	8.08E-01	2.99E+00	84.61656	8.24E-01	3.05E+00	84.84112

Dim.14	6.81E-01	2.52E+00	87.13954	7.03E-01	2.60E+00	87.44574
Dim.15	5.95E-01	2.20E+00	89.34205	6.08E-01	2.25E+00	89.69763
Dim.16	5.32E-01	1.97E+00	91.31123	5.16E-01	1.91E+00	91.6076
Dim.17	4.71E-01	1.74E+00	93.05407	4.25E-01	1.57E+00	93.18128
Dim.18	4.02E-01	1.49E+00	94.54249	3.88E-01	1.44E+00	94.61966
Dim.19	3.70E-01	1.37E+00	95.9141	3.39E-01	1.26E+00	95.87543
Dim.20	2.62E-01	9.71E-01	96.88493	2.78E-01	1.03E+00	96.90383
Dim.21	2.42E-01	8.96E-01	97.78048	2.49E-01	9.22E-01	97.82594
Dim.22	1.83E-01	6.77E-01	98.45749	1.70E-01	6.29E-01	98.45476
Dim.23	1.47E-01	5.44E-01	99.00121	1.44E-01	5.33E-01	98.98765
Dim.24	1.31E-01	4.84E-01	99.48481	1.29E-01	4.78E-01	99.46538
Dim.25	9.37E-02	3.47E-01	99.83185	9.66E-02	3.58E-01	99.82321
Dim.26	4.54E-02	1.68E-01	100	4.77E-02	1.77E-01	100
Dim.27	2.85E-14	1.06E-13	100	1.71E-20	6.33E-20	100

Las cargas factoriales (eigenvectores) indican el peso de cada variable (grupo de alimento) en cada factor (eigenvalor) y lo ideal es que su valor o carga sea alto en un factor y bajo en el otro. La rotación de los factores para su interpretación resultó en la identificación de 2 patrones dietarios, principalmente (Tabla 4). Los factores de carga de cada grupo de alimentos para cada componente varían entre -1 y 1, representando el grado de relación. El patrón 1 se caracteriza por el consumo de proteínas e hidratos de carbono complejos; mientras que el patrón 2 se caracteriza por el consumo de grasas saturadas e hidratos de carbono simples; observaciones encontradas en ambos estudios. Para la interpretación de los patrones dietarios, se usaron las cargas iguales o menores a -0.4 e iguales o mayores a 0.4.

Tabla 4. Cargas factoriales de cada grupo de alimento en cada factor (patrón 1 y patrón 2) de las submuestras de n=46 y n=45. En azul se marcan las cargas factoriales mayores a 0.4 y en rojo las menores a -0.4.

Capítulo 3: Resultados

Grupos de alimentos	n=46		n=45	
	Patrón1	Patrón2	Patrón1	Patrón2
1.Leché	0	0.229	-0.069	0.2095
2.Yogurt	0	0.116	0.0102	0.1246
3.Quesos	-0.15	0.336	-0.1185	0.3494
4.Frutas	0.225	0.117	0.2955	0.1119
5.Vegetales	0.581	0	0.5687	-0.0877
6.Leguminosas	0.527	0.345	0.574	0.388
7.Aguacate	0.342	-0.41	0.2856	-0.3459
8.Maíz	0.245	0.223	0.2553	0.2601
9.Chile	0.591	0	0.6159	-0.0152
10.Arroz	0.264	0.236	0.3831	0.3055
11.Huevo	0.504	0.108	0.5138	0.1344
12.Pescado	0.554	0	0.3781	-0.195
13.Pollo	0.586	0	0.5811	-0.0529
14.Embutidos	0.1	0.485	0.1554	0.5222
15.Carnes rojas	0.386	0	0.3361	0.0577
16.Panes dulces	0	0.529	-0.2147	0.5241
17.Cereales industrializados	0.319	0.231	0.2055	0.196
18.Papa	0.285	0.597	0.2158	0.5329
19.Harinas	0	0.424	0.0195	0.4976
20.Cereales integrales	0.452	0	0.3641	0.0167

21.Antojitos Mexicanos	0.23	0	0.3025	-0.0008
22.Comida rápida	0	0.548	-0.1031	0.5195
23.Botana	0.294	0.437	0.2344	0.4531
24.Postres	-0.284	0.261	-0.2975	0.2257
25.Aderezos	0.293	0.551	0.1765	0.5298
26.Bebidas azucaradas	-0.409	0.163	-0.3621	0.191
27.Agua	0	-0.779	-0.0151	-0.7703

A través de las cargas factoriales de cada componente y los valores normalizados (z-scores) del consumo de cada individuo para cada grupo de alimento se obtuvieron los puntajes de cada patrón para cada participante (Tabla 5). Los puntajes más altos indican que el niño tiene una dieta más apegada a determinado patrón de dieta.

Tabla 5. Puntaje de cada participante en cada factor (patrón 1 y patrón 2) de las sub-muestras de n=46 y n=45. En color verde y azul se marca el patrón que más caracteriza el tipo de alimento de cada participante en ambas sub-muestras.

Participante	n=46		n=45	
	Patrón 1	Patrón 2	Patrón 1	Patrón 2
S117	0.3205371	0.5758733	1.16882758	1.81858564
S134	0.1440915	-0.9681191	0.55136982	-2.748271
S1531	-1.451602	0.5943944	-4.6168316	0.73708252
S1708	-0.6210954	0.3915844	-1.7703588	0.59562999
S179	-1.170841	-0.4113157	-3.9160054	-1.3357873
S1914	-0.0851043	-0.7586012	-0.1747733	-1.6503865
S1922	-0.6085021	2.942155	-1.6032058	10.197272
S1969	-0.0886021	2.483942	0.68172694	7.91541015

Capítulo 3: Resultados

S1972	0.6682865	1.843158	3.77712545	7.3747693
S201	0.9401742	0.143073	3.0747641	1.03002154
S2146	0.6341589	-1.465647	1.70903871	-3.4512501
S2148	0.2025058	0.9404573	1.50997575	3.09274758
S2213	2.288327	1.132702	NA	NA
S2216	2.511243	-0.397457	8.2470872	0.82366517
S2221	0.8065155	-1.299773	1.50607758	-3.6746431
S2269	-0.3801049	0.3659545	-1.0733592	0.11347832
S2270	-0.0431866	0.9992714	0.20017209	3.12107681
S2289	0.5796062	-0.3786825	2.06953986	-0.9093095
S2345	-0.8007509	1.265548	-2.2995197	3.38053581
S2429	0.4174601	0.4636037	1.80812559	1.76414923
S2452	-1.154805	-1.252507	-3.9116185	-4.4317454
S2468	-0.9809453	-0.2169433	-3.2013486	-1.3512255
S2527	0.0232354	-0.6029029	0.19532249	-1.6568602
S2593	-0.5400318	-0.8162261	-1.9329074	-3.0264369
S2600	0.4270049	-0.4282541	1.29947566	-1.4470262
S2601	-1.4277	0.4417136	-3.7773816	1.27743451
S2608	-0.6509099	0.1371638	-1.9505243	0.82868072
S2627	-0.75928	0.1697606	-1.8215033	0.5062726
S2632	-0.6678567	-1.465489	-2.5364791	-4.6979505
S2663	-0.2033831	-0.4476009	-0.2198734	-1.7135678
S2680	-0.4065396	-0.310024	-1.6242634	-1.9594698

S2726	0.4214248	-1.822996	0.21681545	-6.2756088
S2817	0.1120333	0.1744197	0.42609179	0.45319442
S2846	-0.1584052	0.3756168	-0.2473724	1.06318725
S2883	-0.6839789	-0.9429005	-1.9236144	-3.4671207
S2927	-1.56976	-0.8547883	-4.856621	-3.86771
S2967	-0.6185966	0.125412	-1.8711455	0.48074321
S2971	-1.05498	-0.4596928	-3.3184161	-2.2586803
S329	0.1623228	-1.05331	-0.0538472	-2.7031302
S339	-0.0579411	-1.044442	-1.0565482	-3.2718917
S402	0.5130515	0.2638562	3.07276901	1.64162921
S573	-0.3296513	0.7141154	-0.1131881	2.38698517
S578	3.497206	-0.5026956	10.648141	-0.0228818
S847	1.25227	0.5405591	4.29563249	2.54249128
S865	0.4539231	-0.2415238	2.18435766	-0.1065562
S884	0.1391787	1.057557	1.2282699	2.88246698

A través de la exploración de los parámetros metabólicos y la identificación de los perfiles dietarios predominantes se encontró que el patrón 1 se asocia marginalmente a los niveles de colesterol LDL de nuestra sub-muestra (coef = 2.747, $p = 0.0795$); mientras que el patrón 2 se asocia negativamente al colesterol HDL (coef = -1.2785, $p = 0.0105$).

3. Metagenómica: secuenciación *shot-gun*

El secuenciador NextSeq utilizado genera 400 x 10⁶ lecturas pareadas a partir de los fragmentos (i.e. 400,000,000 x 150 x 2 = 120 000 x 10⁶ nucleótidos), de manera que para este proyecto se

generaron un total de 1,624,041,934 lecturas (33,834,207 por muestra) de 150 bases correspondientes a 243,606,290,100 nucleótidos (Figura 21A y B).

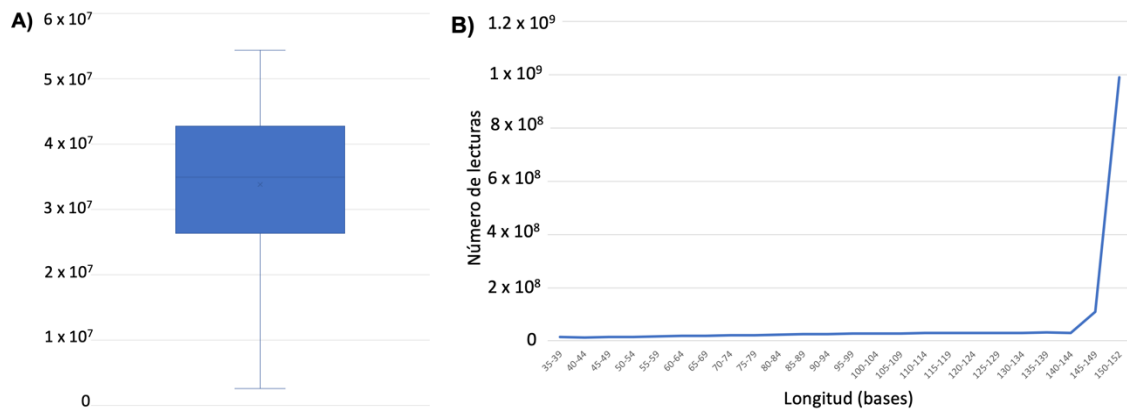


Figura 21. Número y longitud de lecturas secuenciadas. **A)** Distribución del número de lecturas en las 48 muestras. **B)** Distribución de la longitud de las lecturas secuenciadas.

Las secuencias se entregaron en ocho archivos por muestra, cuatro correspondientes a las lecturas sentido y cuatro correspondientes a las lecturas anti-sentido. Después de concatenados los archivos pertenecientes a un sentido dentro una muestra, se procedió a analizar la calidad de las lecturas. Se utilizó el programa, escrito en lenguaje JAVA, FASTQC (106). Todas las muestras secuenciadas resultaron tener promedios de calidad sobre las 28 puntuaciones de calidad (*Phred Score*) (Figura 22).

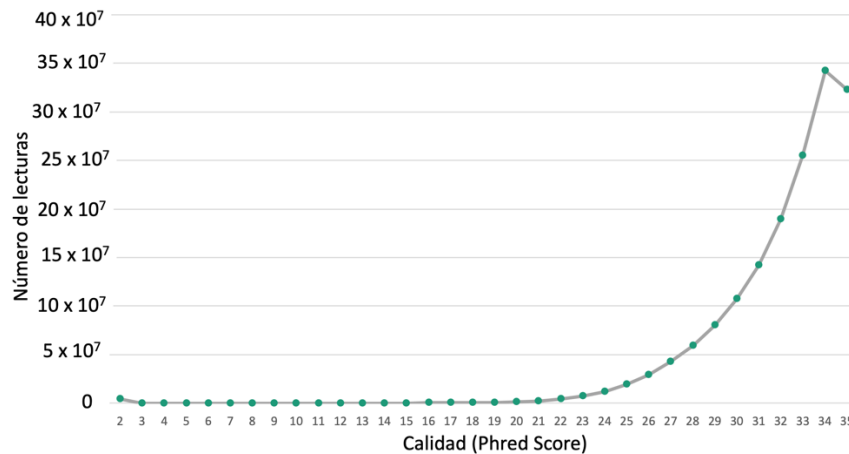


Figura 22. Calidad (Phred Score) de las lecturas secuenciadas. Todas las muestras secuenciadas resultaron tener promedios de calidad sobre las 28 puntuaciones de calidad (Phred Score).

El rango intercuartil del contenido de Guanina/Citosina por secuencia de las muestras se mantuvo entre 45% y 47% (Figura 23A). No se detectó contenido de bases inespecíficas a lo largo de las lecturas. El 1.88% del total de las lecturas tuvo longitudes menores a 140-144 bases. El nivel de duplicación por secuencias, que indica la posibilidad de sobre amplificación, en general se mantuvo por debajo del 10% de secuencias idénticas repetidas 10 veces. El porcentaje de secuencias sobrerrepresentadas fue de entre 0.1% y 0.6% (Figura 23B). No se reportó contenido de adaptadores en las lecturas secuenciadas.

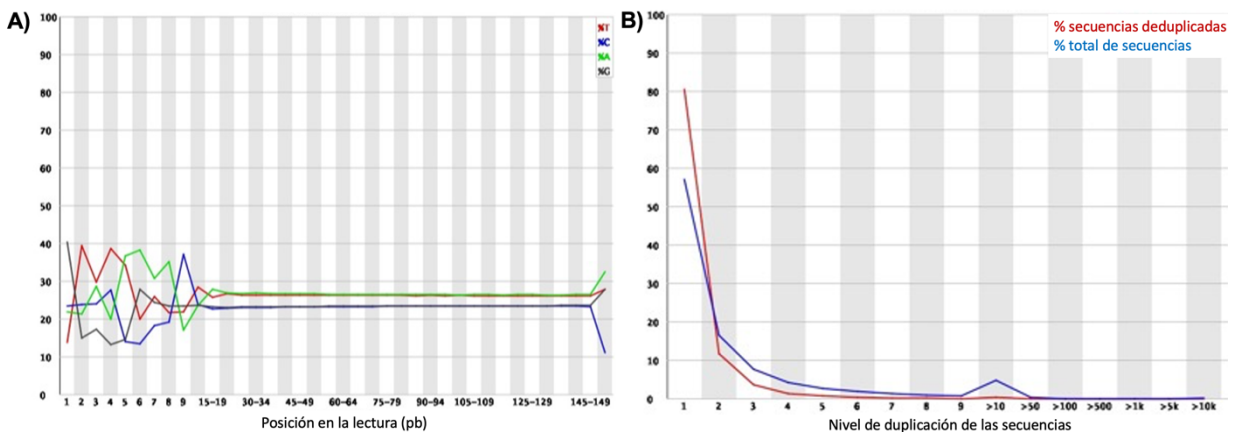


Figura 23. Contenido de bases y secuencias duplicadas en las 48 muestras. **A)** Contenido de bases a lo largo de las secuencias y **B)** porcentaje de secuencias duplicadas.

Para el procesamiento de limpieza de adaptadores y de bases de mala calidad se utilizó el programa, escrito en Python, Cutadapt en modo pareado (107). Se removieron los adaptadores en los extremos 3' y 5', así como también se usaron los parámetros de calidad con un umbral de 20 puntuaciones de calidad y longitud mínima de 20 bases. El 99.6% de todos los pares de lecturas en las muestras resultaron del procesamiento de remoción de adaptadores, y pasaron el umbral de calidad y longitud mínima (Figura 24A). Por otro lado, 1 618 036 578 lecturas de calidad fueron alineadas contra el genoma humano haciendo uso del programa Bowtie2. Durante este proceso se eliminaron las lecturas pertenecientes al genoma del hospedero. El porcentaje de lecturas alineadas 1 o más veces al índice para *Homo sapiens* en las librerías fue de entre 0.1% y 0.6%, resultando en 1, 617, 251, 896 lecturas microbianas (Figura 24B).

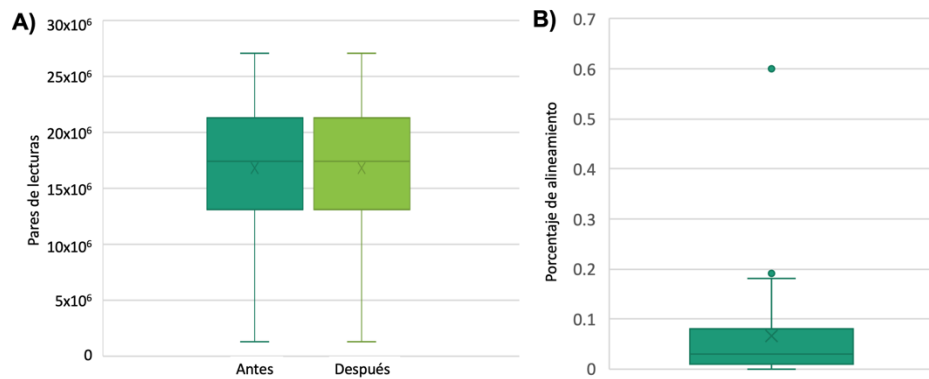


Figura 24. Secuencias microbianas filtradas de lecturas humanas. **A)** Lecturas antes y después de ser filtradas. La caja de bigotes verde oscuro representa el total de pares de lecturas secuenciadas, la caja de bigotes verde claro representa el total de pares de lecturas microbianas (filtradas). **B)** Porcentaje de lecturas alineadas al genoma humano.

Se formaron entre 12 419 y 148 377 *contigs* con longitudes totales de entre 15 528 656 y 243 879 740 bases (promedio 132 282 896) (Figura 25A). Los *contigs* más largos por librería variaron entre los 76193 y los 897637 bases (Figura 25B). El promedio de los porcentajes de lecturas ensambladas en cada una de las 48 muestras fue de 86.06% (Figura 25C). Los valores de N50¹ se reportaron entre 848 y 7940 bases. Se filtraron los *contigs* con longitudes menores a 500 bases (Figura 25D; tabla anexada como suplemento 11).

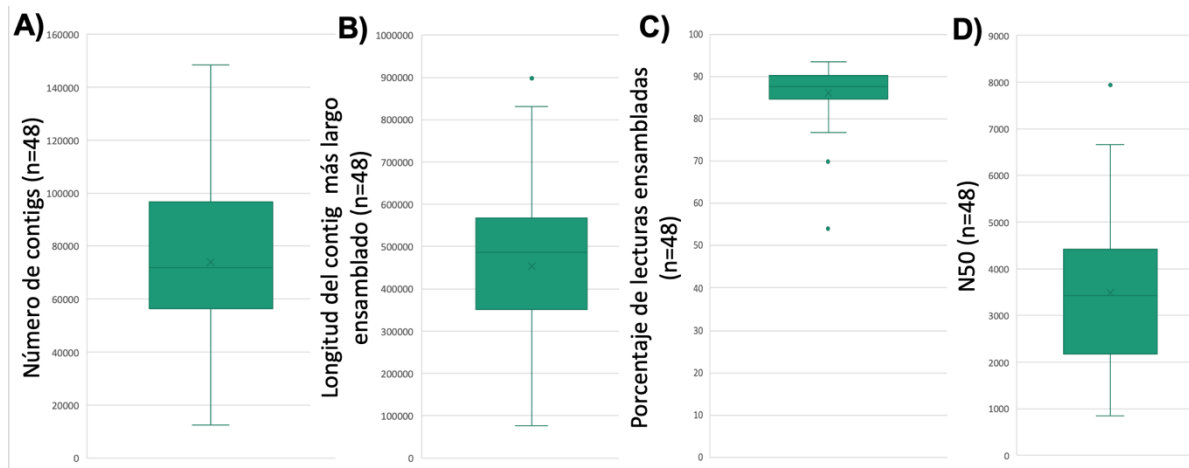


Figura 25. Datos y calidad del ensamblaje. **A)** Número de contigs en las 34 muestras ensambladas. **B)** Longitud del contig más largo por cada muestra. **C)** Porcentaje de lecturas ensambladas en cada una de las 48 muestras. **D)** N50 de cada muestra ensamblada.

¹ N50: la longitud del *contig* más corto a la mitad de la longitud total del genoma.

4. Análisis taxonómico, capacidad funcional y factores de virulencia de la microbiota intestinal.

4.1. Alteraciones de la microbiota intestinal asociadas al metabolismo del metano en población infantil mexicana con obesidad

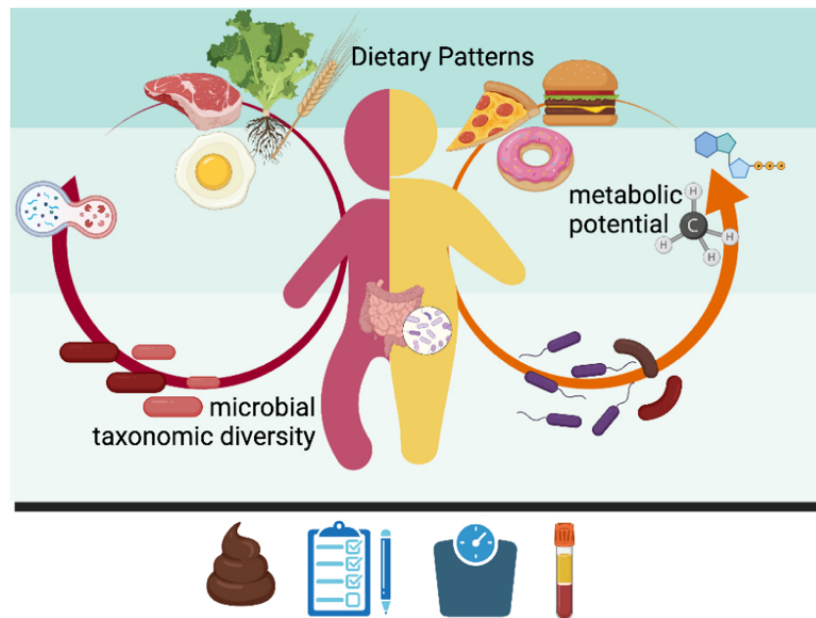


Figura 26. Resumen gráfico del proyecto de alteraciones de la microbiota intestinal asociadas al metabolismo del metano en población infantil mexicana con obesidad. Se identificaron dos patrones dietarios caracterizados por el consumo de carbohidratos complejos y proteínas (patrón 1 a la izquierda de la imagen), y por el consumo de grasas saturadas y carbohidratos simples (patrón 2 a la derecha de la imagen). Se encontraron diferencias taxonómicas en la microbiota de los grupos con normopeso comparados con los de sobrepeso y obesidad. Así como también se encontraron distintos taxa asociados al IMC. Las vías del metabolismo de energía y metano se encontraron sobrerrepresentadas en el microbioma del grupo son sobrepeso y obesidad.

La primera sección del análisis de esta tesis (Figura 26) se realizó anotando las lecturas microbianas de alta calidad usando marcadores filogenéticos de copia única basados en unidades taxonómicas operacionales (mOTUs) (117). Se encontraron 917 anotaciones de taxa a través de las 46 muestras utilizadas para este análisis; de las 48 muestras originales 2 muestras no pasaron los controles de calidad de manera que fueron excluidas. Estas anotaciones se

filtraron por baja abundancia (<0.01%) resultando en 875 taxas en 10 phylas (Figura 27A, tabla de anotación taxonómica usando mOTUs anexada como suplemento 12).

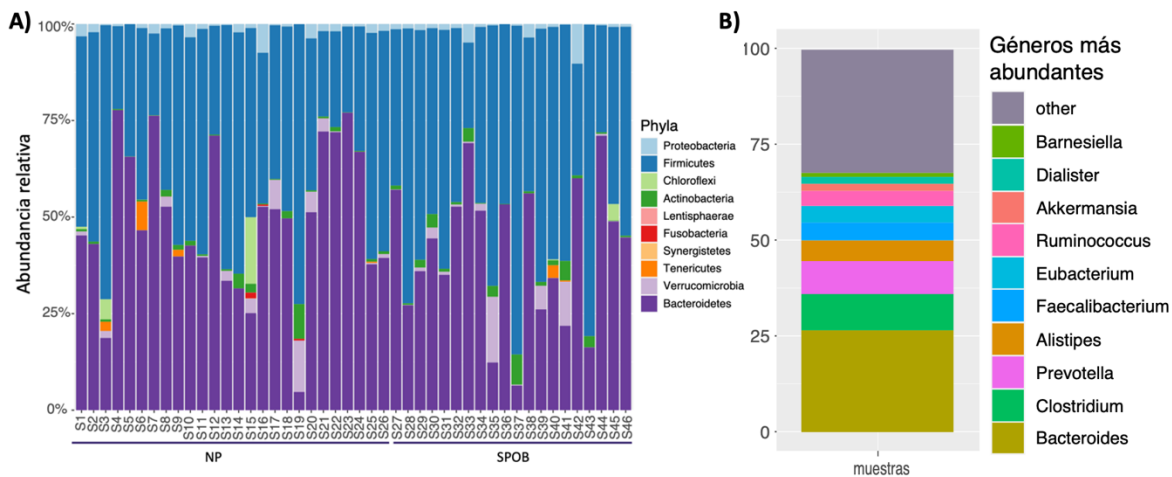


Figura 27. Abundancia relativa de la microbiota de las 46 muestras. **A)** Abundancias relativas a nivel de phylum y **B)** géneros de las 46 muestras incluidas agrupadas por IMC. Las primeras 26 muestras corresponden al grupo de NP: normopeso, las 20 últimas corresponden al grupo de SPOB: sobrepeso y obesidad.

Los géneros más abundantes incluyen *Bacteroides*, *Prevotella*, *Alistipes*, *Eubacterium*, *Ruminococcus*, *Akkermansia*, *Dialister*, *Clostridium*, *Faecalibacterium* y *Barnesiella* (Figura 27B). Dado que la disbiosis favorece un estado inflamatorio que afecta al metabolismo energético, se analizó la diversidad de la microbiota comparando el grupo de normopeso (NP) con el de sobrepeso y obesidad (SPOB). La diversidad alfa evaluada con el índice de Shannon y el inverso de Simpson resultó ligeramente más elevado en el grupo SPOB comparado con el de NP, aunque las diferencias no fueron significativas ($p > 0.05$) (Figura 28A y B). La relación entre Firmicutes y Bacteroidetes resultó mayor en el grupo de SPOB, sin diferencias significativas ($p > 0.05$) (Figura 28C).

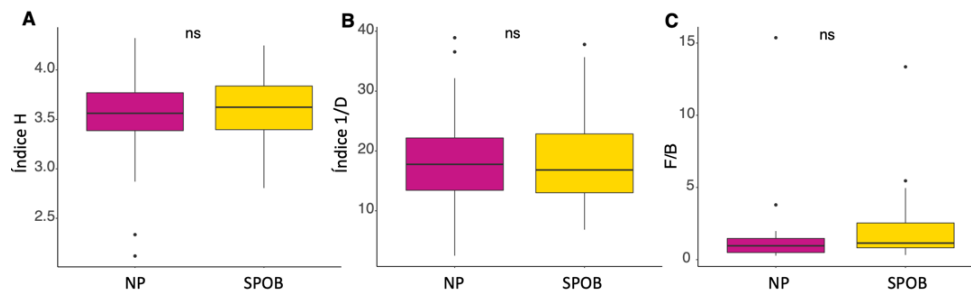


Figura 28. Diversidad alfa. **A)** Índice de Shannon (H), **B)** índice inverso de Simpson (1/D) y **C)** relación entre Firmicutes y Bacteroidetes (F/B) de la microbiota intestinal del grupo con normopeso (magenta) y sobrepeso/obesidad (amarillo). Ns: $p > 0.05$. Las comparaciones se obtuvieron a través de la prueba T y de la prueba de rangos de Wilcoxon (WRST).

Se identificaron taxas que contribuyen a más del 70% de la diferencia en la diversidad beta (Bray-Curtis) entre ambos grupos de IMC (tabla anexada como suplemento 13). Se encontraron diferencias marginales, no estadísticamente significativas, en la abundancia de *Roseburia* sp. (p -value = 0.098), *Bacteroides rodentium* (p -value = 0.055) y *Bacteroides egerthii* (p -value = 0.073); mientras que la abundancia de *Bacteroides intestinalis* (p -value = 0.0012), *Methanobrevibacter smithii* (p -value = 0.042) y *Eubacterium* sp. (p -value = 0.044) fue diferente significativamente entre NP y SPOB (Figura 29).

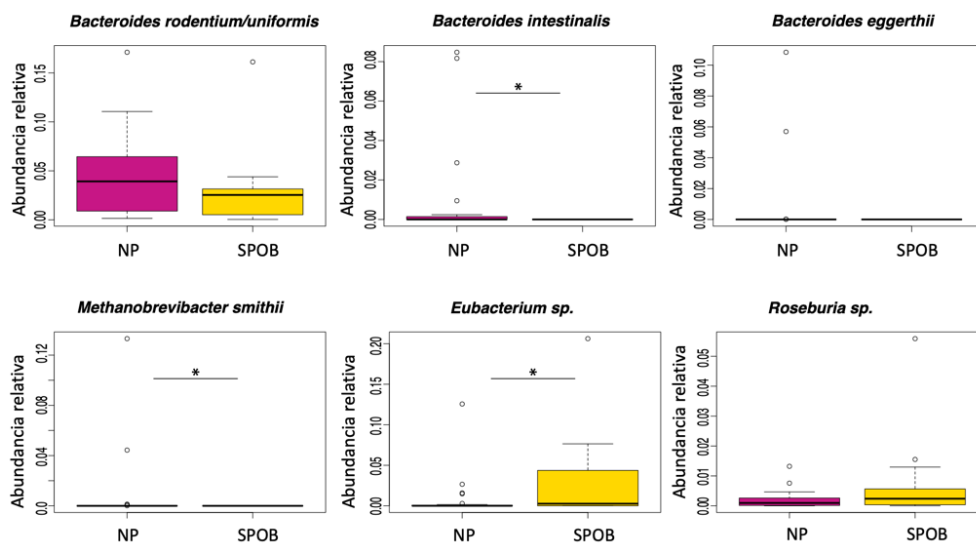


Figura 29. Abundancia relativa de los taxa que resultaron diferentes entre el grupo NP (magenta) comparados con los de SPOB (amarillo). Las comparaciones se realizaron a través de la prueba de rangos de Wilcoxon ajustada por tasa de descubrimientos falsos (FDR): *Bacteroides rodentium/uniformis* $p = 0.055$, *Bacteroides intestinalis* $p = 0.0012$, *Bacteroides 67gerthii* $p = 0.073$, *Methanobrevibacter smithii* $p = 0.042$, *Eubacterium* sp. CAG:180 $p = 0.044$, *Roseburia* species $p = 0.098$. *: $p \leq 0.05$.

Para este análisis se buscaron vectores nutrimentales que se ajustaran a la diversidad beta con el objetivo de investigar a las relaciones lineales que contribuyeran en dirección y peso con el gradiente de diversidad bacteriano. Encontramos que los ácidos grasos monoinsaturados (MUFAs) ($r^2 = 0.1513$, $p = 0.025$), los lípidos ($r^2 = 0.1185$, $p = 0.057$), los ácidos grasos saturados ($r^2 = 0.1004$, $p = 0.080$), los ácidos grasos trans ($r^2 = 0.1062$, $p = 0.069$) y la energía aportada por lípidos (kcal) ($r^2 = 0.1185$, $p = 0.057$) son vectores significativos en la diversidad beta de Bray–Curtis.

Se analizaron las asociaciones entre los taxa diferentes entre los grupos y el consumo de macronutrientes de la población de estudio. En los taxa relacionados con el grupo con normopeso, el incremento en la abundancia de *Bacteroides* se asoció con el consumo de hidratos de carbono (*B. rodentium* coef = 0.002, $p = 0.08$; *B. intestinalis* coef = 0.001, $p = 0.046$; *B. egerthii* coef = 0.0013, $p = 0.04$) y fibra (*B. intestinalis* coef = 0.0014, $p = 0.085$; *B. egerthii* coef = 0.0017, $p = 0.04$). Así mismo, la disminución de su abundancia se asoció con el consumo de lípidos (*B. rodentium* coef = -0.003, $p = 0.06$; *B. intestinalis* coef = -0.0016, $p = 0.02$; *B. egerthii* coef = -0.002, $p = 0.008$). Además, la disminución de la abundancia relativa de *M. smithii* se asoció con el consumo de proteína (coef = -0.0035, $p = 0.046$) (Tabla 6). Por otro lado, en el análisis de los taxa asociados al grupo con SPOB, se encontró que el incremento de la abundancia de *Roseburia* se asoció al consumo de proteínas (coef = 0.0017, $p = 0.02$), fibra (coef = 0.00074, $p = 0.06$) y en general el patrón 1 (coef = 0.0029, $p = 0.02$). Mientras que el incremento de la abundancia de *Eubacterium* se asoció con el consumo de azúcar (coef = 0.0016, $p = 0.007$) y grasas saturadas (coef = 0.002, $p = 0.007$); y disminuyó con fibra (coef = -0.004, $p = 0.022$), grasas poliinsaturadas (coef = -0.003, $p = 0.024$) y el patrón 1 (coef = -0.01, $p = 0.07$) (Tabla 6).

Tabla 6. Análisis de asociación (regresión lineal) entre taxa y consumo de macronutrientes en porcentaje, ajustado por edad, sexo y antecedentes heredofamiliares de sobrepeso y obesidad.

n=46	<i>Bacteroides rodentium</i>		<i>Bacteroides intestinalis</i>		<i>Bacteroides egerthii</i>		<i>Methanobrevibacter smithii</i>		<i>Roseburia sp</i>		<i>Eubacterium spcag180</i>	
	coef	p	coef	p	coef	p	coef	p	coef	p	coef	p
hidratos de carbono (%)	0.002	0.08	0.001	0.046	0.0013	0.04	0.00009	0.9	-	0.14	0.0003	0.8
lípidos (%)	-0.003	0.06	0.0016	0.02	-0.002	0.008	0.0006	0.43	0.0002	0.54	0.001	0.33
proteínas (%)	-	0.83	0.0005	0.97	0.0008	0.62	-0.0035	0.046	0.0017	0.02	-	0.14
azúcares (%)	-0.001	0.1	0.0009	0.74	0.0003	0.19	0.00003	0.92	-	0.55	0.0016	0.007

fibra (%)	0.001	0.4 2	0.001 4	0.08 5	0.001 7	0.04	-0.0012	0.19	0.0007 4	0.06	- 0.00 4	0.022
Ácidos grasos saturados (%)	-0.001	0.1 7	- 0.000 3	0.24	- 0.000 3	0.33	-0.0001	0.69	0.0000 2	0.86	0.00 2	0.007
grasas mono-saturadas (%)	- 0.000 1	0.9 2	0.000 6	0.37	- 0.000 3	0.62	-0.0007	0.4	0.0001 3	0.73	- 0.00 18	0.25
grasas poliinsaturadas (%)	0.002	0.1 2	0.000 6	0.35	0.000 5	0.43	0.0005	0.49	0.0000 18	0.95	- 0.00 3	0.024
grasas trans (%)	0.011	0.2 6	0.002 1	0.63	0.003 2	0.49	0.004	0.41	- 0.0016	0.46	- 0.00 3	0.7
patrón 1	0.004	0.4 7	0.002	0.34 9	0.003 6	0.18	-0.0036	0.22	0.0029	0.02	- 0.01	0.07
patrón 2	-0.008	0.1 4	0.000 19	0.94	0.000 2	0.92	0.0023	0.44	- 0.0005	0.66	0.00 09	0.87

También se buscaron asociaciones entre la abundancia de los taxa de interés y el IMC usando puntajes z estratificados por alto y bajo consumo de patrones dietarios (Tabla 7). La incrementada abundancia relativa de *Eubacterium* sp se asocia con el incremento de IMC en población infantil cuando tienen un alto consumo del patrón 2 (coef = 1.89, $p = 0.019$). La abundancia de *Roseburia* sp en función del bajo consumo del patrón 1 se asocia al incremento del IMC (coef = 15.93, $p = 0.059$). Más aún, el efecto de la abundancia de *B. rodentium* en el IMC de la población de estudio presentó un comportamiento en espejo, en el que el alto consumo de proteínas e hidratos de carbono complejos (patrón 1) o el bajo consumo de grasas saturadas e hidratos de carbono simples (patrón 2) resultan en el mismo efecto. La abundancia de *B. rodentium* se asocia a una disminución del IMC cuando el consumo del patrón 1 es alto (coef = -2.42, $p = 0.013$) y cuando el consumo del patrón 2 es bajo (coef = -1.61, $p = 0.053$).

Tabla 7. Análisis de asociación entre los taxa de interés y el IMC (puntajes z) de acuerdo con el consumo de patrón dietario. El modelo de regresión lineal se ajustó por edad, sexo, antecedentes heredofamiliares de sobrepeso y obesidad y por cada patrón.

Patrón	<i>Bacteroides rodentium</i>		<i>Eubacterium spcag180</i>		<i>Bacteroides intestinalis</i>		<i>Methanobrevibacter smithii</i>		<i>Roseburia sp</i>		<i>Bacteroides eggerthii</i>	
	coef	<i>p</i>	coef	<i>p</i>	coef	<i>p</i>	coef	<i>p</i>	coef	<i>p</i>	coef	<i>p</i>
Patrón 1												
bajo consumo	-0.97	0.28	0.89	0.19	-1.93	0.29	-1.89	0.11	15.93	0.059	-108.5	0.91
alto consumo	-2.42	0.013	2.25	0.17	-2.65	0.16	-45.6	0.66	0.102	0.97	-1.72	0.16
Patrón 2												
bajo consumo	-1.61	0.053	-0.43	0.77	-1.12	0.57	-141.97	0.25	4.85	0.13	-2.02	0.45
alto consumo	-1.53	0.3	1.89	0.019	-3.1	0.12	-1.54	0.26	10.83	0.32	-2.77	0.11

Por otro lado, se realizó un análisis de predicción de genes para investigar el potencial funcional del microbioma. Se realizó un ensamblaje con el 86.06% de las lecturas filtradas por calidad y microbianas. El 75% de los ensamblajes reportaron N50s mayores a 2000 pares de bases. Encontramos 1,582,297 genes no redundantes a lo largo de las 46 muestras. El número promedio de genes anotados por librería fue de $123,326.68 \pm 49,037.8$ DE con una longitud

promedio de 719.44 ± 60.04 pares de bases (tabla de genes anotados (KOs) anexada como suplemento 14) (Figura 30A).

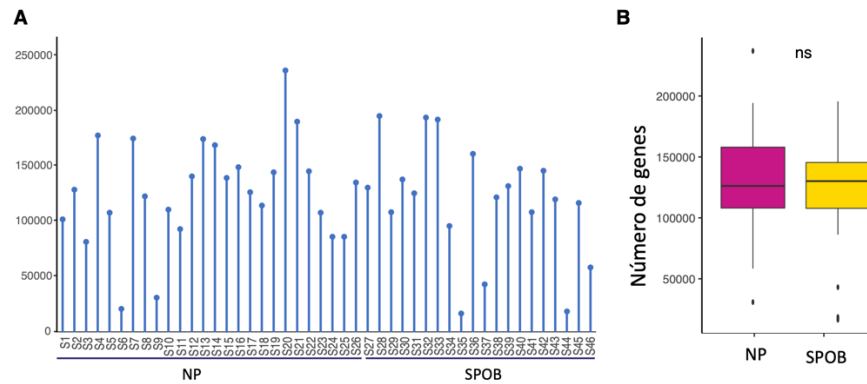


Figura 30. Genes anotados (KOs) en 46 muestras y dos grupos de IMC. **(A)** Número de genes anotados en cada muestra. **(B)** Comparación de genes anotados en el grupo con NP (magenta) y SPOB (amarillo).

No se encontraron diferencias en la riqueza de ambos grupos de IMC (Figura 30B); sin embargo, se encontraron 46 KOs (genes ortólogos de la base KEGG) sobre-representados y 111 sub-representados (p y FDR < 0.05) en el grupo de NP comparado con el de SPOB (Figura 31; tabla anexada como suplemento 15).

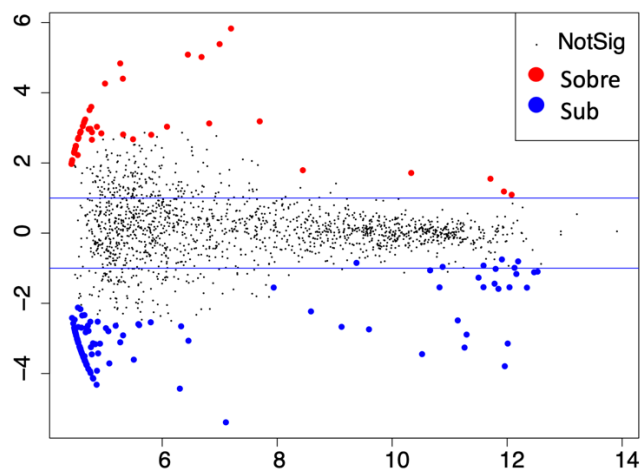


Figura 31. Gráfica MA mostrando la representación diferencial de los genes (resumidos por KOs) de la microbiota entre el grupo con NP comparado con SPOB. Los genes diferencialmente anotados $p < 0.05$; ajustados por FDR $p < 0.05$. MA es la relación entre los valores de intensidad (cuentas) y la diferencia entre los datos (eje-y $M = \text{radio logarítmico}$ (el radio de diferencia logarítmica) y eje-x $A = \text{promedio del conteo normalizado}$)).

Se investigó si cada grupo de KOs diferenciales se asociaba significativamente a una vía metabólica definida en KEGG para determinar si alguna función biológica se encontraba enriquecida en el microbioma de alguno de los grupos de IMC. Encontramos 11 vías KEGG sobre-representadas y 31 sub-representadas que, a su vez, fueron filtradas por diferencias estadísticas significativas y tasa de descubrimientos falsos (FDR) (suplemento 15). Las vías sobre-representadas en el grupo con NP, en comparación con el grupo de SPOB, incluyeron el tráfico de membranas, lisosomas, apoptosis (p y BH < 0.05) y exosomas (p y BH < 0.1) (Figura 32A). El metabolismo del metano, de energía (p y BH < 0.05), la biogénesis de ribosomas y el metabolismo de glicerofosfolípidos (p y BH < 0.1) resultaron sub-representados en el grupo con NP comparado con el de SPOB (Figura 32B).

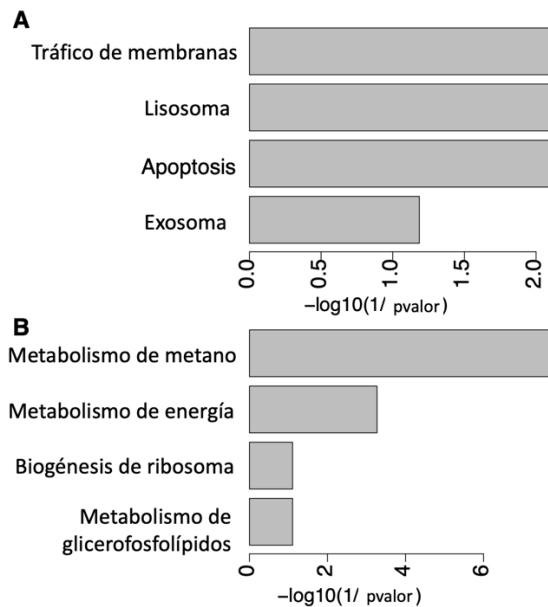


Figura 32. Vías KEGG sobre-representadas (**A**) y sub-representadas (**B**) en el grupo con NP comparado con el de SPOB.

4.2. Factores de virulencia en la microbiota intestinal asociados al IMC y a los marcadores bioquímicos sanguíneos de la población infantil con obesidad

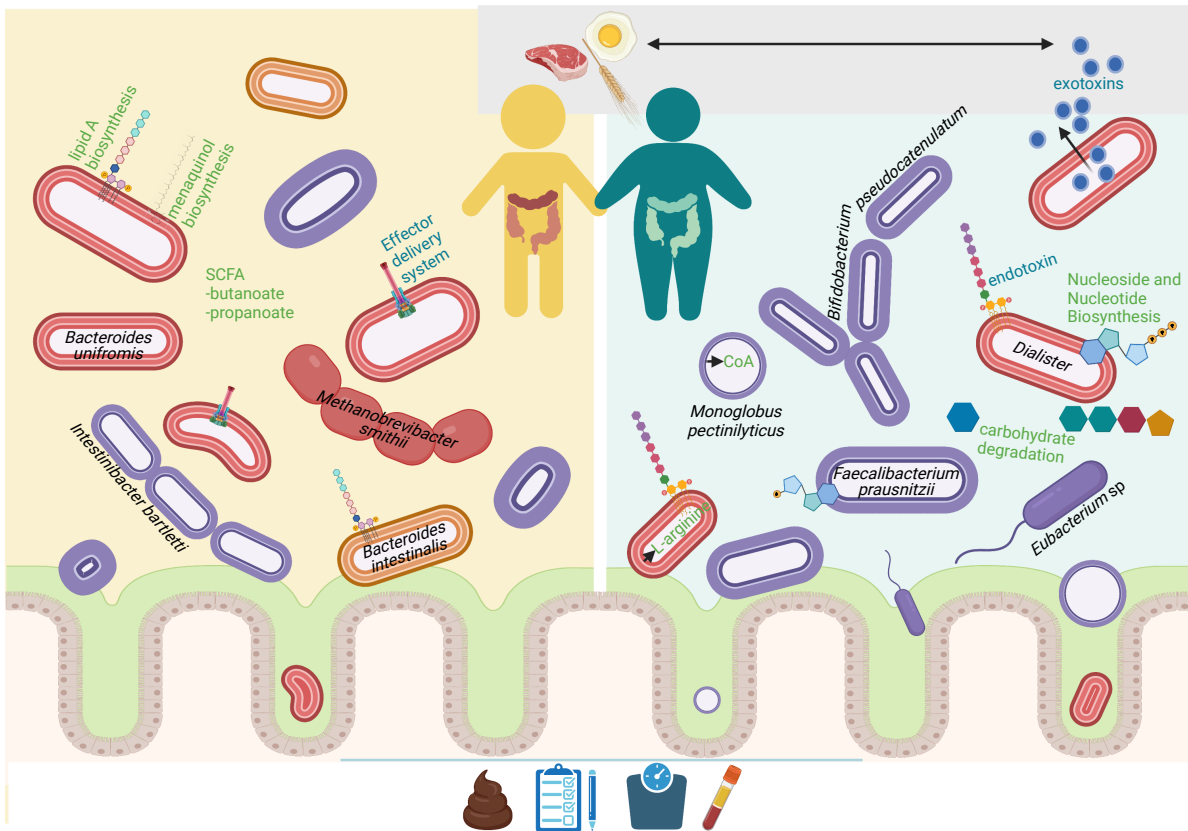


Figura 33. Resumen gráfico del proyecto de Factores de virulencia en la microbiota intestinal asociados al IMC y a los marcadores bioquímicos sanguíneos de la población infantil con obesidad. Se formaron dos categorías de acuerdo con el IMC de los participantes, NP (normopeso) del lado izquierdo (amarillo) y SPOB (sobrepeso y obesidad) del lado derecho (azul). Se identificó la asociación entre el consumo de proteínas y carbohidratos complejos con la abundancia de exotoxinas. Se encontraron diferencias taxonómicas entre ambos grupos que incluyen a *Eubacterium* sp, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Dialister*, *Monoglobus pectinilyticus*, *Bifidobacterium pseudocatenulatum* en el grupo con SPOB; e *Intestinibacter bartlettii*, *Bacteroides intestinalis*, *Bacteroides uniformis* y *Methanobrevibacter smithii* en el grupo con NP. Las diferencias metabólicas que se encontraron entre ambos grupos incluyen la vías de biosíntesis de aminoácidos, de cofactores, transportadores y vitaminas, nucleósidos y nucleótidos, las vías de degradación de carbohidratos y azúcares y la vía de biosíntesis de aminos y poliaminas. La categoría de lipooligosacáridos se encontró diferencialmente abundante en el grupo con SPOB.

La segunda sección de esta tesis implicó la búsqueda de “Factores de virulencia en la microbiota intestinal asociados al IMC y a marcadores bioquímicos sanguíneos en población infantil con obesidad” (Figura 33). Por lo anterior, se realizó la anotación de las lecturas de alta calidad microbianas a través de marcadores de genes clado-específicos del programa HUMAnN3 (Figura 34). Se anotaron 291 especies pertenecientes a 120 géneros a lo largo de las 45 muestras; de

las 46 muestras obtenidas para analizar la composición de la microbiota, 1 fallo en ser anotada con HUMAnN3. Además, en las 45 muestras anotadas a través del MetaPhlan, se encontraron 107 géneros y 247 especies con una abundancia relativa superior al 0.01%. Los géneros más abundantes incluyeron a *Bacteroides*, *Prevotella*, *Alistipes*, *Ruminococcus*, *Eubacterium*, *Faecalibacterium*, *Bifidobacterium*, *Roseburia*, *Akkermansia* y *Barnesiella*.

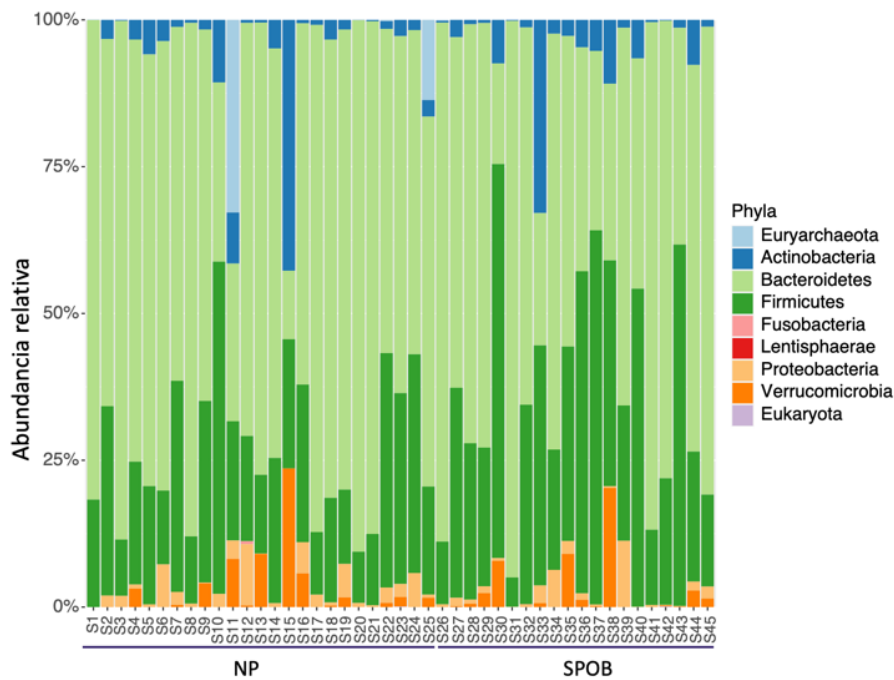


Figura 34. Abundancia relativa de los Filos en las 45 muestras incluidas en el estudio, agrupadas por IMC.

Se analizó la diversidad de la población bacteriana comparando por los grupos previamente realizados por IMC. La distribución de los resultados de la diversidad alfa fue paramétrica para el índice inverso de Simpson a nivel de especies (Shapiro-Wilk $p = 0.893$). El resto de las distribuciones para especies y géneros resultaron no paramétrica (Shapiro-Wilk especies: Shannon $p = 3.881e-05$, Simpson $p = 1.756e-09$; géneros: Shannon $p = 0.007538$, Simpson $p = 0.002619$, Simpson Inverso $p = 0.01373$). Las diferencias de diversidad alfa entre la microbiota del grupo con NP y el grupo con SP/OB fueron significativas para las anotaciones por género (WRST Shannon $p = 0.41$, Simpson $p = 0.33$, Simpson inverso $p = 0.033$) (Figura 35A). Por otro lado, la diversidad alfa agrupada a nivel de especies no fue diferente significativamente entre ambos grupos (Figura 35B).

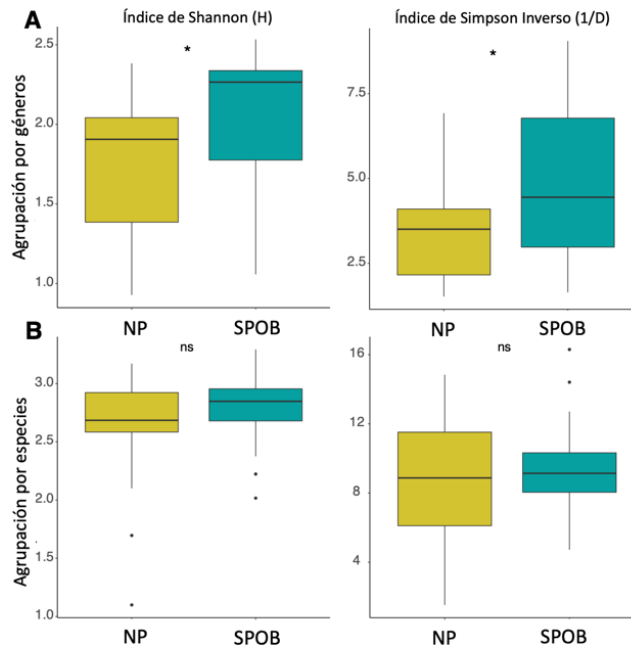


Figura 35. Diversidad alfa. **(A)** Agrupación a nivel de género y **(B)** especies. Índice de Shannon (H) y de Simpson inverso (1/D) de la microbiota intestinal de los grupos de niños con NP (amarillo) y SPOB (turquesa). Las comparaciones se obtuvieron a través de las WRST y prueba T. ns: $p > 0.05$, * $p < 0.05$.

La visualización de la diversidad beta entre la microbiota de la población infantil con normopeso comparada con la población con sobrepeso y obesidad evidencia dos agrupaciones (Figura 36) sin embargo, sólo la comparación de la diversidad wUF (por sus siglas en inglés, weighted UniFrac, que toma en cuenta las abundancias y distancias filogenéticas entre los taxa) fue significativa (adonis-PERMANOVA $p = 0.03197$).

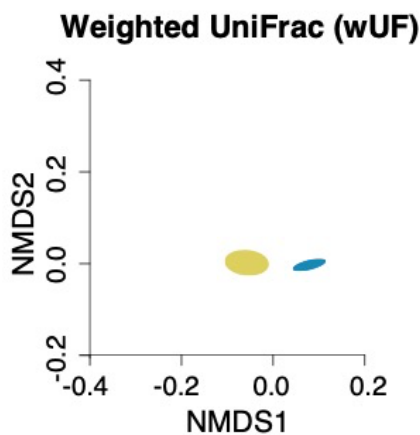


Figura 36. NMDS (por sus siglas en inglés Non-metric Multidimensional Scaling) de las distancias wUF entre el grupo con NP (amarillo) y SPOB (turquesa).

Los taxa que contribuyen mayoritariamente a la diferencia de diversidad Beta entre los grupos (Tabla 8 y 9), obtenida a través del análisis de similitud de porcentajes (por sus siglas en inglés, SIMPER: similarity of percentages analysis) incluyen generos y especies de los filos Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, Verrucomicrobia y Proteobacteria.

Tabla 8. Géneros que contribuyen mayoritariamente a la variación de la diversidad beta entre NP y SPOB (SIMPER).

Reino	Phyla	Clase	Orden	Familia	Género	ARA	p	
Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Bifidobacteriales	Bifidobacteriaceae	<i>Bifidobacterium</i>	0.619209	0.16	
				Bacteroidaceae	<i>Bacteroides</i>	0.244334	0.28	
				Prevotellaceae	<i>Prevotella</i>	0.392434	0.24	
	Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	Rikenellaceae	<i>Alistipes</i>	0.517258	0.89	
				Eubacteriaceae	<i>Eubacterium</i>	0.457307	0.075	
				Lachnospiraceae	<i>Roseburia</i>	0.688064	0.1	
						<i>Faecalibacterium</i>	0.718408	0.044 *
	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Ruminococcaceae	<i>Ruminococcus</i>	0.570175	0.92	
Verrucomicrobia	Verrucomicrobiae	Verrucomicrobiales	Akkermansiaceae	<i>Akkermansia</i>	0.655464	0.61		

*p<0.05; ARA=Abundancia Relativa Acumulada

Tabla 9. Especies que contribuyen mayoritariamente a la variación de la diversidad beta entre NP y SPOB (SIMPER).

Reino	Phyla	Clase	Orden	Familia	Género	Especies	ARA	p
Archaea	Euryarchaeota	Methanobacteria	Methanobacteriales	Methanobacteriaceae	Methanobrevibacter	<i>Methanobrevibacter smithii</i>	0.7083112	0.081
Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Bifidobacteriales	Bifidobacteriaceae	Bifidobacterium	<i>Bifidobacterium longum</i>	0.5443255	0.41
			Bacteroidia	Bacteroidaceae	Bacteroides	<i>Bacteroides caccae</i>	0.4316854	0.53

Capítulo 3: Resultados

					<i>Bacteroides dorei</i>	0.3565043	0.23
					<i>Bacteroides fragilis</i>	0.3170092	0.51
					<i>Bacteroides plebeius</i>	0.6957067	0.17
					<i>Bacteroides stercoris</i>	0.2730471	0.14
					<i>Bacteroides uniformis</i>	0.2227372	0.035 *
					<i>Bacteroides vulgatus</i>	0.1706975	0.67
					<i>Bacteroides xylanisolvens</i>	0.6820434	0.39
			Barnesiellaceae	Barnesiella	<i>Barnesiella intestinhominis</i>	0.6524708	0.79
			Prevotellaceae	Prevotella	<i>Prevotella copri</i>	0.1041508	0.73
			Rikenellaceae	Alistipes	<i>Alistipes inops</i>	0.6672934	0.69
					<i>Alistipes putredinis</i>	0.4931479	0.38
			Clostridiaceae	Clostridium	<i>Clostridium sp CAG510</i>	0.6365187	0.61
			Eubacteriaceae	Eubacterium	<i>Eubacterium sp CAG180</i>	0.3959697	0.024 *
			Lachnospiraceae	Lachnospiraceae _unclassified	<i>Eubacterium rectale</i>	0.5869603	0.1
				Faecalibacterium	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	0.5666714	0.044 *
			Ruminococcaceae		<i>Eubacterium siraeum</i>	0.6203502	0.21
				Ruminococcus	<i>Ruminococcus bromii</i>	0.4626596	0.71
Proteobacteria	Gamma proteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Escherichia	<i>Escherichia coli</i>	0.6039996	0.25
Verrucomicrobia	Verrucomicrobiae	Verrucomicrobiales	Akkermansiaceae	Akkermansia	<i>Akkermansia muciniphila</i>	0.5198455	0.61

*p<0.05; ARA=Abundancia Relativa Acumulada

De estas listas de géneros y especies obtenidas mediante SIMPER, los géneros *Eubacterium*, *Faecalibacterium* (WRST $p = 0.075$ y 0.044 , respectivamente) y a las especies *Bacteroides uniformis* ($p = 0.035$), *Methanobrevibacter smithii* ($p = 0.081$), *Eubacterium* sp ($p = 0.024$) y *Faecalibacterium prausnitzii* ($p = 0.044$) resultaron marginal y significativamente distintos entre NP y SPOB (Figura 37).

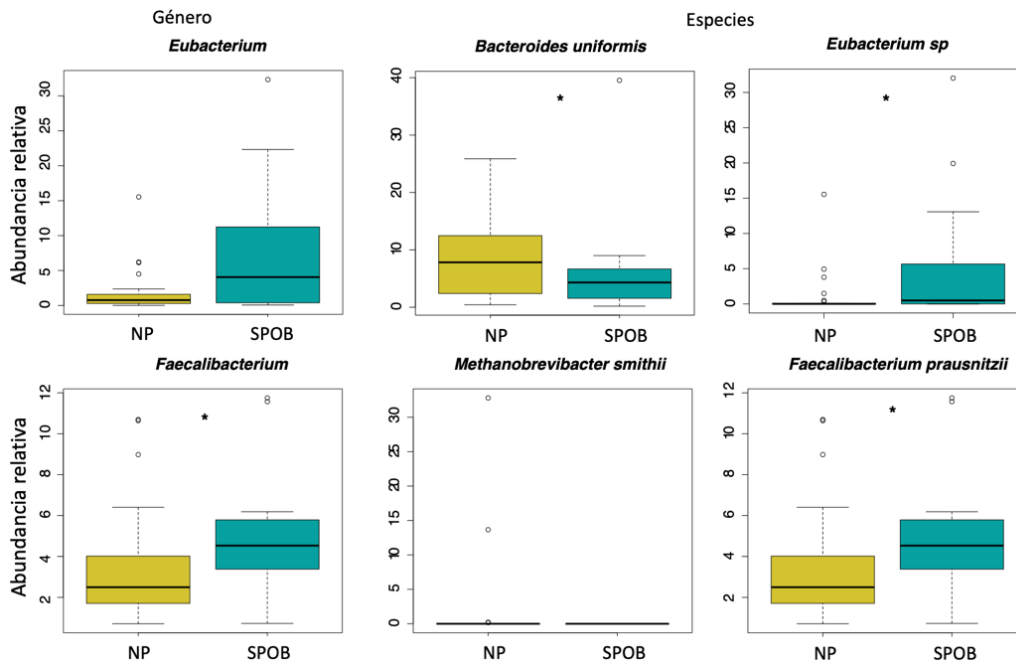


Figura 37. Abundancia relativa de los taxa que fueron diferentes entre los grupos con NP (amarillo) y SPOB (turquesa). Las comparaciones se obtuvieron usando WRST ajustada por FDR, *: $p \leq 0.05$.

Tomando en cuenta la diversidad entre ambos grupos de IMC se ajustaron las variables cuantitativas como vectores en el NMDS. El índice de la diversidad Beta tomando en cuenta las abundancias (Bray-Curtis) de los géneros se correlacionó significativamente con las variables de peso ($r^2 = 0.1314$, $p = 0.049$), la talla ($r^2 = 0.1435$, $p = 0.045$), el porcentaje de consumo de hidratos de carbono ($r^2 = 0.1961$, $p = 0.010$) y lípidos ($r^2 = 0.1960$, $p = 0.011$). Por otro lado, el índice de diversidad Beta considerando abundancias y distancias filogenéticas (wUF) de las especies se correlacionó significativamente con el índice cintura-cadera de los participantes ($r^2 = 0.1377$, $p = 0.035$) y marginalmente con el normopeso y sobrepeso/obesidad ($r^2 = 0.0744$, $p = 0.055$).

Se utilizó el análisis lineal discriminante de tamaño de efecto (por sus siglas en inglés LEfSe: linear discriminant analysis effect size) para identificar a los taxa bacterianos y a las vías metabólicas que con mayor probabilidad predicen las diferencias en la microbiota del grupo con NP comparado con SPOB, tomando en cuenta la consistencia biológica y la relevancia del efecto (126). El grupo con sobrepeso/obesidad resultó tener mayor abundancia del filo Firmicutes (Figura 38A) y una relación entre Firmicutes:Bacteroidetes incrementado (Figura 38B) en comparación con el grupo con NP (LDA, por sus siglas en inglés: Linear Discriminant Analysis, >2 y Wilcoxon rank sum test $p < 0.05$). Así mismo, se encontraron clases representativas de los filos de Firmicutes y Proteobacteria sobrerrepresentados en el grupo SPOB, incluyendo Clostridia, Negativicutes y Deltaproteobacteria (Figura 38A).

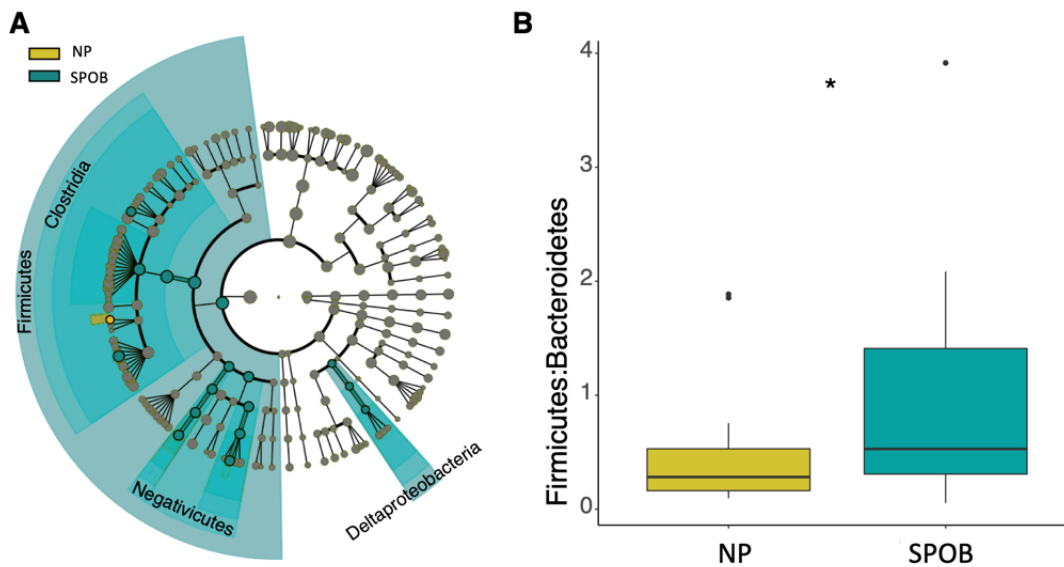


Figura 38. Taxa bacterianos que contribuyen a las diferencias entre la microbiota del grupo NP (amarillo) y SPOB (turquesa) obtenidos mediante LEfSe (análisis lineal discriminante de tamaño de efecto). **(A)** Cladograma mostrando la comparación entre el grupo NP y SPOB, donde los colores resaltan los grupos taxonómicos diferenciales entre ambos. **(B)** Firmicutes:Bacteroidetes (F/B) entre el grupo NP y SPOB. La comparación se obtuvo mediante WRST *p-value < 0.05 .

Los taxa que mayoritariamente explican las diferencias entre los grupos de IMC incluyen *Eubacterium* sp, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Dialister*, *Monoglobus pectinilyticus* y *Bifidobacterium pseudocatenulatum* en el grupo con SPOB. Mientras que *Intestinibacter bartlettii*, *Bacteroides intestinalis* y *Bacteroides uniformis* resultaron tener un tamaño de efecto significativo en el grupo NP (puntajes- scores LDA (log10) < -2 y > 2 , $p < 0.05$) (Figura 39).

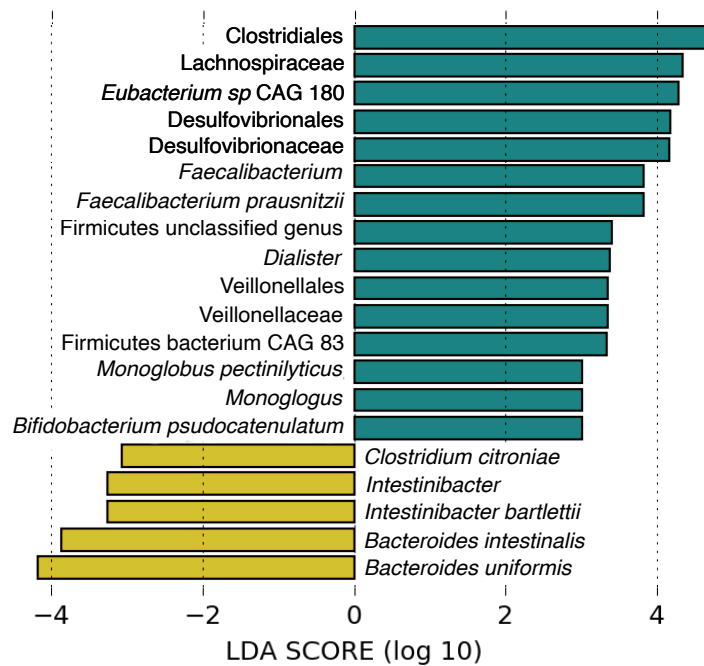


Figura 39. Taxa bacterianos que contribuyen a las diferencias entre la microbiota del grupo NP (amarillo) y SPOB (turquesa) obtenidos mediante LEfSe (análisis lineal discriminante de tamaño de efecto). Lista de los taxa diferencialmente abundantes entre las comunidades microbianas del grupo NP y SPOB. El puntaje LDA (log10) está indicado en la parte inferior de la gráfica, $p < 0.05$.

Otros taxa marginalmente diferenciales entre ambos grupos incluyen *Methanobrevibacter smithii*, *Roseburia*, *Eubacterium rectale*, *Oscillibacter*, *Odoribacter laneus*, *Lactococcus lactis*, *Fusicatenibacter saccharivorans*, *Dorea longicatena*, *Clostridium paraputrificum*, *Eubacterium hallii*, *Coprococcus catus*, *Bilophila wadsworthia*, *Porphyromonas asaccharolytica*, *Prevotella buccalis*, *Parvimonas*, *Alistipes timonensis*, *Tyzzereella nexilis*, *Clostridium citroniae* y *Bacteroides finegoldii* (puntajes LDA (log10) < -2 y > 2 , $p < 0.1$) (Figura 40).

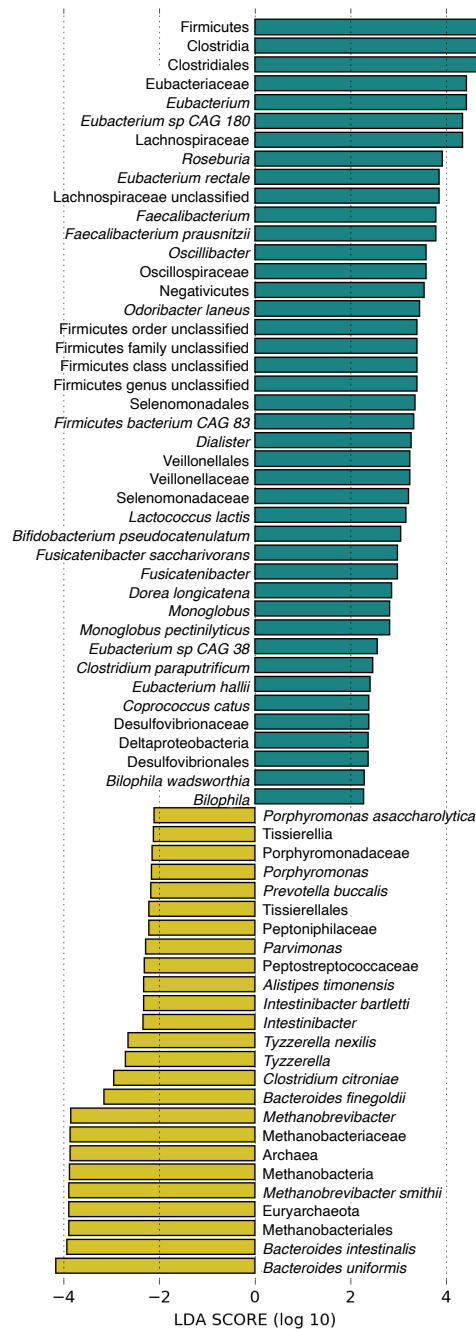


Figura 40. Lista de taxa bacterianos y arqueas que contribuyen a las diferencias entre la microbiota del grupo NP (amarillo) y SPOB (turquesa) obtenidos mediante LEfSe (análisis lineal discriminante de tamaño de efecto). El puntaje-score LDA (log10) está indicado en la parte inferior de la gráfica, $p < 0.1$.

El potencial metabólico del microbioma, resumido por vías MetaCyc y Comisión de Enzimas “nivel 4” (EC), es diferente entre NP y SPOB. Se obtuvieron 436 vías anotadas a través de MetaCyc. La abundancia diferencial entre vías resultó en mayores puntajes LDA (puntajes LDA

(\log_{10})>2) en el grupo SPOB comparado con el de NP, en la vía de biosíntesis de aminoácidos (biosíntesis de L-arginina y L-ornitina), la vía de biosíntesis de cofactores, transportadores y vitaminas (biosíntesis de coenzima A y vitamina B5, y la vía de formación de tiamina), las vías de biosíntesis y degradación de nucleósidos y nucleótidos (biosíntesis de UMP, biosíntesis de ribonucleótido 5-aminoimidazol, biosíntesis *de novo* de deoxiribonucleótidos de pirimidina y degradación de ribonucleótidos de purina), la vía de degradación de hidratos de carbono y azúcares (degradación de galactosa y estaquiosa) y la vía de biosíntesis de aminas y poliaminas (biosíntesis de norespermidina) (Figura 41). Las vías con mayor abundancia en el grupo NP incluyen a la vía de la degradación y fermentación de aminoácidos (degradación de L-glutamato VIII, fermentación de succinato a butanoato), la vía de biosíntesis de cofactores, transportadores y vitaminas (supervía de biosíntesis de dimetilmenaquinol, supervía de biosíntesis de menaquinol y el ciclo gama-glutamil), la vía de biosíntesis de aminas y poliaminas (supervía de biosíntesis de arginina y poliaminas) y la vía de biosíntesis de lípidos.

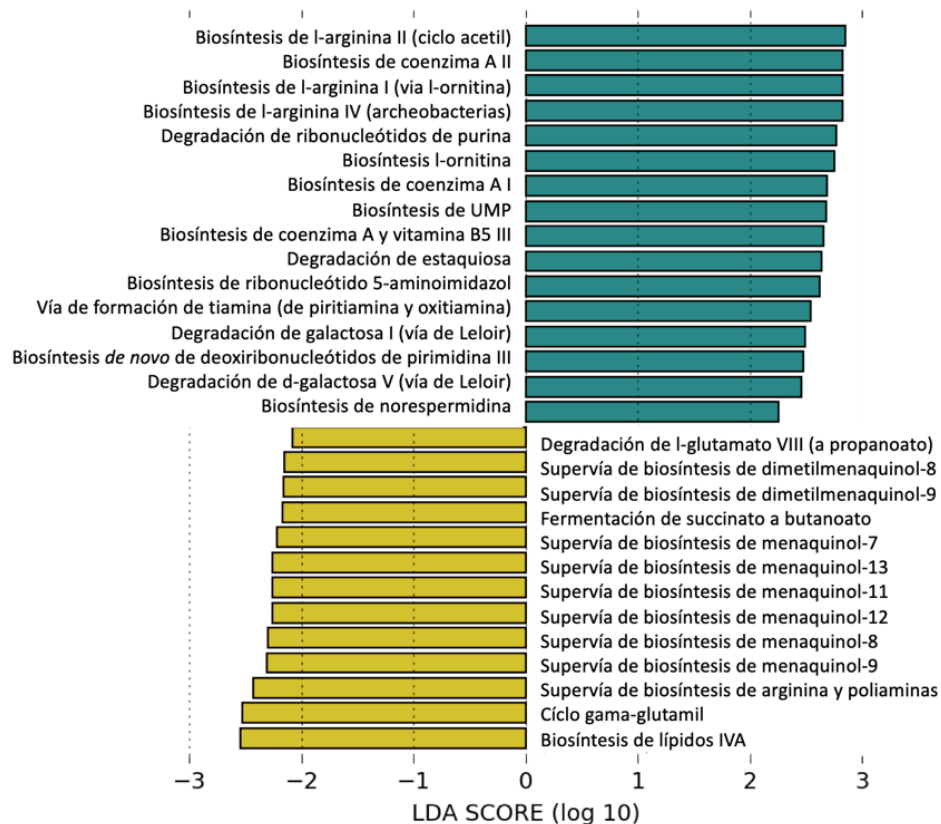


Figura 41. Resumen del análisis lineal discriminante de tamaño de efecto (LEfSe). Lista de vías resumidas por MetaCyc diferencialmente abundantes entre los microbiomas del grupo NP (amarillo) y SPOB (turquesa). El puntaje-score LDA (\log_{10}) está indicado en la parte inferior de la gráfica, $p < 0.05$.

Las vías que se encontraron diferencialmente abundantes entre los grupos NP y SPOB se identificaron en 35 genomas de taxas anotados (Figura 42; figura y tabla anexada como suplemento 16 y suplemento 17). Las abundancias de las vías se encuentran contribuidas mayoritariamente por los géneros *Escherichia*, *Bacteroides*, *Faecalibacterium*, *Eubacterium*, *Bifidobacterium*, *Blautia*, *Ruminococcus* y *Roseburia*.

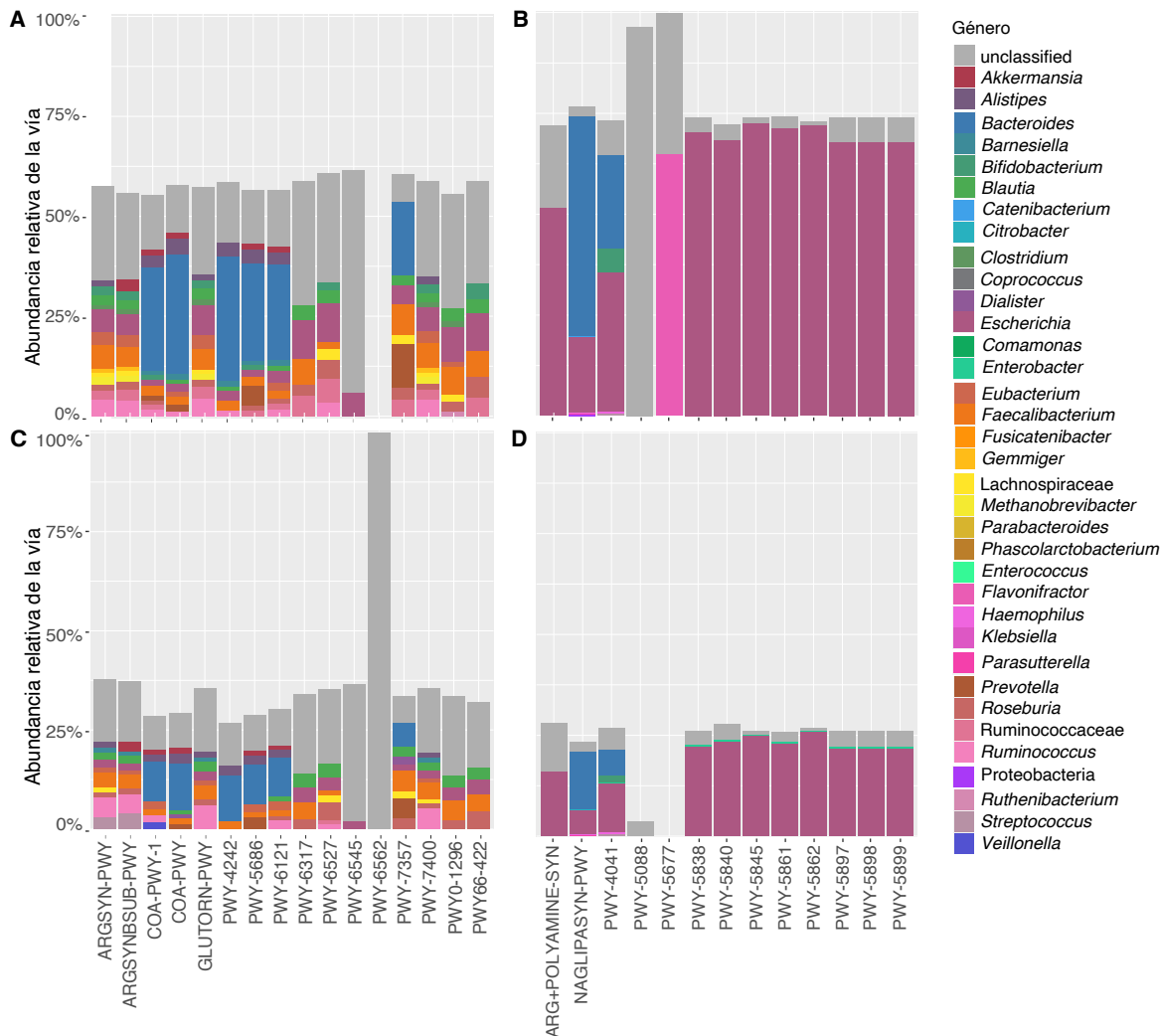


Figura 42. Gráfico de barras estratificado. Cada barra representa una vía (MetaCyc) que mayoritariamente explica las diferencias entre NP y SPOB determinadas por LEfSe (Linear discriminant analysis Effect Size). Los paneles muestran las estratificaciones por contribución de taxa a la vía del grupo de NP (**A & B**, n = 26), SPOB (**C & D**, n = 19). Las vías se identifican por sus siglas en inglés: ARGSYN-PWY: L-arginine biosynthesis I (vía L-ornithine), ARGSYNBSUB-PWY: L-arginine biosynthesis II (acetyl cycle), COA-PWY-1: coenzyme A biosynthesis II (mammalian), COA-PWY: coenzyme A biosynthesis I, GLUTORN-PWY: L-ornithine biosynthesis, PWY-4242: pantothenate and coenzyme A biosynthesis III, PWY-5686: UMP biosynthesis, PWY-6121: 5-aminoimidazole ribonucleotide biosynthesis I, PWY-6317: galactose degradation I (Leloir pathway), PWY-6527: stachyose degradation, PWY-6545: pyrimidine deoxyribonucleotides de novo biosynthesis III, PWY-7357: thiamin formation from pyrithiamine

and oxythiamine (yeast), PWY-7400: L-arginine biosynthesis IV (archaeobacteria), PWY0-1296: purine ribonucleosides degradation, PWY66-422: D-galactose degradation V (Leloir pathway), ARG+POLYAMINE-SYN: superpathway of arginine and polyamine biosynthesis, NAGLIPASYN-PWY: lipid IVA biosynthesis, PWY-4041: γ -glutamyl cycle, PWY-5088: L-glutamate degradation VIII (to propanoate), PWY-5677: succinate fermentation to butanoate, PWY-5838: superpathway of menaquinol-8 biosynthesis I, PWY-5840: superpathway of menaquinol-7 biosynthesis, PWY-5845: superpathway of menaquinol-9 biosynthesis, PWY-5861: superpathway of demethylmenaquinol-8 biosynthesis, PWY-5862: superpathway of demethylmenaquinol-9 biosynthesis, PWY-5897: superpathway of menaquinol-11 biosynthesis, PWY-5898: superpathway of menaquinol-12 biosynthesis, PWY-5899: superpathway of menaquinol-13 biosynthesis.

Por otro lado, encontramos que la información metabólica y dietaria se asocian con taxas específicas de la microbiota intestinal y con la capacidad funcional. Se identificaron a la edad y sexo como variables significativamente asociadas con la composición del microbioma (adonis-PERMANOVA $p < 0.05$), concordante con resultados previos (135–137). De acuerdo con este resultado, se corrigió por edad y sexo en los análisis que involucraron perfiles taxonómicos a nivel de especies.

Para identificar los taxa individuales asociados con las variables metabólicas y dietarias, analizamos la abundancia a través del uso de modelos lineales generalizados. Se buscaron asociaciones con las covariables de índice cintura-cadera (W:H), glucosa (Glu), triglicéridos (TG) y colesterol total (TC) (Figura 43); y con los datos dietarios estimados a partir del CCFA que incluyen energía total, el patrón dietario 1 y 2, el porcentaje de consumo de proteína, fibra, hidratos de carbono, azúcares, lípidos, ácidos grasos saturados (S-FA), ácidos grasos trans (T-FA), ácidos grasos monoinsaturados (MUFA) y ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) (Figura 44). En estos análisis se usaron abundancias relativas transformadas de los datos microbianos composicionales con corrección por inflación de ceros. A través del análisis de la asociación de las especies individuales con los parámetros metabólicos de la población, se encontraron 32 taxa significativos con respecto al W:H, 28 taxa con los niveles de glucosa en sangre, 33 con triglicéridos y 36 con colesterol (p , q y FDR < 0.05 , tabla anexada como suplemento 18). *Victivallis vadensis*, *Ruminococcus* sp, Ruminococcaceae bacterium D5, *Prevotella* sp, *Mitsuokella multiacida* y *Clostridium* sp se asociaron negativa y predominantemente con los parámetros metabólicos. Mientras que *Parvimonas* sp, *Klebsiella variicola*, *Gemella morbillorum*,

Enterococcus mundtii, *Citrobacter youngae*, *C. portucalensis* y *C. europaeus* mostraron asociación positiva con los mismos (Figura 43).



Figura 43. Mapa de calor indicando las asociaciones significativas encontradas entre las abundancias de los taxos microbianos, los datos antropométricos (índice cintura-cadera: W:H), los parámetros metabólicos de glucosa (mg/dl), triglicéridos (mg/dl) y colesterol total (mg/dl) en sangre usando modelos lineales de asociación multivariada (MaAsLin2). La lista completa de taxa, coeficientes, errores estándar, valores p, q y FDR se enlistan en la tabla anexada como suplemento 18.

Para el análisis de la información dietaria estimada a partir del CFCA encontramos 46 taxa significativamente asociadas con la energía total consumida, 40 con el patrón dietario 1 y 52 con el patrón dietario 2; y los porcentajes de consumo de proteínas con 38 taxa, de fibra con 35, de hidratos de carbono con 30 taxa, azúcares con 39, lípidos con 31 y el porcentaje de consumo de los ácidos grasos saturados, trans, poli y monoinsaturados con 25, 36, 36 y 37 taxa,

respectivamente (valor p, q y FDR <0.05, tabla anexada como suplemento 18). *Streptococcus vestibularis*, *Prevotella corporis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Megasphaera elsdenii*, *Klebsiella variicola*, *Citrobacter youngae*, *C. portucalensis*, *C. europaeus*, *Butyrivibrio* sp, *Bacteroides egerthii*, *Bacteroides coprophilus* y *Alloprevotella tannerae* se asociaron positivamente al consumo de energía total (Figura 44). Curiosamente, la mayoría de estos taxa también se encontraron asociados con los parámetros metabólicos de la población de estudio (Figura 43). Los taxa relevantes asociados con el consumo de proteínas e hidratos de carbono complejos, o grasas saturadas e hidratos de carbono simples incluyen *Streptococcus mutans*, *S. macedonicus*, *Ruminococcus* sp, *Propionibacterium acidifaciens*, *Prevotella corporis*, *Parascardovia denticolens*, *Mogibacterium diversum*, *Methanobrevibacter smithii*, *Lactobacillus iners*, *L. delbrueckii*, *Enterococcus mundtii*, *Dorea* sp, *Desulfovibrionaceae* bacterium, *Bacteroidales* bacterium, *Alloprevotella tannerae*, *Actinomyces odontolyticus* y *Acinetobacter johnsonii* (Figura 44). De manera interesante, la mayoría de los taxa asociados positivamente con el patrón de consumo 2 se asociaron negativamente con el patrón 1. Las asociaciones de algunos taxa con el patrón 2 mostraron la misma tendencia en sus asociaciones con el porcentaje de consumo de macronutrientes. Consecuentemente, encontramos *Citrobacter* spp y *Klebsiella variicola* asociadas con el porcentaje de consumo de azúcar, lípidos y ácidos grasos saturados y trans. Por otro lado, encontramos asociaciones de *Victivallis vadensis*, *Ruminococcaceae* bacterium, *Mitosukella multiacida* y *Clostridium* spp con el porcentaje de consumo de proteínas, fibra, hidratos de carbono, ácidos grasos monoinsaturados y poliinsaturados (Figura 44).

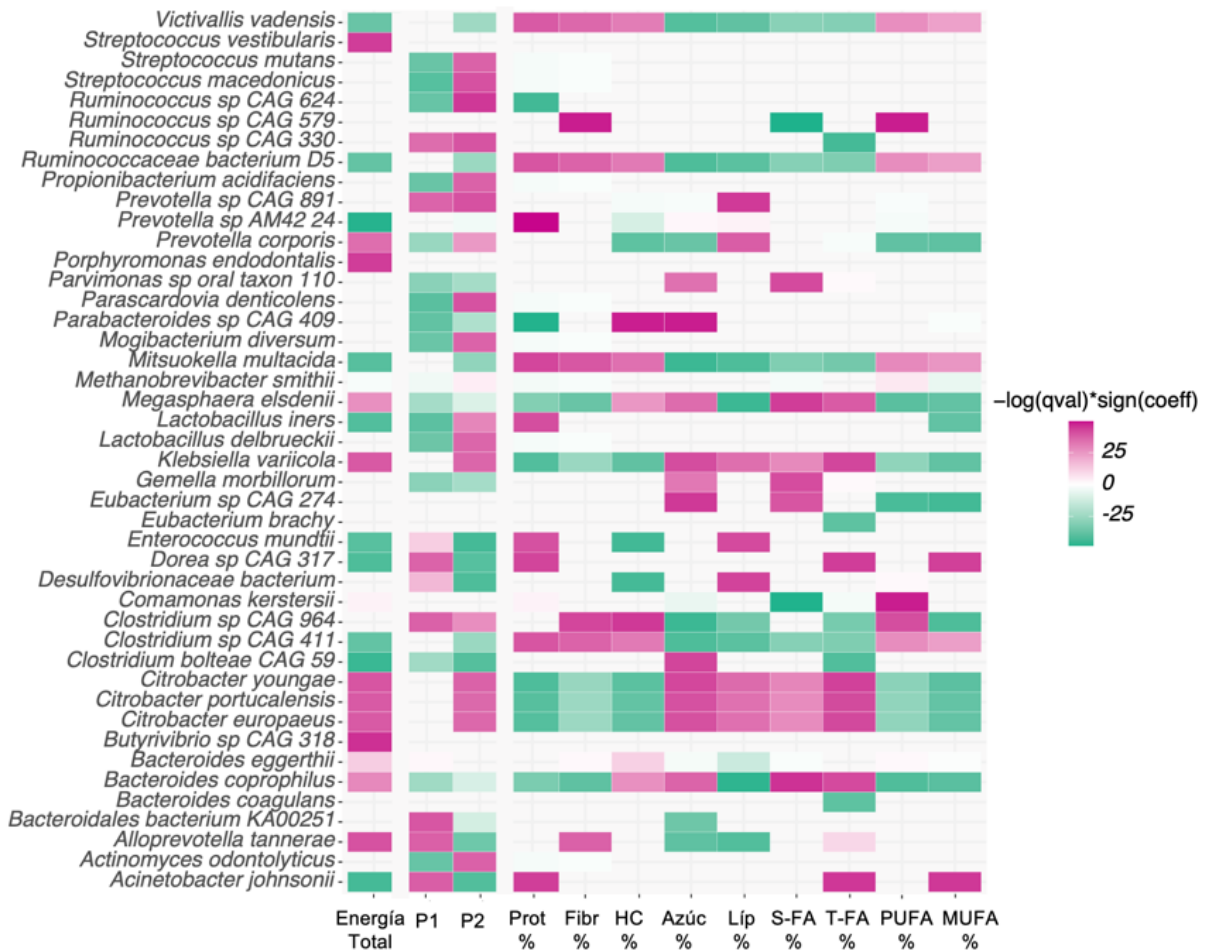


Figura 44. Mapa de calor indicando las asociaciones significativas entre la abundancia de los taxa microbianos y la información dietaria obtenida a través del CFCA usando modelos lineales de asociación multivariada (MaAsLin2). La lista completa de taxa, coeficientes, errores estándar, valores p, q y FDR se enlistan en la tabla anexada como suplemento 18. P1: patrón 1, P2: patrón 2, Prot: proteínas, Fibr: fibra, HC: hidratos de carbono, Azúc: azúcares, Lip: lípidos, S-FA: ácidos grasos saturados, T-FA: ácidos grasos trans, PUFA: ácidos grasos poliinsaturados y MUFA: ácidos grasos monoinsaturados.

Para profundizar en el análisis de como la capacidad funcional de la microbiota se relaciona con los parámetros metabólicos y el consumo de la dieta en la población de estudio, se evaluaron las vías metabólicas anotadas con MetaCyc y el nivel 4 de la comisión de enzimas (ECs) obtenidas a través de HUMAnN3 (138,139). Para el análisis de la capacidad funcional usando las anotaciones de MetaCyc se ajustó por los valores reportados de actividad física (adonis-PERMANOVA, $p < 0.05$) y para los ECs se ajustó por edad (adonis-PERMANOVA, $p < 0.05$) (tabla anexada como suplemento 19).

Las asociaciones significativas con los valores de IMC (puntajes-z), triglicéridos y colesterol total en sangre, el porcentaje de consumo de ácidos grasos trans y el patrón 2 de alimentación incluyeron agrupaciones de genes en 3 vías y seis familias de genes (Tablas 10 y 11). El IMC se asoció negativamente con el ciclo gamma-glutamil y liasa amonio-aspartato ($p < 0.05$ y $q < 0.1$). La vía de degradación de la estaquiosa se asoció positivamente con los niveles sanguíneos de triglicéridos de la población; y el cofactor molibdeno guanililtransferasa, dipeptidasa E y alcohol deshidrogenasa se asociaron positivamente al colesterol total en sangre ($p < 0.05$ y $q < 0.1$). El porcentaje de ácidos grasos trans se asociaron positivamente con la biosíntesis II de 1-4-dihidroxi-6-naftoato y negativamente a la familia de genes de la arabinosa-5-fosfato isomerasa ($p < 0.05$ y $q < 0.05$). La piruvato-sintasa se asoció positivamente con el consumo dietario correspondiente al patrón 2 ($p < 0.05$ y $q < 0.1$).

Tabla 10. Asociaciones obtenidas a través de MaAsLin2 (modelos lineales de asociaciones multivariadas) entre la capacidad funcional de la microbiota resumida como MetaCyc y la información metabólica y dietaria de la población ajustada por actividad física.

Vía (MetaCyc)	Efecto	coef	95% IC	<i>p</i>	<i>q</i>	
PWY.4041	Ciclo gamma glutamil	IMC puntajes-z	-0.0006725	(-1.01e-03, -3.34e-04)	0.000358	0.08601319
PWY.6527	Degradación de estaquiosa	Triglicéridos mg/dl	0.00064815	(2.98e-04, 9.98e-04)	0.00076372	0.09088224
PWY.7371	Biosíntesis de 1-4-dihidroxi-6-naftoato II *	Ácidos grasos trans %	0.0001006	(5.69e-05, 1.44e-04)	5.21E-05	0.02306976

*: $p \leq 0.05$.

Tabla 11. Asociaciones obtenidas a través de MaAsLin2 (modelos lineales de asociaciones multivariadas) entre la capacidad funcional de la microbiota resumida como ECs nivel 4 y la información metabólica y dietaria de la población ajustada por edad.

Nivel 4 de la comisión de enzimas (ECs)	Efecto	coef	95% IC	<i>p</i>	<i>q</i>	
X4.3.1.1	Liasa amonio-aspartato	IMC puntajes-z	0.38241	(-5.39e-01, -2.26e-01)	2.19E-05	0.07349

X2.7.7.77	Cofactor molibdeno guanililtransferasa	Colesterol Total mg/dl	0.31827 9	(1.56e-01, 4.80e-01)	0.00040 1	0.09008 4
X3.4.13.2 1	Dipeptidasa E	Colesterol Total mg/dl	0.28743 6	(1.40e-01, 4.35e-01)	0.00044 2	0.09008 4
X1.1.1.1	Alcohol deshidrogenasa	Colesterol Total mg/dl	0.25916 7	(1.25e-01, 3.94e-01)	0.00049 9	0.09310 7
X1.2.7.1	Piruvato-sintasa	Patrón 2	0.41508 5	(2.46e-01, 5.84e-01)	1.96E-05	0.06591 5
X5.3.1.13	Arabinosa-5-fosfato isomerasa *	Ácidos grasos trans %	- 0.69772 8	(-9.63e-01, -4.33e-01)	6.33E-06	0.01418

*: $p \leq 0.05$.

La diversidad de los factores de virulencia en la microbiota intestinal es diferente entre el grupo con NP y SPOB. La obesidad ha sido asociada con procesos inflamatorios que incluyen la endotoxemia relacionada con los lipopolisacáridos (LPS) (140,141). Se utilizó ABRicate para mapear genes de factores de virulencia en la VFDB (Virulence Factor Database). Se obtuvieron 6711 anotaciones a lo largo de 526 factores de virulencia. Después de filtrar por cobertura ($\geq 50\%$) e identidad ($\geq 75\%$) se identificaron 237 factores de virulencia presentes en nuestras muestras (tabla anexada como suplemento 20). La riqueza y la diversidad alfa evaluada mediante el índice de Shannon fue significativamente mayor en el grupo con NP, en comparación con el de SPOB (Figura 45).

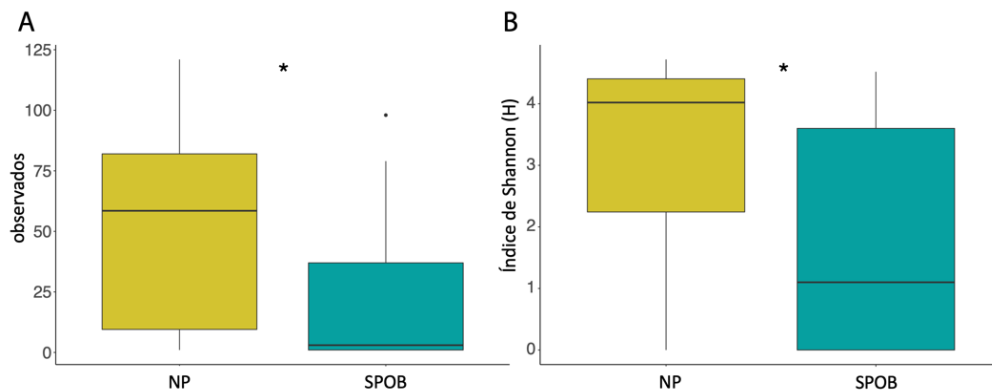


Figura 45. Riqueza (A) e índice de Shannon (H) (B) entre el grupo con NP (amarillo) y SPOB (turquesa). La comparación pareada se obtuvo usando WRST, * $p < 0.05$.

Para los siguientes análisis, los factores de virulencia anotados se agruparon usando su clasificación por identificador (VFID).

La abundancia de los lipooligosacáridos (LOS, CVF 494 y VF 0044) se identificó como diferencial en el grupo con SPOB comparado con el de NP (Tasa de cambio logarítmica= 8.29, $p < 0.001$, FDR < 0.05) (Figura 46, tabla anexada como suplemento 21). La abundancia de los factores de virulencia agrupados por VFID y por categoría no fue diferente entre los dos grupos de IMC (NP y SPOB) (WRST $p > 0.05$).

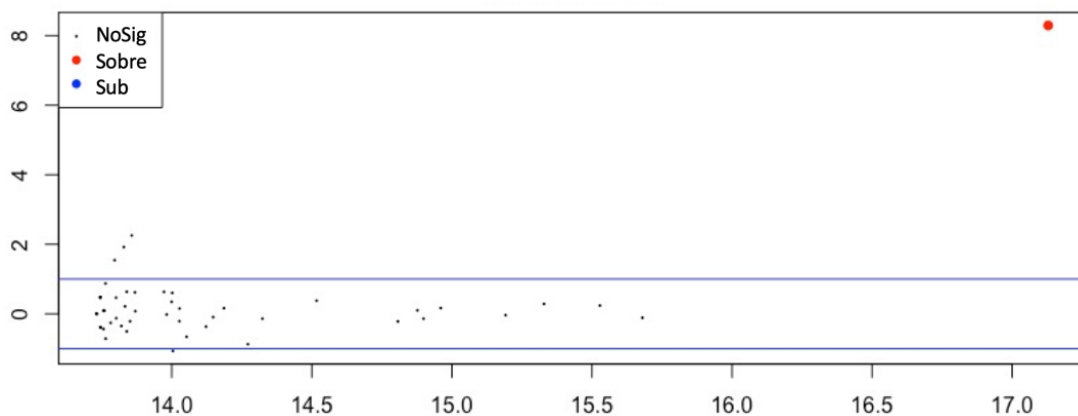


Figura 46. Gráfica MA mostrando la representación diferencial de los factores de virulencia (agrupados por VFID) identificados en la microbiota entre el grupo con SPOB comparado con NP. El grupo de VFID (LOS) diferencialmente anotado $p < 0.05$; ajustados por FDR $p < 0.05$. MA es la relación entre los valores de intensidad (cuentas) y la diferencia entre los datos (eje-y, M= radio logarítmico (el radio de diferencia logarítmica) y eje-x A= promedio del conteo normalizado).

También, evaluamos asociaciones entre los parámetros metabólicos y la información dietaria con las categorías de los factores de virulencia encontradas en los microbiomas de la población de estudio (tabla anexada como suplemento 22). Cinco categorías de factores de virulencia incluyendo exotoxinas, efectores de los sistemas de secreción, adherencia, modulación inmune y factores metabólicos y nutricionales se asociaron con el IMC, W:H; glucosa, triglicéridos y colesterol total en sangre; y con el distinto consumo dietario (Figura 47). Se encontró que la toxina iota y termo-estable (ST), ambas pertenecientes a la categoría de endotoxinas, se asocian positivamente con el IMC. ST también se encontró asociada con el W:H, triglicéridos y colesterol total en sangre. Nueve y siete agrupaciones por VFID pertenecientes a las 5 categorías de factores de virulencia se asociaron positivamente con triglicéridos en sangre y consumo del patrón 1, respectivamente. Seis VFIDs se asociaron negativamente con el porcentaje de

consumo de azúcar. El porcentaje de consumo de lípidos y ácidos grasos trans se encontraron asociados con la categoría de endotoxinas (Figura 47).

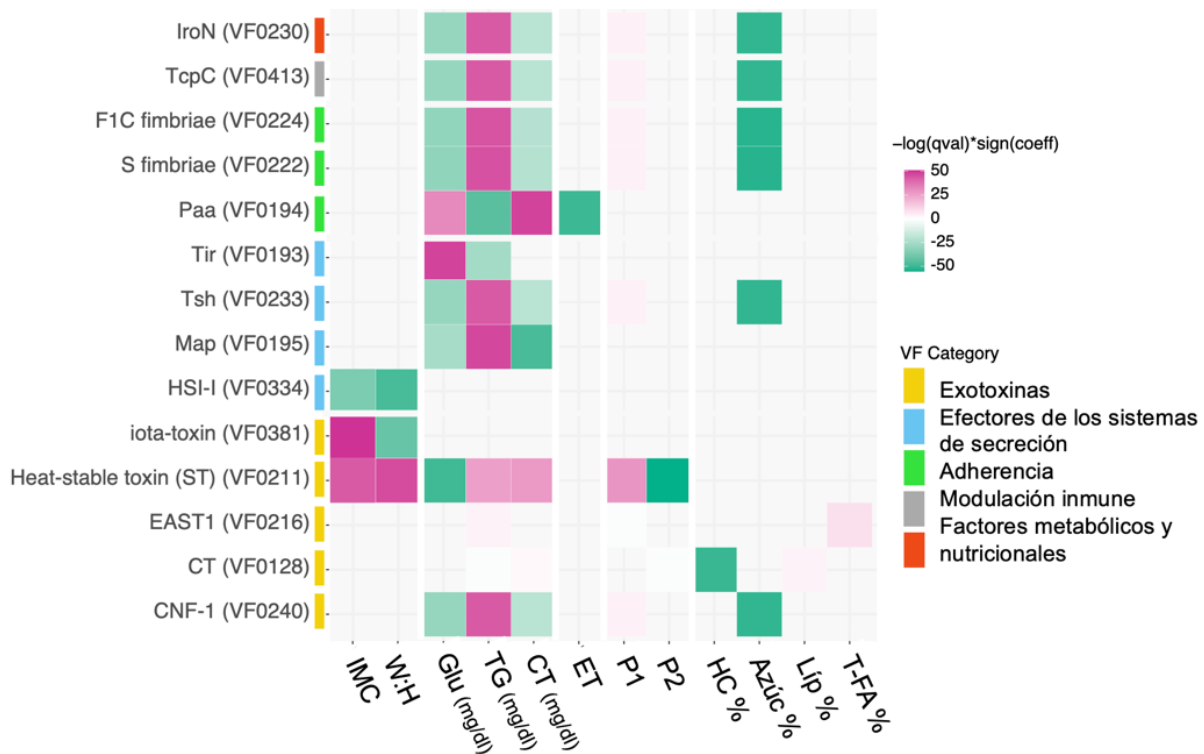


Figura 47. Mapa de calor indicando las asociaciones significativas entre los factores de virulencia agrupados por VFID y la información antropométrica, los parámetros metabólicos y el consumo dietario obtenido a través del CFCA. Las categorías de los factores de virulencia se indican en amarillo (exotoxinas), azul (efectores de los sistemas de secreción), verde (adherencia), gris (modulación inmune) y rojo (factores metabólicos y nutricionales). La lista de VFID, coeficientes, errores estándar, valores p y q se enlistan en la tabla anexada como suplemento 22. IMC: índice de masa corporal, W:H: índice cintura-cadera, Glu: glucosa, TG: triglicéridos, CT: colesterol total, ET: energía total, P1: patrón 1, P2: patrón 2, HC: hidratos de carbono, Azúc: azúcares, Líp: lípidos, T-FA: ácidos grasos trans.

Capítulo 4. Discusión, Conclusiones y Perspectivas

El sobrepeso, la obesidad y el síndrome metabólico asociado en población infantil ha incrementado drásticamente a nivel mundial (142). México se encuentra dentro de los 10 primeros países con mayor índice de obesidad infantil (143). La compleja etiología del sobrepeso y obesidad, así como la obesidad misma, impactan profundamente la calidad de vida (142). Se ha reportado que la obesidad es más prevalente en las mujeres, sin embargo en la población infantil mexicana que formó parte de este estudio no se encontraron diferencias significativas entre la cantidad de niños y niñas con sobrepeso y obesidad (144). En la población infantil de estudio y similar al resultado de estudios previos en la misma población, encontramos mayor acumulación de grasa visceral (W:H) y peso en los datos antropométricos de la población infantil con SPOB comparado con el grupo NP; un vaticinador del fenotipo metabólico de la obesidad (145,146). Los demás criterios que definen al síndrome metabólico, como la tensión arterial, los triglicéridos, colesterol y glucosa en sangre resultaron más elevados en el grupo SPOB, sin embargo, no encontramos diferencias significativas, sugiriendo que este grupo puede estar en mayor riesgo o en el inicio del deterioro metabólico.

La dieta y la microbiota juegan papeles importantes en el desarrollo de la obesidad. Los CFCA permiten el asesoramiento del efecto de la dieta en la composición de la microbiota intestinal a través de diferentes enfoques. Estos incluyen el uso de índices dietarios que capturan la calidad y las características de la dieta en general y de manera dependiente de las cantidades de nutrientes o grupos de alimentos consumidos, permitiendo la asociación entre nutrientes y metabolitos con la microbiota (147). Los CFCA resultan en una herramienta adecuada para estudiar la compleja y variable dieta de los individuos que participaron en el estudio, ya que consideran aproximaciones del consumo de los grupos de alimento y sus cantidades a lo largo de 1 mes. A través del análisis de la información obtenida a través de estos CFCA, obtuvimos dos patrones dietarios en nuestra población de estudio. Los patrones dietarios representan más fidedignamente el consumo alimentario general de un individuo a largo plazo, simplificando la complejidad de la dieta y sacrificando el entendimiento detallado de las interacciones entre nutrientes específicos y la microbiota (147). Es importante resaltar que las personas no consumen nutrientes aislados sino una variedad de alimentos con combinaciones complejas de nutrientes que, a su vez, son interactivos y sinérgicos, haciendo a los patrones de alimentación

una herramienta útil y reproducible (99). Por otro lado, los patrones dietarios que consideran la cantidad y diversidad de los alimentos son de utilidad para formular estrategias para obtener cambios duraderos en la microbiota a largo plazo a nivel poblacional. El consumo de alimentos contenidos en un patrón dietario tiene implícito el complejo efecto sinérgico entre la matriz de múltiples nutrientes que, potencialmente ejerce un mayor impacto a lo largo de la microbiota, comparado con un único nutriente (99). En estudios previos, se han detectado diversos patrones dietarios y se ha asociado el patrón definido como más saludable con la composición de la microbiota intestinal (148). Por ejemplo, una dieta diversa, particularmente heterogénea en el número de diferentes alimentos derivados de plantas, se ha asociado a mayor diversidad en la comunidad microbiana del intestino (149–151). Por otro lado, también se han reportado asociaciones entre la diversidad de la dieta, la composición de la microbiota y los parámetros metabólicos de salud (152). El patrón dietario caracterizado por el consumo de alimentos ricos en proteínas, jugos, vegetales, frutas, botanas y dulces se ha asociado a abundancias relativas incrementadas de *Bacteroidetes*, *Bacteroides* y *Ruminococcus* y disminuidas de *Bifidobacterium*, *Prevotella*, *Blautia* y *Roseburia* en población infantil (153).

A través del análisis de los datos dietarios de la población de estudio (n=45 y n=46) colectados en este trabajo, se generaron patrones dietarios con el objetivo de capturar la complejidad de sus hábitos alimentarios. Un patrón dietario de alta calidad se ha definido por su consumo equilibrado de macronutrientes en el que el 20% de la energía total se extrae de proteínas, 30% de lípidos y 50% de hidratos de carbono, a través del alto consumo de frutas, nueces, vegetales y cereales integrales. Este se ha asociado inversamente a la ganancia de peso y al riesgo de desarrollar obesidad (154). En la población de estudio, el patrón 1 se caracteriza por el consumo de proteínas e hidratos de carbono complejos, que incluyen fibra. En general, los hidratos de carbono son una fuente importante de calorías. Los hidratos de carbono complejos, derivados de alimentos a base de vegetales, son considerados más sanos y constituyen la mayor fracción dietaria que alcanza el intestino grueso donde su efecto es modulado por la variabilidad de la microbiota (155,156). La fermentación de la fibra se lleva a cabo a través de la comunidad microbiana fibrolítica que incluye a los géneros de *Bacteroides*, *Roseburia*, *Ruminococcus* y *Bifidobacterium* (155). De manera concordante, en este estudio se encontró un incremento de *Bacteroides* asociado al consumo de hidratos de carbono complejos. El segundo patrón de este estudio se caracterizó por el consumo de grasas saturadas e hidratos de carbono simples. Los hidratos de carbono simples en la dieta usualmente proveen de calorías sin nutrientes (157). Los hidratos de carbono simples, como son los monosacáridos y disacáridos,

alcanzan el intestino grueso cuando el hospedero se sobrealimenta de azúcares (158). No obstante, no se encontraron asociaciones significativas entre el consumo de los patrones dietarios y el índice de masa corporal de la población infantil.

La microbiota gastrointestinal es un factor biológico que afecta el consumo de energía en el cuerpo humano. Se han reportado diferencias en la diversidad bacteriana, la composición taxonómica y la relación entre phyla entre individuos con normopeso y obesidad (159). Distintos estudios han descrito mayor diversidad microbiana en población infantil con sobrepeso (160,161). En los dos análisis de este trabajo encontramos mayor diversidad alfa en el grupo con SPOB, esta diferencia resultó significativa con la anotación de HUMAnN3 a nivel de géneros. En otros estudios, se ha encontrado mayor diversidad en el grupo con normopeso, sugiriendo que las diferencias de consumo dietario y geográficas juegan un papel importante (162). Por otro lado, consistentemente con reportes previos encontramos una relación F:B elevada en la población infantil con SPOB comparado con los de NP (163). Las taxa más abundantes en el grupo con sobrepeso y obesidad pertenecen a los Firmicutes, mientras que miembros del phylum Bacteroidetes resultaron más abundantes en el grupo de normopeso. Estudios previos han descrito abundancias elevadas del filo Firmicutes y disminuidas de Bacteroidetes en participantes con obesidad comparados con los normopeso, sugiriendo que la diferencia se asocia a la incrementada producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC y SCFAs, por sus siglas en inglés) que parecen tener un rol en la regulación del apetito y que aportan alrededor de un 10% de la energía total dietaria (61,160,161,163–166). Por otro lado, otros estudios no muestran diferencia en la proporción de estos phyla entre los grupos con sobrepeso y obesidad, sugiriendo que la relación F:B no es un marcador de disbiosis robusto para la obesidad (165,167,168).

En los resultados del primer análisis de esta tesis y de acuerdo con los resultados de Murugesan *et.al.* y Maya-Lucas *et.al.*, en la población infantil mexicana con obesidad y sobrepeso no se identificó disbiosis, sino diferencias en abundancias de bacterias particulares en la microbiota intestinal (146,169). Sin embargo, en el segundo análisis de esta tesis se encontró diferencia significativa en la diversidad beta basada en abundancias y distancias filogenéticas (wUF) entre ambas microbiotas de los diferentes grupos de IMC. La diferencia entre ambos resultados de los análisis realizados radica en el método de anotación. Aun cuando ambos (mOTUs y HUMAnN) se basan en marcadores de gen únicos, HUMAnN3 adiciona niveles subsecuentes de anotación resultando una mayor identificación taxonómica. Como resultado de

ambas anotaciones utilizadas en este trabajo, se identificaron integrantes de la familia Porphyromonadaceae, de los géneros *Alistipes*, *Bacteroides* y las especies *Clostridium citroniae*, *Intestinibacter bartlettii* y *Methanobrevibacter smithii* como significativamente más abundantes en el grupo con normopeso comparado con el de sobrepeso y obesidad, de manera consistente con el resultado de estudios previos (62,170–173).

Por otro lado, se han reportado abundancias mayores de Veillonellaceae, *Eubacterium*, *Dialister*, *Lactococcus*, *Roseburia*, *Fusicatenibacter saccharivorans*, *Coprococcus catus*, *Bilophila* y *Bifidobacterium* en la microbiota de individuos con obesidad (166,170,171,174,175). Los miles de millones de bacterias intestinales, incluidas en un intervalo de 500 a 1000 especies distintas, alcanzan la estructura y las funciones características de un microbioma adulto alrededor de los 3 años de vida (176–178). Esta simbiosis entre microbios y hospedero puede ser afectada como consecuencia de cambios transitorios en el ecosistema intestinal (179). El configurador clave de la microbiota intestinal, después de los tres años, es la dieta (180). Los macronutrientes dietarios que incluyen las grasas, proteínas e hidratos de carbono han sido asociados a cambios significativos en la microbiota intestinal (180).

Los resultados de esta tesis muestran que los patrones de alimentación se asocian con los taxa de la microbiota de manera contrastada. La mayoría de los microorganismos asociados negativamente con el patrón 1 se asociaron de manera positiva con el patrón 2. Así mismo, algunos taxa como *Klebsiella variicola*, *Citrobacter youngae*, *C. portucalensis* y *C. europaeus* se asociaron con el patrón 2 y con los parámetros metabólicos analizados. Las dietas altas en hidratos de carbono simples y grasas han sido asociadas a la abundancia de *Klebsiella* y *Citrobacter*, respectivamente (181,182). De manera interesante, la abundancia de *Bacteroides rodentium* cuando el consumo del patrón dietario 1 es elevado y disminuido el del patrón 2 se asocia al incremento del IMC. La presencia de *B. rodentium* parece estar asociado a un fenotipo más delgado cuando se acompaña del elevado consumo de proteínas e hidratos de carbono complejos o por el bajo consumo de grasas saturadas e hidratos de carbono simples. La carne roja es rica en L-carnitina y colina que, se metabolizan en el intestino a través de bacterias como *Prevotella*, *Acinetobacter* y *Desulfovibrio*, en trimetilamina (TMA) que, a su vez, se convierte en trimetilamina N-óxido (TMAO) en el hígado y que ha sido asociado a enfermedades cardiovasculares, hígado graso no alcohólico y enfermedad intestinal inflamatoria (183–185). La proteína y los hidratos de carbono no digeribles se han asociado a incrementos de *Clostridia* y *Ruminococcus*, respectivamente (186,187). En este proyecto se encontraron taxa que incluyen *V. vadensis*, *Ruminococcaceae bacterium*, *Mitsoukella multiacida* y *Acinetobacter johnsonii*

negativamente asociadas a los parámetros metabólicos, y asociadas positivamente a ácidos grasos no saturados ligados a la salud metabólica (185). Más aún, se ha observado que las especies de *Ruminococcus* son la comunidad bacteriana dominante en el intestino de la población infantil mexicana con normopeso (146), apoyando la hipótesis de que este género está asociado a la salud.

La obesidad ha sido asociada al decremento de la abundancia de *Methanobrevibacter smithii*, una arquea metanógena de la microbiota intestinal, que también se encontró mayormente abundante en el grupo con normopeso (188). En el intestino, *M. smithii* juega un papel en la producción de ATP y en la remoción de los productos de la fermentación de otras bacterias que incluyen el metanol y etanol (189,190). Por otro lado, consistentemente con otros estudios, el grupo con sobrepeso y obesidad tuvo mayor abundancia de *Roseburia* (169), la cual se encontró asociada con el bajo consumo de hidratos de carbono complejos y proteínas y el incremento del IMC. Más aún, el consumo de hidratos de carbono como los almidones resistentes, los fructanos y la fructosa (un hidrato de carbono simple) han sido asociados a la abundancia de *Roseburia-Eubacterium* (191). *Eubacterium* y *Roseburia*, entre otros géneros, producen AGCC de productos vegetales, que a su vez se han encontrado elevados en las poblaciones infantiles con obesidad sugiriendo una elevada utilización de sustratos e incrementado cultivo de energía por un microbioma obesogénico (61,161,192). El incremento de *Eubacterium rectale*, entre otros Firmicutes, ha sido relacionada con la obesidad en humanos y a niveles elevados de adiposidad, triglicéridos hepáticos y glucosa en ratones alimentados con fructanos y otros polisacáridos (156,193). Se encontró que la abundancia de *Eubacterium* y *Roseburia* se incrementa con el consumo de azúcar y grasas saturadas, y proteínas, respectivamente, sugiriendo que un tipo de alimentación occidentalizada promueve su proliferación. El consumo alimentario infantil es complejo y no obedece a un solo patrón. La combinación de macronutrientes en un tipo de dieta podría potenciar la disposición de sustratos a distintos géneros, explicando el incremento de *Roseburia* ante el consumo de proteína y fibra (patrón 1). Este resultado es consistente con la asociación encontrada entre *Eubacterium* y el incremento de IMC en niños que tienen un consumo dietario apegado al patrón 2.

También se encontraron asociaciones lineales entre los ácidos grasos monoinsaturados (MUFAs), lípidos, ácidos grasos saturados, ácidos grasos trans, energía derivada de lípidos con la diversidad beta de la microbiota de la población de estudio. Los lípidos de la dieta, ácidos grasos saturados de cadena larga y no saturados, se absorben en forma de micelas por los enterocitos intestinales y son secretados sistémicamente en forma de quilomicrones (194). Los

ácidos grasos saturados son perjudiciales para la salud metabólica y han sido correlacionados con la obesidad, la esteatosis hepática, la diabetes tipo 2 y la inflamación sistémica mediada por IL-6 (195–197). Por otro lado, los MUFAs han sido asociados a estados anti-inflamatorios y constituyen alrededor del 60% de las grasas presentes en la dieta Mediterránea y 36% de la Occidental (194,198). El alto consumo de MUFAs se asocia al incremento de Bacteroides, Prevotella y Faecalibacterium (199,200). De manera contrastada, en este análisis se encontró un decremento en Bacteroides asociado al consumo de lípidos, probablemente correspondientes a ácidos grasos saturados. Los vectores de lípidos ajustados a la diversidad de la microbiota sugieren una divergencia por dieta. Aunado a los resultados anteriores, se encontraron asociaciones entre la sintasa piruvato y el patrón 2, probablemente explicado por el hecho de que el microbioma intestinal humano tiene la capacidad de metabolizar hidratos de carbono en piruvato (201). La variabilidad interindividual en respuesta a la dieta depende de la composición de la microbiota intestinal basal, de su nivel de resiliencia y de los hábitos alimentarios subsecuentes (147,156,202,203).

Como resultado de esta investigación se encontraron distintas especies asociadas negativamente al índice cintura-cadera, glucosa, triglicéridos y colesterol total en sangre. Estas incluyen a *Victivallis vadensis*, *Ruminococcus* sp, *Mitsuokella multiacida*, *Clostridium* sp, *Alistipes* sp y *Acinetobacter johnsonii*. *V. vadensis* es una bacteria Gram negativa, anaerobia estricta y fermentadora de azúcares que ha sido previamente asociada a la salud humana (204–207). La abundancia de esta bacteria, *V. vadensis*, se ha asociado negativamente a la presencia de cólicos y dolor durante una intervención con galactooligosacáridos de cadena corta en individuos con intolerancia a la lactosa (204). Otras intervenciones dietarias que tienen efecto en la presencia de estos grupos bacterianos han sido reportadas. El consumo de hidratos de carbono no digeribles enriquece el género de *Ruminococcus* y consecuentemente la producción de AGCC, mientras que la ingesta de proteína se asocia al incremento en la abundancia de especies del género *Alistipes*; además de promover la secreción de la dipeptidil peptidasa altamente activa en *Mitsuokella multiacida*, que a su vez promueve un estado saludable en humanos (187,208–210). El género *Alistipes* ha sido asociado a efectos protectores ante la fibrosis hepática, colitis y enfermedad cardiovascular (211). Así mismo, las especies de *Acinetobacter* inducen una fuerte respuesta anti-inflamatoria T_H1 en las células inmunes a través de la producción de IL10 y la expresión de los genes antiinflamatorios *FOXP3* y *TGFB* (212).

Por otro lado, los individuos con obesidad han sido asociados a mayores proporciones de especies relacionadas a estados inflamatorios como *F. prausnitzii* y *Dialister* sp (175,213). En esta investigación se encontró a *Klebsiella variicola*, *Gemella morbillorum*, *Enterococcus mundtii*, *Citrobacter youngae*, *C. portucalensis* y *C. europaeus* asociados positivamente al índice cintura-cadera, triglicéridos y colesterol total en sangre. Los géneros de *Klebsiella* y *Gemella* han sido previamente reportadas como biomarcadores asociados al sobrepeso y obesidad (214). Estos géneros son parte de los bacilos coliformes productores de lipopolisacáridos que son parte de las bacterias oportunistas que residen principalmente en el intestino y se asocian al incremento de glucosa en ayuno, IMC y la producción de IL-1 β (215). Por otro lado, *Enterococcus mundtii* es una bacteria ubicua asignada como miembro del grupo de *Enterococcus faecium* y productora de aminos biogénicas y bacteriocinas (216).

Las diferencias en la capacidad funcional, paralela a las diferencias composicionales del microbioma, han sido descritas entre individuos con normopeso y sobrepeso (136,146). De manera concordante, encontramos diferencias significativas en la representación de las vías funcionales entre la microbiota de los niños con normopeso y sobrepeso-obesidad. En el primer análisis encontramos que la capacidad funcional anotada en KOs en el grupo con SPOB resulto ser el doble comparada con el de NP. Vías funcionales de mantenimiento (*housekeeping*) relacionadas al tráfico de membranas, lisosomas, apoptosis y exosomas resultaron enriquecidas en el grupo con NP, mientras que las vías del metano y metabolismo energético resultaron sobre-representadas en el grupo SPOB. El metabolismo energético ha sido previamente predicho como una función de la base KEGG en el grupo de individuos con obesidad, comparados con los delgados (161). La producción de energía se incrementa a través de la fosforilación oxidativa, la glicólisis y la síntesis de ácidos grasos a partir de AGCC, entre otros (172,217). Durante la fermentación de la fibra y de los azúcares, se produce H₂ que, a su vez, se disipa por microbios hirogenotróficos en otros metabolitos como metano (CH₄), acetato y H₂S -gases predominantes en el intestino (218). La remoción de H₂ en el intestino, potencialmente, promueve la efectividad de la fermentación y el incremento de la producción de AGCC y de la absorción de energía (190). Aun cuando *M. smithii* es el metanógeno mayoritariamente responsable de la conversión de CO₂ y H₂ en CH₄, la producción de metano también es influenciada por la cantidad y el tipo de sustratos dietarios (218,219). La excreción de metano se ha identificado asociada al consumo dietario de xilanos y pectina, que son polisacáridos e hidratos de carbono accesibles a la microbiota (MACs, por sus siglas en inglés) respectivamente (220,221). El metano (CH₄) ha sido

descrito como un gasotransmisor que disminuye la motilidad gastrointestinal y como un biomarcador de las alteraciones funcionales del intestino (218,219). Se ha mostrado que la presencia de metano y de hidrógeno en aliento se asocia a mayor IMC y porcentaje de grasa corporal (222,223). De manera que los resultados mostrados en este trabajo apoyan la hipótesis de que el metabolismo del metano es un potencial modulador del balance energético del hospedero (224).

En el segundo análisis se encontró que la abundancia funcional del microbioma de la población infantil con sobrepeso y obesidad incluía la biosíntesis de L-arginina, un amino ácido semi-esencial que se vuelve esencial en períodos de deposición rápida de tejido o estrés (225). Las vías del metabolismo de nucleótidos (biosíntesis de ribonucleótido 5-aminoimidazol, degradación de ribonucleósidos de purina, biosíntesis *de novo* de deoxiribonucleótidos de pirimidina), metabolismo de aminoácidos (biosíntesis de L-arginina y de ornitina) y biosíntesis de pantotenato y CoA también se han encontrado incrementados en el microbioma de niños, adultos seniles y mujeres con obesidad y síndrome metabólico en comparación con individuos delgados y sanos (226–228). El incremento de las vías antes mencionadas podría estar relacionado a que, en individuos con obesidad, frecuentemente hay un incremento en la ingesta alimenticia y una disminución en la actividad física. La degradación de azúcar e hidratos de carbono por el microbioma juegan un papel muy importante en la recolección de energía, explicando posiblemente la abundancia de la degradación de galactosa y estaquiosa en el grupo con SPOB y su asociación positiva con triglicéridos (229). Las vías bacterianas funcionales relacionadas al metabolismo de nucleótidos y lípidos se modulan a través de la actividad física, que en este proyecto se identificó como variable de efecto fijo en el análisis funcional del microbioma (228). Los más abundantes productos de la degradación y fermentación de los amino ácidos de la microbiota son los ácidos grasos de cadena corta (AGCC) y ácidos grasos de cadena ramificada (BCFAs), previamente asociados a la modulación del metabolismo de glucosa y lípidos (201,230).

En este proyecto, también se encontró que el metabolismo de gamma-glutamil se asocia negativamente al IMC, de acuerdo con previas asociaciones negativas con la adiposidad, triglicéridos hepáticos y glucosa en sangre (156). Adicionalmente, el ciclo de gamma-glutamil parece inhibir la señalización de TNF-alfa y reducir la inflamación (Zhang et al., 2015). Las menaquinonas, dimetilmenaquinonas o vitamina K2 son componentes lipofílicos de la membrana citoplasmática de diversas bacterias con funciones redox reversibles que pueden jugar un papel en la sensibilidad a la insulina a través de sus efectos anti-inflamatorios y de disminución de

adiposidad (232). De manera contrastada a los resultados de este proyecto, se ha reportado que las menaquinonas se correlacionan con el IMC en adultos con obesidad de Dinamarca, sugiriendo que los factores como la edad y la dieta pueden jugar un papel en estas diferencias (233). Curiosamente, se encontró a la arabinosa-5-fosfato isomerasa, un gen típico de bacterias Gram negativas que juega un papel en la síntesis de LPS de la membrana externa, asociado negativamente al porcentaje de consumo de ácidos grasos trans (234). Este gen también se ha encontrado en bacterias Gram positivas en donde parece tener un papel regulador del metabolismo y transporte de los hidratos de carbono (235).

A través del reconocimiento de señales y nutrientes, los patobiontes intestinales coordinan la expresión de sus factores de virulencia y ajustan su metabolismo para obtener ventajas en la competición de nutrientes y colonización (236). Los genes de virulencia, usualmente adquiridos por transferencia horizontal, se usan como herramientas de competencia para ganar acceso a nichos únicos e inaccesibles a la microbiota (237). Los factores de virulencia expresados por los patógenos entéricos pueden promover la adherencia a las células epiteliales a través de adhesinas, translocación de efectores bacterianos al hospedero usando sistemas especializados de secreción como los sistemas de secreción tipo tres (T3SS) “tipo jeringa”, cambios de transducción de señales o el uso de toxinas como bacteriocinas para matar competidores bacterianos, la nutrición alternativa que incluye el uso de etanolamina y la inmunomodulación para prolongar la sobrevivencia en el hospedero (80,238).

La mayoría de los determinantes de virulencia se localizan en la superficie externa de la pared bacteriana o se secretan al exterior de la bacteria. Muchos patógenos usan el T3SS como mecanismo de transporte de proteínas efectoras de virulencia a través de la envoltura celular de la bacteria (239). Las proteínas efectoras que perturban los procesos celulares del hospedero son entregadas a través de translocasas que conforman un complejo estructural tipo cuerpo basal, un dominio en cuello y una jeringa externa (239). El locus de borramiento de enterocitos (LEE, por sus siglas en inglés) codifica al T3SS, un elemento de adhesión y un efector, esenciales para formar una lesión de adherencia y borramiento (A/E, attaching and effacing) en los enterocitos (240). Las cepas EPEC y EHEC de *E. coli* activan la expresión de la isla de patogenicidad (PAI) que incluye el LEE en condiciones glucogénicas (238). Adicionalmente, la microbiota gastrointestinal produce metabolitos que tienen el potencial de promover la expresión de los factores de virulencia de los patógenos (241). Por ejemplo, la producción de fucosa o

succinato de la mucina del hospedero por la microbiota, modula la expresión del regulador maestro de los genes LEE en EHEC y promueve la colonización por *C. difficile* (237,238,242,243). Diversas moléculas bacterianas son exportadas por el T3SS codificado por LEE, como el receptor de intimina (Tir) codificado por el gen *espE*. Tir es secretado hacia la célula del hospedero (enterocitos) donde actúa como receptor de la intimina localizada en la superficie bacteriana. Por otro lado, las bacterias Gram-negativas pueden secretar autotransportadores serina-proteasa de Enterobacterias (SPATEs), como Tsh (temperatura sensitive hemagglutinin), a través del sistema de secreción tipo V (T5SS) (244,245). Tsh (VF0233) es una proteína bifuncional con actividad adhesiva y proteolítica que se puede unir a hemoglobina, degradar y transferir el grupo hemo y adherirse al colágeno IV y a la fibronectina (244,246). En este proyecto de investigación se encontró a Tir (VF0193) y Tsh (VF0233) asociados con la glucosa y triglicéridos en sangre, respectivamente. Debido a la escasa información en esta área se desconocen las implicaciones biológicas de estas asociaciones.

La familia Rho de GTPasas pequeñas son reguladoras de la organización de la actina, adhesión celular y migración, tráfico vesicular, citocinesis y apoptosis de células humanas (247). Distintas bacterias patógenas subvierten la señalización de las Rho GTPasas utilizando al T3SS para translocar proteínas efectoras en las células del hospedero. Además de Tir y Tsh, en este proyecto se encontraron otros factores bacterianos incluidos en la categoría de Sistemas de efectores entregados (Effector Delivered System). Map (VF0195) exhibe actividad de factor de intercambio de nucleótidos de guanina (Guanine nucleotide Exchange factors, GEFs); estos regulan la activación e inactivación de las Rho GTPasas a través de GTP y GDP, respectivamente. Las Rho GTPasas, a su vez, median la formación transitoria de un filopodio bacteriano en sitios de adherencia (247,248). HIS-I (VF0334) es parte de las proteínas efectoras translocadas en células procariontes o eucariontes adyacentes a través del sistema de secreción tipo VI (T6SS) de las bacterias Gram-negativas (249). En este estudio se identificaron a Tsh (VF0223), Map (VF0195) y HIS-I (VF0334) en la microbiota intestinal de la población infantil asociadas positivamente a triglicéridos sanguíneos y negativamente asociados al IMC. A pesar de la información obtenida en este estudio, el papel de Tir, Tsh, Map y HIS-I en la obesidad infantil es desconocido, se necesitan más estudios para dilucidar su papel en el desarrollo de las enfermedades metabólicas.

Por otro lado, también se encontraron factores de virulencia incluidos en la categoría de adherencia asociados a los parámetros metabólicos y dietarios. Se encontraron adhesinas que se unen a receptores conformados por ácido siálico (F1C (VF0224), S fimbriae (VF0222) y

adhesina asociada a la lesión A/E porcina (Paa (VF0194)) asociadas con los marcadores bioquímicos metabólicos; la información relacionada de estos factores de virulencia al desarrollo de la obesidad es limitado (250,251).

Toxinas, como los lipopolisacáridos (LPS) se han ligado a la obesidad y a otros desórdenes metabólicos. Los niveles subclínicos de LPS, mayoritariamente inducidos por dietas altas en grasas, son inductores de la inflamación sistémica crónica de bajo grado (140). Los LPS son activadores de la respuesta inmune a través de los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPS, pathogen-associated molecular patterns) característicos de bacterias Gram-negativas (252). Los LPS se unen a las proteínas plasmáticas de unión de LPS (LPS-binding protein, LBP) activando la expresión de varios genes que codifican para efectores inflamatorios como el factor de transcripción NF- κ B y la proteína activadora 1 (AP-1) a través de la proteína receptora CD14, los receptores parecidos al dominio de oligomerización de nucleótidos (nucleotide oligomerization domain, NOD) y TLR4 en la superficie de macrófagos (253).

La contribución de los factores de virulencia a la virulencia debe considerar que son pocos los factores que actúan como determinantes completos o nulos de la misma, que el daño al hospedero es resultado de la virulencia del microbio y de la interacción de los componentes microbianos con el hospedero o con su respuesta inmune y, que los anticuerpos tienen la capacidad de neutralizar la mayoría de estos factores virulentos (69). Las endotoxinas circulatorias se han asociado a incrementos en las citocinas como TNF- α e IL-6 en los adipocitos (254). Adicionalmente, cuando a los LPS les falta la región antigénica O se denominan lipooligosacáridos (LOS) (255). Similar a los LPS, LOS también inducen citocinas proinflamatorias a través de su interacción con TLR4 (256). En este estudio se encontró a la categoría LOS (CVF494, VF0044) sobrerrepresentados en el grupo con SPOB comparados con el de NP, apoyando la conexión entre endotoxinas y la inflamación de bajo grado en el proceso de la obesidad.

Aunado a lo anterior, ha sido reportado que la exposición al butirato proveniente de una dieta alta en fibra promueve la expresión del receptor de la toxina Shiga (Gb3), una citotoxina común a EHEC y *Shigella* (238). De manera interesante, se ha reportado que el acetato, producto del metabolismo de las Bifidobacterias, protege ante la enfermedad severa por EHEC a través del incremento de la función de barrera intestinal y previniendo la endotoxemia por toxina Shiga (257). Se identificaron otros factores de virulencia asociados a los marcadores bioquímicos de la población de estudio de este proyecto. La toxina iota (VF0381) se compone de un elemento de

unión a la célula blanco y otro enzimático que ribosila con ATP a la actina, resultando en la muerte celular (258). Las enterotoxinas termoestables (ST (VF0211), EAST1 (VF0216) y la toxina del cólera (CT (VF0128)) son péptidos relevantes en la inflamación intestinal, la pérdida del balance de electrolitos, la inducción de diarrea y la disrupción de la microbiota (233,259,260). La ST promueve la acumulación intracelular del GMP cíclico (cGMP) que lleva a la liberación de Cl^- y HCO_3^- al lumen intestinal, adicionalmente a la inhibición de la reabsorción de Na^+ (233). El factor 1 citotóxico necrotizante (CNF-1 (VF0240)) es una toxina que modula a la familia de Rho GTPasas a su estado activo unido a GTP, ocasionando la activación de NF- κ B y la liberación de citocinas proinflamatorias y la regulación positiva de la ciclooxigenasa 2 (COX-2) (261,262). Estos hallazgos sugieren que las toxinas bacterianas identificadas juegan un papel, directo o indirecto, en el aumento del IMC y la disfunción metabólica del hospedero a través de la inflamación y, que se asocian con un patrón dietario caracterizado por el alto consumo de proteínas e hidratos de carbono complejos, lípidos y ácidos grasos trans.

De manera interesante, bajo condiciones inflamatorias la concentración de NO_3^- incrementa y la concentración de hierro decrece, promoviendo la adecuación de los patógenos y patobiontes en el ambiente modificado (263). Los sideróforos son quelantes de hierro (Fe^{3+}) producidos por los microbios para secuestrar el nutriente esencial del hospedero (264). Los mecanismos para obtener hierro, como el receptor IroN del sideróforo salmoquelina, son más prevalentes en las bacterias patógenas que en las especies comensales (265). En este estudio se encontró a IroN (Vf0230), un receptor de Fe^{3+} localizado en la membrana externa que posiblemente contribuye al establecimiento de las cepas patógenas en la microbiota intestinal, fuertemente asociado a los niveles de triglicéridos en sangre. También se encontró asociación entre los niveles de triglicéridos y TcpC (VF0413). La proteína inmunomoduladora TcpC (VF0413) combate a las defensas de la inmunidad innata del hospedero a través de la abrogación de la función de MyD88 en los macrófagos, inhibiendo su vía de señalización (266). La Figura 48 resume los diversos factores de virulencia identificados en esta tesis. Estas observaciones sugieren una interacción entre los factores de virulencia, el IMC y los marcadores sanguíneos bioquímicos.

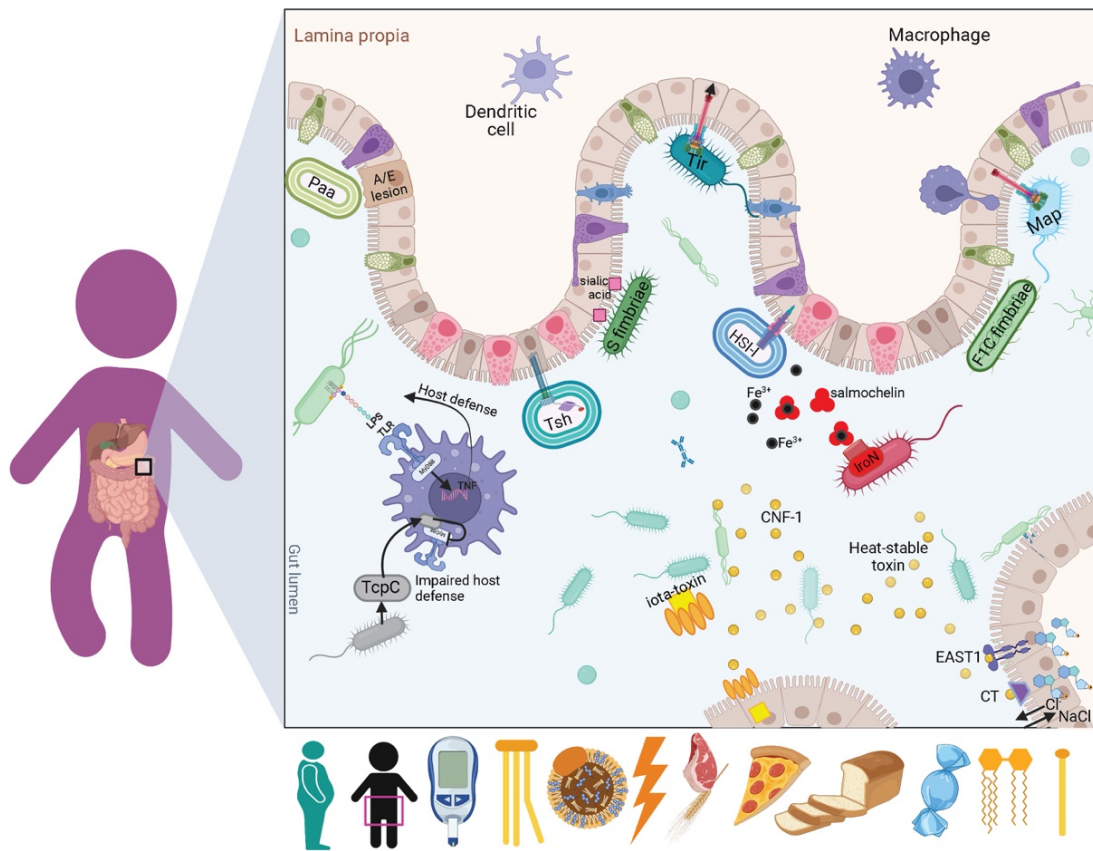


Figura 48. Resumen gráfico de los factores de virulencia en la microbiota intestinal asociados con el IMC, W:H, glucosa (mg/dl), triglicéridos (mg/dl), colesterol (mg/dl) en sangre, energía total, patrón 1 y 2, porcentaje de azúcares, lípidos y ácidos grasos trans. Se esquematizan la lámina propia con células del sistema inmune (moradas), enterocitos, células de Goblet (verde), Paneth (rosas) y el lumen intestinal. Se identificaron factores de virulencia pertenecientes a la categoría de adhesinas (F1C Fimbriae, S Fimbriae y Paa, en verde) de unión a receptores conformados por ácido siálico; a la categoría de moléculas bacterianas secretadas por sistemas (Tir, Tsh, Map y HIS-I en turquesa y azul), a la categoría de proteínas inmunomoduladoras (TcpC (gris) que inhibe la señalización de macrófagos a través de MyD88), la categoría de toxinas (iota, CNF-1, termoestables, EAST1, CT (amarillo) que promueven la inflamación y la liberación de Cl⁻ al lumen) y endotoxinas LPS (verde claro), y la categoría de factores metabólicos y nutricionales (IroN (rojo) receptor del sideróforo de salmoquelina).

Se ha mostrado que la disbiosis induce la permeabilidad intestinal, que ha sido asociada con niveles sistémicos de los productos bacterianos causando inflamación crónica de bajo grado, resistencia a la insulina y efectos lipídicos en el plasma (267). En esta investigación se encontraron parámetros metabólicos asociados con distintos factores de virulencia. La regulación positiva de las citocinas y la activación de la inmunidad innata pueden ser consecuencia de la excesiva ingesta calórica, acumulación de grasa, lipotoxicidad y factores de virulencia (141). La patogenicidad es producto de la combinación de los factores de virulencia y la fisiología del

hospedero, donde el concepto del patobioma emerge como representante de la amplia comunidad que incluye a los agentes patogénicos y potencialmente patogénicos con su ambiente biótico (268,269). En este análisis, se describen las asociaciones encontradas entre la composición taxonómica, capacidad funcional y los factores de virulencia del microbioma con los parámetros antropométricos, metabólicos y la ingesta dietaria en niños con sobrepeso y obesidad; sugiriendo que los factores de virulencia y la función patogénica -características específicas de la comunidad bacteriana del hospedero- tienen el potencial de jugar un papel en el desarrollo de las enfermedades no transmisibles (268).

En conclusión, la obesidad infantil es un factor de riesgo conocido para la obesidad en la vida adulta (270). La infancia representa un periodo crítico en el desarrollo de las bacterias intestinales comensales, donde la resiliencia de la comunidad varía a lo largo de la maduración de la misma (160,271). De manera que se debe prestar especial atención en la identificación de las exposiciones tempranas de la vida modificables y formular estrategias preventivas ante el riesgo de desarrollar obesidad. La composición y el metabolismo de la microbiota son cruciales para determinar la susceptibilidad de la misma y su interacción con el hospedero. El desarrollo de la obesidad es un proceso complejo que involucra a la microbiota intestinal. La microbiota es una comunidad dinámica y su composición es afectada por la dieta y la edad, entre otros factores, que detonan en distintos perfiles de metabolitos que, a su vez, tienen efectos significativos en el hospedero (238). En la población urbana infantil de la Ciudad de México, las proteínas, los hidratos de carbono simples y complejos, así como los lípidos parecen ser factores dietarios claves en las diferentes composiciones de la microbiota de acuerdo al IMC. Los taxa que contribuyen a la diferencia en la diversidad beta entre NP y SPOB se encuentran asociados al tipo de dieta. Por ejemplo, los géneros de *Eubacterium* y *Roseburia* se asociaron con un incremento en el IMC cuando el consumo de grasas saturadas e hidratos de carbono simples era alto y el consumo de proteínas e hidratos de carbono complejos era bajo. Por otro lado, *Bacteroides* se asoció con el decremento del IMC cuando el consumo de hidratos de carbono complejos y proteínas era alto.

En esta tesis se encontraron distintas vías funcionales asociadas a los datos antropométricos, metabólicos y de consumo dietario. Una de ellas fue la asociación del metabolismo del metano con la obesidad que ha sido inconsistente a través de distintos estudios (224). En este estudio se encontraron enriquecidos el metabolismo del metano y el energético

en la microbiota de la población infantil con SPOB, sugiriendo un papel en la modulación del balance energético proveniente de la dieta. Este resultado contribuye a la hipótesis de que el consumo de macronutrientes modifica el perfil de gases intestinales. Por otro lado, los factores de virulencia se encontraron asociados mayoritariamente a los parámetros bioquímicos de la población de estudio.

Las limitaciones de este estudio radican en el análisis de los patrones dietarios que incluyen decisiones relativamente arbitrarias como la formación de los grupos de alimentos, el número de factores a extraer en el análisis de componentes principales y el método de rotación (272). Por otro lado, este método no puede ser específico para identificar nutrientes particulares responsables de la diferencia del riesgo a la enfermedad observada. Es importante mencionar que los patrones dietarios varían de acuerdo a la edad, sexo, nivel socioeconómico, grupo étnico y cultural (99). Adicionalmente, existen diferencias estacionales en el consumo dietario de algunas poblaciones que deben ser tomados en cuenta para el análisis de la composición de la microbiota intestinal. El CFCA utilizado en este estudio se estandarizó y se acopló a la población infantil de México y, aún con las limitantes relacionadas a la recopilación de datos (errores de memoria y medición) la validez del mismo no disminuye dado que considera un error no diferencial. Este instrumento fue aplicado por el mismo personal capacitado a todos los participantes. Aunado a esto, a lo largo de los análisis de esta tesis, sólo se compararon dos comunidades (NP y SPOB) debido al tamaño de la submuestra. Aun cuando se encontraron diferencias composicionales, ampliar el estudio a través de la inclusión del grupo de sobrepeso podría generar más información de las dinámicas y de la transición de estas diferencias. Se requieren más estudios para estratificar a los individuos usando predicciones personalizadas y para identificar biomarcadores microbianos asociados a las distintas respuestas dietarias.

Perspectivas

- Evaluar causalidad entre macro y micronutrientes, composición de la microbiota y el efecto en el hospedero.
- Evaluar en un grupo experimental de ratones la ingesta de proteínas, grasas saturadas, hidratos de carbono simples y complejos para identificar grupos bacterianos susceptibles a estos macronutrientes.
- Identificar diferencias inflamatorias en el hospedero a través de la medición de citocinas, así como estudios de los metabolitos sistémicos en el hospedero.
- Evaluar la expresión de genes y vías metabólicas identificadas en este estudio en un modelo murino, para aportar conocimientos y dilucidar las dinámicas de la microbiota y su interacción con la dieta y el hospedero.

Capítulo 5. Manuscritos Relevantes

A continuación, se recopilan los manuscritos desarrollados como parte de mi investigación doctoral:







Murga-Garrido, S.M. Ulloa-Pérez EJ, Díaz-Benítez CE, Orbe-Orihuela YC, Cornejo-Granados F, Ochoa-Leyva A, Sanchez-Flores A, Cruz M, Burguete-García AI, Lagunas-Martínez A1, *Virulence factors of gut microbiome are associated with BMI and metabolic blood parameters in children with obesity.* Manuscrito en Revisión

Murga-Garrido, S.M. Orbe-Orihuela YC, Díaz-Benítez CE, Castañeda-Márquez AC, Cornejo-Granados F, Ochoa-Leyva A, Sanchez-Flores A, Cruz M, Burguete-García AI, Lagunas-Martínez A. *Alterations of the gut microbiome associated to methane metabolism in Mexican children with obesity.* Children. 2022; 9(2):148.

doi:10.3390/children9020148. PMID: 35204867; PMCID: PMC8870140.

Article

Alterations of the Gut Microbiome Associated to Methane Metabolism in Mexican Children with Obesity

Sofía Magdalena Murga-Garrido ^{1,2}, Yaneth Citlalli Orbe-Orihuela ¹, Cinthya Estefhany Díaz-Benítez ¹, Ana Cristina Castañeda-Márquez ¹, Fernanda Cornejo-Granados ³, Adrian Ochoa-Leyva ³, Alejandro Sanchez-Flores ⁴, Miguel Cruz ⁵, Ana Isabel Burguete-García ^{1,†} and Alfredo Lagunas-Martínez ^{1,*,†}

- ¹ Centro de Investigación sobre Enfermedades Infecciosas, Instituto Nacional de Salud Pública, Cuernavaca 62100, Mexico; sofiamurgaga@gmail.com (S.M.M.-G.); jcitla_oro@hotmail.com (Y.C.O.-O.); cediaz@insp.mx (C.E.D.-B.); cristy_acm@hotmail.com (A.C.C.-M.); aburguete@insp.mx (A.I.B.-G.)
- ² PECEM, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de Mexico 04510, Mexico
- ³ Departamento de Microbiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca 62210, Mexico; fer.cornejog@gmail.com (F.C.-G.); adrian.ochoa@ibt.unam.mx (A.O.-L.)
- ⁴ Unidad Universitaria de Secuenciación Masiva y Bioinformática, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca 62210, Mexico; alejandro.sanchez@ibt.unam.mx
- ⁵ Unidad de Investigación Médica en Bioquímica, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, Ciudad de Mexico 06720, Mexico; mcruzl@yahoo.com
- * Correspondence: alagunas@insp.mx; Tel.: +52-777-329-3000
- † These authors contributed equally to this work.



Citation: Murga-Garrido, S.M.; Orbe-Orihuela, Y.C.; Díaz-Benítez, C.E.; Castañeda-Márquez, A.C.; Cornejo-Granados, F.; Ochoa-Leyva, A.; Sanchez-Flores, A.; Cruz, M.; Burguete-García, A.I.; Lagunas-Martínez, A. Alterations of the Gut Microbiome Associated to Methane Metabolism in Mexican Children with Obesity. *Children* **2022**, *9*, 148. <https://doi.org/10.3390/children9020148>

Academic Editor: Melissa A.E. Lawson

Received: 19 December 2021

Accepted: 20 January 2022

Published: 24 January 2022

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



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Gut microbiota is associated with the development of metabolic disorders. To study its association with childhood obesity, we performed a cross-sectional study with 46 children (6–12 years old). We collected fecal samples, food-frequency questionnaires (FFQs), and anthropometric measurements. Shotgun metagenomics were used to obtain the microbial taxonomic diversity and metabolic potential. We identified two dietary profiles characterized by complex carbohydrates and proteins (pattern 1) and saturated fat and simple carbohydrates (pattern 2). We classified each participant into normal weight (NW) or overweight and obese (OWOB) using their body mass index (BMI) z-score. The ratio of Firmicutes/Bacteroidetes and alpha diversity were not different between the BMI groups. Genera contributing to beta diversity between NW and OWOB groups included *Bacteroides rodentium*, *B. intestinalis*, *B. eggertii*, *Methanobrevibacter smithii*, *Eubacterium* sp., and *Roseburia* sp. *B. rodentium* was associated with lower BMI and dietary pattern 1 intake. *Eubacterium* sp. and *Roseburia* sp. were associated with BMI increments and high consumption of dietary pattern 2. Methane and energy metabolism were found enriched in under-represented KEGG pathways of NW group compared to OWOB. Complex dietary and microbiome interaction leads to metabolic differences during childhood, which should be elucidated to prevent metabolic diseases in adolescence and adulthood.

Keywords: gut microbiome; childhood; obesity; methane; energy; dietary pattern

1. Introduction

Obesity is a multifactorial disease in which increased energy intake is stored as fat [1,2]. It has become a global public health issue, particularly in countries like Mexico, where its prevalence has increased [3].

Disequilibrium of microbiota composition, known as dysbiosis, is common in many inflammatory non-communicable chronic diseases (NCCD) where obesity is included [4–6]. Remarkably, the Firmicutes-to-Bacteroidetes (F:B) ratio has been associated with disease occurrence [7–9]. Children with obesity compared to normal-weighted children have a higher F:B ratio [5,10,11]. In addition, the Firmicutes phylum has been associated with alterations in energy metabolism and positively correlated with energy harvest and fat mass accumulation, whereas the Bacteroidetes proportion has been correlated with loss of fat [8,12].

Bacterial genera, such as *Bacteroides*, *Roseburia*, *Bifidobacterium*, *Faecalibacterium*, and *Enterobacteria*, typically ferment carbohydrates into short-chain fatty acids (SCFA), which in turn bind themselves to G protein-coupled receptors expressed in the intestinal epithelium and adipose tissue [13,14]. Particularly, acetate and propionate can stimulate adipogenesis through GPCR43, whereas butyrate has primarily been associated with health benefits, such as the maintenance of colonic health by moderating cell growth and differentiation of colonic epithelial cells and by restoring intestinal permeability and repressing inflammatory responses [15]. Variations in carbohydrate, protein, and fat intake impact the structure of the microbial community, allowing specific bacterial types to be more prevalent [16–18]. Microbiota components and products interact with the host and affect many physiological processes, thus contributing to inter-individual variation [18]. Microbial metabolism can play important roles in energy extraction from the diet, which can lead to fat deposition and inflammatory processes [19].

Obesity has not only been linked to microbiota's compositional shifts but also to functional alterations [20]. Comparing microbiomes of lean and obese individuals, Thingholm et al. found differences in functional capacity, including decreased superoxide reductase capacity, associated with obesity [20]. Phenotypic differences can be achieved with few gene differences between bacteria, heightening the importance of microbial metabolic potential parallel to taxonomic composition [21,22]. An altered proportion of genes encoding membrane transport functions; butyrate production; cofactor, vitamins, and nucleotide metabolism; and transcription process has been described in populations with obesity and diabetes [20,23,24]. Moreover, bacterial metabolites, such as methane, have been reported as modulators of host energy balance affecting caloric harvest [25]. Methanogens increase the capacity of polysaccharide-eating bacteria to digest polyfructose-containing glycans, leading to increased weight in mice models [26].

The gut microbiome has high inter-individual variability, and it is sensitive to environmental influences; therefore, it is essential to characterize it population-wise to study dysbiosis-associated diseases [27]. In the Mexican infant population, gut microbiome taxonomy, functional composition, and their dynamics are largely unknown; hence, we aim to investigate their characteristics in a group of children between the ages of 6 and 12 years old according to their dietary profile and body mass index. We found microbiome compositional differences involving essential taxa, methane, and energy metabolism between lean and overweight/obese urban children associated to dietary patterns. Since microbiota develops structure, establishes function, and matures throughout infancy and childhood, this is a promising time lap to promote health and prevent later-onset disease.

2. Results

2.1. Overview of the Urban Children Population and Adiposity Classification

This study included a subsample of 46 individuals between 6 and 12 years old from a cross-sectional study previously reported [17]. Recorded individual information includes family history of obesity and overweight, biochemical blood parameters, dietary frequency questionnaire, and current infectious diseases along with phenotypic characterization, including values of age, sex, and body mass index (BMI).

All individuals were grouped into normal weight (NW) or overweight and obese (OWOB) using the World Health Organization (WHO) z-scores for childhood body mass index (BMI) adjusted by gender and age [28]. There were 21 female participants, of which 12 (57%) were classified as normal weight and 9 (43%) as overweight and obese. Meanwhile, from the 25 male participants, 15 (60%) were classified with normal weight and 10 (40%) with obesity (Table 1).

Table 1. General characteristics by BMI status of children from Mexico City.

N = 46		BMI Status	
Characteristics		NW (n = 26)	OWOB (n = 20)
Gender	Female	12 (57%)	9 (43%)
	males	15 (60%)	10 (40%)
Age (years old)		8.03 ± 1.79	8.9 ± 2.1
Weight (kg) ****		25.46 ± 7.29	40.91 ± 12.71
Height (cm) *		127.77 ± 13	135.32 ± 12
Waist: Hip **		0.82 ± 0.037	0.86 ± 0.038
Glucose (mg/dL)		81.15 ± 12.2	81.85 ± 8.45
Triglycerides (mg/dL)		75.23 ± 26.2	103.75 ± 46.43
Cholesterol	HDL(mg/dL)	50.84 ± 10.04	50.85 ± 12.36
	LDL (mg/dL)	100.88 ± 28.68	110.55 ± 32.32
	Total (mg/dL)	152.96 ± 37.95	168.15 ± 42.16
TA	Systole (mean)	93.84 ± 10.27	98.85 ± 10.41
	Diastole (mean)	64.38 ± 9.15	65.12 ± 7.5
Physical activity (Mets)		342.01 ± 293.75	399.86 ± 441.33
Family history of overweight/obesity (%)		50%	70%

The data in this table are presented as mean ± standard deviation for continuous variables or percentage for categorical variables. Mean age was 8 years old for normal-weight group and almost 9 years for the group with overweight and obesity. Weight (p -value = 9.8×10^{-6}), height (p -value = 0.02), and waist-to-hip ratio (p -value = 0.0022) resulted statistically different between both BMI classifications. Glucose, triglycerides, cholesterol, and blood pressure (BP) values were not statistically different although OWOB group showed increased mean values compared to NW. Pairwise comparisons using WRST and t -test were performed to compare data from both groups. ns: $p > 0.05$, *: $p \leq 0.05$, **: $p \leq 0.01$, ****: $p \leq 0.0001$.

2.2. Dietary Profiles in the Urban Children Population

A food-frequency questionnaire (FFQ) was performed individually to calculate the daily intake of each food item (Supplemental Tables S1 and S2) [29]. From this information, we obtained two dietary patterns that were identified and interpreted as “pattern 1,” the healthier pattern characterized by the consumption of proteins and complex carbohydrates, and “pattern 2,” characterized by the consumption of saturated fat and simple carbohydrates (Supplemental Table S3).

A score was obtained for each child that participated based on their reported diet in order to make an approximation on which pattern their diet is more likely to be characterized (Supplemental Table S4). After correcting the p -values for multiple comparisons, we did not find associations between the dietary patterns and the BMI of our population.

2.3. Microbiome Profile in Urban Children Population

Our high-quality microbiota reads were annotated using single copy phylogenetic marker gene (MG)-based operational taxonomic units (mOTUs) [30]. We found 917 taxa annotations across 46 samples further filtered by low abundance, leaving 875 taxa classified into ten phyla (Figure 1; Supplemental Table S5).

The most abundant genera included *Bacteroides*, *Prevotella*, *Alistipes*, *Eubacterium*, *Ruminococcus*, *Akkermansia*, *Dialister*, *Clostridium*, *Faecalibacterium*, and *Barnesiella*. Given that microbiota dysbiosis favors an inflammatory status and impairs energy metabolism, we analyzed NW and OWOB group’s diversity [31,32]. Alpha diversity assessed by Shannon and inverse Simpson diversity index grouped by BMI status showed slightly higher values on the obese and overweight group although differences were not statistically significant (p -value > 0.05) (Figure 2A,B). The ratio between Firmicutes and Bacteroidetes was also higher in OWOB group although no statistical difference was found (p -value > 0.05) (Figure 2C).

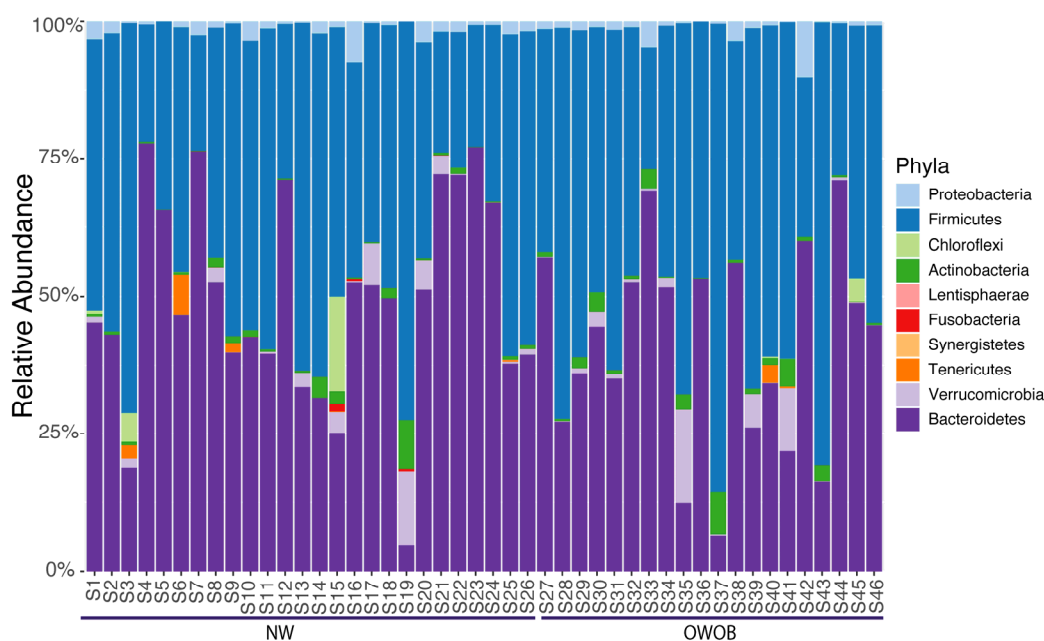


Figure 1. Phylum relative abundance of the 46 samples included in this study ordered by BMI.

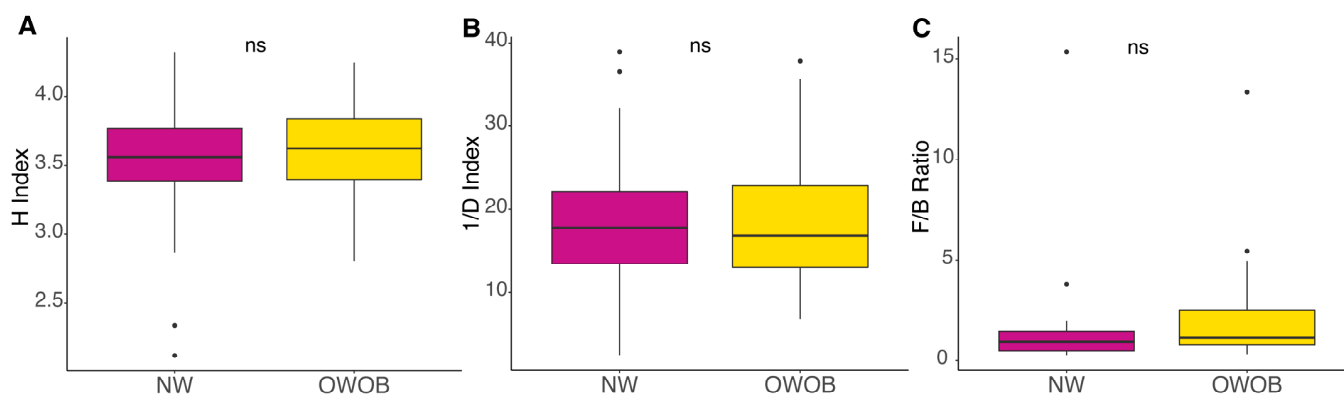


Figure 2. Alpha diversity, (A) Shannon Index (H), (B) Inversed Simpson diversity Index (1/D), and (C) Firmicutes-to-Bacteroidetes ratio (F/B) of normal-weight and obese-overweight groups. NW group is shown in magenta color and OWO in yellow. ns: $p > 0.05$. Pairwise comparisons were obtained using WRST and t -test.

We identified taxa that differ by BMI status performing a similarity of percentages analysis (SIMPER). The taxa that most contribute to beta diversity (Bray–Curtis) by abundance, which cumulatively explain 70%+ of the variation between NW and OWOB groups, include genera and species previously reported as physiologically important (Supplemental Table S6).

We found through the result of this analysis marginal statistical difference between the BMI groups in *Roseburia* sp. (p -value = 0.098), *Bacteroides rodentium* (p -value = 0.055), and *Bacteroides eggerthii* (p -value = 0.073), while *Bacteroides intestinalis* (p -value = 0.0012), *Methanobrevibacter smithii* (p -value = 0.042), and *Eubacterium* sp. (p -value = 0.044) abundance difference was statistically significant (Figure 3). Our results showed that normal-weighted children had increased relative abundance of *B. rodentium*, *B. intestinalis*, *B. eggerthii*, and *Methanobrevibacter smithii*, whereas overweight and obese children had incremented *Eubacterium* sp. and *Roseburia* sp.

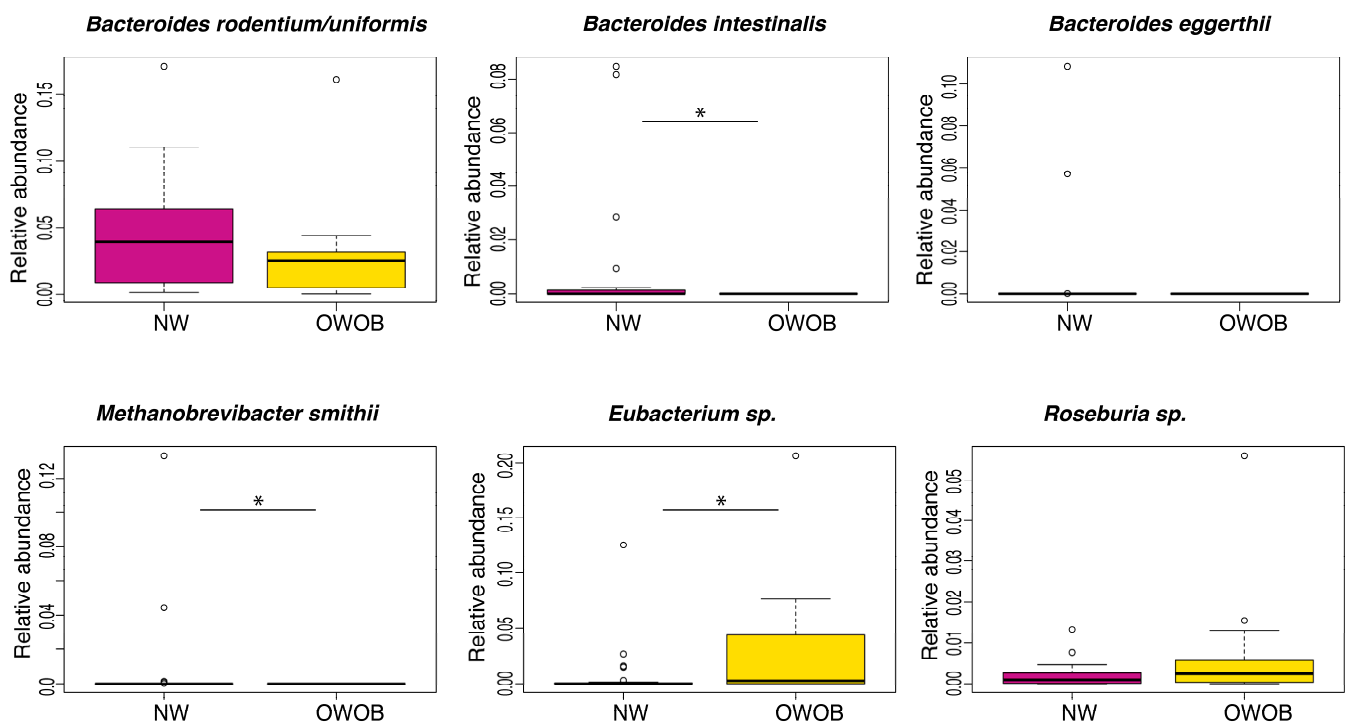


Figure 3. Relative abundance of taxa that showed difference in normal-weight (NW, magenta) group compared to overweight-obese (OWOB, yellow). Pairwise comparisons using Wilcoxon Rank-Sum Test adjusted by FDR: *Bacteroides rodentium/uniformis* p -value = 0.055, *Bacteroides intestinalis* p -value = 0.0012, *Bacteroides eggerthii* p -value = 0.073, *Methanobrevibacter smithii* p -value = 0.042, *Eubacterium sp. CAG:180* p -value = 0.044, *Roseburia* species p -value = 0.098. *: $p \leq 0.05$.

We sought nutritional vectors that fitted the beta diversity ordination to investigate linear relationships that contribute to the direction and strength of the bacterial diversity gradient. Remarkably, we found monounsaturated fatty acids (MUFAs) ($r^2 = 0.1513$, p -value = 0.025), lipids ($r^2 = 0.1185$, p -value = 0.057), saturated fatty acids ($r^2 = 0.1004$, p -value = 0.080), trans fatty acids ($r^2 = 0.1062$, p -value = 0.069), and lipid energy (kcal) ($r^2 = 0.1185$, p -value = 0.057) as vectors in Bray–Curtis beta diversity.

Once we identified the taxa that differ between both BMI groups by similarity of percentage analysis, we performed an association analysis with our population macronutrient intake. In normal-weight-related taxa, *Bacteroides* appeared to increase with the consumption of carbohydrates (*B. rodentium* coef = 0.002, p -value = 0.08; *B. intestinalis* coef = 0.001, p -value = 0.046; *B. eggerthii* coef = 0.0013, p -value = 0.04) and fiber (*B. intestinalis* coef = 0.0014, p -value = 0.085; *B. eggerthii* coef = 0.0017, p -value = 0.04) and decrease with consumption of lipids (*B. rodentium* coef = -0.003 , p -value = 0.06; *B. intestinalis* coef = -0.0016 , p -value = 0.02; *B. eggerthii* coef = -0.002 , p -value = 0.008) (Table 2). *M. smithii* relative abundance decreased with the protein intake (coef = -0.0035 , p -value = 0.046). In overweight- and obesity-related taxa, *Roseburia*, increased with consumption of proteins (coef = 0.0017, p -value = 0.02), fiber (coef = 0.00074, p -value = 0.06), and overall healthier dietary pattern 1 (coef = 0.0029, p -value = 0.02), whereas *Eubacterium* abundance increased with sugar (coef = 0.0016, p -value = 0.007) and saturated fats (coef = 0.002, p -value = 0.007) intake and decreased with fiber (coef = -0.004 , p -value = 0.022), polyunsaturated fats (coef = -0.003 , p -value = 0.024), and dietary pattern 1 (coef = -0.01 , p -value = 0.07).

Table 2. Association analysis between taxa and macronutrient percentage intake.

N = 46	<i>Bacteroides rodentium</i>		<i>Bacteroides intestinalis</i>		<i>Bacteroides eggerthii</i>		<i>Methanobrevibacter smithii</i>		<i>Roseburia sp.</i>		<i>Eubacterium spcag180</i>	
	coef	p	coef	p	coef	p	coef	p	coef	p	coef	p
Carbohydrates (%)	0.002	0.08	0.001	0.046	0.0013	0.04	0.00009	0.9	−0.0004	0.14	−0.0003	0.8
Lipids (%)	−0.003	0.06	−0.0016	0.02	−0.002	0.008	0.0006	0.43	0.0002	0.54	0.001	0.33
Protein (%)	−0.0007	0.83	0.00005	0.97	0.0008	0.62	−0.0035	0.046	0.0017	0.02	−0.004	0.14
Sugars (%)	−0.001	0.1	−0.00009	0.74	−0.0003	0.19	0.00003	0.92	−0.00008	0.55	0.0016	0.007
Fibers (%)	0.001	0.42	0.0014	0.085	0.0017	0.04	−0.0012	0.19	0.00074	0.06	−0.004	0.022
Saturated fats (%)	−0.001	0.17	−0.0003	0.24	−0.0003	0.33	−0.0001	0.69	0.00002	0.86	0.002	0.007
monounsaturated fats (%)	−0.0001	0.92	0.0006	0.37	−0.0003	0.62	−0.0007	0.4	0.00013	0.73	−0.0018	0.25
polyunsaturated fats (%)	0.002	0.12	0.0006	0.35	0.0005	0.43	0.0005	0.49	0.000018	0.95	−0.003	0.024
Trans fat (%)	0.011	0.26	0.0021	0.63	0.0032	0.49	0.004	0.41	−0.0016	0.46	−0.003	0.7
Pattern 1	0.004	0.47	0.002	0.349	0.0036	0.18	−0.0036	0.22	0.0029	0.02	−0.01	0.07
Pattern 2	−0.008	0.14	0.00019	0.94	0.0002	0.92	0.0023	0.44	−0.0005	0.66	0.0009	0.87

Association analysis (linear regression) between taxa and macronutrient percentage intake adjusted by age, sex, and family history of obesity.

We further sought associations between taxa abundance and BMI using z-scores stratified by each, low or high, dietary pattern consumption (Table 3). Higher relative abundance of *Eubacterium sp.* is associated with increased children’s BMI while having a high consumption of dietary pattern 2 (coef = 1.89, p-value = 0.019). A higher abundance of *Roseburia sp.* in addition to low dietary pattern 1 intake is associated with increased children’s BMI (coef = 15.93, p-value = 0.059). Furthermore, the effect of *B. rodentium* abundance on children’s BMI is based on the dietary pattern in a mirror-wise fashion, where a high consumption of proteins and complex carbohydrates (pattern 1) or low consumption of saturated fat and simple carbohydrates (pattern 2) results in the same outcome. *B. rodentium* abundance is associated with lower BMI in children with high dietary pattern 1 consumption (coef = −2.42, p-value = 0.013) and a low dietary pattern 2 intake (coef = −1.61, p-value = 0.053).

Table 3. Association analysis between taxa and BMI z-scores according to dietary pattern intake.

	<i>Bacteroides rodentium</i>		<i>Eubacterium spcag180</i>		<i>Bacteroides intestinalis</i>		<i>Methanobrevibacter smithii</i>		<i>Roseburia sp.</i>		<i>Bacteroides eggerthii</i>	
	coef	p	coef	p	coef	p	coef	p	coef	p	coef	p
Dietary Pattern 1												
low	−0.97	0.28	0.89	0.19	−1.93	0.29	−1.89	0.11	15.93	0.059	−108.5	0.91
high	−2.42	0.013	2.25	0.17	−2.65	0.16	−45.6	0.66	0.102	0.97	−1.72	0.16
Dietary Pattern 2												
low	−1.61	0.053	−0.43	0.77	−1.12	0.57	−141.97	0.25	4.85	0.13	−2.02	0.45
high	−1.53	0.3	1.89	0.019	−3.1	0.12	−1.54	0.26	10.83	0.32	−2.77	0.11

Association analysis between taxa and BMI z-scores according to dietary pattern intake. The linear regression model was adjusted by age, sex, family history of obesity, and by each pattern.

Next, we carried out a gene-prediction analysis to investigate the microbiome functional potential. We assembled 86.06% of the high-quality reads, and 75% of the assemblies reported an N50 higher than 2000 bp. We found 1,582,297 nonredundant genes throughout all our samples. The average number of annotated genes per library was 123,326.67 ± 49,037.8 SD (Supplemental Figure S1), with a length average of 719.44 ± 60.04 pb. There was no gene richness difference between both BMI groups, but interestingly, we found 46 over-represented and 111 under-represented KOs (p-value and FDR < 0.05) in the NW group compared to OWOB (Figure 4; Supplemental Table S7).

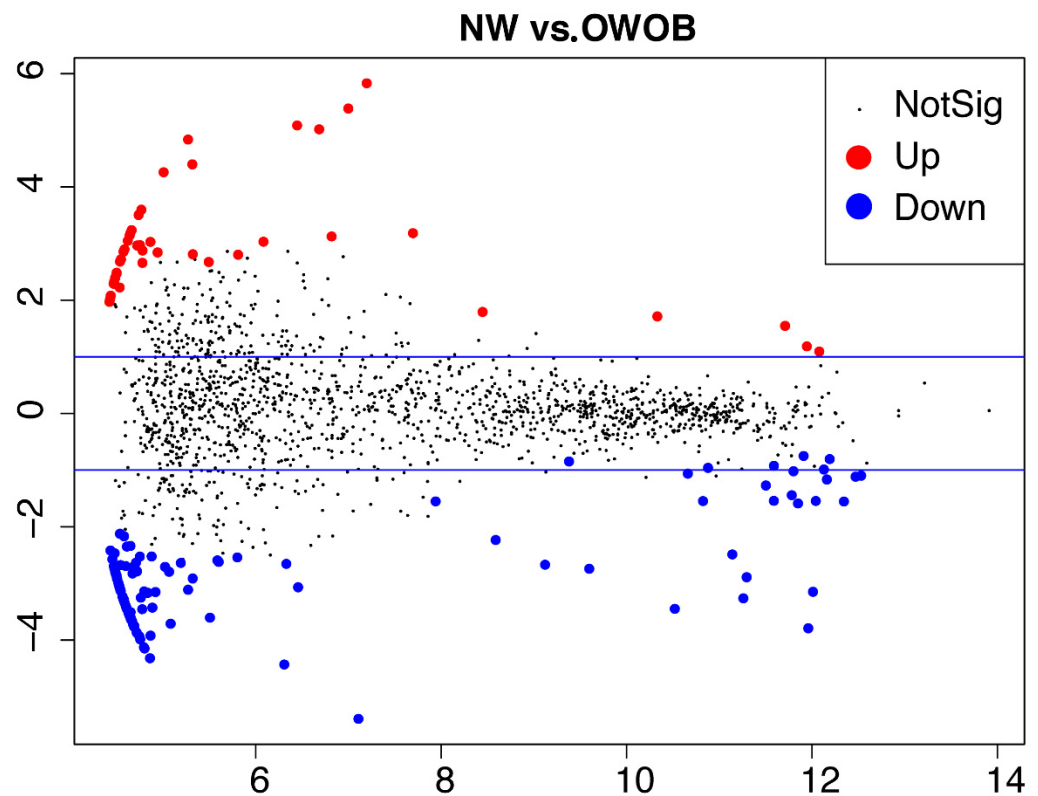


Figure 4. MA-plot showing differential microbiota genes representation (KOs) between normal-weighted vs. overweight and obese children. Differentially expressed genes (DEGs) $p < 0.05$; FDR adjusted $p < 0.05$. MA stands for the relationship between values of intensity (i.e., counts) and difference between the data (y-axis $M = \log$ ratio (log fold change) and x-axis $A = \text{mean, average of normalized counts}$).

We then investigated if each subset of differential KOs associated significantly with KEGG pathways to determine whether known biological functions were enriched in the microbiome of both BMI groups. We found 11 over-represented and 31 under-represented KEGG pathways further filtered by significant statistical difference (p -value) and false-discovery rate (Supplemental Table S8). The over-represented KEGG pathways in the NW group compared to the OWOB were membrane trafficking, lysosome, apoptosis (p -value and BH < 0.05), and exosome (p -value and BH < 0.1) (Figure 5A). Interestingly, methane metabolism, energy metabolism (p -value and BH < 0.05), ribosome biogenesis, and glycerophospholipid metabolism (p -value and BH < 0.1) appeared to be under-represented in NW gut microbiome group compared to OWOB (Figure 5B).

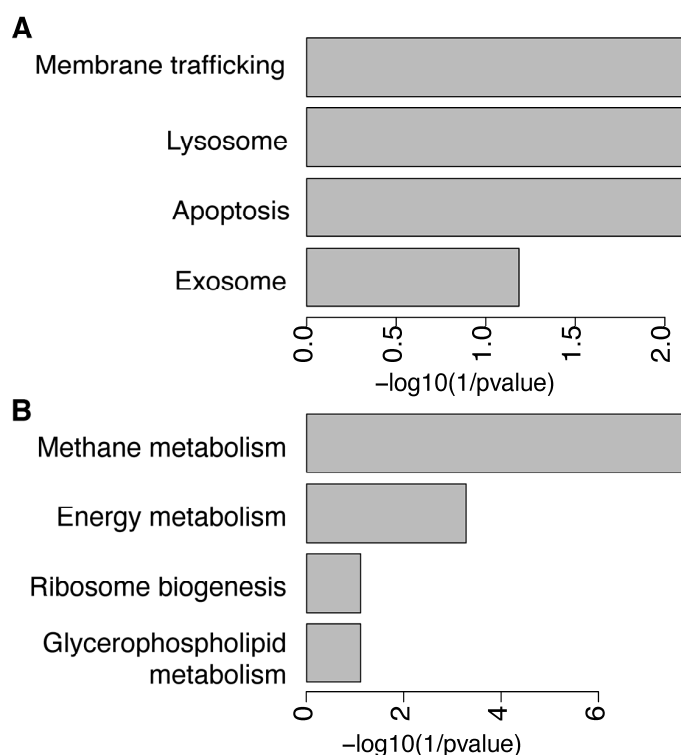


Figure 5. KEGG pathways over-represented (A) and under-represented (B) in NW group compared to OWOB.

3. Discussion

Obesity and its complex etiology profoundly impact the quality of life [1]. Our data show that visceral abdominal fat accumulation in the OWOB group is higher than NW, which is the main predictor for the unhealthy obese phenotype [33]. In addition, most of the other criteria for metabolic syndrome, such as blood pressure, triglyceride, cholesterol, and glucose levels, were higher in the OWOB group. However, we did not find statistical differences, suggesting that this group might be at higher risk or at the beginning of metabolic impairment.

Diet and microbiota play important roles in the development of obesity. Gut microbiota is a known biological factor with an effect on energy intake in the human body. Most abundant genera found in this study have also been reported in other studies [10,34,35]. Higher microbial diversity has been described in children with overweight [36,37]. Although not statistically significant in our study, probably due to our low sample size, alpha diversity also showed a higher trend in the OWOB group, suggesting that dietary and geographical effects could play an essential role, as previously reported [38,39]. Consistent with Bervoets et al., we also found an elevated although not statistically different F:B ratio in OWOB children compared to the NW group [10]. Taxa identified as more abundant in the OWOB group belong to the Firmicutes phylum, whereas taxa in NW group belong to the Bacteroidetes phylum, accordingly to the difference in Firmicutes: Bacteroidetes ratio between both groups. Previous studies have shown elevated counts of Firmicutes and fewer counts of Bacteroidetes in obese individuals when compared to those with normal weight, which might be associated with increased production of SCFAs and energy harvest [5]. Nevertheless, others have shown no difference in this phylum's proportion between obese and non-obese groups, suggesting that F:B ratio is not a robust dysbiosis marker for obesity [40,41].

We used dietary patterns to analyze 46 urban children's consumption aiming to capture the complexity of their eating habits. High-quality dietary pattern (defined by a balanced consumption of macronutrients in which energy is obtained by 20% proteins, up to 30% lipids, 50% carbohydrates) and high consumption of fruits, nuts, vegetables, whole grains,

and yogurt has been inversely associated with weight gain and the risk of developing obesity [42]. In this study, pattern 1 was mainly characterized by high consumption of proteins and complex carbohydrates, which includes fiber. In general, carbohydrates serve as a major source of calories. Complex carbohydrates, derived from whole and unprocessed plant-based foods, are considered the healthier diet type and constitute a significant fraction of diet reaching the large intestine, where its effect is modulated by gut microbiome variations [43,44]. Fermentation of this complex fiber is performed by fibrolytic communities that usually belong to *Bacteroides*, *Roseburia*, *Ruminococcus*, and *Bifidobacterium* genus [43]. Our results showed increments of *Bacteroides* with the consumption of fiber and carbohydrates.

In this study, pattern 2 was characterized by the consumption of saturated fat and simple carbohydrates. Simple carbohydrates in diet usually provide calories without nutrients [45]. In addition, monosaccharides and disaccharides, both simple carbohydrates, can reach the large intestine when the host overfeeds with these sugars [46].

Similar to Murugesan et al. [47], in this study, we did not find dysbiosis but rather a different abundance of particular bacteria in gut microbiota between our groups. We identified three species of the *Bacteroides* genus as significantly more abundant in the NW group compared to OWOB, which is consistent with pattern 1 consumption. In this children population, the abundance of *Bacteroides rodentium*, along with high dietary pattern 1 and low dietary pattern 2 consumption, is associated with BMI decrement. Therefore, in the presence of *B. rodentium*, a leaner phenotype is produced when eating more proteins and complex carbohydrates or by consuming less saturated fat and simple carbohydrates.

Obesity has been associated with decreased abundance in *Methanobrevibacter smithii*, a gut microbiota methanogen archaea, which was also more abundant in the NW group [48]. In the gut, *M. smithii* plays a role in the production of ATP and in the removal of fermentation end products, such as methanol and ethanol, produced by other bacteria [49,50]. *M. smithii* relative abundance decreased with protein intake, suggesting that complex carbohydrates are more likely to enhance its proliferation in the NW group.

On the other hand, consistent with a previous report, our OWOB group had a significantly higher abundance of *Roseburia* sp. [47]. We found an association between the abundance of *Roseburia*, low complex carbohydrates and proteins intake, and BMI increment. Moreover, carbohydrate intake, such as resistant starches, fructans, and fructose (a simple carbohydrate), has been associated with the *Roseburia-Eubacterium* abundance [51]. *Eubacterium* and *Roseburia*, among other genera, produce SCFAs from plant-vegetable products, which have been found increased in obese children, suggesting an elevated substrate utilization and increased energy harvesting by an obesogenic microbiome [5,37,52]. Increments of *Eubacterium rectale*, among other Firmicutes genera, has been related to obesity in humans and to higher adiposity levels, liver triglycerides, and glucose in mice fed with fructans and storage polysaccharides [34,44]. We found that the abundance of *Eubacterium* sp. and *Roseburia* sp. increases with sugar and saturated fats intake and proteins, respectively, suggesting that a Western-type diet might be driving their proliferation. Children's dietary intake is complex and does not obey a single pattern [3]; a combination of macronutrients parallel to a more prevalent diet type might be potentiating substrate availability for some genus, thus explaining why we found that *Roseburia* sp. increases with the consumption of proteins, fiber, and overall healthier dietary pattern 1. Moreover, this is consistent with our finding associating *Eubacterium* sp. with BMI increment in children consuming the dietary pattern 2.

We found linear relationships between our population's gut microbiota's beta diversity and monounsaturated fatty acids (MUFAs), lipids, saturated fatty acids, trans-fatty acids, and lipid energy. These dietary lipids, long-chain saturated and unsaturated fatty acids, are absorbed in form of micelles by the intestinal enterocytes and further secreted systemically in chylomicrons [53]. Dietary saturated fatty acids are deleterious to metabolic health and have been correlated to obesity, hepatic steatosis, type 2 diabetes, and systemic inflammation mediated by IL-6 [54–56]. On the other hand, MUFAs have been mostly linked to anti-inflammatory states and constitute around 60% of fats present in Mediterranean diet

and 36% of Western diet [53,57]. Higher MUFA consumption reduces saturated fatty acids and increases *Bacteroides*, *Prevotella*, and *Faecalibacterium* genera [58,59]. Our results showed decrements of *Bacteroides* associated with consumption of lipids probably belonging to saturated fatty acids. Lipid-fitted vectors on our samples' diversity suggest a divergence prompted by diet.

Functional capacity differences parallel to compositional microbiome differences have been described between lean and obese individuals [20]. Accordingly, we found differences in KOs and functional pathway representation between lean (NW) and OWOB. Microbiome functional capacity of the OWOB group resulted in more than twice the number of represented KOs compared to NW. Housekeeping pathways related to membrane trafficking, lysosome, apoptosis, and exosome appeared enriched in the upregulated pathways in the NW group.

Methane and energy metabolism appeared significantly represented in the OWOB group. We also found a trending representation of ribosome biogenesis and glycerophospholipid metabolism in OWOB group. Energy metabolism has been predicted as a KEGG function in obese groups compared to lean ones [37]. Energy production can be increased by oxidative phosphorylation, glycolysis, and fatty acid synthesis from SCFA [60]. During fiber and sugar fermentation, H₂ is produced and is dissipated by hydrogenotrophic microbes into other metabolites, such as methane (CH₄), acetate, and H₂S, some of the predominant intestinal gases [61]. Removal of H₂ in the gut could allow more effective fermentation and upsurge SCFAs production, which increases energy absorption [50]. Even though *M. smithii* is the major methanogen responsible for the conversion of CO₂ and H₂ into CH₄, methane production is also influenced by the amount and types of dietary substrates [61,62]. Methane excretion has been associated with the consumption of xylan and pectin, which are polysaccharides and a microbiota-accessible carbohydrate (MAC), respectively, in diet [63,64]. Furthermore, methane has been described as a gasotransmitter that slows gastrointestinal motility and as a biomarker in gut function alterations [61,62]. Lowering bowel transit promotes gut microbiome load and amplifies the time energy can be harvested, thus contributing to weight gain [65]. Furthermore, it has been shown that presence of methane and hydrogen on breath is associated with higher BMI and body fat percentage [25,65]. Our results support the hypothesis that methane metabolism is a potential modulator of host energy balance [66].

4. Conclusions

In the urban Mexican children population, proteins, simple and complex carbohydrates, and lipids seem to be dietary key factors driving major differences in BMI and microbiome effects on the host.

Taxa contributing to beta diversity difference between NW and OWOB groups appeared to be associated with dietary patterns. For example, *Eubacterium* and *Roseburia* genera were associated with increased BMI when the intake of saturated fats and simple carbohydrates was high and the intake of proteins and complex carbohydrates was low. On the other hand, *Bacteroides* genus was associated with decreased BMI during high consumption of complex carbohydrates and proteins.

The association of methane metabolism and obesity has been inconsistent across populations and studies [66]. In this study, we found the methane and energy metabolism of the gut microbiome in Mexican children with overweight or obesity enriched, which is most likely modulating energy balance harvested from the diet. This study contributes to the hypothesis that macronutrient intake modifies the intestinal gas profiles.

A major limitation of this study is that only two communities (NW vs. OWOB) were compared due to subsample size. Although these show organismal and functional differences, expanding this study to include an overweight group could give more information on the dynamics and transition of these differences. In addition, other limitations are related to food-consumption frequency. However, this nondifferential error is not likely to have an effect on the validity of our results. Further investigation is needed to stratify

subjects using personalized predictions and to identify microbial biomarkers associated with the distinct dietary responses.

5. Materials and Methods

Sample and data collection: This cross-sectional study is part of a previously reported study [17] approved by the Research Committee of the National Institute of Public Health (INSP, No.1129). Ethical approval on the project was given by the INSP Commission of Ethics (CI:1129-No.1294) on 27 August 2012.

We randomly selected 48 samples from a biological bank of 1042 fecal samples. Two sample reads failed to annotate correctly against the taxonomy and functional reference databases, excluding them and leaving a sample size of $n = 46$. A food-frequency questionnaire and anthropometric measurements were performed after obtention of assent and informed consent from all participants and their parents or legal guardians. Children with a diagnosis of infectious or gastrointestinal diseases and those who had taken antibiotics for two months prior to the study were excluded.

5.1. Adiposity

The *who2007* function was used through the *RStudio* program to calculate z-scores of the body mass index (BMI) adjusted by age and sex in children between 5 and 19 years old [28]. We used the age-adjusted reference tables of weight, height, and BMI from the R package.

5.2. Dietary Patterns

Baseline dietary intake was measured using a validated food-frequency questionnaire (FFQ)—comprised of 11 food sections—that was filled in the presence of the parents or tutor of each participant [29]. The one hundred and seven food items contained in FFQ were consolidated into 27 food groups based on nutritional characteristics (Supplemental Table S1). According to the reported frequency of each item inside the groups (10 options ranging from never to => six times a day), the average of the daily consumption was calculated. The obtained factor was multiplied by the equivalent grams that conforms a portion based on the reports of the Mexican National Health and Nutrition Surveys (ENSANUT) [67] to obtain the quantity of grams that each individual consumes daily of each food. The number of grams or milliliters consumed of each of the 27 groups of foods was calculated to obtain the percentage of contribution of each group to the total daily consumption, which then was normalized using z-scores (Supplemental Table S2). After corroborating that the quantitative data were correlated using the *corrplot* R package ($r = 0.84$), we performed a principal component analysis (PCA) that yielded two factors with an eigenvalue threshold of 2.67, which explain 23.57% of the total variance of the individual's diet (Supplemental Figure S2). To perform a better interpretation of the components, an orthogonal rotation (*varimax*) was performed in order to redistribute the explained variance, obtain the most extreme weight factor, and to distinguish the components (Table 2). The patterns were defined based on loading factors > 0.35 . The two dietary patterns were interpreted as pattern 1, the healthier pattern characterized by the consumption of proteins and complex carbohydrates, and pattern 2, characterized by the consumption of saturated fat and simple carbohydrates (Supplemental Table S3). Finally, a score of each factor per individual was calculated, giving each participant a value for each dietary pattern. The highest value was interpreted as the more likely type of diet consumed by a particular child (Supplemental Table S4).

5.3. Genomic DNA Extraction

DNA was extracted from 200 mg of each fecal sample using the QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Bacterial lysis was performed using QIAamp kit buffers, proteinase K, and high-temperature incubation. Released genomic DNA was recovered through wash and purification columns. Isolated DNA was stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until further use.

5.4. Metagenomic Sample Processing

Pair-end libraries were elaborated from 1-ng DNA, and strands were enzymatically fragmented with ATM to 300–600bp and tagged with unique combinations of Nextera XT index (REF: 15032350, Illumina) in a barcode sample-specific fashion. PCR was carried out under the following conditions: initial denaturation for 3 min at 72 °C and 30 s at 95 °C, followed by 12 cycles of denaturation for 10 s at 95 °C, annealing for 30 s at 55 °C and elongation for 30 s at 72 °C, and a final elongation step for 5 min at 72 °C. The genomic amplification was recovered using magnetic beads washed with 80% ethanol. PCR products were resuspended in Nuclease-free water and quantified using Qubit dsDNA HS Assay kit (Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, USA). Furthermore, concentration and fragment length of libraries were assessed using a Bioanalyzer system (Agilent Technologies; Santa Clara, CA, USA). A final library for sequencing was created with equimolar ratios of libraries from each sample. The genomic pool for all 46 samples was sequenced throughout two independent runs by the USeq from INMEGEN on Illumina NextSeq 500 platform to obtain 1,624,041,934,150-bases pair-end reads in total.

5.5. Metagenomic Analysis

The quality of the 1,624,041,934 raw reads was assessed using the program FastQC (version 0.11.8) [68] followed by preprocessing using Cutadapt (version 1.18) [69] with which barcodes, bad quality bases (<20 Phred score), and short-length fragments (<20 paired bases) were trimmed. The remaining 1,618,036,578 high-quality reads were subjected to host genome contaminating reads filtering by first mapping them independently to *homo sapiens* assembly (Ensembl release 95, GRCh38.dna.alt) using Bowtie2 (version 2.3.4.3) [70]. Following this, the 1,617,251,896 reads that did not map to the human genome were identified using Samtools view (version 1.9) [71], $-f$ 4 was specified for unmapped, and $-F$ 4 for mapped reads before regenerating *fastq* files containing either microbiome or human genome sequences (custom Perl script).

On the other hand, 86.06% of our previously preprocessed (high-quality bacteria) metagenomic reads were assembled using the metaspades.py script of the program SPAdes, for each library (version 3.13.0) [72]. Suggested k-mer lengths by the program developers were used to compute the assembly: $-k$ 21,33,55,77. The quality of the assembly was assessed using the Quality Assessment Tool (Quast, version 5.0.2 Metaquast) [73,74]. Through all samples, between 12,419 and 148,377 contigs were assembled with lengths between 15,528,656 and 243,879,740 bases (132,282,896 average). The reported N50 values were between 848 and 7940 bases. Contigs with less than 500 bases were filtered out.

5.6. Taxonomic Annotation

The 1,617,251,896 high-quality microbiome reads were used for taxonomic annotation using the program mOTUs2 (version 2.5.1) [30]. A phylogenetic marker gene (MG)-based operational taxonomic units (mOTUs) strategy was performed to profile more than 7700 microbial species. We used the resulting profile, which reported relative abundance for each mOTU at phylum, genus, and species level for further analysis. Rare taxa, defined as taxa that do not have a count greater than 10 reads in at least one sample, were removed. A relative abundance proportion filter threshold was set to 0.01% (Supplemental Table S5).

5.7. Diversity Analysis

Alpha and beta diversity were assessed using the R packages Phyloseq (version 1.30.0) and Vegan (version 2.5–6) [75,76]. The data were assessed for normal distribution using the Shapiro–Wilk test to further compare normal weight against overweight and obese groups by either Wilcoxon Rank-Sum Test or *t*-test. Non-metric multidimensional scaling (nMDS) analyses were performed to evaluate distances between groups. Stress values obtained were <0.2 for Bray–Curtis and Jaccard beta diversities. To obtain a list of mOTUs which cumulatively explain more than 70% of the variation between groups, we used the Vegan R package function *simper* with 999 permutations (Supplemental Table S6). Wilcoxon

Rank-Sum Test was used to evaluate differences between groups of each taxa obtained by *simper*. Continuous variables were fitted as vectors on the nMDS analysis using the *envfit* function of the Vegan package [76].

5.8. Functional Annotation

A protein-coding gene prediction was performed using the Prokaryotic Dynamic Programming Gene-finding Algorithm (Prodigal, version 2.6.3), with the meta option and with closed ends, using the filtered contigs as input [77,78]. We followed the custom-made metagenomic assembly and annotation pipeline found in https://github.com/qijunz/DO_metagenomics/tree/master/pipeline (5 July 2021). The primary annotation of each file was concatenated into a single file of pooled predicted open reading frames (ORFs). Predicted genes were then compared in an all-against-all fashion in order to cluster nonredundant sequences and extract the representative sequences database using CD-HIT and -EST (version 4.8.1) [79]. The sequence identity threshold was set to 95% with a word length of 8, the alignment coverage for the shorter sequence was set to 90%, and the program was set to cluster into the most similar group that met the threshold. The collection of nonredundant predicted genes was used to build a Bowtie index, using Bowtie2 (version 2.3.4.3) [70] for the alignment of each sample in order to obtain the number of genes in each library (Supplemental Figure S1A,B). Predicted genes were annotated throughout the KEGG database in order to obtain a KEGG Orthology number for each ORF predicted. Annotation was performed using Kofam and HMMER/HMMSEARCH against a customize hidden Markov model database of prokaryotes KOs [80]. Gene abundance was obtained using RSEM and normalized by transcripts per million (TMP) values, which were further analyzed using quasi-likelihood F-test (Qlfi) in edgeR (v. 3.28.1) in order to obtain differential presence of genes between BMI groups (logarithmic fold change over 1 and under -1 , p -value and FDR < 0.05) [81,82]. We further ran the Fisher-enrichment test for each group of significantly differentiated genes obtained by Qlfi and further filtered the results by p -value and FDR < 0.05 (Supplemental Tables S7 and S8).

5.9. Association Tests

We performed linear regressions of continuous variables running the general linear model (glm R function) adjusting by covariates or confounding variables, such as age, sex, family history of obesity, and physical activity. Association analysis between BMI z-scores and taxa stratified by low and high dietary profile was further adjusted by each dietary pattern, 1 or 2. Adjusting variables were identified when, individually, they modified the coefficient more than 10%. p -Values were adjusted using Bonferroni correction through multiple comparisons; statistical significance was considered when $p < 0.01$.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/children9020148/s1>, Figure S1: Number of genes predicted for each library; Figure S2: Correlation matrix between food groups; Table S1. Each of the 107 food items contained in the 27 defined groups surveyed in the FFQ; Table S2: Z-scores transformed daily intake percentage table for each food group; Table S3: Dietary patterns obtained through PCA factorial analysis and orthogonal rotation; Table S4: Dietary pattern score obtained for each child that participated based on their reported diet; Table S5: Relative abundance (>0.01%) of bacterial genera detected in fecal samples; Table S6: Taxa (at genus or specie level) that contribute the most to beta diversity variation between NW and OWOB groups (SIMPER); Table S7: KO representation analysis; Table S8: Enriched pathways as determined by Fisher's test.

Author Contributions: Conceptualization, S.M.M.-G., A.L.-M. and A.I.B.-G.; methodology, S.M.M.-G., Y.C.O.-O., A.L.-M.; C.E.D.-B., F.C.-G., A.O.-L. and A.S.-F.; formal analysis, S.M.M.-G., Y.C.O.-O., A.C.C.-M. and A.I.B.-G.; investigation, S.M.M.-G., A.L.-M. and A.I.B.-G.; resources, A.I.B.-G., A.L.-M. and M.C.; data curation, S.M.M.-G. and A.S.-F.; writing—original draft preparation, S.M.M.-G., A.L.-M. and A.I.B.-G.; writing—review and editing, S.M.M.-G., Y.C.O.-O., A.C.C.-M., M.C., A.O.-L., F.C.-G., C.E.D.-B., A.S.-F., A.I.B.-G. and A.L.-M.; visualization, S.M.M.-G. and A.L.-M.; supervision, A.I.B.-G. and A.L.-M.; project administration, A.L.-M. and A.I.B.-G.; funding acquisition, A.I.B.-G. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by CONACYT SSA/IMSS/ISSSTE-CONACYT 2015-262133 and CONACYT CB2017-2018, A1-S-33221. S.M.M.-G. was supported by “El Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología—CONACYT” (The National Council for Science and Technology) with register number 895733.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki. Written consent and approval for the use of samples was further ratified by the Biosafety Commission of the National Institute of Public Health CB:1120-CI:1129 (INSP, Cuernavaca Morelos, México). Ethical approval on the project was given by the INSP Commission of Ethics (CI:1129-No.1294).

Informed Consent Statement: Informed consent and assent, before the inclusion and use of biological samples and data, was obtained from all subjects and their parents or legal guardians involved in the study.

Data Availability Statement: The data reported in this paper are accessible in the NCBI Short Read Archive (SRA) under accession ID PRJNA721692.

Acknowledgments: The authors thank all participants and Alfredo Mendoza Vargas from the Unidad de Secuenciación e Identificación de Polimorfismos, Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN) for providing sequencing and support services and the University of Wisconsin Center for High-Throughput Computing (CHTC) in the Department of Computer Sciences for providing computational resources, support, and assistance. We thank copy editor Daniela Murga-Garrido for her diligent proofreading, style, and text editing.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Abbreviations

BH	Benjamini–Hochberg method
BMI	body mass index
BP	blood pressure
ENSANUT	Encuesta Nacional de Salud y Nutrición
F:B	Firmicutes-to-Bacteroidetes
FDR	false-discovery rate
FFQ	food-frequency questionnaires
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
KO	KEGG Orthology
LPS	Lipopolysaccharides
mOTUS	(MG)-based operational taxonomic units
MAC	microbiota-accessible carbohydrates
MUFAs	monounsaturated fatty acids
NCCD	non-communicable chronic diseases
NW	normal weight
OWOB	overweight and obese
PCA	Principal Component Analysis
SCFA	short-chain fatty acids
SIMPER	similarity of percentages analysis
WHO	World Health Organization

References

- González-Muniesa, P.; Martínez-González, M.-A.; Hu, F.B.; Després, J.-P.; Matsuzawa, Y.; Loos, R.J.F.; Moreno, L.A.; Bray, G.A.; Martínez, J.A. Obesity. *Nat. Rev. Dis. Primers* **2017**, *3*, 17034. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Tyson, N.; Frank, M. Childhood and Adolescent Obesity Definitions as Related to BMI, Evaluation and Management Options. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* **2018**, *48*, 158–164. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Romero-Martínez, M.; Shamah-Levy, T.; Vielma-Orozco, E.; Heredia-Hernández, O.; Mojica-Cuevas, J.; Cuevas-Nasu, L.; Rivera-Dommarco, J. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2018-19: Metodología y perspectivas. *Salud Publica Mex.* **2019**, *61*, 917–923. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Noce, A.; Marrone, G.; Di Daniele, F.; Ottaviani, E.; Wilson Jones, G.; Bernini, R.; Romani, A.; Rovella, V. Impact of Gut Microbiota Composition on Onset and Progression of Chronic Non-Communicable Diseases. *Nutrients* **2019**, *11*, 1073. [[CrossRef](#)]
- Riva, A.; Borgo, F.; Lassandro, C.; Verduci, E.; Morace, G.; Borghi, E.; Berry, D. Pediatric Obesity Is Associated with an Altered Gut Microbiota and Discordant Shifts in *Firmicutes* Populations. *Environ. Microbiol.* **2017**, *19*, 95–105. [[CrossRef](#)]

6. Wilkins, L.J.; Monga, M.; Miller, A.W. Defining Dysbiosis for a Cluster of Chronic Diseases. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 12918. [[CrossRef](#)]
7. Crovesy, L.; Masterson, D.; Rosado, E.L. Profile of the Gut Microbiota of Adults with Obesity: A Systematic Review. *Eur. J. Clin. Nutr.* **2020**, *74*, 1251–1262. [[CrossRef](#)]
8. Ley, R.E.; Turnbaugh, P.J.; Klein, S.; Gordon, J.I. Human Gut Microbes Associated with Obesity. *Nature* **2006**, *444*, 1022–1023. [[CrossRef](#)]
9. Tseng, C.-H.; Wu, C.-Y. The Gut Microbiome in Obesity. *J. Formos. Med. Assoc.* **2019**, *118*, S3–S9. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Bervoets, L.; Van Hoorenbeeck, K.; Kortleven, I.; Van Noten, C.; Hens, N.; Vael, C.; Goossens, H.; Desager, K.N.; Vankerckhoven, V. Differences in Gut Microbiota Composition between Obese and Lean Children: A Cross-Sectional Study. *Gut Pathog.* **2013**, *5*, 10. [[CrossRef](#)]
11. Orbe-Orihuela, Y.C.; Lagunas-Martínez, A.; Bahena-Román, M.; Madrid-Marina, V.; Torres-Poveda, K.; Flores-Alfaro, E.; Méndez-Padrón, A.; Díaz-Benítez, C.E.; Peralta-Zaragoza, O.; Antúnez-Ortiz, D.; et al. High Relative Abundance of Firmicutes and Increased TNF- α Levels Correlate with Obesity in Children. *Salud Publica Mex.* **2018**, *60*, 5–11. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Jumpertz, R.; Le, D.S.; Turnbaugh, P.J.; Trinidad, C.; Bogardus, C.; Gordon, J.I.; Krakoff, J. Energy-Balance Studies Reveal Associations between Gut Microbes, Caloric Load, and Nutrient Absorption in Humans. *Am. J. Clin. Nutr.* **2011**, *94*, 58–65. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Al-Lahham, S.H.; Peppelenbosch, M.P.; Roelofsen, H.; Vonk, R.J.; Venema, K. Biological Effects of Propionic Acid in Humans; Metabolism, Potential Applications and Underlying Mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta* **2010**, *1801*, 1175–1183. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Lin, H.V.; Frassetto, A.; Kowalik, E.J.; Nawrocki, A.R.; Lu, M.M.; Kosinski, J.R.; Hubert, J.A.; Szeto, D.; Yao, X.; Forrest, G.; et al. Butyrate and Propionate Protect against Diet-Induced Obesity and Regulate Gut Hormones via Free Fatty Acid Receptor 3-Independent Mechanisms. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e35240. [[CrossRef](#)]
15. Macfarlane, G.T.; Macfarlane, S. Fermentation in the Human Large Intestine: Its Physiologic Consequences and the Potential Contribution of Prebiotics. *J. Clin. Gastroenterol.* **2011**, *45*, S120–S127. [[CrossRef](#)]
16. Albenberg, L.G.; Wu, G.D. Diet and the Intestinal Microbiome: Associations, Functions, and Implications for Health and Disease. *Gastroenterology* **2014**, *146*, 1564–1572. [[CrossRef](#)]
17. Estrada-Velasco, B.I.; Cruz, M.; García-Mena, J.; Salgado, A.V.; Romero, J.P.; Serrano, M.D.L.R.G.; Madrid-Marina, V.; Orihuela, C.O.; Islas, C.L.; Burguete-García, A.I. Childhood Obesity Is Associated to the Interaction between Firmicutes and High Energy Food Consumption. *Nutr. Hosp.* **2015**, *31*, 1074–1081. [[CrossRef](#)]
18. Wu, G.; Zhang, C.; Wang, J.; Zhang, F.; Wang, R.; Shen, J.; Wang, L.; Pang, X.; Zhang, X.; Zhao, L.; et al. Diminution of the Gut Resistome after a Gut Microbiota-Targeted Dietary Intervention in Obese Children. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 24030. [[CrossRef](#)]
19. Bäckhed, F.; Ley, R.E.; Sonnenburg, J.L.; Peterson, D.A.; Gordon, J.I. Host-Bacterial Mutualism in the Human Intestine. *Science* **2005**, *307*, 1915–1920. [[CrossRef](#)]
20. Thingholm, L.B.; Rühlemann, M.C.; Koch, M.; Fuqua, B.; Laucke, G.; Boehm, R.; Bang, C.; Franzosa, E.A.; Hübenthal, M.; Rahnavard, A.; et al. Obese Individuals with and without Type 2 Diabetes Show Different Gut Microbial Functional Capacity and Composition. *Cell Host Microbe* **2019**, *26*, 252–264.e10. [[CrossRef](#)]
21. Visconti, A.; Le Roy, C.I.; Rosa, F.; Rossi, N.; Martin, T.C.; Mohnhey, R.P.; Li, W.; de Rinaldis, E.; Bell, J.T.; Venter, J.C.; et al. Interplay between the Human Gut Microbiome and Host Metabolism. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 4505. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Zeevi, D.; Korem, T.; Godneva, A.; Bar, N.; Kurilshikov, A.; Lotan-Pompan, M.; Weinberger, A.; Fu, J.; Wijmenga, C.; Zhernakova, A.; et al. Structural Variation in the Gut Microbiome Associates with Host Health. *Nature* **2019**, *568*, 43–48. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Ferrer, M.; Ruiz, A.; Lanza, F.; Haange, S.-B.; Oberbach, A.; Till, H.; Bargiela, R.; Campoy, C.; Segura, M.T.; Richter, M.; et al. Microbiota from the Distal Guts of Lean and Obese Adolescents Exhibit Partial Functional Redundancy besides Clear Differences in Community Structure. *Environ. Microbiol.* **2013**, *15*, 211–226. [[CrossRef](#)]
24. Greenblum, S.; Turnbaugh, P.J.; Borenstein, E. Metagenomic Systems Biology of the Human Gut Microbiome Reveals Topological Shifts Associated with Obesity and Inflammatory Bowel Disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 594–599. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Mathur, R.; Amichai, M.; Chua, K.S.; Mirocha, J.; Barlow, G.M.; Pimentel, M. Methane and Hydrogen Positivity on Breath Test Is Associated with Greater Body Mass Index and Body Fat. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2013**, *98*, E698–E702. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Turnbaugh, P.J.; Ley, R.E.; Mahowald, M.A.; Magrini, V.; Mardis, E.R.; Gordon, J.I. An Obesity-Associated Gut Microbiome with Increased Capacity for Energy Harvest. *Nature* **2006**, *444*, 1027–1031. [[CrossRef](#)]
27. Falony, G.; Joossens, M.; Vieira-Silva, S.; Wang, J.; Darzi, Y.; Faust, K.; Kurilshikov, A.; Bonder, M.J.; Valles-Colomer, M.; Vandeputte, D.; et al. Population-Level Analysis of Gut Microbiome Variation. *Science* **2016**, *352*, 560–564. [[CrossRef](#)]
28. de Onis, M.; Onyango, A.W.; Borghi, E.; Siyam, A.; Nishida, C.; Siekmann, J. Development of a WHO Growth Reference for School-Aged Children and Adolescents. *Bull. World Health Organ.* **2007**, *85*, 660–667. [[CrossRef](#)]
29. Willett, W. *Nutritional Epidemiology*; Oxford University Press: Oxford, UK, 2012; ISBN 978-0-19-024084-4.
30. Milanese, A.; Mende, D.R.; Paoli, L.; Salazar, G.; Ruscheweyh, H.-J.; Cuenca, M.; Hingamp, P.; Alves, R.; Costea, P.I.; Coelho, L.P.; et al. Microbial Abundance, Activity and Population Genomic Profiling with MOTUs2. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 1014. [[CrossRef](#)]
31. Ridaura, V.K.; Faith, J.J.; Rey, F.E.; Cheng, J.; Duncan, A.E.; Kau, A.L.; Griffin, N.W.; Lombard, V.; Henrissat, B.; Bain, J.R.; et al. Gut Microbiota from Twins Discordant for Obesity Modulate Metabolism in Mice. *Science* **2013**, *341*, 1241214. [[CrossRef](#)]

32. Santacruz, A.; Marcos, A.; Wärnberg, J.; Martí, A.; Martín-Matillas, M.; Campoy, C.; Moreno, L.A.; Veiga, O.; Redondo-Figuero, C.; Garagorri, J.M.; et al. Interplay between Weight Loss and Gut Microbiota Composition in Overweight Adolescents. *Obesity* **2009**, *17*, 1906–1915. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Hwang, Y.-C.; Hayashi, T.; Fujimoto, W.Y.; Kahn, S.E.; Leonetti, D.L.; McNeely, M.J.; Boyko, E.J. Visceral Abdominal Fat Accumulation Predicts the Conversion of Metabolically Healthy Obese Subjects to an Unhealthy Phenotype. *Int. J. Obes.* **2015**, *39*, 1365–1370. [[CrossRef](#)]
34. Gomes, A.C.; Hoffmann, C.; Mota, J.F. The Human Gut Microbiota: Metabolism and Perspective in Obesity. *Gut Microbes* **2018**, *9*, 308–325. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. King, C.H.; Desai, H.; Sylvetsky, A.C.; LoTempio, J.; Ayanyan, S.; Carrie, J.; Crandall, K.A.; Fochtman, B.C.; Gasparyan, L.; Gulzar, N.; et al. Baseline Human Gut Microbiota Profile in Healthy People and Standard Reporting Template. *PLoS ONE* **2019**, *14*, e0206484. [[CrossRef](#)]
36. Bai, J.; Hu, Y.; Bruner, D.W. 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.* **2019**, *14*, e12480. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Yun, Y.; Kim, H.-N.; Kim, S.E.; Heo, S.G.; Chang, Y.; Ryu, S.; Shin, H.; Kim, H.-L. Comparative Analysis of Gut Microbiota Associated with Body Mass Index in a Large Korean Cohort. *BMC Microbiol.* **2017**, *17*, 151. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Filippo, C.D.; Cavalieri, D.; Paola, M.D.; Ramazzotti, M.; Poulet, J.B.; Massart, S.; Collini, S.; Pieraccini, G.; Lionetti, P. Impact of Diet in Shaping Gut Microbiota Revealed by a Comparative Study in Children from Europe and Rural Africa. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 14691–14696. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Gallardo-Becerra, L.; Cornejo-Granados, F.; García-López, R.; Valdez-Lara, A.; Bikel, S.; Canizales-Quinteros, S.; López-Contreras, B.E.; Mendoza-Vargas, A.; Nielsen, H.; Ochoa-Leyva, A. Metatranscriptomic Analysis to Define the Secrebiome, and 16S rRNA Profiling of the Gut Microbiome in Obesity and Metabolic Syndrome of Mexican Children. *Microb. Cell Fact.* **2020**, *19*, 61. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Magne, F.; Gotteland, M.; Gauthier, L.; Zazueta, A.; Poeso, S.; Navarrete, P.; Balamurugan, R. The Firmicutes/Bacteroidetes Ratio: A Relevant Marker of Gut Dysbiosis in Obese Patients? *Nutrients* **2020**, *12*, 1474. [[CrossRef](#)]
41. Sze, M.A.; Schloss, P.D. Looking for a Signal in the Noise: Revisiting Obesity and the Microbiome. *MBio* **2016**, *7*, e01018-16. [[CrossRef](#)]
42. Razquin, C.; Martinez, J.A.; Martinez-Gonzalez, M.A.; Mitjavila, M.T.; Estruch, R.; Martí, A. A 3 Years Follow-up of a Mediterranean Diet Rich in Virgin Olive Oil Is Associated with High Plasma Antioxidant Capacity and Reduced Body Weight Gain. *Eur. J. Clin. Nutr.* **2009**, *63*, 1387–1393. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Chassard, C.; Lacroix, C. Carbohydrates and the Human Gut Microbiota. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* **2013**, *16*, 453–460. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Murga-Garrido, S.M.; Hong, Q.; Cross, T.-W.L.; Hutchison, E.R.; Han, J.; Thomas, S.P.; Vivas, E.I.; Denu, J.; Ceschin, D.G.; Tang, Z.-Z.; et al. Gut Microbiome Variation Modulates the Effects of Dietary Fiber on Host Metabolism. *Microbiome* **2021**, *9*, 117. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Ferretti, F.; Mariani, M. Simple vs. Complex Carbohydrate Dietary Patterns and the Global Overweight and Obesity Pandemic. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2017**, *14*, 1174. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Payne, A.N.; Chassard, C.; Lacroix, C. Gut Microbial Adaptation to Dietary Consumption of Fructose, Artificial Sweeteners and Sugar Alcohols: Implications for Host–Microbe Interactions Contributing to Obesity. *Obes. Rev.* **2012**, *13*, 799–809. [[CrossRef](#)]
47. Murugesan, S.; Ulloa-Martínez, M.; Martínez-Rojano, H.; Galván-Rodríguez, F.M.; Miranda-Brito, C.; Romano, M.C.; Piña-Escobedo, A.; Pizano-Zárate, M.L.; Hoyo-Vadillo, C.; García-Mena, J. 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.* **2015**, *34*, 1337–1346. [[CrossRef](#)]
48. Million, M.; Maraninchi, M.; Henry, M.; Armougom, F.; Richet, H.; Carrieri, P.; Valero, R.; Raccach, D.; Vialettes, B.; Raoult, D. Obesity-Associated Gut Microbiota Is Enriched in Lactobacillus Reuteri and Depleted in Bifidobacterium Animalis and Methanobrevibacter Smithii. *Int. J. Obes.* **2012**, *36*, 817–825. [[CrossRef](#)]
49. Fricke, W.F.; Seedorf, H.; Henne, A.; Krüer, M.; Liesegang, H.; Hedderich, R.; Gottschalk, G.; Thauer, R.K. The Genome Sequence of Methanosphaera Stadtmanae Reveals Why This Human Intestinal Archaeon Is Restricted to Methanol and H₂ for Methane Formation and ATP Synthesis. *J. Bacteriol.* **2006**, *188*, 642–658. [[CrossRef](#)]
50. Samuel, B.S.; Gordon, J.I. A Humanized Gnotobiotic Mouse Model of Host–Archaeal–Bacterial Mutualism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 10011–10016. [[CrossRef](#)]
51. Duncan, S.H.; Belongue, A.; Holtrop, G.; Johnstone, A.M.; Flint, H.J.; Lobley, G.E. Reduced Dietary Intake of Carbohydrates by Obese Subjects Results in Decreased Concentrations of Butyrate and Butyrate-Producing Bacteria in Feces. *Appl. Environ. Microbiol.* **2007**, *73*, 1073–1078. [[CrossRef](#)]
52. Newman, T.M.; Shively, C.A.; Register, T.C.; Appt, S.E.; Yadav, H.; Colwell, R.R.; Fanelli, B.; Dadlani, M.; Graubics, K.; Nguyen, U.T.; et al. Diet, Obesity, and the Gut Microbiome as Determinants Modulating Metabolic Outcomes in a Non-Human Primate Model. *Microbiome* **2021**, *9*, 100. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Ravaut, G.; Légiot, A.; Bergeron, K.-F.; Mounier, C. Monounsaturated Fatty Acids in Obesity-Related Inflammation. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *22*, 330. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Calder, P.C.; Ahluwalia, N.; Brouns, F.; Buetler, T.; Clement, K.; Cunningham, K.; Esposito, K.; Jönsson, L.S.; Kolb, H.; Lansink, M.; et al. Dietary Factors and Low-Grade Inflammation in Relation to Overweight and Obesity. *Br. J. Nutr.* **2011**, *106* (Suppl. S3), S5–S78. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Cnop, M. Fatty Acids and Glucolipotoxicity in the Pathogenesis of Type 2 Diabetes. *Biochem. Soc. Trans.* **2008**, *36*, 348–352. [[CrossRef](#)]

56. Lundman, P.; Boquist, S.; Samnegård, A.; Bennermo, M.; Held, C.; Ericsson, C.-G.; Silveira, A.; Hamsten, A.; Tornvall, P. A High-Fat Meal Is Accompanied by Increased Plasma Interleukin-6 Concentrations. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* **2007**, *17*, 195–202. [[CrossRef](#)]
57. Shively, C.A.; Appt, S.E.; Vitolins, M.Z.; Uberseder, B.; Michalson, K.T.; Silverstein-Metzler, M.G.; Register, T.C. Mediterranean versus Western Diet Effects on Caloric Intake, Obesity, Metabolism, and Hepatosteatosis in Nonhuman Primates. *Obesity* **2019**, *27*, 777–784. [[CrossRef](#)]
58. De Filippis, F.; Pellegrini, N.; Vannini, L.; Jeffery, I.B.; La Stora, A.; Laghi, L.; Serrazanetti, D.I.; Di Cagno, R.; Ferracino, I.; Lazzi, C.; et al. High-Level Adherence to a Mediterranean Diet Beneficially Impacts the Gut Microbiota and Associated Metabolome. *Gut* **2016**, *65*, 1812–1821. [[CrossRef](#)]
59. Raatz, S.K.; Conrad, Z.; Jahns, L.; Belury, M.A.; Picklo, M.J. Modeled Replacement of Traditional Soybean and Canola Oil with High-Oleic Varieties Increases Monounsaturated Fatty Acid and Reduces Both Saturated Fatty Acid and Polyunsaturated Fatty Acid Intake in the US Adult Population. *Am. J. Clin. Nutr.* **2018**, *108*, 594–602. [[CrossRef](#)]
60. Hird, F.J.; Weidemann, M.J. Oxidative Phosphorylation Accompanying Oxidation of Short-Chain Fatty Acids by Rat-Liver Mitochondria. *Biochem. J.* **1966**, *98*, 378–388. [[CrossRef](#)]
61. Kalantar-Zadeh, K.; Berean, K.J.; Burgell, R.E.; Muir, J.G.; Gibson, P.R. Intestinal Gases: Influence on Gut Disorders and the Role of Dietary Manipulations. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2019**, *16*, 733–747. [[CrossRef](#)]
62. Pimentel, M.; Mathur, R.; Chang, C. Gas and the Microbiome. *Curr. Gastroenterol. Rep.* **2013**, *15*, 356. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Marthinsen, D.; Fleming, S.E. Excretion of Breath and Flatus Gases by Humans Consuming High-Fiber Diets. *J. Nutr.* **1982**, *112*, 1133–1143. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Sonnenburg, E.D.; Sonnenburg, J.L. Starving Our Microbial Self: The Deleterious Consequences of a Diet Deficient in Microbiota-Accessible Carbohydrates. *Cell Metab.* **2014**, *20*, 779–786. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Basseri, R.J.; Basseri, B.; Pimentel, M.; Chong, K.; Youdim, A.; Low, K.; Hwang, L.; Soffer, E.; Chang, C.; Mathur, R. Intestinal Methane Production in Obese Individuals Is Associated with a Higher Body Mass Index. *Gastroenterol. Hepatol.* **2012**, *8*, 22–28.
66. Peters, B.A.; Shapiro, J.A.; Church, T.R.; Miller, G.; Trinh-Shevrin, C.; Yuen, E.; Friedlander, C.; Hayes, R.B.; Ahn, J. A Taxonomic Signature of Obesity in a Large Study of American Adults. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 9749. [[CrossRef](#)]
67. Gutiérrez, J.; Rivera-Dommarco, J.; Shamah-Levy, T.; Villalpando-Hernández, S.; Franco, A.; Cuevas-Nasu, L.; Romero-Martínez, M.; Hernández-Ávila, M. *Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012. Resultados Nacionales, Primera Edición*; Instituto Nacional de Salud Pública, Secretaría de Salud: Cuernavaca, Mexico, 2012; ISBN 978-607-511-037-0.
68. Andrews, S. *FastQC: A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data*; Babraham Institute: Cambridge, UK, 2010.
69. Martin, M. Cutadapt Removes Adapter Sequences from High-Throughput Sequencing Reads. *EMBnet. J.* **2011**, *17*, 10–12. [[CrossRef](#)]
70. Langmead, B.; Salzberg, S.L. Fast Gapped-Read Alignment with Bowtie 2. *Nat. Methods* **2012**, *9*, 357–359. [[CrossRef](#)]
71. Li, H.; Handsaker, B.; Wysoker, A.; Fennell, T.; Ruan, J.; Homer, N.; Marth, G.; Abecasis, G.; Durbin, R. 1000 Genome Project Data Processing Subgroup the Sequence Alignment/Map Format and SAMtools. *Bioinformatics* **2009**, *25*, 2078–2079. [[CrossRef](#)]
72. Nurk, S.; Meleshko, D.; Korobeynikov, A.; Pevzner, P.A. MetaSPAdes: A New Versatile Metagenomic Assembler. *Genome Res.* **2017**, *27*, 824–834. [[CrossRef](#)]
73. Gurevich, A.; Saveliev, V.; Vyahhi, N.; Tesler, G. QUAST: Quality Assessment Tool for Genome Assemblies. *Bioinformatics* **2013**, *29*, 1072–1075. [[CrossRef](#)]
74. Mikheenko, A.; Saveliev, V.; Gurevich, A. MetaQUAST: Evaluation of Metagenome Assemblies. *Bioinformatics* **2016**, *32*, 1088–1090. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. McMurdie, P.J.; Holmes, S. Phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e61217. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Oksanen, J.; Blanchet, F.G.; Friendly, M.; Kindt, R.; Legendre, P.; McGlenn, D. Vegan: Community Ecology Package. R Package Version 2.5-7. 2020. Available online: <https://CRAN.R-project.org/package=vegan> (accessed on 5 July 2021).
77. Hyatt, D.; Chen, G.-L.; LoCascio, P.F.; Land, M.L.; Larimer, F.W.; Hauser, L.J. Prodigal: Prokaryotic Gene Recognition and Translation Initiation Site Identification. *BMC Bioinform.* **2010**, *11*, 119. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
78. Hyatt, D.; LoCascio, P.F.; Hauser, L.J.; Uberbacher, E.C. Gene and Translation Initiation Site Prediction in Metagenomic Sequences. *Bioinformatics* **2012**, *28*, 2223–2230. [[CrossRef](#)]
79. Fu, L.; Niu, B.; Zhu, Z.; Wu, S.; Li, W. CD-HIT: Accelerated for Clustering the next-Generation Sequencing Data. *Bioinformatics* **2012**, *28*, 3150–3152. [[CrossRef](#)]
80. Aramaki, T.; Blanc-Mathieu, R.; Endo, H.; Ohkubo, K.; Kanehisa, M.; Goto, S.; Ogata, H. KofamKOALA: KEGG Ortholog Assignment Based on Profile HMM and Adaptive Score Threshold. *Bioinformatics* **2020**, *36*, 2251–2252. [[CrossRef](#)]
81. McCarthy, D.J.; Chen, Y.; Smyth, G.K. Differential Expression Analysis of Multifactor RNA-Seq Experiments with Respect to Biological Variation. *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40*, 4288–4297. [[CrossRef](#)]
82. Robinson, M.D.; McCarthy, D.J.; Smyth, G.K. EdgeR: A Bioconductor Package for Differential Expression Analysis of Digital Gene Expression Data. *Bioinformatics* **2010**, *26*, 139–140. [[CrossRef](#)]

Capítulo 6. Otros Manuscritos

A continuación, se recopilan manuscritos de trabajos de investigación adicionales que enriquecieron mi investigación doctoral:

Orbe-Orihuela YC, Godoy-Lozano EE, Lagunas-Martínez A, Castañeda- Márquez AC, **Murga-Garrido SM**, Díaz-Benítez CE, Ochoa-Leyva A, Cornejo-Granados F, Cruz M, Estrada K, Sanchez -Flores A, Burguete-García AI. *Coprococcus catus* associated with the *emrK* and *ampC* resistance genes in childhood obesity. Manuscrito en revisión

Orbe-Orihuela YC, Godoy-Lozano EE, Lagunas-Martínez A, Castañeda-Márquez AC, **Murga-Garrido SM**, Díaz-Benítez CE, Ochoa-Leyva A, Cornejo-Granados F, Cruz M, Estrada K, Bermúdez-Morales VH, Sanchez-Flores A, Burguete-García AI. *Association of Gut Microbiota with Dietary-dependent Childhood Obesity*. Arch Med Res. 2022 Apr 2:S0188-4409(22)00028-5. doi: 10.1016/j.arcmed.2022.03.007. PMID: 35382951.

Murga-Garrido, S.M. Hong, Q., Cross, TW.L. et al. *Gut microbiome variation modulates the effects of dietary fiber on host metabolism*. Microbiome. 2021 May 20;9(1):117. doi: 10.1186/s40168-021-01061-6. PMID: 34016169; PMCID: PMC8138933.

Sublette MG, Cross TL, Korcarz CE, Hansen KM, **Murga-Garrido SM**, Hazen SL, Wang Z, Oguss MK, Rey FE, Stein JH. *Effects of Smoking and Smoking Cessation on the Intestinal Microbiota*. J Clin Med. 2020 Sep 14;9(9):2963. doi: 10.3390/jcm9092963. PMID: 32937839; PMCID: PMC7564179.

ORIGINAL ARTICLE

Association of Gut Microbiota with Dietary-dependent Childhood Obesity

Yaneth Citlalli Orbe-Orihuela,^{a,*} Elizabeth Ernestina Godoy-Lozano,^{a,*} Alfredo Lagunas-Martínez,^a Ana Cristina Castañeda-Márquez,^a Sofía Murga-Garrido,^b Cinthya Estefhany Díaz-Benítez,^a Adrian Ochoa-Leyva,^c Fernanda Cornejo-Granados,^c Miguel Cruz,^d Karel Estrada,^e Victor Hugo Bermúdez-Morales,^a Alejandro Sanchez-Flores,^e and Ana Isabel Burguete-García^a

^a *Epidemiología Genética, Centro de Investigación en Enfermedades Infecciosas, Instituto Nacional de Salud Pública, Cuernavaca, México*

^b *El Plan de Estudios Combinados en Medicina, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México*

^c *Departamento de Microbiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, México*

^d *Unidad de Investigación Médica en Bioquímica, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, Ciudad de México, México*

^e *Unidad Universitaria de Secuenciación Masiva y Bioinformática, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, México*

Received for publication October 19, 2021; accepted March 18, 2022 (ARCMED-D-21-01335).

Aim. To evaluate the taxonomic profile of the gut microbiota using metagenomics and the association with diet-dependent childhood obesity.

Methods. A cross-sectional study of a subsample of 46 children was conducted. The children were classified as normal-weight, overweight, and obese according to their age and sex and the World Health Organization (WHO) guidelines. Dietary patterns were determined through principal component analysis. The profile of the human gut microbiota was determined by bioinformatic analysis using whole metagenome shotgun sequencing. The association of gut microbiota and z-BMI, waist circumference and hip circumference, and the possible modifying effect of diet were analyzed using multiple regression models.

Results. Children with an abundance of *Holdemania spp.* and high protein and complex carbohydrate consumption had a lower z-BMI ($\beta -19.06$, $p = 0.011$), waist circumference ($\beta -171.92$, $p = 0.003$), and hip circumference ($\beta -157.57$, $p = 0.004$). In contrast, observed a positive association between *Coprococcus catus* and the low intake of this dietary pattern with hip circumference ($\beta 147.87$, $p = 0.025$). Furthermore, the presence of *Bilophila spp.* and *Paraprevotella xylaniphila* with high saturated fat and simple carbohydrate consumption we observed a positive association between z-BMI ($\beta 47.5$, $p = 0.002$), hip circumference ($\beta 44.54$, $p = 0.025$), and waist circumference ($\beta 44.34$, $p = 0.004$).

Conclusion. We suggest that the synergism between diet and the profile of children's gut microbiota can be a factor that could be associated with the development of obesity and its complications in childhood. © 2022 Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS). Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

Key Words: Gastrointestinal microbiome, Pediatric obesity, Diet, Metagenomics.

Introduction

Childhood obesity is a major global public health problem (1). In Mexico, the prevalence of overweight and obese children is 35.6% according to the National Survey of Health and Nutrition (ENSANUT-2018) (2).

* These authors contributed equally to this work.

Address reprint requests to: Ana Isabel Burguete-García, MD, PhD, Av. Universidad Col. Santa María Ahuacatitlan, Cuernavaca, Morelos, México, 62100; Phone: (+52) (777) 329-3000 ext. 2886.; E-mail: aburguete@insp.mx

Obesity is caused by a combination of factors non-modifiable and modifiable factors such as diet and gut microbiota (GM) (3,4). GM performs metabolic and biological functions that humans cannot perform (5,6). Besides, a previous study showed that dietary characteristics can explain 57% of the gut bacterial profile (6). Several studies have reported that the high consumption of saturated fats and refined sugars promotes the loss of GM equilibrium (dysbiosis) and a systemic inflammatory state, which is a characteristic of various pathologies, such as obesity (7–9).

Therefore, the relationship between the GM profile and diet in children could become a new field to incorporate into obesity prevention strategies. To evaluate the taxonomic profile of the gut microbiota using metagenomics and the association with diet-dependent childhood obesity.

Material and Methods

Study Population

The present paper conducted a cross-sectional study using a subsample of 48 individuals, and sample selection was performed using simple random sampling from the biological bank of the study previously reported by our research group (10). Samples from two children were eliminated from the analysis due to nonuniform bacterial enrichment (final $n = 46$). The available information for all samples included children's diet, physical activity, socioeconomic data, personal pathological history, family history of being overweight/obese, and biochemical and anthropometric measurements. The inclusion criteria were that the children had not presented gastrointestinal or chronic diseases and had not ingested antibiotics two months before the interview (10).

The study was approved by the ethics, biosecurity, and research committee of the National Institute of Public Health with approval number 1706. Informed consent and approval were obtained.

Anthropometric Measurements

The z-score body mass index (z-BMI), waist circumference, and hip circumference were determined from anthropometric measurements obtained by trained and standardized personnel using international techniques with previously calibrated instruments. Anthropometric measurements included weight (kg) measured on a SECA scale (SECA GmbH. & Co., Hamburg, Germany) with an accuracy of 0.1 kg, waist circumference (cm) obtained with a SECA-marked stadiometer with an accuracy of 1 mm (SECA GmbH. & Co., Hamburg, Germany) and hip circumference (cm) obtained with a SECA anthropometric tape with the precision of 1 mm (Seca GmbH. & Co., Hamburg, Ger-

many). All the participants remained standing with their arms by their sides without shoes and with as little clothing as possible (11,12). The waist circumference, hip circumference, and z-BMI (was calculated according to age and sex from the BMI [kg/m²]) (13) were used as continuous variables in the regression models; from the z-BMI, the children were classified as normal-weight (>-2 to $<+1$ SD), overweight ($>+1$ to $<+2$ SD) and obese ($>+2$ SD) (categorical BMI) (13) for use in the metagenomic analysis.

DNA Extraction, Sequencing, and Bioinformatic Analysis

Total DNA was purified from stool samples using a QIAmpKit DNA Stool Mini kit for humans (Qiagen Hilden, North Rhine-Westphalia, Germany) following the supplier's instructions. The DNA was used to determine the sequences of the metagenome using the Nextera XT Library Prep kit (Illumina, USA). PCR and 2.0% agarose gel electrophoresis verified that all metagenomic libraries were approximately 500 bp in size. The size and quality of the libraries were analyzed by a bioanalyzer (Agilent 2100 Technology). Finally, DNA libraries were quantified by fluorometry (QubitTM dsDNA HS Assay, Invitrogen, USA) and sequenced in NextSeq 500 cells in 1500 cycle paired-end format at the National Institute of Genomic Medicine (INMEGEN).

The sequence quality (Q_{20}) was evaluated using the Python-Cutadapt program in paired mode (14). Sequences of the human genome were mapped using the Bowtie2 software v2.4.2 (15), and reads were removed using SAMtools (16). The remaining reads were assembled using the Megahit software (v 1.0) (17), and the assemblies' quality was evaluated using the MetaQuast tools (v2.2) (Supplementary Table 1) (18). The sequences can be found at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/721692>. Taxonomic annotation was performed by annotating single-copy genes using Metaphlan2 (Metagenomic Phylogenetic Analysis v2.0), and the abundance at the genus level was plotted using ggplot2/R (19,24). The alpha diversity was analyzed through the Chao1 and Shannon indices from the abundance matrix at the genus level with Phyloseq/R (v.3.6) (Supplementary Figure 1A, 1B) (20). The similarity between the distribution of the beta diversity at the genus and species levels by categorical BMI was evaluated with the Bray-Curtis index, generating a graph with the nonmetric multidimensional scale (NMDS) with vegan/R v2.4-6 (Supplementary Figure 1C, 1D) (21).

Subsequently, differentially abundant genera and species were identified among the BMI categories with the metagenomeSeq method (v 1.28.2) (22,23), and a $p \leq 0.05$ was considered significant. The graphics were plotted using the ggplot2/R (24).

Dietary Patterns

To identify dietary patterns, dietary intake was evaluated over one year using a food frequency questionnaire (FFQ) previously validated with a Mexican population (25). The questionnaire included 111 items divided into 12 sections: dairy products, fruits, vegetables, legumes, eggs, meats and sausages, typical dishes, cereals, drinks, sweets and desserts, fats, and food supplements. The information was collected in the presence of children's parents or caregivers to obtain more specific measurements (26,27).

The foods were classified into 27 groups based on the similarity of the nutrient content between them (Supplementary Table 2). We obtained the percentage consumption of each food group that contributes to the total daily diet (in milliliters or grams) in each child and processed to z-scores for each food group (28,29). Principal component analysis (PCA) was performed with orthogonal rotation (varimax) being considered when eigenvalues >1.5. The patterns were satisfied for those food groups with factor loadings >0.35.

Covariates

The data on overweight and obesity in parents were collected by trained personnel through a questionnaire consisting of 18 questions on the presence or absence of obesity in one or both parents. Physical activity in leisure time was obtained through a physical activity questionnaire adapted to the study population based on a previously validated questionnaire (30). The questionnaire collected information about leisure activity and inactivity in the last month. The duration of physical activity in leisure time turned into metabolic equivalents (MET/hour/week) using the "Food Processor Nutrition and Fitness" v10.12.0 software (ESHA Research Inc., Salem, Oregon, USA).

Statistical Analyses

The variable distribution was reported with the following measures of central tendency as the means and standard deviations (SDs) for continuous variables and percentages for categorical variables. The *Kruskal-Wallis*'s test was used for the continuous variables and the X^2 test was used for the categorical variables stratified by BMI (categorical BMI).

The association between the relative abundance of bacteria and anthropometric measures (z-BMI, waist circumference, and hip circumference) was analyzed by linear regression models. The possible modifying effect of dietary patterns was evaluated between the associations of GM and anthropometric measures were analyzed by linear regression models according to the consumption (low/high) of dietary patterns. Patterns were dichotomized as low consumption (values \leq mean) and high consumption (values >mean). Potential confounding factors were selected using the methodology of directed acyclic diagrams (DAGs)

(31,32), other variables identified in the literature were evaluated, and only those variables that caused a change in the estimator >10% were considered (33). The regression models included age, sex, history of parent's overweight/obesity, and physical activity during leisure time as potential confounders; and p values ≤ 0.05 were considered significant. For the regression models stratified by consumption of the dietary pattern, the Bonferroni correction was used. (34). All statistical analyses were performed using the STATA statistical package v14.0 (College Station, TX).

Results

In this study, 46 children between 6–12 years old were selected (26 normal-weight, 11 overweight, and 9 obese). Table 1 shows the general characteristics of the general population.

Two dietary patterns were identified, representing 23.56% of the variability of total dietary consumption. A pattern based on protein and complex carbohydrates was defined by high consumption of vegetables, legumes, chili, eggs, fish, chicken, red meat, and whole grains and low consumption of sugary drinks. A pattern based on saturated fats and simple carbohydrates includes high consumption of sausages, sweet bread, potatoes, flours, fast food, snacks, and dressings, and low consumption of avocados and natural water (Supplementary Table 3).

From the metagenomic assemblies, we identified 130 genera (*Bacteroides* and *Alistipes* were very abundant) (Supplementary Figure 2).

We observed that obese children (OB) had greater abundance of *Dialister spp.* (4.4 ± 10.91 vs. 0.074 ± 0.21 , $p = 0.03$), *Paraprevotella xyliniphila* (0.122 ± 0.15 vs. 0.02 ± 0.08 , $p = 0.008$), and *Coprococcus catus* (0.04 ± 0.041 vs. 0.01 ± 0.02 , $p = 0.012$); lower abundance of unclassifiable bacterial genera in the family *Propionibacteriaceae* (*Propionibacteriaceae_unclassif*) (0.0003 ± 0.0010 vs. 0.005 ± 0.008 , $p = 0.04$) and *Holdemania spp.* (0.013 ± 0.021 vs. 0.044 ± 0.05 , $p = 0.03$); and lower abundance of the species *Bacteroides cellulosilyticus* (0.821 ± 1.69 vs. 2.08 ± 3.97 , $p = 0.03$), *Bacteroides intestinalis* (0.001 ± 0.003 vs. 1.98 ± 5.26 , $p = 0.03$), *Bacteroides thetaio-tomicron* (0.30 ± 0.35 vs. 1.32 ± 2.48 , $p = 0.03$) and *Butyricimonas synergistica* (0.0001 ± 0.0003 vs. 0.0023 ± 0.0035 , $p = 0.03$) compared with normal-weight children (NW) (Supplementary Figure 3, and 4).

In overweight children (OW), we observed a higher abundance of *Bilophila spp.* (0.16 ± 0.28 vs. 0.018 ± 0.03 , $p = 0.04$) and lower abundance of *Porphyromonas spp.* (0.003 ± 0.013 vs. 0.064 ± 0.14 , $p = 0.04$), *Clostridium bartlettii* (0.002 ± 0.008 vs. 0.054 ± 0.10 , $p = 0.004$), *Bacteroides finegoldii* (0.010 ± 0.02 vs. 0.86 ± 1.82 , $p = 0.009$) and *Bacteroides intestinalis* (0.0 ± 0.0 vs. 1.98 ± 5.26 , $p = 0.02$) compared to normal-weight children

Table 1. General characteristics of children by BMI.

Characteristics <i>n</i> = 46	Normal weight (–2 a +1 DE) (58.33%) Mean (S.D)	Overweight (>+1 a +2 DE) (22.92%) Mean (S.D)	Obesity (>2 DE) (18.75%) Mean (S.D)	<i>p</i>
Age (years)	8.03 (1.7)	9.0(2.1)	8.7(2.1)	0.33
zBMI	–0.38 (0.63)	1.56(0.26)	2.77(0.58)	<0.001
Waist circumference	54.7(5.53)	67.25(9.10)	75.64(9.11)	<0.001
Hip circumference	66.73(6.70)	79.36(10.47)	88.83(11.58)	<0.001
physical activity in leisure time (Mets)	348.2 (298.1)	398.4(359.8)	423.6 (573.9)	0.86
Total energy (Kcal)	1938.1(679.1)	2102.2(445.4)	1632.7(496.9)	0.23
Sex				
Boy (%)	53.9	30.7	15.4	0.39
Girl (%)	63.6	13.7	22.7	
History of parent's overweight/obesity				
No (%)	70	15	15	0.4
Yes (%)	50	28.6	21.4	
Proteins and complex carbohydrate patterns				
Low intake (%)	56.5	26.1	17.4	0.9
High intake (%)	56.5	21.74	21.74	
Saturated fats and simple carbohydrates patterns				
Low intake (%)	52.2	26.1	21.8	0.84
High intake (%)	60.9	21.8	17.4	

Results were expressed as mean \pm standard deviation (SD) for continuous variables and percentages (%) for categorical variables. Significant *p*-value $p \leq 0.05$ for continuous variables was K-wallis and X^2 for categorical variables.

(NW). Finally, we identified a greater abundance of *Granulicella spp.* (0.004 ± 0.007 vs. 0.014 ± 0.017 , $p = 0.04$) in obese children (OB) than in overweight children (OW) (Supplementary Figures 3, and 4).

To genus level we observed the following positive associations: *Diallistera spp.* and z-BMI (β : 0.28, CI 95% (0.06, 0.50), $p = 0.013$), hip circumference (β : 0.72, CI 95% (0.0035, 1.43), $p = 0.049$); *Bilophila spp.* and z-BMI (β : 9.66, CI 95% (0.69, –18.63) $p = 0.035$), waist circumference (β : 21.23, CI 95% (0.79, 41.66) $p = 0.042$). In contrast, we found negative associations between the unclassifiable bacterial genus in the family *Propionibacteriaceae* and hip circumference (β : –412.44, CI 95% (–822.4, –2.73), $p = 0.049$); *Holdemania spp.* on z-BMI (β : –20.4, CI 95% (–40.58, –0.29), $p = 0.047$) and waist circumference (β : –66.6, CI 95% (–121.68, –11.5), $p = 0.019$) (Table 2). To species level we observed that, positive association between *Paraprevotella xylaniphila* and z-BMI (β : 9.64, CI 95% (2.33, 16.95), $p = 0.01$) (Table 2).

When we evaluate the effect modification of the dietary pattern on the association between GM and z-BMI, waist circumference, hip circumference, we observed a negative effect of *Holdemania spp.* on z-BMI (β : –19.06, CI 95% (–33.15, –4.99), $p = 0.011$), waist circumference (β : –171.92, CI 95% (–277.23, –66.63), $p = 0.003$) and hip circumference (β : –157.57, CI 95% (–257.45, –57.69), $p = 0.004$) with high protein and complex carbohydrate intake (Table 3). In contrast, the bacterial species *Coprococcus catus* was positively associated with hip circumference (β : 147.87, CI 95% (21.36, 274.39), $p = 0.025$) in

children with low consumption of the same pattern (Table 4).

On the other hand, we observed a positive association between the abundance of *Bilophila spp.* with waist circumference (β 47.5, CI 95% (20.81, 74.20), $p = 0.002$) and hip circumference (β 44.54, CI 95% (5.23, 83.85), $p = 0.025$) when there is high saturated fat and simple carbohydrate consumption (Table 5). At the species level, observed that the abundance of *Paraprevotella xylaniphila* and consumption of the same pattern are positively associated with waist circumference (β 44.34, CI 95% (16.26, 72.43), $p = 0.004$) (Table 6).

Discussion

We found positive associations between some genus and species gut bacterial, and anthropometric measures diet dependent.

Maya-Lucas O, et al. reported a greater abundance of *Holdemania* in normal-weight children compared to obese children dependent on high consumption of protein and complex carbohydrates (4), these results are consistent with the data found in our study. This bacterial genus is an important butyrate generator from dietary fiber, and butyrate participates in the synthesis of mucin, providing greater stability of tight junctions (36) and decreasing the translocation of LPS fragments and the inflammatory response and thus the development of metabolic alterations (4,35,37).

Additionally, we found a positive association between the presence of *Bilophila* with hip circumference and waist

Table 2. Association between different abundances of genus and species and adiposity.

	BMI			Waist circumference			Hip circumference		
	β	95% CI	<i>p</i>	β	95% CI	<i>p</i>	β	95% CI	<i>p</i>
Genus									
Granulicella	33.81	(-73.04, 140.68)	0.52	180.79	(-80.37, 441.96)	0.16	205.61	(-75.18, 486.4)	0.15
Propionibacter unclassified	-78.39	(-211.9, 55.20)	0.24	-359.99	(-742.25, 22.26)	0.064	-412.44	(-822.14, -2.73)	0.049
Porphhyromonas	-4.52	(-13.63, 4.59)	0.32	-10.41	(-37.73, 16.91)	0.45	-10.57	(-40.05, 18.91)	0.48
Holdemania	-20.4	(-40.58, -0.29)	0.047	-66.6	(-121.68, -11.5)	0.019	-43.24	(-105.37, 18.89)	0.17
Diallister	0.28	(0.06, .50)	0.013	0.63	(-0.036, 1.30)	0.063	0.72	(0.0035, 1.43)	0.049
Bilophila	9.66	(0.69, -18.63)	0.035	21.23	(0.79, 41.66)	0.042	16.18	(-6.45, 38.81)	0.16
Species									
Bacteroides cellulosilyticus	-0.09	(-0.20, 0.03)	0.15	-0.51	(-1.29, 0.27)	0.20	-0.76	(-1.61, 0.07)	0.074
Bacteroides finegoldii	-0.71	(-1.52, 0.11)	0.086	-1.60	(-3.95, 0.74)	0.18	-0.76	(-3.35, 1.82)	0.55
Bacteroides intestinalis	-0.26	(-2.80, 0.019)	0.068	0.070	(-0.65, 0.79)	0.85	-0.17	(-0.95, 0.61)	0.66
Bacteroides thetaiotaomicron	-0.31	(-0.89, 0.28)	0.294	-0.56	(-2.00, 0.87)	0.43	-0.55	(-2.13, 1.03)	0.46
Butyricimonas synergistica	-210.9	(-564.1, 142.7)	0.235	-106.09	(-956.91, 744.71)	0.82	-333.17	(-1257.8, 591.43)	0.47
Paraprevotella xylaniphila	9.64	(2.33, 16.95)	0.011	20.18	(-0.75, 41.12)	0.059	20.87	(-2.12, 43.87)	0.074
Coprococcus catus	13.05	(-9.44, 35.54)	0.25	21.11	(-34.19, 76.41)	0.45	31.01	(-29.08, 91.10)	0.33
Clostridium bartlettii	-11.95	(-26.07, 2.15)	0.095	-29.17	(-63.16, 4.80)	0.090	-34.28	(-71.21, 2.64)	0.068

Adjusted by sex, family history of obesity, physical activity in leisure time, age, and saturated fats and simple carbohydrates patterns. *p* value $p \leq 0.025$ adjusted by multiple comparisons. Boldface indicates a significant *p* value.

Table 3. Association between genus and adiposity stratified by consumption of proteins and complex carbohydrate patterns.

consumption	BMI			waist circumference			Hip circumference		
	β	95% CI	<i>p</i>	β	95% CI	<i>p</i>	β	95% CI	<i>p</i>
Granulicella									
Low	23.9	(-43.24, 91.09)	0.46	264.01	(-28.5, 556.59)	0.074	294.36	(-206.85, 795.58)	0.23
High	-9.53	(-67.32, 48.24)	0.73	-182.84	(-638.71, 273.02)	0.4	-100.72	(-533.18, 331.73)	0.62
Propionibacteriaceae_unclassified									
Low	14.25	(-78.28, 106.79)	0.74	-11.83	(-452.31, 428.6)	0.95	-138.98	(-848.18, 570.22)	0.68
High	-53.51	(130.58, 23.56)	0.16	-393.74	(-1019.76, 232.28)	0.2	-330.73	(-922.28, 260.80)	0.25
Porphhyromonas									
Low	-2.046	(-6.52, 2.425)	0.34	-9.44	(-30.69, 11.80)	0.36	-11.88	(-46.66, 22.89)	0.47
High	-6.54	(-17.49, 4.39)	0.22	-73.4	(-157.01, 10.20)	0.08	-74.93	(-151.46, 1.58)	0.054
Holdemania									
Low	-4.76	(-17.27, 7.74)	0.43	-16.38	(-76.28, 43.52)	0.57	20.67	(-76.67, 118.03)	0.65
High	-19.06	(-33.15, -4.99)	0.011	-171.92	(-277.23, -66.63)	0.003	-157.57	(-257.45, -57.69)	0.004
Diallister									
Low	0.257	(-0.09, 0.609)	0.14	1.09	(-0.61, 2.78)	0.19	1.004	(1.85, 3.85)	0.46
High	0.102	(-0.013, 0.22)	0.079	0.71	(-0.24, 1.66)	0.13	0.736	(-0.14, 1.60)	0.09
Bilophila									
Low	2.11	(-2.50, 6.73)	0.34	16.44	(-4.359, 37.24)	0.11	7.41	(-28.88, 43.69)	0.67
High	1.48	(-3.08, 6.05)	0.5	20.21	(-15.47, 55.90)	0.24	20.83	(-12.21, 53.87)	0.2

Adjusted by sex, family history of obesity, physical activity in leisure time, age, and saturated fats and simple carbohydrates patterns. *p* value $p \leq 0.025$ adjusted by multiple comparisons. Boldface indicates a significant *p* value.

circumference with higher saturated fat and simple carbohydrate consumption. Our results are like those described by David LA, et al. They observed a positive correlation between a higher abundance of *Bilophila* and saturated fat consumption in adults (38). Sen T, et al. observed a higher abundance of *Bilophila* and body weight in rats fed a low-fat diet combined with a high sucrose concentration compared to rats consuming a low-fat and sucrose diet (39). *Bilophila* is a sulfidogenic bacteria that produces sulfite reductase A, which is a genotoxic and proinflammatory gas that inhibits molecules involved in the stability of the

intestinal lumen, increases permeability, contributes to a chronic inflammatory state, and alters bile acid metabolism (40,41).

We also observed that *Paraprevotella xylaniphila* was positively associated with waist circumference when there was high consumption of saturated fat and simple carbohydrate. Fei Y, et al. observed a high abundance of the *Paraprevotella* genus in rats fed a high-fat diet compared to rats fed diets supplemented with Xilooligosaccharides (42). *P. clara* and *P. xylaniphila* have been reported as the main succinate fermentation bacteria in diets (43). Serena

Table 4. Association between species and adiposity stratified by consumption of proteins and complex carbohydrate patterns.

Consumption	BMI			Waist circumference			Hip circumference		
	β	95% CI	<i>p</i>	β	95% CI	<i>p</i>	β	95% CI	<i>p</i>
<i>Bacteroides cellulosilyticus</i>									
Low	-0.09	(-0.45, 0.25)	0.56	0.17	(-1.49, 1.85)	0.83	-0.58	(-3.28, 2.10)	0.65
High	-0.09	(-0.23, 0.04)	0.18	-0.93	(-2.01, 0.13)	0.083	-1.00	(-1.98, -0.03)	0.054
<i>Bacteroides intestinalis</i>									
Low	-0.06	(-0.20, 0.06)	0.32	-0.14	(-0.79, 0.51)	0.67	-0.21	(-1.22, 0.78)	0.67
High	-0.13	(-0.38, 0.12)	0.29	0.83	(-1.35, 3.02)	0.43	0.63	(-1.34, 2.61)	0.50
<i>Paraprevotella xylaniphila</i>									
Low	1.93	(-4.47, 8.32)	0.53	9.94	(-20.00, 39.90)	0.49	32.67	(-11.21, 76.55)	0.13
High	2.08	(-2.52, 6.69)	0.34	36.07	(0.53, 71.60)	0.047	24.81	(-9.04, 58.66)	0.14
<i>Coprococcus catus</i>									
Low	9.47	(-10.33, 29.28)	0.32	73.75	(-13.89, 161.39)	0.093	147.87	(21.36, 274.39)	0.025
High	4.52	(-7.05, 16.09)	0.42	19.25	(-80.87, 119.38)	0.68	-6.10	(-13.69, 1.48)	0.10
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>									
Low	-0.058	(-0.31, 0.19)	0.63	-35	(-1.53, 0.82)	0.54	.004	(-1.85, 1.86)	0.99
High	-0.59	(-1.62, 0.43)	0.24	-5.32	(-14.05, 3.39)	0.24	-6.10	(-13.69, 1.48)	0.10
<i>ButyrClimonas synergistica</i>									
Low	-93.3	(-306.8, 120.24)	0.36	-369.82	(-1380.39, 640.7)	0.44	-364.67	(-1949.5, 1220.1)	0.63
High	-86.29	(-307.3, 134.68)	0.42	368.243	(-1543.92, 2280.4)	0.69	-3.02	(-1732.89, 1726.8)	0.99
<i>Clostridium bartlettii</i>									
Low	-5.39	(-11.04, 0.25)	0.060	-21.2	(-48.75, 6.29)	0.12	-24.61	(-68.84, 19.61)	0.26
High	-16.20	(-34.31, 1.89)	0.076	-159.7	(-307.94, -11.49)	0.036	-150.41	(-281.73, -19.1)	0.027
<i>Bacteroides finegoldii</i>									
Low	-0.17	(-0.55, 0.19)	0.34	-0.65	(-2.43, 1.11)	0.45	.13	(-2.67, 2.94)	0.92
High	-0.29	(-1.04, 0.43)	0.41	-1.63	(-7.98, 4.71)	0.60	-1.59	(-7.29, 4.11)	0.56

Adjusted by the following: sex, family history of obesity, physical activity in leisure time, age, and saturated fats and simple carbohydrates patterns. *p* value $p \leq 0.025$ adjusted by multiple comparisons. Boldface indicates a significant *p* value.

Table 5. Association between genus and adiposity stratified by consumption of saturated fats and simple carbohydrates patterns.

consumption	BMI			Waist circumference			Hip circumference		
	β	95% CI	<i>p</i>	β	95% CI	<i>p</i>	β	95% CI	<i>p</i>
<i>Granulicella</i>									
Low	3.63	(-53.27, 60.55)	0.89	19.67	(-365.98, 405.32)	0.95	-5.71	(-334.33, 322.90)	0.97
High	22.78	(-83.88, 129.44)	0.66	132.9	(-540.50, 806.30)	0.68	491.7	(-313.41, 1296.32)	0.21
<i>Propionibacteriaceae unclassif</i>									
Low	-40.14	(-151.02, 70.71)	0.45	-252.47	(-1005.46, 500.5)	0.49	-201.6	(-844.26, 441.04)	0.51
High	-40.14	(-145.81, 35.93)	0.22	-352.24	(924.44, 219.94)	0.21	-264.31	(-1003.15, 474.53)	0.45
<i>Porphyromonas</i>									
Low	-1.1	(-6.09, 3.87)	0.64	-10	(-43.60, 23.58)	0.54	-3.517	(-32.43, 25.39)	0.8
High	-5.71	(17.39, 5.96)	0.31	-13.62	(-89.37, 62.130)	0.78	-23.47	(-117.73, 70.78)	0.65
<i>Holdemania</i>									
Low	-7.9	(-18.53, 2.63)	0.13	-60.91	(-131.01, 9.16)	0.084	-28.45	(-92.44, 35.52)	0.36
High	-12.63	(-31.20, 5.92)	0.17	-52.38	(-173.74, 68.97)	0.34	-41.64	(-195.62, 112.3)	0.57
<i>Dialister</i>									
Low	0.09	(-0.034, 0.21)	0.14	0.6285	(-0.19, 1.45)	0.12	0.62	(-0.06, 1.30)	0.072
High	0.32	(-0.17, 0.81)	0.18	2.46	(-0.51, 5.44)	0.098	2.22	(-1.66, 6.1)	0.24
<i>Bilophila</i>									
Low	1.41	(-3.49, 6.32)	0.55	8.21	(-25.16, 41.58)	0.69	-1.99	(-30.65, 26.65)	0.85
High	5.06	(-0.095, 10.22)	0.054	47.5	(20.81, 74.20)	0.002	44.54	(5.23, 83.85)	0.025

Adjusted by the following: sex, family history of obesity, physical activity in leisure time, age, and protein and complex carbohydrates patterns. *p* value $p \leq 0.025$ adjusted by multiple comparisons. Boldface indicates a significant *p* value.

C, et al. observed higher concentrations of plasma succinate in obese individuals and positive correlations of succinate with BMI, insulin, glucose, HOMA-IR, and triglycerides (44). We found increased hip circumference in children with an abundance of *Coprococcus catus* and low

consumption of proteins and complex carbohydrates. These results are consistent with those reported by Kasai C, et al. in an adult population. They found a greater abundance of *Coprococcus catus* in obese subjects than in nonobese subjects (45), suggesting that the abundance of *Coprococ-*

Table 6. Association between genus and adiposity stratified by consumption of saturated fats and simple carbohydrates patterns.

consumption	BMI			waist circumference			Hip circumference		
	β	95% CI	<i>p</i>	β	95% CI	<i>p</i>	β	95% CI	<i>p</i>
Bacteroides cellulosilyticus									
Low	-0.08	(-0.26, 0.093)	0.34	-0.77	(-1.93, 0.37)	0.17	-0.82	(-1.77, 0.11)	0.08
High	-0.08	(-0.32, 0.15)	0.45	0.0096	(-1.51, 1.52)	0.98	-0.14	(-2.04, 1.74)	0.87
Bacteroides intestinalis									
Low	-0.03	(-0.19, 0.11)	0.59	-0.01	(-1.07, 1.03)	0.97	-0.04	(-0.95, 0.86)	0.91
High	-0.16	(-0.40, 0.075)	0.17	0.41	(-1.17, 2.01)	0.58	0.12	(-1.88, 2.13)	0.89
Paraprevotella xylaniphila									
Low	0.20	(-6.79, 7.20)	0.95	11.45	(-37.96, 60.85)	0.63	10.28	(-32.43, 53.0)	0.61
High	4.61	(-0.65, 9.89)	0.082	44.34	(16.26, 72.43)	0.004	43.46	(4.05, 82.87)	0.03
Coproccoccus catus									
Low	3.2	(-7.93, 14.48)	0.54	20.63	(-59.27, 100.5)	0.59	25.62	(-42.81, 94.06)	0.43
High	5.81	(-15.19, 26.82)	0.56	60.63	(-69.21, 190.48)	0.33	113.62	(-41.84, 269.08)	0.14
Bacteroides thetaiotaomicron									
Low	-0.07	(-0.35, 0.21)	0.60	-0.26	(-2.26, 1.73)	0.78	0.12	(-1.61, 1.86)	0.87
High	-0.22	(-1.04, 0.59)	0.57	-2.17	(-7.23, 2.87)	0.37	-2.72	(-9.02, 3.57)	0.37
Butyricimonas synergistica									
Low	-134.48	(-390.19, 121.23)	0.28	-456.11	(-2327.8, 1415.54)	0.61	-244.32	(-1871.7, 1383.1)	0.75
High	-21.78	(-271.27, 227.68)	0.85	762.38	(-757.79, 2282.5)	0.30	323.0	(-1629.9, 2275.9)	0.73
Clostridium bartlettii									
Low	-11.34	(-28.88, 6.19)	0.18	-105.95	(-225.20, 13.28)	0.078	-96.57	(-198.4, 5.31)	0.062
High	-7.74	(-14.59, -0.88)	0.029	-24.00	(72.66, 24.66)	0.31	-35.51	(-95.32, 24.27)	0.22
Bacteroides finegoldii									
Low	-0.25	(-0.68, 0.17)	0.22	-0.79	(-3.94, 2.35)	0.6	-0.69	(-3.42, 2.02)	0.59
High	-0.16	(-1.00, 0.66)	0.67	-0.94	(-6.21, 4.32)	0.79	0.12	(-6.48, 6.71)	0.97

Adjusted by the following: sex, family history of obesity, physical activity in leisure time, age, and protein and complex carbohydrates patterns. *p* value $p \leq 0.025$ adjusted by multiple comparisons. Boldface indicates a significant *p* value.

cus catus (belonging to filum Firmicutes) is related to the metabolism of polysaccharides and high energy extraction capacity from the diet, promoting an increase in adipose tissue (46).

In addition, we observed a diet-independent negative association of unclassified bacterial genera in the family *Propionibacteriaceae* with hip circumference. These bacteria produce propionic acid from lactic acid and vitamin B12, suggesting that these bacteria are probiotics (46).

In contrast, *Diallister spp.* was associated with increased z-BMI and hip circumference. Our results are consistent with the findings of Chen X, et al. that reported a higher abundance of *Diallister spp.* in obese individuals than in normal-weight individuals ($p = 0.02$) (47). However, De la Cuesta-Zuluaga J, et al. reported that *Diallister spp.* was associated with normal concentrations of cardiometabolic indicators and normal-weight ($p < 0.005$) (48). This difference could be due to artifacts related to the use of V4 16S rRNA GM profiling in adults, and weight classification is according to body size phenotypes (48).

Our study's strength was the analysis of GM using Whole Metagenome Shotgun (WMS) sequencing, which reduces biases and provides a more sensitive GM profile. Additionally, WMS sequencing allowed a taxonomic profile resolution at a species level with high confidence (49), contributing to a more detailed and better understanding of the relationship between GM and diet.

Nonetheless, this study has some limitations related to food consumption frequency; however, this nondifferential error would not affect the validity of the results. The instrument was applied by trained personnel to all participants, and information was collected via a consensus between caregivers and children for precise measurements.

Conclusion

Our results suggest that high protein intake and an abundance of *Holdemania spp.* are negatively associated with z-BMI, waist circumference, and hip circumference. Furthermore, *Coproccoccus catus* and low consumption of protein increase hip circumference. Additionally, *Bilophila spp.* and *P. xylaniphila* and high saturated fat and simple carbohydrate consumption increase anthropometric measures.

This evidence has greater importance in the field of public health; however, it is of great importance to validate our results through experimental models to obtain a better knowledge of the functioning and synergy of the bacteria of the human gut, diet, and your possible involvement in the development of childhood obesity.

Conflict of Interest

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

Acknowledgments

We thank the participants of the present study and the team of the biochemistry unit (IMSS) for their technical assistance in the biochemical determination and the genetic epidemiology (INSP) group for the determination of the anthropometric measurements and questionnaire application.

Funding

The study was supported by the National Council of Sciences and Technology (CONACYT, grant no. SSA/IMSS/ISSSTE-CONACYT 2012-180808, CONACYT SSA/IMSS/ISSSTE-CONACYT 2015-262133, CONACYT CB2017-2018 and Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS, 2011-785-012, Fis: FIS/IMSS/PROT/PRIO/10/011) and was supported by CONACYT with register number 895733.

Supplementary Materials

Supplementary material associated with this article can be found, in the online version, at doi:[10.1016/j.arcmed.2022.03.007](https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2022.03.007).

References

- World Health Organization. Obesity and overweight. 2020. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight> (Accessed November 1, de 2020).
- Shamah-Levy T, Vielma-Orozco E, Heredia-Hernández O, et al. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2018-19: Resultados Nacionales. Primera edición. Cuernavaca, México: Instituto Nacional de Salud Pública; 2020.
- Lopez-Cepero AA, Palacios C. Association of the intestinal microbiota and obesity. *P R Health Sci J* 2015;34:60–64.
- Maya-Lucas O, Murugesan S, Nirmalkar K, et al. The gut microbiome of Mexican children affected by obesity. *Anaerobe* 2019;55:11–23. doi:[10.1016/j.anaerobe.2018.10.009](https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2018.10.009).
- Nagpal R, Newman TM, Whang S, et al. Obesity-Linked Gut Microbiome Dysbiosis Associated with Derangements in Gut Permeability and Intestinal Cellular Homeostasis Independent of Diet. *J Diabetes Res* 2018;2018:3462092. doi:[10.1155/2018/3462092](https://doi.org/10.1155/2018/3462092).
- Zhang C, Zhang M, Wang S, et al. Interactions between gut microbiota, host genetics and diet relevant to the development of metabolic syndromes in mice. *ISME J* 2010;4(2):232–241. doi:[10.1038/ismej.2009.112](https://doi.org/10.1038/ismej.2009.112).
- Castañeda-Márquez AC, Díaz-Benítez CE, Bahena-Roman M, et al. *Lactobacillus paracasei* as a protective factor of obesity induced by an unhealthy diet in children. *Obes Res Clin Pract* 2020;14:271–278. doi:[10.1016/j.orcp.2020.04.005](https://doi.org/10.1016/j.orcp.2020.04.005).
- Tagliabue A, Eli M. The role of gut microbiota in human obesity: recent findings and future perspectives. *Nutr Metabol Cardiovasc Dis* 2013;23:160–168. doi:[10.1016/j.numecd.2012.09.002](https://doi.org/10.1016/j.numecd.2012.09.002).
- Jumpertz R, Le DS, Turnbaugh PJ, et al. Energy-balance studies reveal associations between gut microbes, caloric load, and nutrient absorption in humans. *Am J Clin Nutr* 2011;94:58–65. doi:[10.3945/ajcn.110.010132](https://doi.org/10.3945/ajcn.110.010132).
- Estrada-Velasco BI, Cruz M, Garcia-Mena J, et al. Childhood obesity is associated to the interaction between Firmicutes and high energy food consumption. *Nutr Hosp* 2015;31:1074–1081. doi:[10.3305/nh.2015.31.3.8302](https://doi.org/10.3305/nh.2015.31.3.8302).
- Lohman TG, Roche AF, Martorell R, et al. Anthropometric standardization reference manual. Champaign, Illinois: Human Kinetics Books; 1998. p. 3–8. 39–70.
- Habicht JP. Estandarización de métodos epidemiológicos cuantitativos sobre el terreno. *Oficina Sanitaria Panamericana* 1974;LXXV(5):375–384.
- De Onis M, Onyango A, Borghi E, et al. Development of a WHO growth reference for schoolaged children and adolescents. *Bull World Health Organ* 2007;85:660–667. doi:[10.2471/blt.07.043497](https://doi.org/10.2471/blt.07.043497).
- Martin M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.journal* 2011;17:10–12. doi:[10.14806/ej.17.1.200](https://doi.org/10.14806/ej.17.1.200).
- Langmead B, Salzberg SL. Fast gapped-read alignment with Bowtie2. *Nat Methods* 2012;9:357–359. doi:[10.1038/nmeth.1923](https://doi.org/10.1038/nmeth.1923).
- Li H, Handsaker B, Wysoker A, et al. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* 2009;25:2078–2079. doi:[10.1093/bioinformatics/btp352](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp352).
- Li D, Liu CM, Luo R, et al. MEGAHIT: an ultra-fast single-node solution for large and complex metagenomics assembly via succinct de Bruijn graph. *Bioinformatics* 2015;31:1674–1676. doi:[10.1093/bioinformatics/btv033](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv033).
- Mikheenko A, Saveliev V, Gurevich A. MetaQUAST: evaluation of metagenome assemblies. *Bioinformatics* 2016;32:1088–1090. doi:[10.1093/bioinformatics/btv697](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv697).
- Segata N, Waldron L, Ballarini A, et al. Metagenomic microbial community profiling using unique clade-specific marker genes. *Nat Methods* 2013;9:811–814. doi:[10.1038/nmeth.2066](https://doi.org/10.1038/nmeth.2066).
- McMurdie PJ, Holmes S. Phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS One* 2013;8:e61217. doi:[10.1371/journal.pone.0061217](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217).
- Dixon P. VEGAN, a package of R functions for community ecology. *J Veg Sci* 2003;14:927–930. doi:[10.1111/j.1654-1103.2003.tb02228.x](https://doi.org/10.1111/j.1654-1103.2003.tb02228.x).
- McMurdie PJ, Holmes S. Waste not, want not: why rarefying microbiome data is inadmissible. *PLoS Comput Biol* 2014;10:e1003531. doi:[10.1371/journal.pcbi.1003531](https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003531).
- Paulson JN, Stine OC, Bravo HC, et al. Differential abundance analysis for microbial marker-gene surveys. *Nat Methods* 2013;10:1200–1202. doi:[10.1038/nmeth.2658](https://doi.org/10.1038/nmeth.2658).
- Wickham H. ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. Second edition. New York, NY: Springer; 2016. doi:[10.1007/978-3-319-24277-4](https://doi.org/10.1007/978-3-319-24277-4).
- Willett W. *Nutritional Epidemiology*. First edition. USA, Oxford: Oxford University Press; 1990.
- Pérez-Rodrigo C, Artiach-Escauriaza B, Artiach-Escauriaza J, et al. Dietary assessment in children and adolescents: issues and recommendations. *Nutr Hosp* 2015;31(Suppl.3):76–83. doi:[10.3305/nh.2015.31.sup3.8755](https://doi.org/10.3305/nh.2015.31.sup3.8755).
- Olukotun O, Seal N. A systematic review of dietary assessment tools for children age 11 years and younger. *ICAN* 2015;7:139–134. doi:[10.1177/1941406415584819](https://doi.org/10.1177/1941406415584819).
- Lozada AL, Flore M, Rodríguez S, et al. Patrones dietarios en adolescentes mexicanas. Una comparación de dos métodos. *Encuesta Nacional de Nutrición, 1999*. Salud Pública Mex 2007;49:263–273.
- Newby PK, Muller D, Hallfrisch J, et al. Food patterns measured by factor analysis and anthropometric changes in adults. *AJCN* 2004;80:504–513. doi:[10.1093/ajcn/80.2.504](https://doi.org/10.1093/ajcn/80.2.504).
- Hernández B, Gortmaker S, Laird N, et al. Validez y reproducibilidad de un cuestionario de actividad e inactividad física para escolares de la ciudad de México (Spanish). *Salud Pública Mex [SerialontheInternet]* 2000;42:315.
- Greenland S, Pearl J, Robins JM. Causal diagrams for epidemiologic research. *Epidemiology* 1999;10:37–48.


32. Textor J, Hardt J, Knüppel S. DAGitty: A Graphical Tool for Analyzing Causal Diagrams. *Epidemiology* 2011;22:745. doi:10.1097/EDE.0b013e318225c2be.
33. Greenland S. Modeling and variable selection in epidemiologic analysis. *Am J Public Health* 1989;79:340–349.
34. Kotz S, Johnson NL. *Encyclopedia of statistical sciences*. Second edition. New York: John Wiley & Sons; 1985.
35. Gomez-Arango LF, Barrett HL, Wilkinson SA, et al. Low dietary fiber intake increases Collinsella abundance in the gut microbiota of overweight and obese pregnant women. *Gut Microbes* 2018;9:189–201. doi:10.1080/19490976.2017.1406584.
36. Peng L, Li ZR, Green RS, et al. Butyrate enhances the intestinal barrier by facilitating tight junction assembly via activation of AMP-activated protein kinase in Caco-2 cell monolayers. *J Nutr* 2009;139:1619–1625. doi:10.3945/jn.109.104638.
37. Cani PD, Bibiloni R, Knauf C, et al. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes* 2008;57:1470–1481. doi:10.2337/db07-1403.
38. David LA, Maurice CF, Carmody RN, et al. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature* 2014;505:559–563. doi:10.1038/nature12820.
39. Sen T, Cawthon CR, Ihde BT, et al. Diet-driven microbiota dysbiosis is associated with vagal remodeling and obesity. *Physiol Behav* 2017;173:305–317. doi:10.1016/j.physbeh.2017.02.027.
40. Baldwin J, Collins B, Wolf PG, et al. Table grape consumption reduces adiposity and markers of hepatic lipogenesis and alters gut microbiota in butter fat-fed mice. *J Nutr Biochem* 2016;27:123–135. doi:10.1016/j.jnutbio.2015.08.027.
41. Devkota S, Wang Y, Musch MW, et al. Dietary-fat-induced taurocholic acid promotes pathobiont expansion and colitis in IL10^{-/-} mice. *Nature* 2012;5:104–108 487. doi:10.1038/nature11225.
42. Fei Y, Wang Y, Pang Y, et al. Xylooligosaccharide Modulates Gut Microbiota and Alleviates Colonic Inflammation Caused by High Fat Diet Induced Obesity. *Front Physiol* 2020;22:1601 10. doi:10.3389/fphys.2019.01601.
43. Morotomi M, Nagai F, Sakon H, et al. Paraprevotella clara gen. nov., sp. nov. and Paraprevotella xylaniphila sp. nov., members of the family Prevotellaceae isolated from human faeces. *Int J Syst Evol Microbiol* 2009;59:1895–1900. doi:10.1099/ijs.0.008169-0.
44. Serena C, Ceperuelo-Mallafre V, Keiran N, et al. Elevated circulating levels of succinate in human obesity are linked to specific gut microbiota. *ISME J* 2018;12:1642–1657. doi:10.1038/s41396-018-0068-2.
45. Kasai C, Sugimoto K, Moritani I, et al. Comparison of the gut microbiota composition between obese and non-obese individuals in a Japanese population, as analyzed by terminal restriction fragment length polymorphism and next-generation sequencing. *BMC Gastroenterol* 2015;11:15–100. doi:10.1186/s12876-015-0330-2.
46. Kiatpapan P, Murooka Y. Genetic manipulation system in propionibacteria. *J Biosci Bioeng* 2002;93:1–8 PMID: 16233156.
47. Chen X, Sun H, Jiang F, et al. Alteration of the gut microbiota associated with childhood obesity by 16S rRNA gene sequencing. *PeerJ* 2020;8:e8317. doi:10.7717/peerj.8317.
48. De la Cuesta-Zuluaga J, Corrales-Agudelo V, Carmona JA, et al. Body size phenotypes comprehensively assess cardiometabolic risk and refine the association between obesity and gut microbiota. *Int J Obes (Lond)* 2018;42:424–432. doi:10.1038/ijo.2017.281.
49. Escobar-Zepeda A, Godoy-Lozano EE, Raggi L, et al. Analysis of sequencing strategies and tools for taxonomic annotation: Defining standards for progressive metagenomics. *Sci reports* 2018;10:4259. doi:10.1038/s41598-018-30515-5.

RESEARCH

Open Access



Gut microbiome variation modulates the effects of dietary fiber on host metabolism

Sofia M. Murga-Garrido^{1,2†}, Qilin Hong^{3†}, Tzu-Wen L. Cross^{1,4†}, Evan R. Hutchison¹, Jessica Han⁵, Sydney P. Thomas⁵, Eugenio I. Vivas¹, John Denu⁵, Danilo G. Ceschin⁶, Zheng-Zheng Tang^{3,5*} and Federico E. Rey^{1*} 

Abstract

Background: There is general consensus that consumption of dietary fermentable fiber improves cardiometabolic health, in part by promoting mutualistic microbes and by increasing production of beneficial metabolites in the distal gut. However, human studies have reported variations in the observed benefits among individuals consuming the same fiber. Several factors likely contribute to this variation, including host genetic and gut microbial differences. We hypothesized that gut microbial metabolism of dietary fiber represents an important and differential factor that modulates how dietary fiber impacts the host.

Results: We examined genetically identical gnotobiotic mice harboring two distinct complex gut microbial communities and exposed to four isocaloric diets, each containing different fibers: (i) cellulose, (ii) inulin, (iii) pectin, (iv) a mix of 5 fermentable fibers (assorted fiber). Gut microbiome analysis showed that each transplanted community preserved a core of common taxa across diets that differentiated it from the other community, but there were variations in richness and bacterial taxa abundance within each community among the different diet treatments. Host epigenetic, transcriptional, and metabolomic analyses revealed diet-directed differences between animals colonized with the two communities, including variation in amino acids and lipid pathways that were associated with divergent health outcomes.

Conclusion: This study demonstrates that interindividual variation in the gut microbiome is causally linked to differential effects of dietary fiber on host metabolic phenotypes and suggests that a one-fits-all fiber supplementation approach to promote health is unlikely to elicit consistent effects across individuals. Overall, the presented results underscore the importance of microbe-diet interactions on host metabolism and suggest that gut microbes modulate dietary fiber efficacy.

Introduction

Humans harbor diverse and dynamic microbial communities in their intestines that span the three domains of life [1, 2]. These microbes play key roles on host biology, including breakdown of complex dietary components, vitamin production, energy harvesting, immune system

maturation, and protection against pathogens [2–4]. While many microbial functions are shared among gut communities from unrelated individuals, large interpersonal differences have also been reported [1]. Factors such as genetics, environment, and lifestyles contribute to these differences [5, 6]. Identifying the consequences of this variation as it relates to host immune responses, drug effectiveness, and metabolism is key to better understand how microbes modulate human biology and for successful implementation of precision medicine and personalized nutritional strategies.

Metabolic disease represents a major health challenge worldwide, with an estimate prevalence of 20–25% of

* Correspondence: ztang2@wisc.edu; ferey@wisc.edu

[†]Sofia M. Murga-Garrido, Qilin Hong, and Tzu-Wen L. Cross are co-first authors; order determined by relative overall contributions.

³Department of Biostatistics and Medical Informatics, University of Wisconsin-Madison, 600 Highland Avenue, Madison, WI 53792, USA

¹Department of Bacteriology, University of Wisconsin-Madison, 1550 Linden Dr., Madison, WI 53706, USA

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2021 **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

the world's adult population [7, 8]. A large number of studies indicate that the gut microbiota influences the development of metabolic syndrome [9–13]. Gut microbes exacerbate metabolic disease in part by activating inflammatory pathways, and by producing compounds from diet that dysregulate host signaling and metabolism [14–17]. Microbes can also play protective roles against metabolic disease. A large body of evidence suggests that microbes and microbial metabolites derived from dietary fiber, including short-chain fatty acids (SCFAs), mediate some of the beneficial effects associated with dietary fiber consumption [18–20].

Dietary fiber are edible carbohydrate polymers with at least three monomeric units that are resistant to host digestive enzymes and not broken down or absorbed in the small intestine [21]. The chemical structure of a fiber determines important physicochemical properties including its solubility and viscosity. Dietary fibers can be divided into soluble and insoluble forms [22, 23]. Insoluble forms such as cellulose have a fecal bulking effect, and resist metabolization by gut microbes, particularly in monogastric hosts. Dietary fibers that microbes can use for carbon and energy are also referred as microbiota-accessible carbohydrates (MACs) [24]. MACs, such as inulin, pectin, and resistant starches, are broken down and metabolized through complex mechanisms by different gut bacteria [25]. Multiple lines of evidence suggest that dietary MACs have important effects on the ecology of the gut ecosystem [26]. MACs can support the growth of beneficial bacteria, promote intestinal barrier function, lower systemic inflammation [27], and prevent some of the detrimental effects caused by high-fat diet [28]. Microbial metabolism of MACs also promotes hepatic fatty acid metabolism at least in part via production of acetate, which serves as precursor for hepatic synthesis of fatty acids and related glycerophospholipid species [29].

While epidemiological studies support the notion that consumption of dietary fiber is generally beneficial for metabolic and cardiovascular health [30], results of interventions in humans vary widely. Several studies indicate that there is a large degree of interpersonal variation in the benefits attained among individuals receiving the same dietary fiber intervention [31–36]. In some cases, these inconsistent effects of fiber on host metabolism across subjects have been linked to differences in the gut microbiota of the consumers [32, 36] and potential microbial biomarkers for responsiveness to specific dietary interventions have been identified [34, 35, 37]. One study identified a higher *Prevotella/Bacteroides* ratio associated with improved glucose homeostasis in response to barley kernels in humans and demonstrated that *Prevotella copri* modulates glucose homeostasis in mice [35].

The studies described above suggest that interindividual differences in the gut microbiota may influence host metabolic responses to dietary fiber in humans. We sought to further examine this hypothesis using a tractable animal model and defined dietary fiber interventions. We colonized genetically identical germ-free (GF) mice with two distinct human fecal communities and fed them isocaloric diets containing different types of fiber. We found that the two transplanted communities elicited divergent metabolic epigenetic and transcriptional responses to the same dietary fiber. Furthermore, differences between mice colonized with these two communities varied depending on the type of fiber the animals consumed. Lastly, we identified candidate taxa and metabolites associated with these host phenotypes.

Results and discussion

Identifying fecal microbiomes with distinct metabolic potential

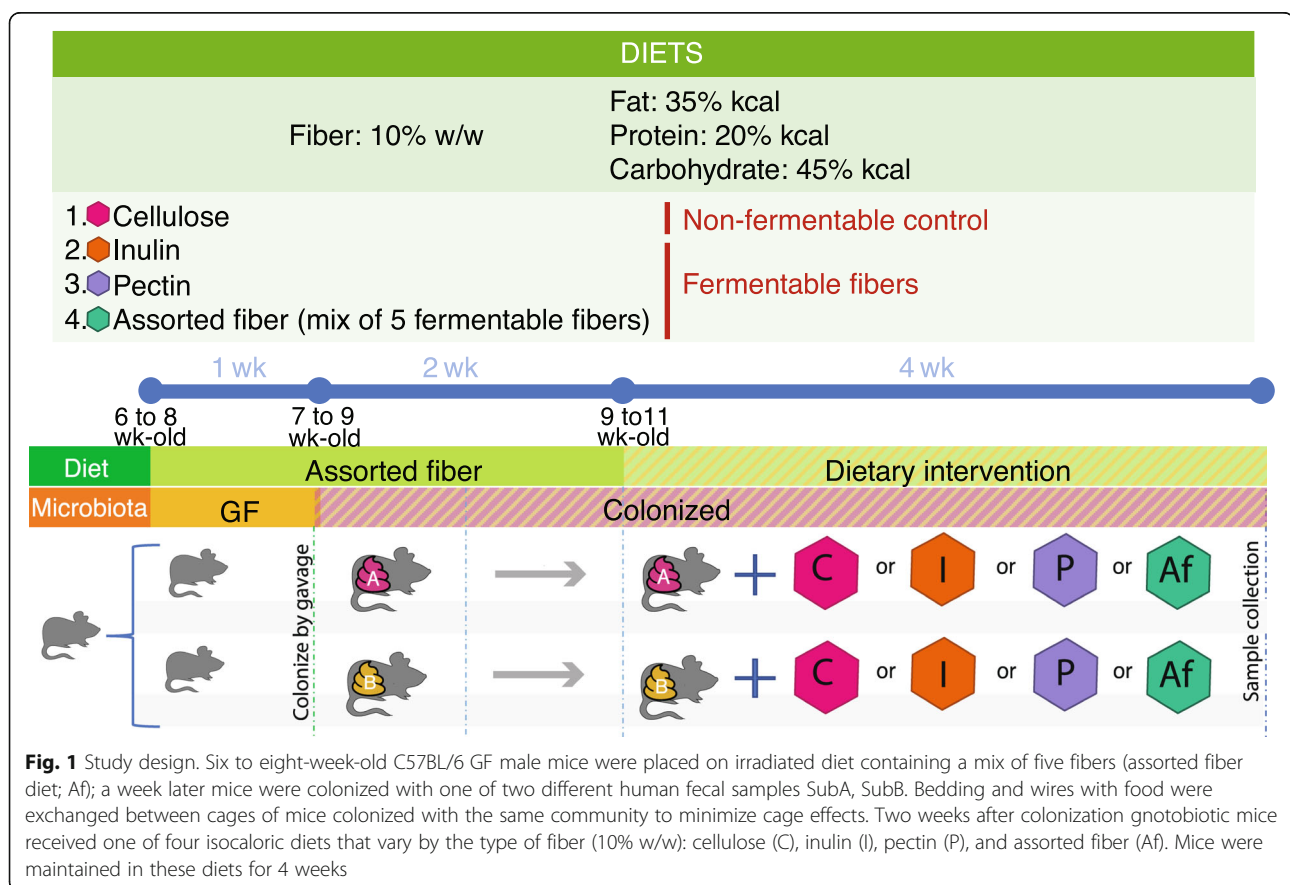
We sought to identify two human gut communities that upon engraftment in mice exhibit significantly distinct metabolic capacities. We used fecal specimens from a cohort of previously analyzed samples obtained from adults in their mid-seventies [38]. We initially selected eight fecal samples that showed significant compositional differences (Fig. S1A, B) and used them to colonize eight groups of adult male GF C57BL/6 mice ($n = 2\text{--}4/\text{fecal sample}$). Mice were fed a semi-purified diet containing an assortment of diverse, commonly consumed, commercially available fibers (i.e., assorted fiber) that included resistant starch (RS) type 2 and 4, short-chain fructo-oligosaccharides (scFOS), inulin, and pectin (total fiber content 10% w/w; Table S1). This diet—as well as all the other diets used in this study, were formulated to mimic human consumption while maintaining a defined and reproducible composition. We used 10% w/w dietary fiber and 35% kcal derived from fat as it is comparable to the intake level of dietary fiber in US adults from 2001 to 2010 based on the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) data [39, 40]. This was calculated by gram of fiber per 1000 kcal intake estimated for humans and adjusted to typical mouse caloric consumption. Animals were placed on this diet 1 week prior to colonization and maintained for two additional weeks after inoculation. Comparison of 16S rRNA gene analysis of cecal samples obtained from transplanted animals clustered by donor (Fig. S1C). Transplanted bacterial communities were more similar to that of their donor than to any other human sample in the dataset (Fig. S1D). Recovery of genera of at least 0.02% relative abundance in at least one of the samples associated with each human subject (i.e., donor and mouse fecal pellets) was $59.2\% \pm 10.8$ (Fig. S1E) and accounted for $85 \pm 14\%$ of the relative abundance of the

community from the donor (Fig. S1F). The transplanted communities also exhibited differences in alpha diversity (Fig. S1G). Furthermore, as expected from this variation, transplanted communities also differed in their capacity to produce SCFAs (Fig. S2). There was a ~ 4-fold range in the levels of cecal butyrate among the eight groups despite all animals consuming the same diet (Fig. S2A). Butyrate is known to vary widely among humans and has been linked with beneficial health effects on the host [41, 42]. Additionally, we used PICRUSt2 to predict the functional profiles of the 8 transplanted communities using 16S rRNA gene data [43, 44]. Principal coordinates analysis (PCoA) using Bray Curtis dissimilarity (Fig. S3) shows clear separation among most communities suggesting distinct functional capabilities of engrafted microbiomes. Following these analyses, we selected two markedly different communities: samples 1 and 8, from here on referred as SubA (i.e., fecal community from subject A) and SubB (i.e., fecal community from subject B) respectively, based on differences in alpha diversity, predicted metabolic properties, and capacities to produce butyrate, to examine how variation in gut community composition modulate host responses to different types of fiber. The donors of these samples are overweight (BMI = 30), have no history of type II diabetes,

cancer, or heart disease, and have self-reported consumption of a standard western-type diet.

Effects of dietary fiber on host metabolic outcomes is influenced by gut microbial community

Six- to eight-week-old male GF C57BL/6 mice were placed on the assorted fiber diet described above for 1 week, and subsequently colonized via oral gavage with fecal communities SubA or SubB ($n = 30\text{--}36$ mice/community, $n = 66$). Mice colonized with these two communities were maintained on the same diet for 2 weeks to allow the engrafted microbiomes to stabilize. After this stabilization period, mice colonized with each community were divided into four treatments (Fig. 1) and received one of four isocaloric diets ($n = 7\text{--}10$ mice/community/diet) that differed on the type of fiber they contained: (i) cellulose (non-fermentable fiber), (ii) inulin, (iii) pectin, or (iv) assorted fiber described above (Fig. 1). We selected cellulose as a source fiber that is mostly not accessible to microbes in the mouse gut. This diet served as a control, to define baseline differences between mice colonized with the two communities that were independent of interactions with MACs. We chose inulin and pectin as the former is commonly used as a prebiotic in the USA, while the latter has been proven to



support growth of a wide variety of gut microbes [45], and it is commonly used as a dietary supplement. We also chose these two dietary fibers due to their distinct structures, including differences in basic units, linkages, and degree of polymerization. We colonized all mice in the same diet (assorted fiber diet) to favor consistent engraftment of mice inoculated with the same community. Furthermore, the assorted fiber diet has the same total amount of dietary fiber as the rest of the treatment groups used in this study, but with more diversity in fermentable substrates, which we reasoned would support engraftment of taxa relevant to all dietary treatments. Inclusion of this group in the experimental phase of the study also served as a control to inform whether this diet used during the colonization period drives major differences between mice colonized with the two communities used in the study.

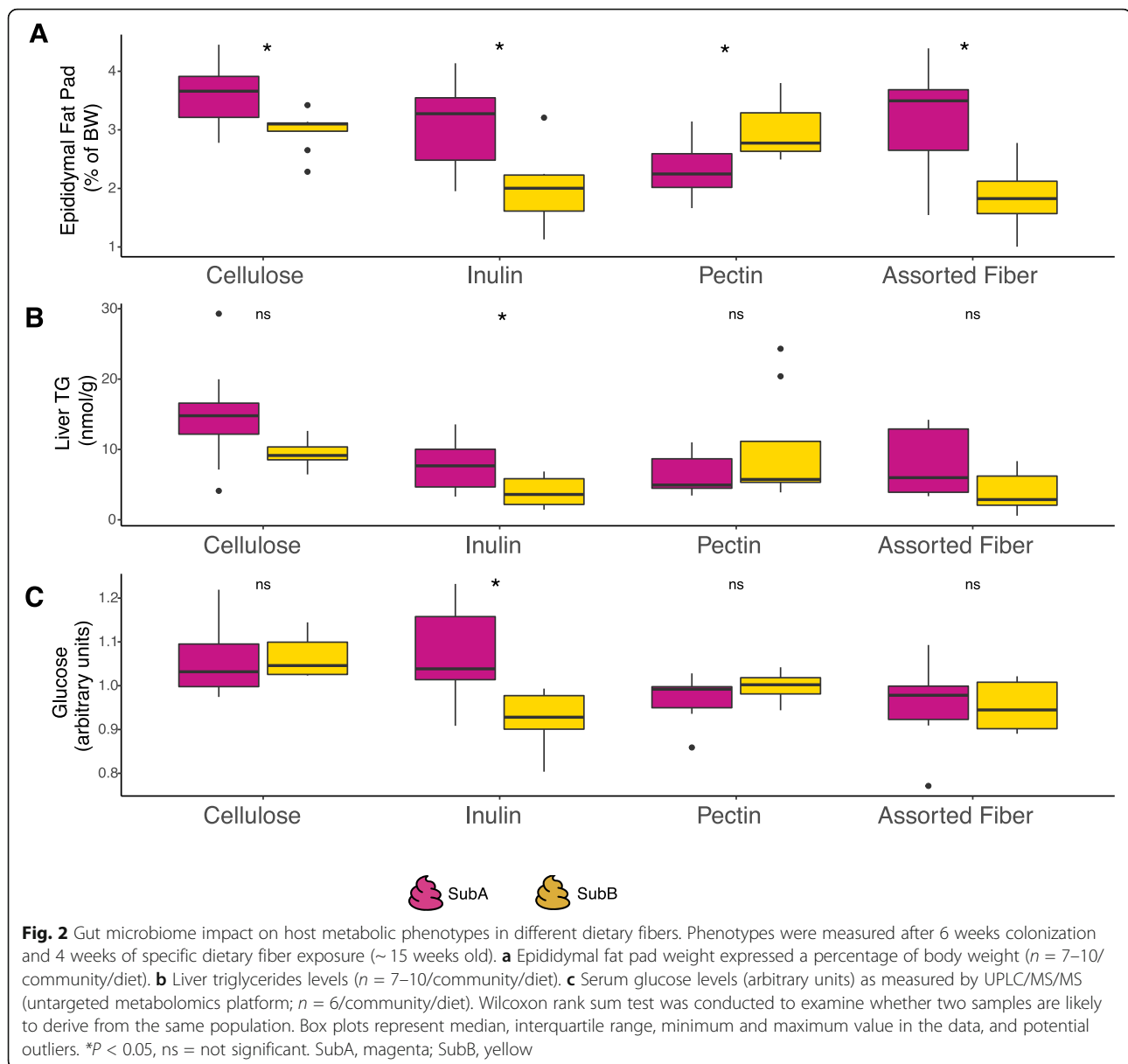
We compared metabolic phenotypes of animals colonized with the two different communities consuming each of the diets described above (Table S2). We found significant effects of diet, gut community, and their interaction on host adiposity as determined by epididymal fat pad weight (normalized by body weight) (two-way ANOVA $P < 0.01$). Diet and community, but not their interaction, also showed significant effect on liver triglycerides (TG) (two-way ANOVA $P < 0.05$), whereas diet and its interaction with gut community showed a significant effect on serum glucose levels (two-way ANOVA $P < 0.05$; Table S2). Remarkably, while the pectin diet had an overall beneficial effect on metabolic phenotypes relative to non-fermentable cellulose (i.e., reduced adiposity and liver TG) for SubA-colonized mice, this diet was less favorable for SubB-colonized animals, which showed the strongest benefits on the inulin fiber (Fig. 2, Table S2). We also assessed whether there were significant differences in these phenotypes between mice colonized with the two different communities that were exposed to the same diet through pairwise comparisons using Wilcoxon rank sum test. In the cellulose diet, SubB-colonized mice showed lower levels of adiposity compared to mice colonized with SubA, whereas there were no statistical differences in the levels of liver TG and fasting serum glucose between these groups (Fig. 2). In the inulin diet, mice inoculated with SubB showed decreased adiposity, decreased liver TG, and lower serum levels of fasting glucose relative to animals colonized with SubA. In contrast, pectin-fed mice colonized with SubB accumulated more fat mass relative to SubA-colonized counterparts (Fig. 2a), whereas serum glucose and liver TG were comparable between the two community groups. Lastly, mice colonized with SubB showed significantly lower levels of adiposity than those colonized with SubA in the assorted fiber diet, whereas serum glucose and liver TG were comparable between

the two groups (Fig. 2). Altogether, these results underscore the importance of microbe by dietary fiber interactions on host metabolism and suggest that gut microbes modulate responses to dietary fiber.

Dietary fibers cause significant restructuring of SubA and SubB communities

16S rRNA gene sequences were generated from cecal samples collected from the mice described above (Tables S3 and S4). PCoA of unweighted UniFrac distances—a metric sensitive to taxonomic phylogenetic distances that does not consider abundance—of these samples show a clear clustering by donor community (Fig. 3a) and less by diet, supporting the notion that all four diets support colonization of similar assemblages for both communities. In all diets, mice colonized with the same donor preserved a core of common species that differentiated it from mice colonized with the other community (Fig. S4A). Nevertheless, there were concomitant subtle richness and pronounced abundance variations within each donor community across the different fiber treatments (Fig. S4). PCoA of weighted UniFrac distances between both communities in the four different diet treatments (Fig. 3b) shows that SubA and SubB post-intervention microbiomes (i.e., microbiome in each diet) cluster separately; however, the inulin diet appeared to be the treatment that separated the two communities the most (Fig. S5). Furthermore, the two communities shifted consistently in response to the same fibers (Fig. 3b), suggesting that related taxa from both communities are responding similarly to a given diet and that the different fibers have distinct effects on abundance of the taxa. PERMANOVA on weighted and unweighted UniFrac distances between engrafted microbiomes derived from the two communities for each dietary fiber intervention showed that these are different in all four diet comparisons ($P < 0.05$). Each diet resulted in a unique set of differences between the two microbial communities and included phyla-level variations. Remarkably, the Firmicutes:Bacteroidetes (F/B) ratio was significantly increased in SubB-colonized mice consuming inulin and assorted fiber relative to SubA-colonized animals in these diets respectively, whereas the F/B ratio was higher in animals colonized with SubA consuming the cellulose diet relative to SubB counterparts, and there was no difference in this ratio between the two communities for mice consuming the pectin diet (Fig. S6A, B).

We used linear discriminant analysis effect size (LEfSe) analysis to identify bacterial taxa significantly contributing to the differences observed between post-intervention microbiomes for each diet [46] (Fig. 3c; Fig. S7). In the cellulose diet, SubA-colonized mice showed higher overall abundance of Firmicutes, Bacteroidetes, and Actinobacteria, whereas in SubB-colonized animals



Verrucomicrobia and Proteobacteria exhibited increased abundance. Interestingly, phylum level comparisons between the two communities yielded similar differences for the inulin and assorted fiber-fed mice. Animals colonized with the SubB community showed higher levels of Firmicutes, Actinobacteria, and Proteobacteria, whereas mice colonized with SubA had higher relative abundance of Bacteroidetes in both diets. At the genus level, SubB-colonized animals showed higher relative abundance of *Bifidobacterium* in these two diets, whereas mice harboring the SubA microbiome showed increased levels of *Eubacterium*, *Bacteroides*, *Butyricimonas*, *Lactococcus*, and *Ruminococcus* (Ruminococcaceae) relative to SubB-colonized animals ($P < 0.05$). In the pectin diet, mice colonized with the SubB microbiome showed higher

levels of the Proteobacteria phylum and higher levels of the *Akkermansia*, *Faecalibacterium*, *Eubacterium*, and *Clostridium* genera whereas SubA-colonized mice showed higher levels of the Lachnospiraceae family and *Dorea* genus ($P < 0.05$); some of the changes observed in pectin (e.g., *Holdemania*, Lachnospiraceae, and *Eubacterium*) exhibit the opposite pattern seen in mice fed inulin (Figs. S7 and S8).

It is also important to note that some of the genera that showed diet-specific differences between communities were only detected in one of the communities; these included *Bifidobacterium*, *Clostridium*, and *Faecalibacterium*, all detected only in SubB-colonized mice. Interestingly, while the bifidogenic effect of inulin has been well documented [47], in our study the assorted fiber

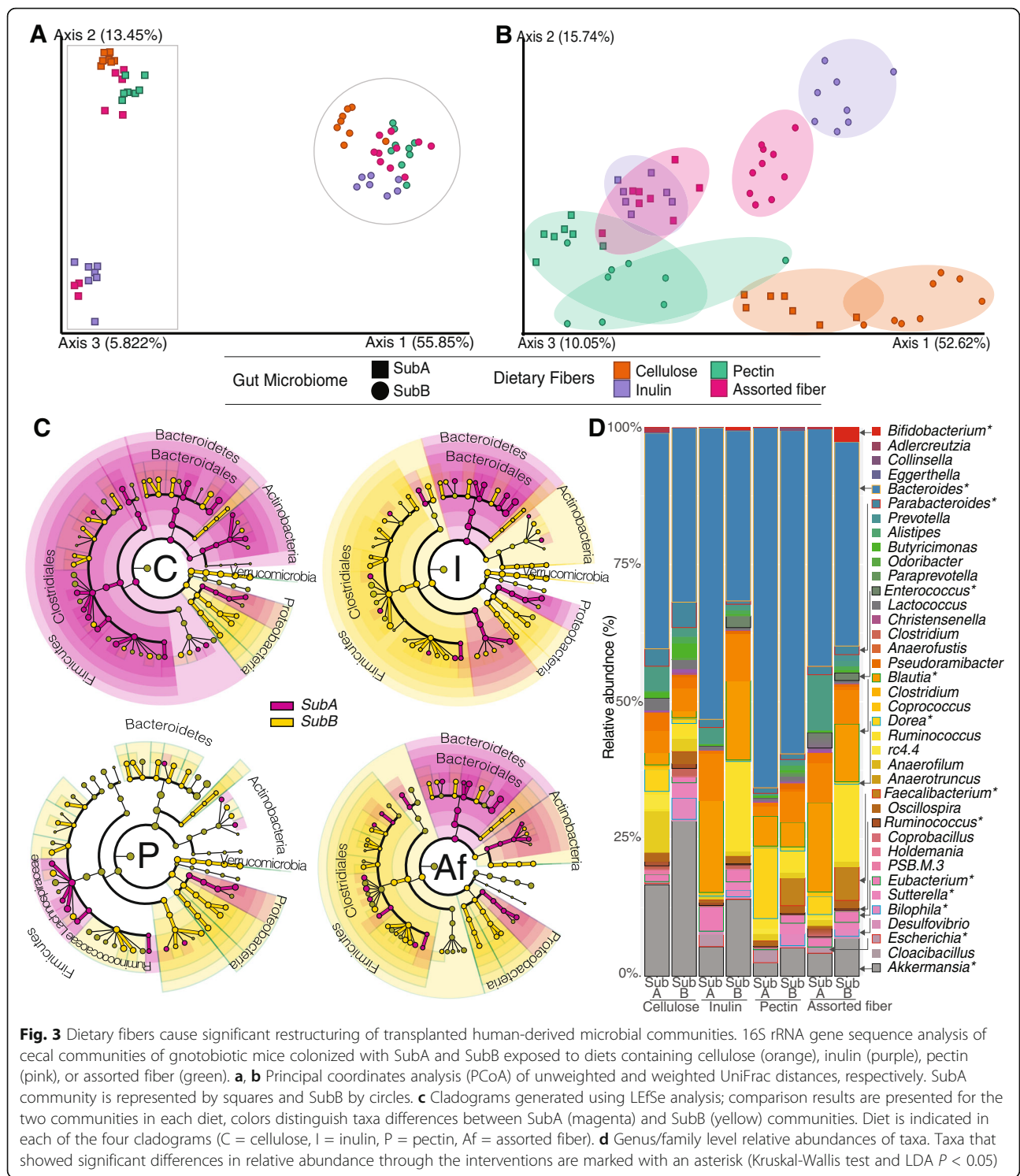


Fig. 3 Dietary fibers cause significant restructuring of transplanted human-derived microbial communities. 16S rRNA gene sequence analysis of cecal communities of gnotobiotic mice colonized with SubA and SubB exposed to diets containing cellulose (orange), inulin (purple), pectin (pink), or assorted fiber (green). **a, b** Principal coordinates analysis (PCoA) of unweighted and weighted UniFrac distances, respectively. SubA community is represented by squares and SubB by circles. **c** Cladograms generated using LEfSe analysis; comparison results are presented for the two communities in each diet, colors distinguish taxa differences between SubA (magenta) and SubB (yellow) communities. Diet is indicated in each of the four cladograms (C = cellulose, I = inulin, P = pectin, Af = assorted fiber). **d** Genus/family level relative abundances of taxa. Taxa that showed significant differences in relative abundance through the interventions are marked with an asterisk (Kruskal-Wallis test and LDA $P < 0.05$)

diet, which has only 2% inulin, supported significantly higher levels of this genus than the inulin diet, which contains 10% w/w inulin. However, assorted fiber diet also contains scFOS and resistant starch—both known to have bifidogenic effects [48]. It is also possible that the inclusion of additional substrates opens niche

opportunities for taxa that would otherwise compete with *Bifidobacteria* for inulin.

Gas chromatography-based quantification analyses revealed dietary fiber-specific differences in cecal levels of the SCFA acid butyrate and valerate, whereas levels of acetate and propionate were comparable between

communities for each diet (Fig. S9). Butyrate was significantly increased in the cecum of SubB-colonized mice consuming cellulose, pectin, and assorted fiber relative to the SubA-colonized animals consuming the same diets (Fig. S9B). Valerate was significantly higher in the gut of SubA-colonized animals in all diets except assorted fiber, whereas cecal levels of the branched-chain fatty acids (BCFA) isovalerate and isobutyrate were higher in SubA-colonized mice relative to SubB counterparts in the cellulose diet ($P < 0.05$; Fig. S9E). Altogether, these results illustrate the divergent effects of dietary fibers on microbial-derived SCFA and BCFA production, which is in consistent with previous work [49, 50].

SubA and SubB were selected based on their distinct abilities to produce butyrate when transplanted to mice fed the assorted fiber diet (Figs. S2 and S9B). While previous work suggests that butyrate has a protective role against metabolic disease [40, 51], comparisons of cecal butyrate levels between mice colonized with the two communities for each diet tested did not fully explain differences in the observed metabolic phenotypes, suggesting that butyrate is not a major contributor to the phenotypic differences observed between SubA- and SubB-colonized mice (Fig. S9B, Fig. 2). However, Pearson correlation analysis across all mice in the study revealed that cecal levels of butyrate were negatively associated with adiposity ($r = -0.4682$ $P = 0.003$); similar results were seen for cecal levels of acetate ($r = -0.3595$ $P = 0.0266$) and total SCFA ($r = -0.3226$ $P = 0.0483$). No significant associations were detected between any of the SCFAs and the other phenotypes measured. These results suggest that while butyrate and potentially acetate may influence adiposity, there are likely other microbial, community-specific, fiber type-dependent metabolites or microbial signals that modulate their effects on this phenotype.

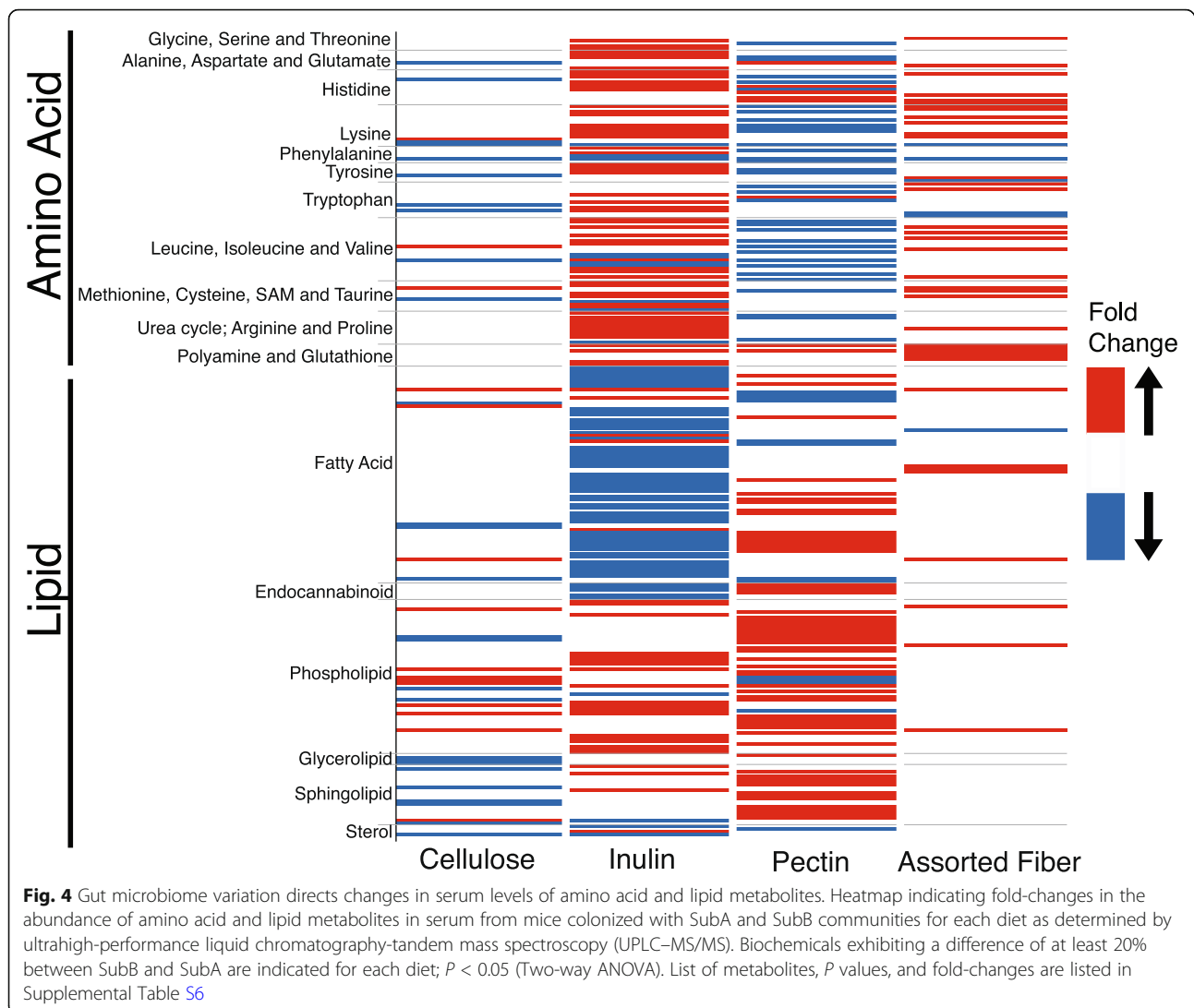
Post-intervention microbiomes mediate community effects on metabolic outcomes

We sought to evaluate the potential mediating role of post-intervention microbiomes in the SubA/B community effects on metabolic outcomes (adiposity, liver TG, and serum glucose) within each diet group. We focused this analysis on the cellulose, inulin, and pectin dietary fiber interventions, as these included a single type of fiber, as opposed to the assorted fiber which included a mixture of several fibers (RS type 2 and 4, scFOS, inulin, and pectin). We first performed association tests between post-intervention microbiomes (beta-diversity) and host metabolic phenotypes using PERMANOVA. In the inulin diet, post-intervention microbiomes showed differences in beta-diversity associated with changes in liver TG ($P < 0.05$) and glucose phenotypes ($P < 0.01$), whereas differences between the two microbiomes in

pectin-fed mice were associated with variation in the adiposity phenotype ($P < 0.05$). We then assessed the mediation effect of the gut microbiome in the relationship between communities and host metabolic phenotypes. The distance-based mediation test showed significant mediation effect of overall diversity of microbiome for the glucose outcome in the inulin-fed group (unweighted UniFrac and Jaccard $P < 0.05$). To identify mediator taxa, we applied a causal mediation model on each internal node of the taxonomy tree (Table S5). For the adiposity outcome, we found the Proteobacteria phylum, the Bacteroidales order, and the Christensenellaceae family as mediators in pectin-fed mice ($P < 0.05$). For the serum glucose outcome, we found Clostridiales order in inulin-fed mice ($P < 0.05$). Altogether, these analyses further support the notion that dietary fiber-microbe interactions modulate metabolic phenotypes and highlight potentially relevant taxa.

Gut microbiome-dietary fiber interactions modulate blood metabolites

Gut microbes influence host metabolism at least in part by modulating nutrient availability and through the production of a myriad of metabolites, many of which reach systemic circulation [14–17]. We sought to examine whether the gut microbial differences described above between mice colonized with SubA and SubB in the four diets resulted in changes in host metabolism as assessed by metabolomics of serum samples. We applied ultrahigh-performance liquid chromatography-tandem mass spectroscopy (UPLC–MS/MS) to quantify 774 compounds in serum from the 8 groups of mice described above (6 samples/community/diet) (Table S6). Two-way ANOVA analysis between SubB- and SubA-transplanted mice, identified 1 serum metabolite in the cellulose diet, 235 in the inulin diet, 160 in the pectin diet, and 19 in the assorted fiber diet that showed significant differences between the two communities ($P < 0.05$, false discovery rate (FDR) adjusted- $P < 0.1$). A large fraction of these metabolites also showed a significant diet by community interaction ($P < 0.05$; Table S6). For the purpose of generating hypotheses, all metabolites showing $P < 0.05$ were used for further analyses. Animals consuming inulin and pectin diets showed the largest number of significant changes in biochemicals between the two communities. Inspection of the differentially abundant biochemicals within each diet revealed diet-specific changes in metabolites related to amino acids and lipid metabolic pathways, including alanine-aspartate, histidine, lysine, tyrosine, leucine-isoleucine-valine, urea cycle: arginine and proline, methionine-cysteine-taurine, fatty acids, endocannabinoid, and sphingolipid metabolic pathways (Fig. 4, Table S6). These results support the notion that consumption of



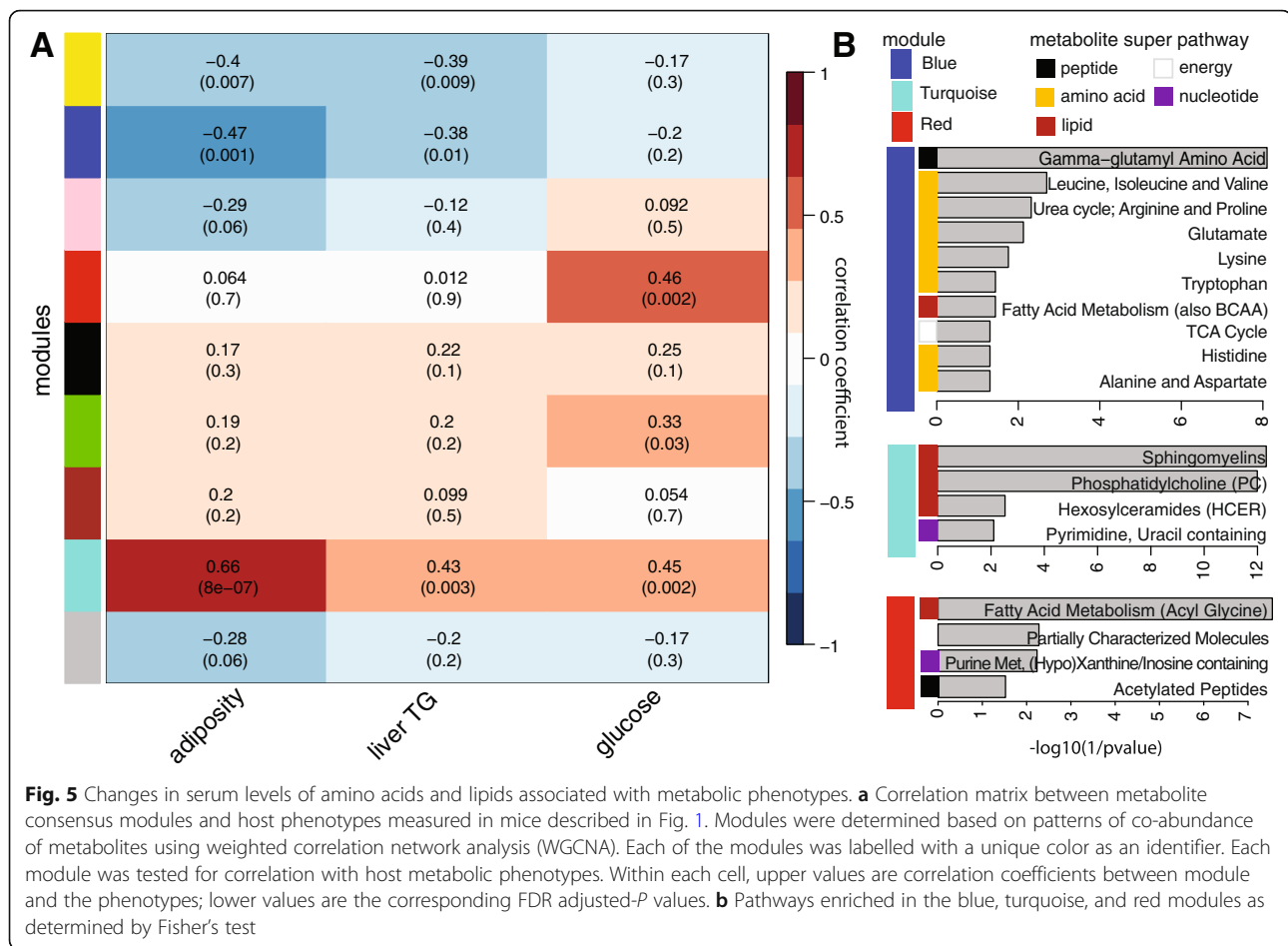
dietary fiber elicits individual responses on blood metabolites that are influenced by differences in the gut microbiome.

Amino acids and lipid metabolic pathways associate with host phenotypes

We tested whether levels of serum metabolites were associated with host metabolic outcomes. We used the dynamic tree cut method in weighted correlation network analysis (WGCNA, Fig. S10; Table S7) to define modules of tightly correlated serum metabolites. The associations between these modules and host metabolic phenotypes are shown in Fig. 5a. Candidate biochemicals that belong to these enriched pathways are listed in Table S6. The turquoise module is positively correlated with adiposity ($r = 0.66$, $P = 8e-07$), liver TG ($r = 0.43$, $P = 0.003$), and serum glucose ($r = 0.45$, $P = 0.002$), whereas the blue module yielded negative correlations with adiposity ($r =$

-0.47 $P = 0.001$) and liver TG ($r = -0.38$ $P = 0.01$). The red module showed highest association with the glucose phenotype ($r = 0.46$ $P = 0.002$). Pathway enrichment analysis revealed significant over-representation of metabolites related to sphingomyelins, phosphatidylcholine (PC), and hexosylceramides pathways in the turquoise module whereas the blue module was enriched for metabolites in the gamma-glutamyl amino acid, branched-chain amino acid (BCAA), urea cycle, glutamate, lysine and tryptophan pathways and the red module in fatty acid metabolism (acyl glycine), purine metabolism ((Hypo)Xanthine/Inosine containing), and acetylated peptides (Fig. 5b).

Sphingomyelins (turquoise module) are strongly associated with adiposity, TG, and glucose levels. These metabolites are increased in SubB-colonized mice in the pectin diet, which exhibited increased adiposity relative to SubA-colonized mice. Previous work indicates that



sphingolipids mediate cellular processes involved in apoptosis, cell differentiation, and inflammation [52]. Furthermore, serum levels of sphingomyelins and ceramides have been associated with the development of obesity [53]. Sphingomyelins can be hydrolyzed by sphingomyelinases releasing phosphocholines and ceramides, leading to metabolic impairment [53]. Furthermore, most of the identified sphingomyelin-lipid metabolism changes are within the pectin-fed group (Tables S6 and S8). These results support the notion that microbiome-fiber interactions modulate host levels of sphingolipids and ceramides. This is consistent with recent work suggesting that *Bacteroides*-derived sphingolipids in the intestine provide an endogenous source of sphingolipids to the host [54].

As mentioned above, amino acids are enriched in the blue module and largely contribute to the negative association observed between this module and adiposity, liver TG, and glucose levels. These include histidine, which was increased in SubB-colonized mice consuming the inulin diet compared to SubA-colonized counterparts (Table S8). SubB-colonized animals in this diet exhibited lower glucose and adiposity relative to the SubA-

colonized animals (Fig. 2). This is consistent with previous work showing that histidine supplementation results in an improvement in insulin sensitivity and lower body fat [55]. Several bacterial metabolites derived from histidine were also increased in SubB-colonized mice in the inulin diet compared to SubA-colonized animals, including imidazole propionate (Table S6), which has been linked to impaired insulin signaling and type II diabetes in humans [15, 56].

BCAAs were also enriched in the blue module and detected at higher levels in SubB-colonized mice in the inulin diet compared to SubA-colonized animals. Previous reports indicated that BCAAs upregulate glucose transporters and activate insulin secretion [57, 58]. However, there is also evidence that leucine and isoleucine have a negative impact on metabolic health [59, 60], and several studies have suggested that excessive intake of amino acids could lead to inhibition of insulin signaling [61]. Additionally, the bacterial metabolite derived of tryptophan, indolepropionate [62], which we detected at significantly higher levels in mice colonized with the SubB community consuming inulin relative to SubA counterparts, has been previously associated with

increased dietary fiber intake and linked to reduced risk of low-grade inflammation [63] and improved glucose homeostasis [64]. Mice fed the cellulose diet showed virtually no differences in the metabolites enriched in this module. Gamma-glutamyl amino acids were also highly enriched in the blue module. Gamma-glutamyl dipeptides are also involved in glutathione (GSH) metabolism, which plays an important role in antioxidant defense, and are produced when gamma-glutamyl transpeptidase catalyzes the transfer of the gamma-glutamyl moiety of glutathione to amino acids. Gamma-glutamyl transpeptidase is expressed in several mammalian tissues and in bacteria [65, 66]. While the role of these metabolites on metabolic health remains poorly understood, a recent study showed gamma-glutamyl amino acids γ -glutamyl cysteine and γ -glutamyl valine inhibit TNF- α signaling in intestinal epithelial cells and reduce inflammation [67]. Overall, these results suggest that circulating levels of sphingolipids, amino acids, and gamma-glutamyl dipeptides are impacted by interactions between microbes and dietary fibers. Interestingly, these circulating metabolites also showed significant correlations with cecal levels of acetate and butyrate (Fig. S11). While further studies are needed to assess the role of these two SCFAs in modulating the abundance of systemic metabolites, both acetate and butyrate are known to impact many facets of metabolism via interactions with G-protein coupled receptors present in the gut and in the periphery [20].

Connecting bacterial taxa, serum metabolites, and host metabolic phenotypes

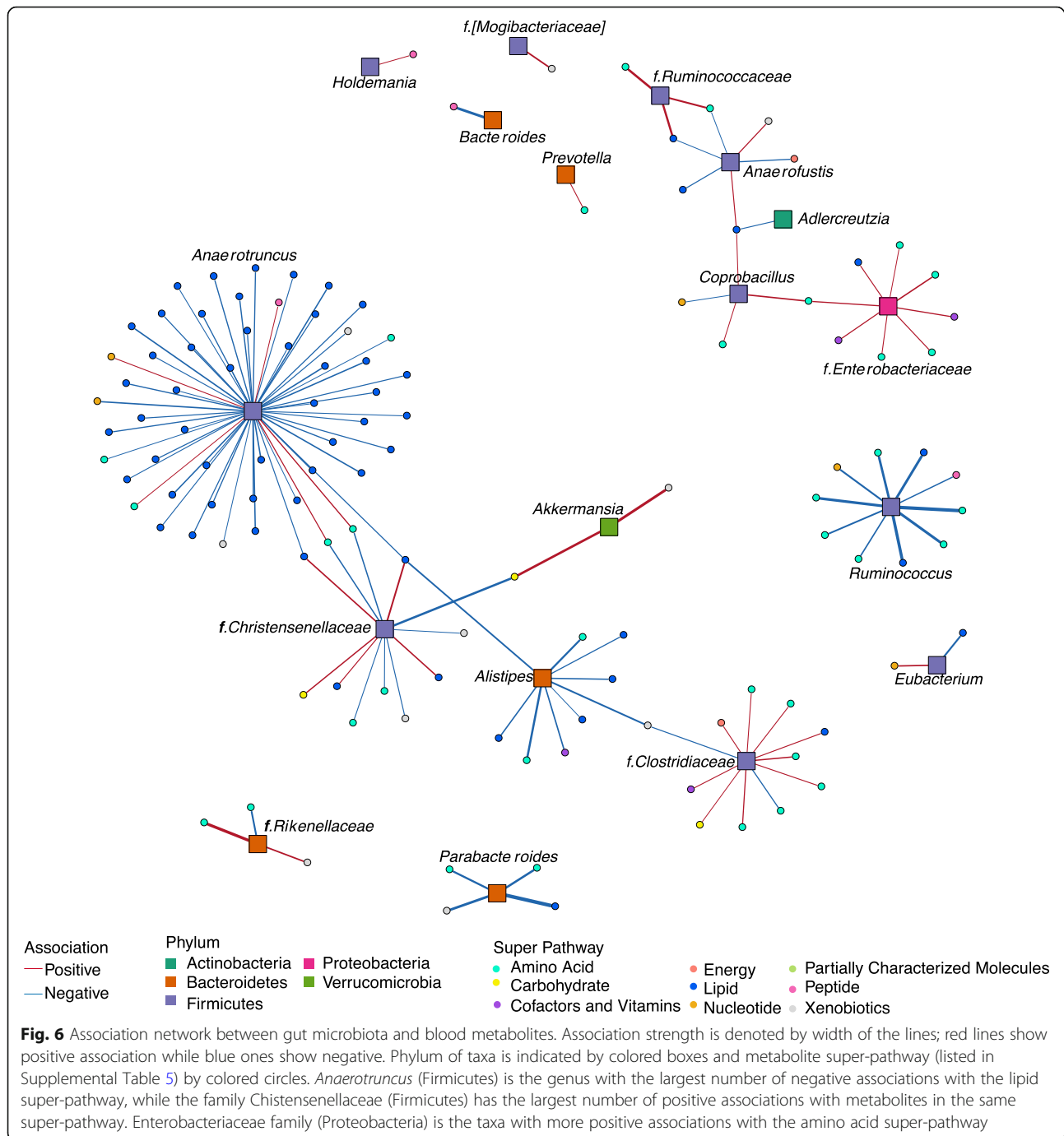
To identify bacterial taxa associated with metabolites, we applied a log-contrast model with metabolites as the response. The association analysis linking taxa and metabolite super-pathways show that the Firmicutes phylum is involved in most associations, followed by Bacteroidetes (Fig. 6). Interestingly, the genus *Anaerotruncus* is negatively associated with metabolites of the lipid super-pathway that includes fatty acids (long-chain saturated and unsaturated, and branched), lysophospholipids, and monacylglycerol. This genus is also positively associated with metabolites of the amino acid and the nucleotide super-pathways, including lysine, glycine, arginine-proline metabolism, and the purine and pyrimidine. *Ruminococcus* (Ruminococcaceae) is negatively associated with metabolites of the amino acid and the lipid super-pathways, including BCAA, glutamate and tryptophan metabolism, fatty acids, purine, and gamma-glutamyl amino acid, whereas *Parabacteroides* is negatively associated with metabolites in the arginine-proline and dihydroxy fatty acid pathways. Interestingly, *Anaerotruncus* and *Ruminococcus* (Ruminococcaceae), along with *Parabacteroides*, showed significantly higher

relative abundance in mice colonized with the SubA community in the inulin diet, which exhibit higher adiposity, liver TG, and glucose compared to mice in the same diet colonized with the SubB community ($P < 0.01$; Fig. S8).

The Rikenellaceae family showed a strong positive association with tryptophan and tyrosine metabolism and a negative association with BCAA metabolism. Interestingly, Rikenellaceae and Ruminococcaceae were also positively correlated with cecal levels of BCFAs—the end products of bacterial BCAA catabolism (Fig. S12). The relative abundance of Rikenellaceae was significantly increased in SubA-colonized mice consuming cellulose, inulin, and assorted fiber and in SubB-colonized mice consuming pectin, which exhibited worse metabolic outcomes relative to the other community in their respective diets. This is consistent with previous reports describing increased abundance of Rikenellaceae in leptin-resistant obese and diabetic mice [68, 69]. Moreover, we found this family was positively associated with genes in the glycerophospholipid metabolic process, which generates lipids that can be packed in very low-density lipoproteins [70]. The *Bacteroides* genus showed a strong negative correlation with gamma-glutamyl amino acids, and it was detected at significantly higher levels in SubA-colonized animals except when animals were fed pectin ($P < 0.05$). *Eubacterium* was negatively associated with plasmalogens and positively associated to purine metabolism. As discussed above, this genus was also more abundant in SubA-colonized mice consuming inulin diet relative to SubB-colonized counterparts, and in SubB-colonized mice consuming pectin diet relative to SubA-colonized animals in the same diet. In both cases, the increased levels of *Eubacterium* were associated with less favorable metabolic outcomes (Fig. 2 and Fig. S8). Altogether, these results link changes in levels of bacterial taxa differentially represented in the two communities across the different diets with alterations in systemic levels of metabolites and host metabolic phenotypes.

Dietary modulation of gut microbiome influences impact of gut communities on hepatic gene expression

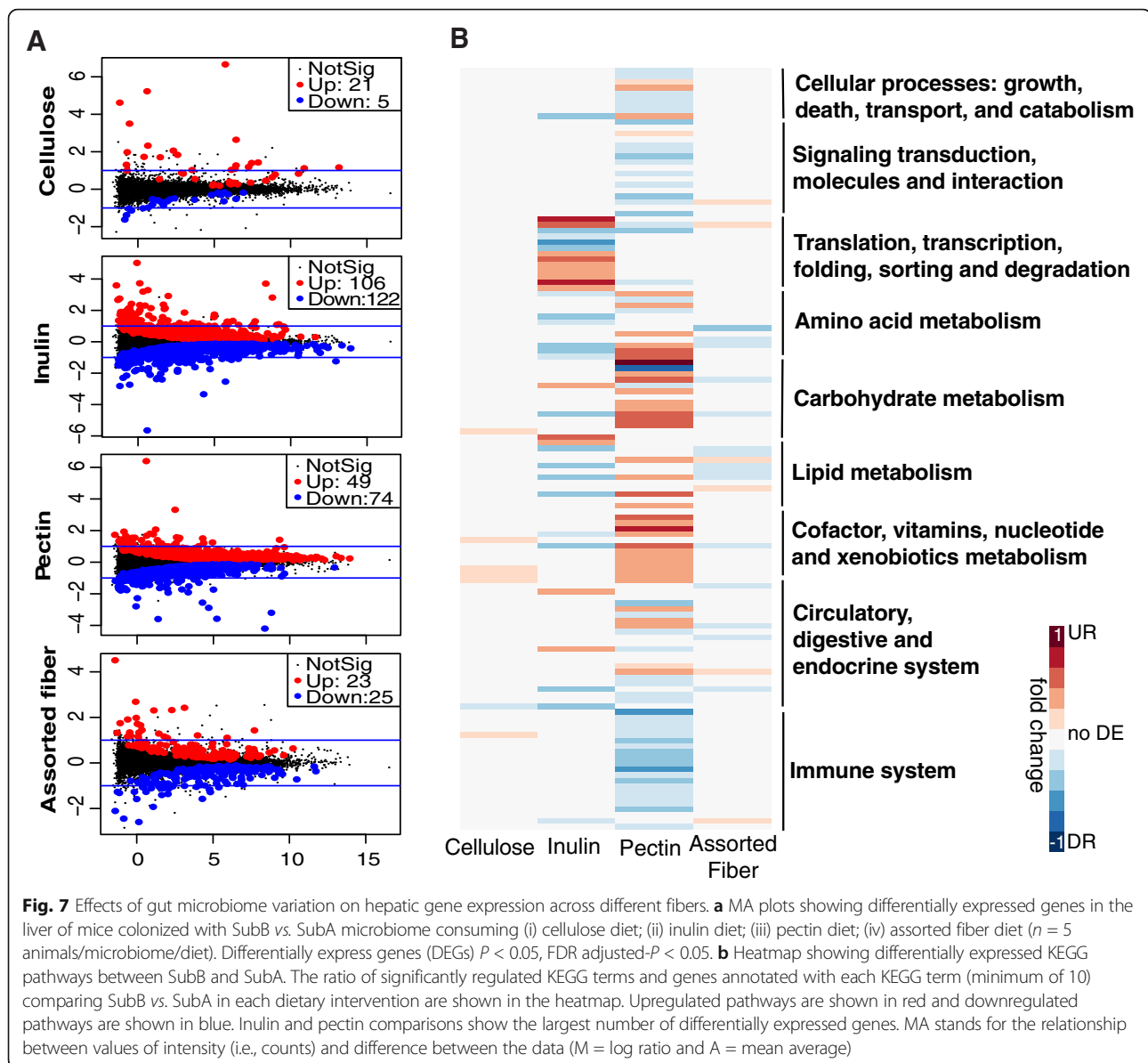
The liver receives a large fraction of its blood supply through the portal circulation, which is the direct venous outflow of the intestine. As such, the liver is continuously exposed to gut microbial-derived products, including SCFAs and bacterial toxins [71]. Differences in abundance of microbial metabolites, including SCFAs, have been linked to changes in global host epigenetic states and gene expression [72]. Epigenetic states of chromatin are reflected in the covalent post-translational modifications (PTMs) on histone proteins. We found that colonization of mice with SubA and SubB



communities affected covalent post-translational modifications (PTMs) on histone proteins (Supporting information, Figs. S13 and S14). To test directly whether these differences were linked to changes in hepatic gene expression, we performed RNA sequencing (RNA-seq) analysis. Tests of differential gene expression yielded larger number of significantly regulated genes between the two communities for the inulin and pectin dietary interventions (Fig. 7), while cellulose-fed mice showed the

least number of differences. Only 26 genes were differentially expressed between the two communities in cellulose-fed mice, compared to 228 genes in inulin, 123 in pectin, and 48 in the assorted fiber diets ($P < 0.05$ and FDR adjusted- $P < 0.05$; Fig. 7a, Table S9).

Linear model fit test for over-representation of gene ontology (GO) among differentially expressed genes in biological process (BP), molecular function (MF), and cellular component (CC) categories as well as



enrichment analysis on Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathways revealed divergent results between dietary interventions (Table S10). Among the transcripts expressed at lower levels in SubB relative to SubA-colonized mice in the cellulose diet, there were genes associated with regulation of phosphorylation and protein modification. SubB-colonized animals consuming inulin diet showed lower levels of expression of genes associated with amino acid metabolism, fatty acid metabolic process, peroxisome components, oxidoreductase activity, and peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) signaling pathway relative SubA-colonized counterparts. Upregulated genes in SubB-colonized mice were associated with ribosome

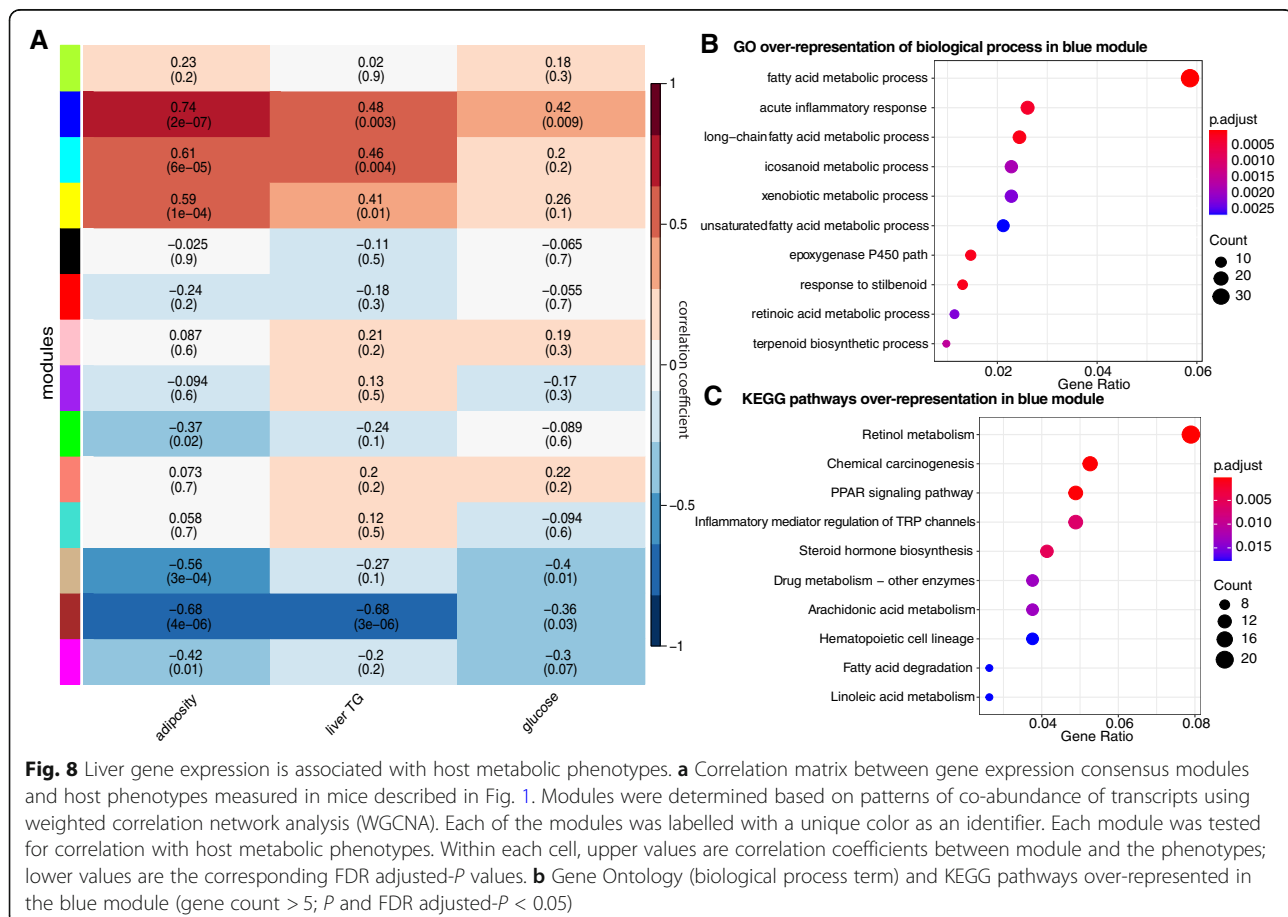
biogenesis, RNA metabolic process, and protein processing in endoplasmic reticulum. Mice consuming assorted fiber diet showed some similarities in the enrichment of differentially expressed genes as those in the inulin diet. Genes downregulated in SubB relative to SubA-colonized mice fed inulin and assorted fiber diets showed overlapping GO terms including oxidative stress, regulation of cellular ketone metabolic process, lipid metabolic process, fatty acid metabolic-catabolic process and lipid modification, fatty acid oxidation, long-chain fatty acid metabolic process, and oxidoreductase activity.

In the pectin diet, mice colonized with SubB expressed higher levels of genes involved in cofactor, vitamins, and nucleotide metabolism; fatty acid metabolism,

oxidoreductase activity, carbohydrate and valine, leucine and isoleucine metabolism (Fig. 7b, Table S10). These include six genes encoding cytochrome P450, some of which are known to play important roles in the synthesis of steroid hormones (*Cyp2a4*, *Cyp17a1*) and xenobiotic metabolism (*Cyp2a5*) [73, 74]. Surprisingly, SubA-colonized animals in the pectin diet—which show lower levels of adiposity (Fig. 2a) relative to SuB-colonized mice—exhibited higher levels of expression of genes involved in immune system process, inflammatory response, phagocytic cup and vesicle cellular component, cytokine receptor activity and binding, and infection pathways. Previous work has shown that the overall health effects of consumption of MACs such as inulin and pectin can be context dependent. Long-term consumption of pectin or inulin by Toll-like receptor 5 (TLR5) KO mice, which show innate immune deficiencies and gut microbiome alterations, results in liver inflammation and hepatocellular carcinoma [75]. Altogether, these results suggested that the gut microbiome is a differential factor that modulates hepatic gene expression. Furthermore, data suggests that the impact of the gut microbiome on liver gene expression is influenced by the type of dietary fiber consumed.

Liver gene expression is associated with host metabolic phenotypes

WGCNA was applied to the normalized read count data obtained from RNA-Seq analysis. Fourteen gene modules, each clustering highly co-expressed genes, were identified (each module was assigned a different color; Fig. S15, Table S11). We performed correlation analysis between the phenotypic data and the calculated eigen-gene—defined as the first principal component of the expression matrix of the corresponding module—for each module identified (Fig. 8a). The blue module and adiposity showed the strongest association ($r = 0.74$, $P = 2e-07$). We narrowed down possible relevant genes contributing to this module by performing biological process GO and KEGG pathway analysis enrichment (Fig. 8b, c). In total, 614 out of the 677 transcripts in the blue module mapped into biological process gene ontology. These showed significant enrichment in several processes including the fatty acid metabolic process, acute inflammatory response, long-chain fatty acid, and unsaturated fatty acid metabolic process ($P < 0.05$ and FDR adjusted- $P < 0.05$). Pathway enrichment analysis of 266 genes with KEGG annotation in this module yielded significant enrichment in pathways that included PPAR



signaling, inflammatory mediator regulation of transient receptor potential (TRP) channels, fatty acid degradation, and linoleic acid metabolism ($P < 0.05$ and FDR adjusted- $P < 0.05$).

When only considering genes in the blue module with significant positive association to each phenotype, we observed 209, 151, and 107 genes for adiposity, liver TG, and glucose, respectively ($P < 0.05$). The GO biological process analysis for this set of genes in the blue module showed that throughout the measured phenotypes, the fatty acid metabolic process was the gene ontology with more gene counts, followed by long-chain fatty acid metabolic process, xenobiotic metabolic process, and epoxygenase P450 pathway. The statistically significant ($P < 0.05$ and FDR adjusted- $P < 0.05$) enriched KEGG pathways associated with the measured phenotypes were retinol metabolism, chemical carcinogenesis, PPAR signaling pathway, steroid hormone biosynthesis, linoleic acid metabolism, biosynthesis of unsaturated fatty acids, and fatty acid elongation. Nucleoside, ribonucleoside and purine nucleoside bisphosphate metabolic process, and fatty acid degradation are the GO terms and KEGG pathways that were enriched in the association with adiposity and liver TG (Fig. S16), whereas inflammatory mediator regulation of TRP channels and pyruvate metabolism pathways are enriched among the genes associated with glucose levels.

Gene expression in liver is associated with abundance of gut bacterial taxa

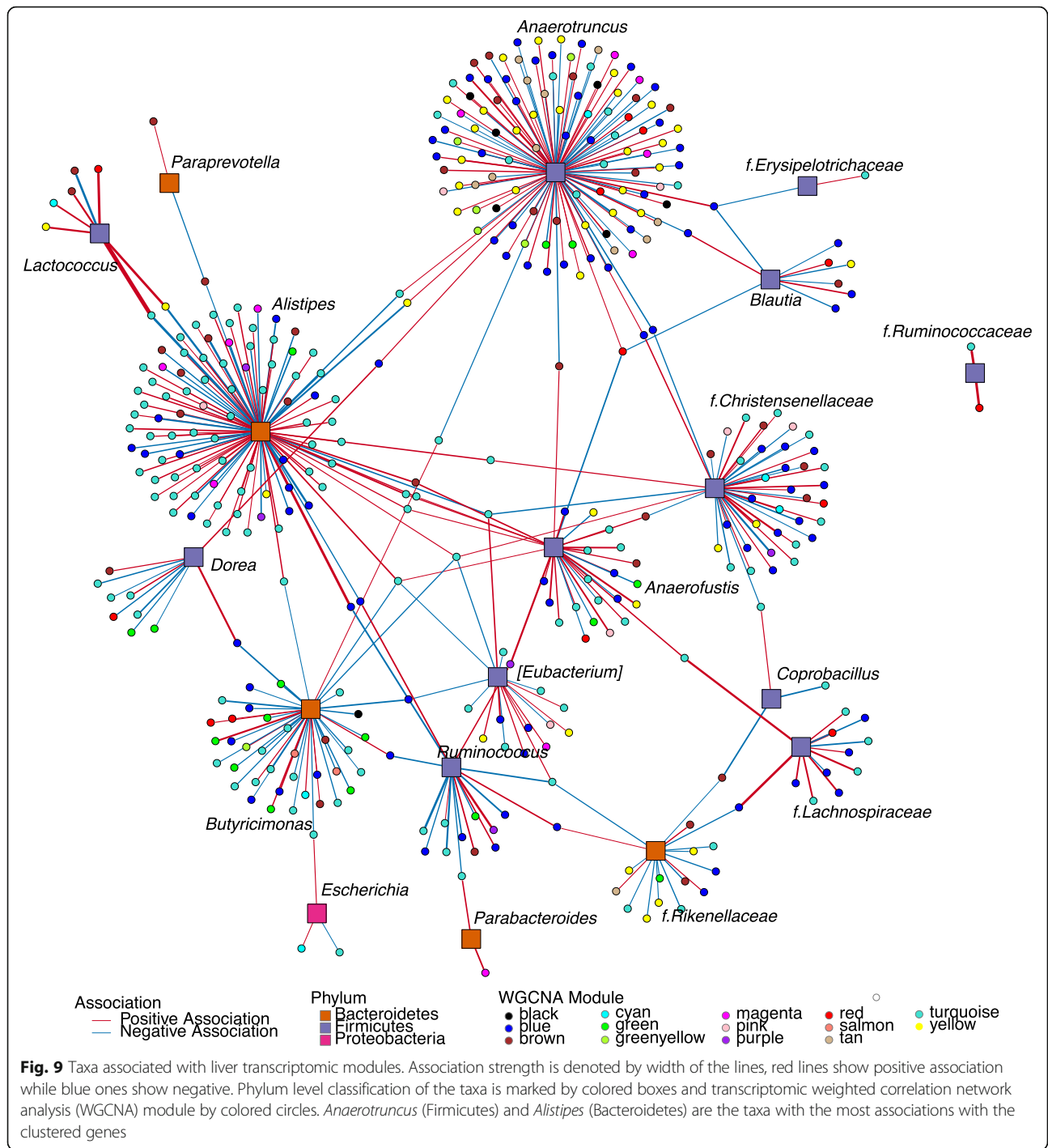
The association analysis linking taxa and liver gene expression modules showed that the Firmicutes phylum is involved in most associations, followed by Bacteroidetes (Fig. 9). Interestingly, *Anaerotruncus* cluster has the highest number of gene associations (334), followed by *Alistipes* (105), *Butyricimonas* (58), and Christensenellaceae (49) (Table S12). This association network revealed an overall positive association between *Anaerotruncus* with genes belonging to the lipid metabolic process, and a negative association with genes belonging to purine ribonucleotide and nucleoside metabolic process, cholesterol biosynthetic process, cellular lipid, fatty acid and phospholipid biosynthetic process, and response to cytokines. Interestingly, serum metabolomics data shows an overall negative association of this genus with metabolites of the lipid super-pathway (Fig. 6), suggesting that these taxa may play a role in host lipid metabolism. *Alistipes* was positively associated with genes in the lipoprotein biosynthetic process clustered in the turquoise module, whereas *Butyricimonas* was overall negatively associated with immune system processes. Previous work has found the *Anaerotruncus* and *Alistipes* genera enriched in genetically obese (*ob/ob*) mice exhibiting severe glycolipid metabolism disorders relative to wild type and *ob/ob* mice

consuming inulin with improved metabolic parameters [76, 77]. Abundance of these two genera was also linked with consumption of high-fat diets in humans [78–80]. Altogether, these studies suggest that *Anaerotruncus* and *Alistipes* may directly or indirectly contribute to the metabolism of dietary fats and fiber types and community context influence this dynamic. Furthermore, the strong correlations between intestinal microbes, hepatic gene expression, and host metabolic phenotypes provide potential connections between dietary fiber-microbes-health that warrant further examination.

Conclusion

Human and mouse studies encompassing genetically diverse populations have shown that host's genetic variation impacts all facets of physiology including responses to diet [81]. However, it is now clear that these populations also contain a significant amount of genetic variation derived from their largely individual associated microbiomes. Previous work in humans showed that dietary supplementation of resistant starch increases fecal butyrate levels, but with remarkable interindividual variation [50]. Furthermore, a recent study suggested that individual gut microbiota differences can be used to predict post-prandial glycemic responses to specific foods [82]. While these studies provide strong support to the notion that the gut microbiome is a major source of variability that influences responses to diet, dissecting the effects of microbial vs. host genetic variation while controlling environmental exposure is practically impossible to achieve in human studies. Modeling this variation in GF mice provides the opportunity to unravel the effects of host genetics from environmental and microbial exposures allowing the discovery of causal relationships between microbes and host phenotypes [76, 77]. Using this approach, we demonstrate that consumption of the same dietary fiber by genetically identical mice harboring different human-derived microbiomes can lead to different host metabolic outcomes (Fig. 2). Remarkably, these phenotypic responses varied as a function of the type of fiber present in the diet and were associated with changes in cecal and blood metabolites, and hepatic gene expression.

A recent study using antibiotics and PEG treatment to deplete the mouse indigenous gut microbiota, followed by transplant of human fecal microbiota from four obese donors into these animals which were fed a high-fat diet, showed that host metabolic effects in response to inulin supplementation varied as a function of the human community used to colonize the mice [83]. This work also identified several genera including *Barnesiella*, *Bilophila*, *Butyricimonas*, and several *Alistipes* amplicon sequence variants (ASVs) positively correlated with adiposity and/or hepatic steatosis whereas *Akkermansia*, *Raoultella*, and *Blautia* were negatively



correlated with at least one of these metabolic outcomes in the transplanted mice. Some of these findings are consistent with our results, e.g., *Alistipes* and *Butyrivimonas* were detected at lower levels in SubB-colonized subjects in the inulin diet relative to SubA-colonized mice in the same diet, whereas *Akkermansia* was detected at higher levels in SubB-colonized in this diet, which showed an overall healthier metabolic profile than SubA-colonized counterparts.

Interestingly, higher basal levels of *Akkermansia* were detected in the gut microbiomes of obese individuals that benefited from a dietary inulin intervention, (i.e., responders) relative to non-responders of the same treatment [83]. Furthermore, higher baseline levels of *Akkermansia* were also associated with better clinical outcomes among individuals with metabolic syndrome subjected to a calorie-restricted diet [84]. Further studies are needed to establish the causal

relationship between *Akkermansia* and enhanced response to this MAC and to identify potential molecular/microbial players involved.

The results presented here, combined with the work discussed above, suggest that the efficacy of dietary interventions such as prebiotics depends on the gut microbiota of the consumer and one-fits-all approaches to promote health are unlikely to elicit consistent effects across individuals. Identifying gut microbial biomarkers associated with beneficial responses to common interventions may help to stratify subjects into more effective personalized treatments.

While ascertaining causal mechanisms explaining differences in host metabolic phenotypes between microbiomes for each diet is beyond the goal of the current study, our results illustrate how introduction of MACs promote divergent host phenotypes caused by the two gut communities. This result has implications not only for personalized nutrition approaches but is also relevant for animal studies in the nutrition field. The use of AIN93-based purified diets [85] that contain cellulose as the sole source of fiber is common practice in nutrition studies. These diets are useful tools for the field, but their lack/low levels of dietary MACs might not support gut bacterial taxa that are relevant to the process studied. While there is not sufficient evidence to prescribe the use of a particular fiber or a specific combination of different fibers, the presented results describe some of the consequences of their inclusion or lack thereof. Furthermore, inclusion of some fermentable fibers in rodent diets will enable conditions that are more representative of human and rodent nutrition.

A major limitation of the study is that only two communities were compared. While these showed clear organismal and functional differences (Figs. S1 and S3) and elicited distinct host metabolic phenotypes, they likely capture a small fraction of the variability observed among human gut microbiomes. Expanding this study to include a wider range of communities, including samples from subjects with extreme diets, markedly different lifestyles, or different health status may expand the range of responses to dietary fiber mediated by gut microbes. Additionally, our study did not characterize the degree to which each of the fibers was metabolized by the two communities. Identifying gut signatures associated with desired health outcomes in response to specific fibers may reveal biomarkers of beneficial diet-microbiome interactions that guide personalized nutrition approaches. In conclusion, the present study underscores the importance of the gut microbiome as a differential factor that contributes to individual variation in metabolic responses to dietary fiber.

Methods

Dietary formulation

The four diets used during this study contained 35% kcal fat, 20% kcal protein, 45% kcal carbohydrate, and

different fiber type which equals 10% weight. A non-fermentable fiber, cellulose (Solka Floc), was used as control while inulin [Oligo-Fiber Inulin instant (100010911); Cargill, Minneapolis, MN], pectin (PE1006; Gojira Fine Chemicals, LLC, Bedford Height, OH), and a formulation of assorted fibers which contained 23.4 g/kg inulin, 21.5 g/kg short-chain fructooligosaccharide (i.e., scFOS, NUTRAFLORA[®], Ingredion Inc., Westchester, IL), 33.3 g/kg resistant starch type 2 (HI-MAIZE[®] 260, Ingredion Inc., Westchester, IL), 23.5 g/kg resistant starch type 4 (Fibersym[®], MPG, Atchison, KS), 23.5 pectin, as sources of fermentable fibers (Table S1). Experimental diets were manufactured and sterilized via irradiation by Envigo (10% cellulose diet; TD.170720, 10% inulin diet; TD.170721, 10% pectin diet; TD.170725, and assorted fiber diet; TD.170726).

Gnotobiotic husbandry

All experiments involving gnotobiotic mice were performed under protocols approved by the University of Wisconsin-Madison Animal Care and Use Committee. All germ-free (GF) C57BL/6 mice were maintained in a controlled environment in plastic flexible film gnotobiotic isolators under a strict 12-h light/dark cycle and received sterilized water and chow (LabDiet 5021; LabDiet, St. Louis, MO) ad libitum. A week prior to colonization, mice were switched to the assorted fiber diet. GF status of mice was confirmed prior to starting the experiment using culture-dependent methods. No turbidity was observed when feces collected from the mice were inoculated in a panel of rich media and incubated at 37 °C aerobically and anaerobically for a week.

Colonization of germ-free mice and dietary fiber interventions

Screening phase protocol

Richness and diversity metrics (i.e., alpha and beta) obtained from previous publication [38] plus Faith's phylogenetic diversity (calculated using QIIME 2 [86]) were used to describe 8 Wisconsin Longitudinal Study (WLS) samples selected for this study [87]. All donors were adults between 70 and 82 years old, (6 men, 2 women) with reported body mass index interval was between 23 and 38. Fecal suspensions were prepared under anaerobic conditions in Hungate tubes. A ~ 0.5-cm piece of frozen fecal aliquot straw technique (FAST) straw material were resuspended in 5 ml mega media as previously described [16, 88]. Adult 6–8-week-old male C57BL/6 GF mice (total $n = 23$) were inoculated by oral gavage with ~ 200 μ l of fecal suspension ($n = 2$ –4 mice/sample), after being fed with an assorted fiber diet (see below) for a week in sealed positive pressure individually ventilated cages (IVCs; Allentown). Each cage contained 2–4 mice. Upon inoculation, mice were maintained on

the same assorted fiber diet for 2 more weeks. Cecal contents were collected for SCFAs and 16S rRNA gene sequencing analysis from each of the 8 gnotobiotic groups.

Study design

The two fecal communities exhibiting the highest (SubB) vs. lowest (SubA) butyrate-producing activity were then selected for subsequent experiments. Both samples belonged to individuals of the same sex (males), similar age (76.5 ± 1 years old), BMI = 30, and with no history of diabetes, cancer, or heart disease. Three-day diet recall indicates that both subjects consumed a typical western diet. Fecal samples from SubA and SubB were inoculated into 7–9-week-old GF male mice ($n = 30$ – 36 mice/community) consuming assorted fiber diet as described above. All gnotobiotic mice continued with the same irradiated assorted fiber diet for two more weeks (stabilization period). Bedding and wires with food were exchanged between cages of mice colonized with the same community to minimize cage effects. Mice were then switched to one of the four diets described above: cellulose, inulin, pectin, and assorted fiber ($n = 7$ – 10 mice/community/diet), and maintained in these diets for another 4 weeks. Animals were euthanized after 4 h of fasting.

Measurements of short-chain fatty acids (SCFA)

SCFA analysis of mouse samples

Cecal levels of SCFAs were measured as previously described [19]. Briefly, a mixture of 10 μ l of internal standards (200 mM for mice and 20 mM for human each; acetic acid-D4, Sigma-Aldrich no. 233315; propionic acid-D6, Sigma-Aldrich no. 490644; and butyric acid-D7, CDN isotopes no. D-171) was subsequently added, followed by 20 μ l of 33% HCl and 1 ml diethyl ether. The vials were sealed, vortexed vigorously for 3 min, and then centrifuged (4000g, 10 min). The upper organic layer was transferred to another vial and a second diethyl ether extraction was performed. After combining the 2 ether extracts, a 60 μ l-aliquot was removed, combined with 2 μ l *N*-tert-butyltrimethylsilyl-*N*-methyltrifluoroacetamide (Sigma-Aldrich no. 394882) in a GC auto-sampler vial with a 200 μ l glass insert, and incubated for 2 h at room temperature. Derivatized samples (1 μ l) were injected onto an Agilent 7890B/5977A GC/MSD instrument with an Agilent DB1-ms 0.25 mm \times 60 m column with a 0.25- μ m bonded phase. A discontinuous oven program was used starting at 40 $^{\circ}$ C for 2.25 min, then ramping at 20 $^{\circ}$ C min⁻¹ to 200 $^{\circ}$ C, then ramping at 100 $^{\circ}$ C min⁻¹ to 300 $^{\circ}$ C and holding for 7 min. The total run time was 18.25 min. Linear column flow was maintained at 1.26 ml min⁻¹. The inlet temperature was set to 250 $^{\circ}$ C with an injection split ratio of 15:1. Acquisition B.07.02.1938. The m/z values of monitored ions in mice cecal measurements were as follows: 117 (acetic

acid), 120 (acetic acid-D4), 131 (propionic acid), 136 (propionic acid-D6), 145 (butyric acid), and 152 (butyric acid-D7). Concentrations were normalized to milligrams of cecal contents.

Measurements of branched-chain fatty acids (BCFA)

Levels of BCFA were quantified in cecal samples collected from mice exposed to the four different diets used in the study ($n = 66$; $n = 7$ – 10 per community/dietary fiber intervention) using the headspace GC analysis method. Frozen, weighed samples (~ 70 mg) were added to chilled 20-ml headspace vials (Restek, Bellefonte, PA) containing 2.0 g NaHSO₄, distilled water (300 μ l—sample weight), and 1.0 ml of 60 μ M 2-butanol (internal standard; added just prior to the sample). Vials were crimp sealed immediately after sample addition and vortexed periodically to disperse and mix the contents. Headspace GC analyses were performed using a Shimadzu (Columbia, MD) HS-20 headspace sampler connected to a Shimadzu GC-2010 Plus GC equipped with a SH-Stabilwax column (30 m, 0.25 mm ID, 0.10 μ m df) linked to a FID. Samples were equilibrated with shaking to 80 $^{\circ}$ C for 20 min, pressurized to 80 kPa for 3 min prior to column injection (2 ml injection loop, load time 0.2 min, sample and transfer line temperature 150 $^{\circ}$ C, 1:15 split ratio, N₂ column flow 1.2 ml/min), with a column temperature program starting at 40 $^{\circ}$ C/2 min, increased to 200 $^{\circ}$ C (20 $^{\circ}$ C/min), held 2 min, decreased to 120 $^{\circ}$ C (20 $^{\circ}$ C/min), decreased to 40 $^{\circ}$ C (40 $^{\circ}$ C/min), and stabilized 1 min prior to the subsequent injection. The GC cycle time was approximately 23 min. Standard mixtures were prepared and analyzed by the same method, and peak areas determined using Shimadzu Lab Solution software (version 5.92), with adjustment for fecal sample size.

Tissue collection and analysis

Blood was collected via cardiac puncture of anesthetized mice following a 4-h fast. Serum was obtained by centrifugation and stored at -80 $^{\circ}$ C. Cecal contents, liver, and gonadal fat pads were collected at the time of euthanasia, snap frozen in liquid nitrogen, and stored at -80 $^{\circ}$ C until analysis. Glucose was measured using ultrahigh-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC–MS/MS) by Metabolon.

Liver triglyceride measurements

Liver triglycerides (TG) were quantified as previously described [19, 89]. Briefly, between 30 and 40 mg of frozen liver tissue was homogenized in 30 ml of 2:1 chloroform:methanol and disrupted using a bead beater (BioSpec Products, Barlesville, OK; maximum setting for 6 min at room temperature). Samples were incubated overnight at 4 $^{\circ}$ C with gentle agitation and 1 ml of 4 mM MgCl was added for phase separation. The organic solvent (500 μ l) was left to evaporate overnight and the dried

lipids were reconstituted in 200 μ l butanol:triton- \times 114 mix (3:2 vol:vol). TG content was determined by colorimetric assay from Sigma (Sigma, F6428), according to the manufacturer's instructions and expressed in nanomole per gram of wet tissue for final concentration.

Statistical analysis of mouse phenotypes

To assess differences on metabolic phenotypes measured between microbiota communities within each dietary intervention and between the same microbiota across different diets, we performed a nonparametric test and use permutation approach to obtain the P value for two-group comparison through Wilcoxon rank sum test. Homogeneity of variance was tested using Levene's test ($P > 0.05$) previous to performing a two-way ANOVA to investigate the effect of dietary intervention, transplanted microbiota community, and their interaction on each phenotype ($P < 0.05$).

16S rRNA gene sequencing

Genomic DNA was extracted from cecal contents using a bead-beating protocol [76]. Briefly, \sim 50 mg of fecal pellet sample were resuspended in a solution containing 500 μ l of extraction buffer [200 mM Tris:HCl (pH 8.0), 200 mM NaCl, 20 mM EDTA], 210 μ l of 20% SDS, 500 μ l phenol:chloroform:isoamyl alcohol (pH 7.9, 25:24:1) (Invitrogen 15593-049), and 500 μ l of 0.1-mm diameter zirconia/silica beads. Samples were mechanically disrupted using a bead beater (BioSpec Products, Barlesville, OK; maximum setting for 3 min at room temperature), followed by centrifugation, recovery of the aqueous phase with 60 μ l 3 M NaAcetate, and precipitation with isopropanol. QIAquick 96-well PCR Purification Kit was used to remove contaminants. Isolated DNA was eluted in 10 mM Tris (pH 8.0) buffer and was stored at -20°C until further use.

Amplification of 16S rRNA genes (V4) was done from DNA by PCR using unique 8-bp barcodes on the forward and reverse primers and fused with Illumina sequencing adapters [90]. Each sample was amplified in duplicate in a reaction volume of 12.5 μ l using KAPA HiFi HotStart DNA polymerase (KAPA Biosystems, Wilmington, MA, cat. # KK2602), 10 μ M of each primer, and \sim 12.5 ng of genomic DNA. PCR was carried out under the following conditions: initial denaturation for 3 min at 95°C , followed by 25 cycles of denaturation for 30 s at 95°C , annealing for 30 s at 55°C and elongation for 30 s at 72°C , and a final elongation step for 5 min at 72°C . PCR products were purified with the QIAquick 96-well PCR Purification Kit and then quantified using Qubit dsDNA BR Assay kit (Invitrogen, Oregon, USA). Samples were equimolar pooled and sequenced on the Illumina MiSeq 2 \times 250 bp platform.

Sequences were processed using QIIME 2 pipeline [86]. Demultiplexed 250 bases paired-end sequences were imported using Casava 1.8 format and denoised using DADA2 [91, 92] to obtain amplicon sequence variant (ASV) table. Singletons (ASV present < 2 times) and ASVs that are present in less than 10% of the samples were discarded. Greengenes [93] reference sequences (clustered at 99% similarity) were used to train a naïve Bayes taxonomy classifier to further annotate ASVs taxonomically. ASVs were then collapsed based on genus or lowest-level (i.e., family, order, class, phylum) taxonomy possible. An even sampling depth of 5795 and 33,714 sequences per sample was used for assessing alpha- and beta-diversity measures in the screening and study phase, respectively. Shannon diversity Index and Faith's phylogenetic diversity (PD) was used to measure alpha diversity. Beta-diversity was calculated using principal coordinates analysis (PCoA), Jaccard, and weighted and unweighted UniFrac metrics [94]. Weighted UniFrac distances between microbiota communities were tested by pairwise PERMANOVA using Qiime2 beta-group-significance command with the $-p$ -pairwise parameter [95]. Also, linear discriminant analysis (LDA) effect size (LEfSe Galaxy Version 1.0) was performed to each microbiota pair (SubA and SubB) for each dietary fiber intervention to elucidate significantly different abundances of bacterial taxa. The parameters used for these analyses were set with default P value ($\alpha = 0.05$) and LDA score of 2.0 [46].

PICRUSt2 was used to predict functional content or microbiome 16S rRNA genes [43, 44] using QIIME2 generated data. An even sampling depth of 3,919,286 gene counts was used to rarefy all samples to further analyze diversity using Bray Curtis analysis.

Untargeted metabolomics of serum samples

Untargeted mass spectrometry data was collected at Metabolon Inc from 100 μ l serum samples of 6 randomly selected mice in each treatment. The 48 samples were prepared using the automated MicroLab STAR system (Hamilton Company). Recovery standards were added and protein, dissociate small molecules bound to protein or trapped in the precipitated protein matrix were removed. To recover chemically diverse metabolites, proteins were precipitated with methanol under vigorous shaking for 2 min (Glen Mills GenoGrinder 2000) followed by centrifugation. The resulting extract was divided into five fractions: two for analysis by two separate reverse-phase UPLC-MS/MS methods with positive ion mode electrospray ionization (ESI), one for analysis by reverse-phase UPLC-MS/MS with negative ion mode ESI, one for analysis by HILIC/UPLC-MS/MS with negative ion mode ESI, and one sample was reserved for backup. Samples were placed briefly on a

TurboVap (Zymark) to remove the organic solvent. The sample extracts were stored overnight under nitrogen before preparation for analysis.

Ultrahigh-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS)

All methods utilized a Waters ACQUITY ultraperformance liquid chromatography system and a Thermo Scientific Q-Exactive high-resolution/accurate mass spectrometer interfaced with a heated ESI source and an Orbitrap mass analyzer operated at 35,000 mass resolution. The sample extract was dried and then reconstituted in solvents compatible to each of the four methods. Each reconstitution solvent contained a series of standards at fixed concentrations to ensure injection and chromatographic consistency. One aliquot was analyzed using acidic positive ion conditions, chromatographically optimized for more hydrophilic compounds. In this method, the extract was gradient eluted from a C18 column (Waters UPLC BEH C18-2.1 × 100 mm, 1.7 μm) using water and methanol, containing 0.05% perfluoropentanoic acid and 0.1% formic acid. Another aliquot was also analyzed using acidic positive ion conditions; however, it was chromatographically optimized for more hydrophobic compounds. In this method, the extract was gradient eluted from the same aforementioned C18 column using methanol, acetonitrile, water, 0.05% perfluoropentanoic acid, and 0.01% formic acid and was operated at an overall higher organic content. Another aliquot was analyzed using basic negative ion optimized conditions using a separate dedicated C18 column. The basic extracts were gradient eluted from the column using methanol and water, amended with 6.5 mM ammonium bicarbonate at pH 8. The fourth aliquot was analyzed via negative ionization following elution from a HILIC column (Waters UPLC BEH Amide 2.1 × 150 mm, 1.7 μm) using a gradient consisting of water and acetonitrile with 10 mM ammonium formate, pH 10.8. Raw data was extracted, peak-identified, and QC processed using Metabolon's hardware and software. Compounds were identified by comparison to library entries of purified standards or recurrent unknown entities based on retention time/index, mass to charge ratio (m/z), and chromatographic data, and peaks were quantified using area-under-the-curve.

Statistical analysis

The dataset comprises a total of 774 biochemicals. Metabolic profiles were quantified in terms of relative abundance and median scaled to 1. Following log transformation and imputation of missing values, if any, with the minimum observed value for each compound, two-way ANOVA contrast were used to identify biochemicals that differed significantly between experimental groups. An FDR adjusted- P value (i.e., q -

value) is calculated to take into account the multiple comparisons that normally occur in metabolomic-based studies, and all metabolites with q -value < 0.05 were included.

RNA-seq analysis

Mouse liver tissue samples were submitted to the University of Wisconsin Biotechnology Center (UWBC) Gene Expression Center for total RNA extraction. In a 96-well format, tissue samples were lysed using QIAzol Lysis Reagent (Qiagen, Hilden, Germany) and the TissueLyser. Following phase separation by centrifugation, the aqueous phase was recovered, ethanol was added, and the solution was added to an RNeasy 96 Universal Tissue plate. Plate was processed following the RNeasy 96 Universal Tissue protocol. An on-column DNase treatment step was included. RNA was eluted in nuclease-free water. Each sample was quantified and analyzed on a NanoDrop One Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and Agilent 2100 Bioanalyzer (Santa Clara, CA, USA) for purity and integrity, respectively.

Total RNA samples that met the Illumina sample input guidelines were prepared according the TruSeq® Stranded mRNA Sample Preparation Guide (Rev. E) using the Illumina® TruSeq® Stranded mRNA Sample Preparation kit (Illumina Inc., San Diego, CA, USA). For each library preparation, mRNA was purified from 1000 ng total RNA using poly-T oligo-attached magnetic beads. Subsequently, each poly-A-enriched sample was fragmented using divalent cations under elevated temperature. The mRNA fragments were converted to double-stranded cDNA (ds cDNA) using SuperScript II (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), RNaseH, and DNA Pol I, primed by random primers. The ds cDNA was purified with AMPure XP beads (Agencourt, Beckman Coulter). The cDNA products were incubated with Klenow DNA Polymerase to add an "A" base (Adenine) to the 3' end of the blunt DNA fragments. DNA fragments were ligated to unique dual index (UDI) adapters (IDT for Illumina- TruSeq RNA UD Index- catalog 20022371, IDT for Illumina - Nextera DNA Unique Dual Indexes, Set A and custom synthesized UDIs), which have a single "T" base (Thymine) overhang at their 3' end. The adapter-ligated DNA products were purified with AMPure XP beads. Adapter-ligated DNA was amplified in a Linker Mediated PCR reaction (LM-PCR) for 10 cycles using Phusion™ DNA Polymerase and Illumina's PE genomic DNA primer set followed by purification with AMPure XP beads. Finally, the quality and quantity of the finished libraries were assessed using an Agilent DNA1000 chip (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA) and Qubit® dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), respectively. Libraries were standardized to 2 nM. Paired-end 2 × 150 bp sequencing

was performed, using standard SBS chemistry on an Illumina NovaSeq6000 sequencer. Images were analyzed using the standard Illumina Pipeline, version 1.8.2.

High-quality reads were obtained after removal of adaptor sequences and high content of unknown bases. Filtered reads were mapped to mouse genome reference GRCm38.p6 from Ensemble (release 97) database using Spliced Transcripts Alignment to Reference tool (STAR, v2.7.2a). Further quantification of mapped transcript reads to the reference was performed using featureCounts tool (v1.6.4). Readcount data was analyzed for differential gene expression using edgeR Bioconductor package (version 3.28.0) performing the generalized linear model quasi-likelihood F-test from empirical Bayes methods to estimate gene-specific biological variation [96]. Quasi-likelihood method accounts for uncertainty in dispersion estimation, therefore, gives stricter error rate control which makes it ideal for differential expression analyses of our RNA-seq data [96]. Filtering of low expressed genes was performed by keeping counts in a minimum number of samples computed through the built-in function “filterByExpr”. Normalization for RNA composition effect was performed in order to compare relative changes in expression levels between conditions using trimmed mean of *M*-values (TMM) between each pair of samples [97]. Biological and technical variability estimation was performed by analyzing sample replicates. Negative binomial generalized linear models were fitted and tagwise dispersion estimates were obtained using Cox-Reid profile-adjusted likelihood method in order to determine differential expression. Differentially expressed genes (DEGs) were obtained after filtering by logarithmic fold-change 1 and -1 , *P* value 0.05, and false discovery rate (FDR adjusted-*P*) 0.05, yielding 55,573 genes in total. Gene Ontology (GO) functional enrichment analysis for biological process (BP), cellular component (CC), molecular function (MF), and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathways was obtained as part of the downstream procedure to interpret the differential expression of genes. We performed Gene Ontology and KEGG pathways enrichment analyses for the differentially expressed genes. The resulting gene representation data was then filtered to include only GO terms or KEGG pathways with at least 10 annotated genes; a minimum of 5 genes that were significantly regulated and a *P* value (≥ 5).

Mass spectrometry analysis of post-translational modification (PTM) of histones from liver

Tissue fractionation and histone extraction and label-free chemical derivatization from liver

Tissue fractionation and histone acid extraction was performed using previously published protocols [72, 98].

Briefly, 50–100 mg of frozen mice liver tissue ($n = 32$, 4 samples per treatment) was dounce-homogenized on ice in a hypotonic lysis buffer containing histone deacetylase and protease inhibitors, followed by the centrifugation to pellet nuclei. Histones were acid extracted, and a Bradford assay was performed to quantify protein yield. In total, 5 μg of dried histone extract was then subjected to hybrid chemical derivatization [99] using heavy acetic anhydride. This procedure was followed by trypsinization for 4 h and derivatization of newly generated peptide N-termini with phenylisocyanate (PIC). Finally, labelled histones were desalted using C18 stage tips.

Nano-liquid chromatography and electrospray ionization tandem MS

For each sample, derivatized histone peptides were injected onto a Dionex Ultimate3000 nanoflow HPLC with a Waters nanoAcquity UPLC C18 column (100 m \times 150 mm, 3 m) coupled to a Thermo Fisher Q-Exactive mass spectrometer at 700 nL/min. Mobile phase consisted of water + 0.1% formic acid (A) and acetonitrile + 0.1% formic acid (B). Histone peptides were resolved with a 2-step linear gradient of 2 to 25% mobile phase B over 60 min followed by 25 to 40% mobile phase B over 15 min. Data was acquired using data-independent acquisition (DIA) mode. The mass spectrometer was operated with a MS1 scan at resolution = 35,000, automatic gain control target = 1×10^6 , and scan range = 390–910 m/z, followed by a DIA scan with a loop count of 10. DIA settings were as follows: window size = 10 m/z, resolution = 17,500, automatic gain control target = 1×10^6 , DIA maximum fill time = AUTO, and normalized collision energy = 30. For each cycle, one full MS1 scan was followed by 10 MS2 scans using an isolation window size of 10 m/z.

Histone PTM quantification

EpiProfile 2.0 was used for quantification of histone PTMs [100]. The R script provided by Denu lab (<https://github.com/DenuLab/HistoneAnalysisWorkflow>) was used to perform data cleaning, normalization, statistical analysis, and visualization.

Data processing for microbiome, metabolome, and transcriptome

Normalization/transformation/filtering

For the taxa that were unclassified at the genus level, their identities at higher levels were used. We combined all ASVs belonging to the same genus and filtered out the genera that appear in fewer than 20% of total samples, leaving 5 phyla, 11 classes, 11 orders, 25 families, and 45 genera. For the metabolome data, we normalized biochemicals by using inverse normal transformation and transformed variables that did not follow a normal

distribution (Shapiro-Wilk test $P < 0.05$) were removed, resulting in 712 biochemicals. The RNA-seq data were normalized with voom methodology [101]. The voom method estimates the mean-variance relationship and computes appropriate observation-level weights to transform count data to log₂-counts per million. We used median absolute deviation to measure the variability of each gene because two genes without notable variance between samples will be highly correlated. As a heuristic cut-off, the top 5000 most variant genes had been used in the downstream analysis.

Weighted correlation network analysis (WGCNA) for metabolome and transcriptome

In order to group the biochemicals that were highly correlated, we built the co-expression network using WGCNA [102]. The WGCNA is an efficient and robust method in grouping metabolomic and transcriptomic data [103, 104] and allowed us to summarize each module by its module eigenvalue. A one-sided Fisher test was used to determine if a pathway was enriched within the turquoise and blue modules in metabolomic data. P values were then adjusted using Benjamini-Hochberg method, and a cut-off of $P < 0.05$ and FDR adjusted- $P < 0.05$ were chosen to determine if a pathway was significantly enriched. We used Pearson's correlation between expression profile of each gene and module eigenvalue to identify module membership. Using the module eigenvalue, the module-traits relationships were estimated by calculating Pearson's correlations between the module eigenvalue and the traits of interest. We considered 0.90 as a correlation cut-off to choose soft-thresholding power and set the minimal module size as 20. For metabolome, the metabolites were clustered into 8 modules plus 43 unclustered metabolites. The transformed values of the unclustered metabolites were combined with standardized module eigenvalues in the following analysis. For the transcriptome data, 14 modules (defined as clusters of highly interconnected genes) were identified by using DynamicTree Cut algorithm. WGCNA led to 14 different modules by using DynamicTree Cut algorithm. Over-representation of genes in the blue module was characterized based on gene ontology biological process and KEGG pathways using clusterProfiler [105].

Microbiome association with host -omics

We applied the sparse linear log-contrast model [106] to pinpoint important genera that are associated with individual metabolite/gene. In this model, the host omics variable is the response and the genus-level microbial taxa are compositional covariates. The sparse linear log-contrast model respects the compositional nature of the microbiome data and avoids choosing an arbitrary

reference taxon, in which the unit-sum constraint on the compositional vector is translated into the zero-sum constraint on the association coefficients across taxa in log ratio scale. In our analysis, we used 10-fold cross validation to choose the tuning parameter. To obtain stable selection results, we generated 100 bootstrap samples and used the same cross validation procedure to select the genera. We also followed the stability selection approach [107] to assess the stability of the selected genera, where 100 subsamples of half sample size were taken to compute the selection probabilities. In the association network (Figs. 6 and 9), we kept genera with stability selection probability larger than 0.85 and filter out the lowly associated genera which the absolute value of coefficient is less than 0.1.

Causal mediation analysis

We performed mediation analyses to investigate how the post-intervention gut microbiome/metabolites/gene expressions may mediate the effect of fecal colonization on various phenotypes (adiposity, liver TG, glucose) under a given diet. We employed the causal mediation model with batch effects as confounder, SubA/B microbial communities as exposure, and different phenotypes as outcome. All the mediation effect hypotheses were tested by using the resampling method. Below we described two approaches for testing microbiome mediation effects on the global community level and on the subcompositions defined on the taxonomy tree. For the metabolites and genes, we applied mediation analysis to the corresponding WGCNA modules.

Beta-diversity mediation analysis for microbiome

For beta-diversity distance matrices, we performed the distance-based mediation test by using the MedTest package in R language [108]. The Jaccard and unweighted UniFrac distance matrices were calculated based on the rarefied genus-level abundance matrix (rarefied to the minimum sequence depth) to reduce potential sequence depth-dependent bias.

Tree-based mediation analysis microbiome

We used maximum round error 0.5 to replace 0 [109] in full-composition abundance matrix, then calculated the sub-composition relative abundance matrix for each high-rank internal node. We removed extremely rare taxa (only detected in 10% of the observations or less). We selected the most abundant taxa in the relative abundance matrix as the reference taxa and took additive logarithm transformation on the compositional data so that the transformed data could be considered as multivariate variables. Finally, we applied the causal mediation model on each high-rank internal node in the taxonomy tree.

Metabolite module/gene module mediation analysis

In order to identify the microbial community status effect on different phenotypes which were transmitted through the metabolite modules/gene modules, we applied causal mediation model by considering the corresponding WGCNA modules as multiple independent mediators.

Abbreviations

ANOVA: Analysis of variance; Af: Assorted fiber; ASV: Amplicon sequence variant; BCAA: Branched-chain amino acid; BCFA: Branched-chain fatty acids; BP: Biological process; C: Cellulose; CC: Cellular component; DEGs: Differentially expressed genes; ds cDNA: Double-stranded cDNA; F/B: Firmicutes:Bacteroidetes ratio; FAST: Fecal aliquot straw technique; FC: Fold-change; FDR: False discovery rate; GF: Germ-free; GO: Gene ontology; GSH: Glutathione; I: Inulin; KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes; LEfSe: Linear discriminant analysis effect size; MACs: Microbiota-accessible carbohydrates; MF: Molecular function; *ob/ob*: Genetically obese; P: Pectin; PC: Phosphatidylcholine; PCoA: Principal coordinates analysis; PD: Phylogenetic diversity; PERMANOVA: Permutational multivariate analysis of variance; PPAR: Peroxisome proliferator-activated receptor; PTMs: Post-translational modifications; RNA-seq: RNA sequencing; RS: Resistant starch; SCFAs: Short-chain fatty acids; scFOS: Short-chain fructo-oligosaccharides; SubA: Subject A; SubB: Subject B; TG: Liver triglycerides; TMM: Trimmed mean of M-values; TNF- α : Tumor necrosis factor alpha; TRP: Transient receptor potential; UPLC-MS/MS: Ultrahigh-performance liquid chromatography-tandem mass spectroscopy; uwUF: Unweighted UniFrac; WGCNA: Weighted correlation network analysis; WLS: Wisconsin Longitudinal Study; wUF: Weighted UniFrac

Supplementary Information

The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1186/s40168-021-01061-6>.

Additional file 1: Fig. S1. Screening phase. 16S rRNA gene sequence analysis of fecal samples from human donors and recipient mice. A. Principal Coordinates Analysis (PCoA) of unweighted UniFrac (uwUF) distances from eight human fecal samples collected for Wisconsin Longevity Study. B. Bacterial relative abundance summarized at the phylum level. C. Percentage of genera shared between each donor fecal sample and its corresponding recipient mice cecal samples. Number of mice colonized for each fecal donor is reported under each bar. D. Percent relative abundance of the fecal donor community captured in the mouse cecal samples. E. uwUF distances between donor fecal samples and each engrafted cecal community. Averages of distances between corresponding human donor-mouse engrafted community are indicated as DONOR. Average of uwUF distances between non-matched donor-mouse community are indicated as OTHER. F. PCoA of uwUF distances of the eight human fecal samples engrafted in the mouse cecum. Circles with the same colors indicate biological replicates colonized with the same community. G. Alpha-diversity as determined by Faith's phylogenetic diversity of each of the eight engrafted communities. $***P < 0.001$.

Additional file 2: Fig. S2. Variation in cecal short-chain fatty acids among transplanted communities. Cecal levels of (A) butyrate; (B) acetate; and (C) propionate ($\mu\text{moles/g}$ wet weight) for each the eight transplanted groups of mice described in Fig. S1.

Additional file 3: Fig. S3. Variation in predicted metabolic capacity among engrafted gut communities. Principal Coordinates Analysis (PCoA) of Bray Curtis dissimilarity using the PICRUSt2 predicted metabolic functions of the eight transplanted human microbiota samples used in this study. Circles with the same colors indicate biological replicates colonized with the same community.

Additional file 4: Fig. S4. Characterization of transplanted communities in mice. 16S rRNA gene sequence analysis of engrafted cecal communities. Germ-free mice were colonized with SubA or SubB and

exposed to one of four diets containing a different type of fiber; (i) Cellulose; (ii) Inulin; (iii) Pectin; or (iv) Assorted fiber. A. Heatmap showing presence/absence of bacterial taxa in the gut of transplanted animals across the four different diets. Red indicates presence and black absence. Each column represents an individual mouse. B. Alpha diversity (Shannon Index) of SubA and SubB communities after dietary intervention. $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$, $****P < 0.0001$.

Additional file 5: Fig. S5. Differences in gut microbiota between SubA- and SubB-colonized animals across the different diets used. Weighted UniFrac distances between fecal microbiomes of SubA and SubB colonized mice. The UniFrac matrix was permuted 999 times; $n = 7$ -10 animals/microbiome/diet.

Additional file 6: Fig. S6. Individual effect of dietary fibers on Firmicutes to Bacteroidetes ratio. Comparison of Firmicutes and Bacteroidetes between engrafted SubA and SubB communities across different diets. A. Relative abundance of Bacteroidetes (white) and Firmicutes (black) in SubA (magenta) and SubB (yellow) colonized mice for each dietary fiber intervention. B. Firmicutes:Bacteroidetes ratio in SubA (magenta) and SubB (yellow) for the four dietary interventions. $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$, $****P < 0.0001$.

Additional file 7: Fig. S7. Linear discriminant analysis Effect Size (LEfSe) summary. List of taxa differentially abundant between gut community SubA (magenta) and SubB (yellow) in the four diets. LDA score (log 10) is indicated at the bottom of each graph.

Additional file 8: Fig. S8. Relative abundance of gut bacterial taxa for SubA and SubB. Box plots indicating relative abundance of taxa of interest relevant to the diversity, association, and mediation analyses. This figure shows relative abundance of taxa that has at least one significant difference between SubA and SubB within a dietary intervention. SubA is represented with the color magenta and SubB with the color yellow. $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$, $****P < 0.0001$.

Additional file 9: Fig. S9. Short Chain Fatty Acids (SCFA). Cecal levels of (A) acetate; (B) butyrate, (C) propionate and total SCFA ($\mu\text{moles/g}$ wet wt) E. valerate and Branched-chain Fatty Acids (BCFA) Isobutyrate and Isovalerate of SubA (magenta) and SubB (yellow) by diet. Wilcoxon test comparison $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$, $****P < 0.0001$.

Additional file 10: Fig. S10. Dendrogram of serum metabolites from transplanted mice. Clustering dendrograms of 712 serum metabolites with dissimilarity based on topological overlap, together with assigned module colors. There are 9 modules that cluster different numbers of metabolites.

Additional file 11: Fig. S11. Correlations between Short Chain Fatty Acids and blood metabolites. Correlation matrix between metabolites consensus modules and cecal SCFAs from mice described in Fig. 1. Modules were determined based on patterns of co-abundance of metabolites using weighted correlation network analysis (WGCNA). Each of the modules was labelled with a unique color as an identifier. Each module was tested for correlation with each cecal SCFA quantified. Within each cell, upper values are correlation coefficients between module and the phenotypes; lower values are the corresponding FDR adjusted- P values. B. Pathways enriched in the yellow, blue and turquoise modules as determined by Fisher's test.

Additional file 12: Fig. S12. Branched-Chain Fatty Acids and taxa correlation. The heatmap shows all correlations ($P < 0.05$) using Spearman method between BCFA and taxa in each dietary intervention.

Additional file 13: Fig. S13. Gut community-mediated epigenetic changes in liver are sensitive to dietary fiber. Abundance of histone Post-Translational Modifications (PTMs) on H3 lysines (K9, K14, K27, and K36). A. H3K9K14 peptide. B. H3K27K36 peptide ($n = 4$ /community/diet). $*P < 0.05$, $**P < 0.01$; ac, acetylated; unmod, unmodified; meth1,2,3, mono- di- and try- methylated respectively; pr, propionylated.

Additional file 14: Fig. S14. Effect of gut community on liver histone post-translational modifications (PTMs). Heatmap show relative difference in abundance for each histone PTM quantified in liver for mice colonized with the two communities (Log2 fold-change of SubB/SubA) in each diet. $*P < 0.1$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$ ($n = 3$ -4/condition). ac, acetylated;

unmod, unmodified; meth1,2,3, mono- di- and try- methylated respectively; pr, propionylated.

Additional file 15: Fig. S15. Dendrogram of liver transcripts from transplanted mice. Clustering dendrograms of genes with dissimilarity based on topological overlap, together with assigned module colors. There are 14 modules that cluster different numbers of transcripts.

Additional file 16: Fig. S16. Gene Ontology and KEGG pathway enrichment of transcripts in the blue module associated with metabolic phenotypes. A. Biological Process GO and KEGG enrichment of blue module associated with adiposity, B. Association with liver triglycerides. C. Association with glucose. Gene counts and FDR adjusted-*P* values are indicated for each enrichment box.

Additional file 17: Table S1. Diets used in the study.

Additional file 18: Table S2. Statistical analysis of metabolic phenotypes in transplanted mice.

Additional file 19: Table S3. Relative abundance of bacterial ASVs detected in mice. 16S rRNA gene sequence analysis of cecal samples from gnotobiotic mice colonized with SubA or SubB communities consuming one of four diets containing different types of fiber; (i) Cellulose; (ii) Inulin; (iii) Pectin; or (iv) Assorted fiber for four weeks.

Additional file 20: Table S4. Relative abundance of bacterial genera detected in mice. 16S rRNA gene sequence analysis of cecal samples from gnotobiotic mice colonized with SubA or SubB communities consuming one of four diets containing different type of fiber; (i) Cellulose; (ii) Inulin; (iii) Pectin; or (iv) Assorted fiber for four weeks. Taxa summarized at the genus level.

Additional file 21: Table S5. Mediation analysis results. For each dietary fiber intervention associated phenotype a mediator type was evaluated.

Additional file 22: Table S6. List of serum metabolites measured in transplanted mice. Fold-change (FC) between SubB and SubA is indicated as follow: darker green indicates $FC < 1$ with $P \leq 0.05$, lighter green indicates $FC < 1$ with $0.05 < P < 0.1$, darker red indicates $FC \geq 1$ with $P \leq 0.05$, and lighter red indicates $FC \geq 1$ with $0.05 < P < 0.1$. Two-Way ANOVA main effects: Community, diet, and their interaction are indicated in blue shaded cells when significant ($P \leq 0.05$) ANOVA effect; light blue shaded cells indicate $0.05 < P < 0.10$.

Additional file 23: Table S7. Weighted Correlation Network Analysis assignment of serum metabolites into modules. Abbreviations: MS, Metabolite Significance; p.MS., *P*-value of Metabolite Significance; MM, module membership; p.MM *P*-value of the module membership.

Additional file 24: Table S8. Serum metabolites contained in the blue and turquoise modules. Metabolites (biochemicals) are organized by pathways. Fold-change between SubB and SubA is indicated for the four diets as follow: darker green indicates $FC < 1$ with $P \leq 0.05$, lighter green indicates $FC < 1$ with $0.05 < P < 0.1$, darker red indicates $FC \geq 1$ with $P \leq 0.05$, and lighter red indicates $FC \geq 1$ with $0.05 < P < 0.1$. The last two columns show metabolite significance (MS) which reports the association of each metabolite with each phenotype and the corresponding *P*-value (p.MS).

Additional file 25: Table S9. Liver gene expression analysis. List of genes differentially expressed in the liver from mice colonized with SubB vs. SubA communities. (LogFC > 1 and < -1, *P* and FDR adjusted-*P* < 0.05).

Additional file 26: Table S10. Analysis of differentially expressed genes in liver. Number of differentially regulated genes contained in each listed KEGG pathway and Gene Ontology Term.

Additional file 27: Table S11. Weighted Correlation Network Analysis assignment of liver transcripts. Abbreviations: GS, Gene Significance; p.MS., *P*-value of Gene Significance; MM, module membership; p.MM for the *P*-value of the module membership.

Additional file 28: Table S12. List of liver transcripts associated with bacterial taxa. bcv.prob denotes the probability of specific taxa being selected in log-contrast model based on 100 bootstrap samples; stab.-prob denotes the probability of specific taxa being selected in log-contrast model based on 100 subsamples of half sample size. refitted.cof

denotes the coefficient estimation in the log-contrast model based on selected taxa listed in this table.

Additional file 29. Supplemental results. Effects of microbiota-fiber interactions on liver histone posttranslational modifications.

Acknowledgements

The authors thank the University of Wisconsin Biotechnology Center DNA Sequencing Facility for providing sequencing and support services, and the University of Wisconsin Center for High Throughput Computing (CHTC) in the Department of Computer Sciences for providing computational resources, support, and assistance. Part of the bioinformatics analysis was performed in the Cluster Navira, CIDIE - CONICET - UCC (Plataforma Nacional de Bioinformática). The authors also thank Mr. Chris Pruessner and Dr. Ody Maningat from MPG for their generosity in donating Fibersym for our diet formulation.

Authors' contributions

TWLC and FER conceived the study. TWLC, SMMG, ERH, and EIV performed mouse studies and collected phenotypic and transcriptomic data. JH, SPT, and JD conducted and analyzed epigenetic studies. QH, SMMG, DGC, and ZZT conducted statistical analyses. SMMG, QH, ZZT, and FER wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Funding

This work was supported in part by grants NIH DK108259 (to F.E.R.), GM140464 (to Z.T) and by the Food Safety, Nutrition, and Health program under grant no. 2019-67017-29255 /project accession no. 1018638 and Hatch grant WIS03073 both from the USDA National Institute of Food and Agriculture (to F.E.R.). This work was also supported in part by a Transatlantic Networks of Excellence Award from the Leducq Foundation. T.-W.L.C was supported by the National Institutes of Health, under Ruth L. Kirschstein National Research Service Award T32 HL 007936 from the National Heart Lung and Blood Institute to the University of Wisconsin-Madison Cardiovascular Research Center. S.M.M.G. was supported by "El Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología - CONACYT" (The National Council for Science and Technology) with register number 895733 and by "Programa 2018 para Actividades Especiales de Cooperación Interinstitucional con Fines de Internacionalización para alumnos y egresados de nivel licenciatura de la UNAM" (PAECI Scholarship) offered by the "Dirección General de Cooperación e Internacionalización (DGECI)" of the "Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)." Funding for this research was also provided by Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT) PICT-2017-4497. D.G.C is staff researcher of CONICET.

Availability of data and materials

The data reported in this paper are accessible in the NCBI Short Read Archive (SRA) under accession ID PRJNA665643 and European Nucleotide Archive (ENA) accession number PRJEB40242. Original R scripts and data used for statistical analysis are available in GitHub (<https://github.com/KIRinHong/fiberNmicrobiome>).

Declarations

Ethics approval and consent to participate

The use of Wisconsin Longitudinal Study fecal samples was approved by the Institutional Review Board at the University of Wisconsin-Madison.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Author details

¹Department of Bacteriology, University of Wisconsin-Madison, 1550 Linden Dr., Madison, WI 53706, USA. ²PECEM (MD/PhD), Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Coyoacán, Ciudad de México, México. ³Department of Biostatistics and Medical Informatics, University of Wisconsin-Madison, 600 Highland Avenue, Madison, WI 53792, USA. ⁴Present Address: Department of Nutrition Science, Purdue University, 700 W. State

Street, Stone Hall 205, West Lafayette, IN 47907, USA. ⁵Wisconsin Institute for Discovery, Madison, WI, USA. ⁶Unidad de Bioinformática Traslacional, Centro de Investigación en Medicina Traslacional Severo Amuchástegui, Instituto Universitario de Ciencias Biomédicas de Córdoba, Av. Naciones Unidas 420, 5000 Córdoba, CP, Argentina.

Received: 19 October 2020 Accepted: 24 March 2021

Published online: 20 May 2021

References

- Li J, Jia H, Cai X, Zhong H, Feng Q, Sunagawa S, et al. An integrated catalog of reference genes in the human gut microbiome. *Nat Biotechnol*. 2014; 32(8):834–41. <https://doi.org/10.1038/nbt.2942>.
- Yatsunenko T, Rey FE, Manary MJ, Trehan I, Dominguez-Bello MG, Contreras M, et al. Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature*. 2012;486(7402):222–7. <https://doi.org/10.1038/nature11053>.
- Kau AL, Ahern PP, Griffin NW, Goodman AL, Gordon JL. Human nutrition, the gut microbiome and the immune system. *Nature*. 2011;474(7351):327–36. <https://doi.org/10.1038/nature10213>.
- Thursby E, Juge N. Introduction to the human gut microbiota. *Biochem J*. 2017;474(11):1823–36. <https://doi.org/10.1042/BCJ20160510>.
- Deschasaux M, Bouter KE, Prodan A, Levin E, Groen AK, Herrema H, et al. Depicting the composition of gut microbiota in a population with varied ethnic origins but shared geography. *Nat Med*. 2018;24(10):1526–31. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0160-1>.
- Falony G, Joossens M, Vieira-Silva S, Wang J, Darzi Y, Faust K, et al. Population-level analysis of gut microbiome variation. *Science*. 2016; 352(6285):560–4. <https://doi.org/10.1126/science.aad3503>.
- The GBD 2015 Obesity Collaborators. Health effects of overweight and obesity in 195 countries over 25 years. *N Engl J Med*. 2017;377:13–27.
- Wei B, Liu Y, Lin X, Fang Y, Cui J, Wan J. Dietary fiber intake and risk of metabolic syndrome: a meta-analysis of observational studies. *Clin Nutr*. 2018;37(6):1935–42. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2017.10.019>.
- Bäckhed F, Manchester JK, Semenkovich CF, Gordon JL. Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. *PNAS*. 2007;104(3):979–84. <https://doi.org/10.1073/pnas.0605374104>.
- Cho I, Yamanishi S, Cox L, Methé BA, Zavadil J, Li K, et al. Antibiotics in early life alter the murine colonic microbiome and adiposity. *Nature*. 2012; 488(7413):621–6. <https://doi.org/10.1038/nature11400>.
- Ridaura VK, Faith JJ, Rey FE, Cheng J, Duncan AE, Kau AL, et al. Gut microbiota from twins discordant for obesity modulate metabolism in mice. *Science*. 2013;341(6150):1241214. <https://doi.org/10.1126/science.1241214>.
- Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JL. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*. 2006;444(7122):1027–31. <https://doi.org/10.1038/nature05414>.
- Vrieze A, Van Nood E, Holleman F, Salojärvi J, Kootte RS, Bartsman JFWM, et al. Transfer of intestinal microbiota from lean donors increases insulin sensitivity in individuals with metabolic syndrome. *Gastroenterology*. 2012; 143:913–916.e7.
- Koeth RA, Wang Z, Levison BS, Buffa JA, Org E, Sheehy BT, et al. Intestinal microbiota metabolism of L-carnitine, a nutrient in red meat, promotes atherosclerosis. *Nat Med*. 2013;19(5):576–85. <https://doi.org/10.1038/nm.3145>.
- Koh A, Molinaro A, Ståhlman M, Khan MT, Schmidt C, Mannerås-Holm L, et al. Microbially produced imidazole propionate impairs insulin signaling through mTORC1. *Cell*. 2018;175:947–961.e17.
- Romano KA, Vivas EI, Amador-Noguez D, Rey FE. Intestinal microbiota composition modulates choline bioavailability from diet and accumulation of the proatherogenic metabolite trimethylamine-N-oxide. *mBio*. 2015;6: e02481–14.
- Wang Z, Klipfell E, Bennett BJ, Koeth R, Levison BS, DuGar B, et al. Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease. *Nature*. 2011;472(7341):57–63. <https://doi.org/10.1038/nature09922>.
- De Vadder F, Kovatcheva-Datchary P, Goncalves D, Vinera J, Zitoun C, Duchamp A, et al. Microbiota-generated metabolites promote metabolic benefits via gut-brain neural circuits. *Cell*. 2014;156(1–2):84–96. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.12.016>.
- Kasahara K, Krautkramer KA, Org E, Romano KA, Kerby RL, Vivas EI, et al. Interactions between *Roseburia intestinalis* and diet modulate atherogenesis in a murine model. *Nat Microbiol*. 2018;3(12):1461–71. <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0272-x>.
- Koh A, De Vadder F, Kovatcheva-Datchary P, Bäckhed F. From dietary fiber to host physiology: short-chain fatty acids as key bacterial metabolites. *Cell*. 2016;165(6):1332–45. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.041>.
- Makki K, Deehan EC, Walter J, Bäckhed F. The impact of dietary fiber on gut microbiota in host health and disease. *Cell Host Microbe*. 2018;23(6):705–15. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.05.012>.
- Deehan EC, Duar RM, Armet AM, Perez-Muñoz ME, Jin M, Walter J. Modulation of the gastrointestinal microbiome with nondigestible fermentable carbohydrates to improve human health. *Microbiol Spectr*. 2017;5:24.
- Wang H, Hong T, Li N, Zang B, Wu X. Soluble dietary fiber improves energy homeostasis in obese mice by remodeling the gut microbiota. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018;498(1):146–51. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.02.017>.
- Sonnenburg ED, Sonnenburg JL. Starving our microbial self: the deleterious consequences of a diet deficient in microbiota-accessible carbohydrates. *Cell Metab*. 2014;20(5):779–86. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.07.003>.
- Martens EC, Kelly AG, Tausin AS, Brumer H. The devil lies in the details: how variations in polysaccharide fine-structure impact the physiology and evolution of gut microbes. *J Mol Biol*. 2014;426(23):3851–65. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2014.06.022>.
- Gentile CL, Weir TL. The gut microbiota at the intersection of diet and human health. *Science*. 2018;362(6416):776–80. <https://doi.org/10.1126/science.aau5812>.
- Cani PD, Possemiers S, Van de Wiele T, Guiot Y, Everard A, Rottier O, et al. Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability. *Gut*. 2009;58(8):1091–103. <https://doi.org/10.1136/gut.2008.165886>.
- Chassaing B, Miles-Brown J, Pellizzon M, Ulman E, Ricci M, Zhang L, et al. Lack of soluble fiber drives diet-induced adiposity in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2015;309(7):G528–41. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00172.2015>.
- Kindt A, Liebisch G, Clavel T, Haller D, Hörmannspurger G, Yoon H, et al. The gut microbiota promotes hepatic fatty acid desaturation and elongation in mice. *Nat Commun*. 2018;9(1):3760. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05767-4>.
- Veronese N, Solmi M, Caruso MG, Giannelli G, Osella AR, Evangelou E, et al. Dietary fiber and health outcomes: an umbrella review of systematic reviews and meta-analyses. *Am J Clin Nutr*. 2018;107(3):436–44. <https://doi.org/10.1093/ajcn/nqx082>.
- Armet AM, Deehan EC, Thöne JV, Hewko SJ, Walter J. The effect of isolated and synthetic dietary fibers on markers of metabolic diseases in human intervention studies: a systematic review. *Adv Nutr*. 2020;11(2):420–38. <https://doi.org/10.1093/advances/nmz074>.
- Healey GR, Murphy R, Brough L, Butts CA, Coad J. Interindividual variability in gut microbiota and host response to dietary interventions. *Nutr Rev*. 2017;75(12):1059–80. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nux062>.
- Hegele RA, Wolever TM, Story JA, Connelly PW, Jenkins DJ. Intestinal fatty acid-binding protein variation associated with variation in the response of plasma lipoproteins to dietary fibre. *Eur J Clin Invest*. 1997;27(10):857–62. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2362.1997.2010748.x>.
- Korpela K, Flint HJ, Johnstone AM, Lappi J, Poutanen K, Dewulf E, et al. Gut microbiota signatures predict host and microbiota responses to dietary interventions in obese individuals. *PLoS One*. 2014;9(3):e90702. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090702>.
- Kovatcheva-Datchary P, Nilsson A, Akrami R, Lee YS, De Vadder F, Arora T, et al. Dietary fiber-induced improvement in glucose metabolism is associated with increased abundance of Prevotella. *Cell Metab*. 2015;22(6): 971–82. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.10.001>.
- Martínez I, Lattimer JM, Hubach KL, Case JA, Yang J, Weber CG, et al. Gut microbiome composition is linked to whole grain-induced immunological improvements. *ISME J*. 2013;7(2):269–80. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.104>.
- Nguyen NK, Deehan EC, Zhang Z, Jin M, Baskota N, Perez-Muñoz ME, et al. Gut microbiota modulation with long-chain corn bran arabinoxylan in adults with overweight and obesity is linked to an individualized temporal increase in fecal propionate. *Microbiome*. 2020;8(1):118. <https://doi.org/10.1186/s40168-020-00887-w>.
- Dill-McFarland KA, Tang Z-Z, Kemis JH, Kerby RL, Chen G, Palloni A, et al. Close social relationships correlate with human gut microbiota composition. *Sci Rep*. 2019;9(1):703. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37298-9>.

39. McGill CR, Fulgoni VL, Devareddy L. Ten-year trends in fiber and whole grain intakes and food sources for the United States population: National Health and Nutrition Examination Survey 2001-2010. *Nutrients*. 2015;7(2):1119–30. <https://doi.org/10.3390/nu7021119>.
40. Shan Z, Rehm CD, Rogers G, Ruan M, Wang DD, Hu FB, et al. Trends in dietary carbohydrate, protein, and fat intake and diet quality among US adults, 1999-2016. *JAMA*. 2019;322(12):1178–87. <https://doi.org/10.1001/jama.2019.13771>.
41. Kasubuchi M, Hasegawa S, Hiramatsu T, Ichimura A, Kimura I. Dietary gut microbial metabolites, short-chain fatty acids, and host metabolic regulation. *Nutrients*. 2015;7(4):2839–49. <https://doi.org/10.3390/nu7042839>.
42. McOrist AL, Miller RB, Bird AR, Keogh JB, Noakes M, Topping DL, et al. Fecal butyrate levels vary widely among individuals but are usually increased by a diet high in resistant starch. *J Nutr*. 2011;141(5):883–9. <https://doi.org/10.3945/jn.110.128504>.
43. Douglas GM, Maffei VJ, Zaneveld JR, Yurgel SN, Brown JR, Taylor CM, et al. PICRUSt2 for prediction of metagenome functions. *Nat Biotechnol*. 2020;38(6):685–8. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0548-6>.
44. Langille MGJ, Zaneveld J, Caporaso JG, McDonald D, Knights D, Reyes JA, et al. Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. *Nat Biotechnol*. 2013;31(9):814–21. <https://doi.org/10.1038/nbt.2676>.
45. Gibson GR, Hutkins R, Sanders ME, Prescott SL, Reimer RA, Salminen SJ, et al. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2017;14(8):491–502. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.75>.
46. Segata N, Izard J, Waldron L, Gevers D, Miropolsky L, Garrett WS, et al. Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biol*. 2011;12(6):R60. <https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-6-r60>.
47. Ramirez-Farias C, Slezak K, Fuller Z, Duncan A, Holtrop G, Louis P. Effect of inulin on the human gut microbiota: stimulation of *Bifidobacterium adolescentis* and *Faecalibacterium prausnitzii*. *Br J Nutr*. 2021;101:541–50.
48. Bounhik Y, Raskine L, Simoneau G, Paineau D, Bornet F. The capacity of short-chain fructo-oligosaccharides to stimulate faecal bifidobacteria: a dose-response relationship study in healthy humans. *Nutr J*. 2006;5(1). <https://doi.org/10.1186/1475-2891-5-8>.
49. Cantu-Jungles TM, Hamaker BR. New view on dietary fiber selection for predictable shifts in gut microbiota. *mBio*. 2020;11:e02179–19.
50. Venkataraman A, Sieber JR, Schmidt AW, Waldron C, Theis KR, Schmidt TM. Variable responses of human microbiomes to dietary supplementation with resistant starch. *Microbiome*. 2016;4(1):33. <https://doi.org/10.1186/s40168-016-0178-x>.
51. Sanna S, van Zuydam NR, Mahajan A, Kurilshikov A, Vich Vila A, Vösa U, et al. Causal relationships among the gut microbiome, short-chain fatty acids and metabolic diseases. *Nat Genet*. 2019;51(4):600–5. <https://doi.org/10.1038/s41588-019-0350-x>.
52. Heaver SL, Johnson EL, Ley RE. Sphingolipids in host-microbial interactions. *Curr Opin Microbiol*. 2018;43:92–9. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2017.12.011>.
53. Boini KM, Xia M, Koka S, Gehr TW, Li PL. Sphingolipids in obesity and related complications. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2017;22:96–116. <https://doi.org/10.2741/4474>.
54. Johnson EL, Heaver SL, Waters JL, Kim BI, Bretin A, Goodman AL, et al. Sphingolipids produced by gut bacteria enter host metabolic pathways impacting ceramide levels. *Nat Commun*. 2020;11(1):2471. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16274-w>.
55. DiNicolantonio JJ, McCarty MF, OKeefe JH. Role of dietary histidine in the prevention of obesity and metabolic syndrome. *Open Heart*. 2018;5(2):e000676. <https://doi.org/10.1136/openhrt-2017-000676>.
56. Molinaro A, Bel Lassen P, Henricsson M, Wu H, Adriouch S, Belda E, et al. Imidazole propionate is increased in diabetes and associated with dietary patterns and altered microbial ecology. *Nat Commun*. 2020;11(1):1–0.
57. Floyd JC, Fajans SS, Conn JW, Knopf RF, Rull J. Stimulation of insulin secretion by amino acids. *J Clin Invest*. 1966;45(9):1487–502. <https://doi.org/10.1172/JCI105456>.
58. Nishitani S, Takehana K, Fujitani S, Sonaka I. Branched-chain amino acids improve glucose metabolism in rats with liver cirrhosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2005;288(6):G1292–300. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00510.2003>.
59. Connelly MA, Wolak-Dinsmore J, Dullaart RPF. Branched chain amino acids are associated with insulin resistance independent of leptin and adiponectin in subjects with varying degrees of glucose tolerance. *Metab Syndr Relat Disord*. 2017;15(4):183–6. <https://doi.org/10.1089/met.2016.0145>.
60. Lynch CJ, Adams SH. Branched-chain amino acids in metabolic signalling and insulin resistance. *Nat Rev Endocrinol*. 2014;10(12):723–36. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2014.171>.
61. Tremblay F, Lavigne C, Jacques H, Marette A. Role of dietary proteins and amino acids in the pathogenesis of insulin resistance. *Annu Rev Nutr*. 2007;27(1):293–310. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.25.050304.092545>.
62. Elsdén SR, Hilton MG, Waller JM. The end products of the metabolism of aromatic amino acids by clostridia. *Arch Microbiol*. 1976;107(3):283–8. <https://doi.org/10.1007/BF00425340>.
63. Brial F, Le Lay A, Dumas M-E, Gauguier D. Implication of gut microbiota metabolites in cardiovascular and metabolic diseases. *Cell Mol Life Sci*. 2018;75(21):3977–90. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2901-1>.
64. de Mello VD, Paananen J, Lindström J, Lankinen MA, Shi L, Kuusisto J, et al. Indolepropionic acid and novel lipid metabolites are associated with a lower risk of type 2 diabetes in the Finnish Diabetes Prevention Study. *Sci Rep*. 2017;7(1):46337. <https://doi.org/10.1038/srep46337>.
65. Jump RLP, Polinkovsky A, Hurlless K, Sitzlar B, Eckart K, Tomas M, et al. Metabolomics analysis identifies intestinal microbiota-derived biomarkers of colonization resistance in clindamycin-treated mice. *PLoS One*. 2014;9(7):e101267. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0101267>.
66. Olson CA, Vuong HE, Yano JM, Liang QY, Nusbaum DJ, Hsiao EY. The gut microbiota mediates the anti-seizure effects of the ketogenic diet. *Cell*. 2018;173:1728–1741.e13.
67. Zhang H, Kovacs-Nolan J, Kodera T, Eto Y, Mine Y. γ -Glutamyl cysteine and γ -glutamyl valine inhibit TNF- α signaling in intestinal epithelial cells and reduce inflammation in a mouse model of colitis via allosteric activation of the calcium-sensing receptor. *Biochim Biophys Acta*. 2015;1852(5):792–804. <https://doi.org/10.1016/j.bbdis.2014.12.023>.
68. Geurts L, Lazarevic V, Derrien M, Everard A, Van Roye M, Knauf C, et al. Altered gut microbiota and endocannabinoid system tone in obese and diabetic leptin-resistant mice: impact on apelin regulation in adipose tissue. *Front Microbiol*. 2011;13:2–149.
69. Kim K-A, Gu W, Lee I-A, Joh E-H, Kim D-H. High fat diet-induced gut microbiota exacerbates inflammation and obesity in mice via the TLR4 signaling pathway. *PLoS One*. 2012;7(10):e47713. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047713>.
70. Rauschert S, Uhl O, Koletzko B, Kirchberg F, Mori TA, Huang R-C, et al. Lipidomics reveals associations of phospholipids with obesity and insulin resistance in young adults. *J Clin Endocrinol Metab*. 2016;101(3):871–9. <https://doi.org/10.1210/jc.2015-3525>.
71. Son G, Kremer M, Hines IN. Contribution of gut bacteria to liver pathobiology. *Gastroenterol Res Pract*. 2010;2010:1–13. <https://doi.org/10.1155/2010/453563>.
72. Krautkramer KA, Reiter L, Denu JM, Dowell JA. Quantification of SAHA-dependent changes in histone modifications using data-independent acquisition mass spectrometry. *J Proteome Res*. 2015;14(8):3252–62. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.5b00245>.
73. Gilep AA, Sushko TA, Usanov SA. At the crossroads of steroid hormone biosynthesis: the role, substrate specificity and evolutionary development of CYP17. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1814(1):200–9. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2010.06.021>.
74. Lindberg R, Burkhardt B, Ichikawa T. The structure and characterization of type I P-45015, gene as major steroid 15 α -hydroxylase and its comparison with type II P-4501 \sim gene. *J Biol Chem*. 1989;264(11):6465–71. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)83371-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)83371-3).
75. Singh V, Yeoh BS, Chassaing B, Xiao X, Saha P, Aguilera Olvera R, et al. Dysregulated microbial fermentation of soluble fiber induces cholestatic liver cancer. *Cell*. 2018;175:679–694.e22.
76. Turnbaugh PJ, Ridaura VK, Faith JJ, Rey FE, Knight R, Gordon JL. The effect of diet on the human gut microbiome: a metagenomic analysis in humanized gnotobiotic mice. *Sci Transl Med*. 2009;1:6ra14.
77. Smits SA, Marcobal A, Higginbottom S, Sonnenburg JL, Kashyap PC. Individualized responses of gut microbiota to dietary intervention modeled in humanized mice. *mSystems*. 2016;1:e00098–16.
78. Shikany JM, Demmer RT, Johnson AJ, Fino NF, Meyer K, Ensrud KE, et al. Association of dietary patterns with the gut microbiota in older, community-dwelling men. *Am J Clin Nutr*. 2019;110(4):1003–14. <https://doi.org/10.1093/ajcn/nqz174>.

79. David LA, Maurice CF, Carmody RN, Gootenberg DB, Button JE, Wolfe BE, et al. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature*. 2014;505(7484):559–63. <https://doi.org/10.1038/nature12820>.
80. Bailén M, Bressa C, Martínez-López S, González-Soltero R, Montalvo Lominchar MG, San Juan C, et al. Microbiota features associated with a high-fat/low-fiber diet in healthy adults. *Front Nutr*. 2020;7:583608. <https://doi.org/10.3389/fnut.2020.583608>.
81. Meddens SFW, de Vlaming R, Bowers P, et al. Genomic analysis of diet composition finds novel loci and associations with health and lifestyle. *Mol Psychiatry*. 2020. <https://doi.org/10.1038/s41380-020-0697-5>.
82. Zeevi D, Korem T, Zmora N, Israeli D, Rothschild D, Weinberger A, et al. Personalized nutrition by prediction of glycemic responses. *Cell*. 2015;163(5):1079–94. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.11.001>.
83. Rodriguez J, Hiel S, Neyrinck AM, Le Roy T, Pötgens SA, Leyrolle Q, et al. Discovery of the gut microbial signature driving the efficacy of prebiotic intervention in obese patients. *Gut*. 2020;69(11):1975–87. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2019-319726>.
84. Dao MC, Everard A, Aron-Wisniewsky J, Sokolovska N, Prifti E, Verger EO, et al. Akkermansia muciniphila and improved metabolic health during a dietary intervention in obesity: relationship with gut microbiome richness and ecology. *Gut*. 2016;65(3):426–36. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2014-3-08778>.
85. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet. *J Nutr*. 1993;123(11):1939–51. <https://doi.org/10.1093/jn/123.11.1939>.
86. Bolyen E, Rideout JR, Dillon MR, Bokulich NA, Abnet CC, Al-Ghalith GA, et al. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nat Biotechnol*. 2019;37(8):852–7. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0209-9>.
87. Herd P, Carr D, Roan C. Cohort Profile: Wisconsin Longitudinal Study (WLS). *Int J Epidemiol*. 2014;43(1):34–41. <https://doi.org/10.1093/ije/dys194>.
88. Romano KA, Dill-McFarland KA, Kasahara K, Kerby RL, Vivas EI, Amador-Noguez D, et al. Fecal aliquot straw technique (FAST) allows for easy and reproducible subsampling: assessing interpersonal variation in trimethylamine-N-oxide (TMAO) accumulation. *Microbiome*. 2018;6(1):91. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0458-8>.
89. Rector RS, Thyfault JP, Morris RT, Laye MJ, Borengasser SJ, Booth FW, et al. Daily exercise increases hepatic fatty acid oxidation and prevents steatosis in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2008;294(3):G619–26. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00428.2007>.
90. Kozich JJ, Westcott SL, Baxter NT, Highlander SK, Schloss PD. Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina sequencing platform. *Appl Environ Microbiol*. 2013;79(17):5112–20. <https://doi.org/10.1128/AEM.01043-13>.
91. Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ, Han AW, Johnson AJA, Holmes SP. DADA2: high-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat Methods*. 2016;13(7):581–3. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>.
92. Callahan BJ, McMurdie PJ, Holmes SP. Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis. *ISME J*. 2017;11(12):2639–43. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.119>.
93. McDonald D, Price MN, Goodrich J, Nawrocki EP, DeSantis TZ, Probst A, et al. An improved Greengenes taxonomy with explicit ranks for ecological and evolutionary analyses of bacteria and archaea. *ISME J*. 2012;6(3):610–8. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.139>.
94. Lozupone C, Knight R. UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities. *AEM*. 2005;71(12):8228–35. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.12.8228-8235.2005>.
95. Anderson MJ. Permutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA). *Wiley StatsRef: Statistics Reference Online*. Chichester: Wiley; 2017. p. 1–15.
96. Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. edgeR: a bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*. 2010;26(1):139–40. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp616>.
97. Robinson MD, Oshlack A. A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-seq data. *Genome Biol*. 2010;11(3):R25. <https://doi.org/10.1186/gb-2010-11-3-r25>.
98. Krautkramer KA, Kreznar JH, Romano KA, Vivas EI, Barrett-Wilt GA, Rabaglia ME, et al. Diet-microbiota interactions mediate global epigenetic programming in multiple host tissues. *Mol Cell*. 2016;64(5):982–92. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.10.025>.
99. Maile TM, Izrael-Tomasevic A, Cheung T, Guler GD, Tindell C, Masselot A, et al. Mass spectrometric quantification of histone post-translational modifications by a hybrid chemical labeling method. *Mol Cell Proteomics*. 2015;14(4):1148–58. <https://doi.org/10.1074/mcp.O114.046573>.
100. Thomas SP, Haws SA, Borth LE, Denu JM. A practical guide for analysis of histone post-translational modifications by mass spectrometry: best practices and pitfalls. *Methods*. 2020;184:53–60. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2019.12.001>.
101. Law CW, Chen Y, Shi W, Smyth GK. voom: precision weights unlock linear model analysis tools for RNA-seq read counts. *Genome Biol*. 2014;15:R29.
102. Langfelder P, Horvath S. WGCNA: an R package for weighted correlation network analysis. *BMC Bioinformatics*. 2008;9(1):559. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-559>.
103. McHardy IH, Goudarzi M, Tong M, Ruegger PM, Schwager E, Weger JR, et al. Integrative analysis of the microbiome and metabolome of the human intestinal mucosal surface reveals exquisite inter-relationships. *Microbiome*. 2013;1(1):17. <https://doi.org/10.1186/2049-2618-1-17>.
104. Tang Z-Z, Chen G, Hong Q, Huang S, Smith HM, Shah RD, et al. Multi-omic analysis of the microbiome and metabolome in healthy subjects reveals microbiome-dependent relationships between diet and metabolites. *Front Genet*. 2019;10:454. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00454>.
105. Yu G, Wang L-G, Han Y, He Q-Y. clusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters. *OMICS*. 2012;16(5):284–7. <https://doi.org/10.1089/omi.2011.0118>.
106. Lin W, Shi P, Feng R, Li H. Variable selection in regression with compositional covariates. *Biometrika*. 2014;101(4):785–97. <https://doi.org/10.1093/biomet/asu031>.
107. Meinshausen N, Bühlmann P. Stability selection: stability selection. *J R Stat Soc Series B Stat Methodol*. 2010;72:417–73.
108. Zhang J, Wei Z, Chen J. A distance-based approach for testing the mediation effect of the human microbiome. *Bioinformatics*. 2018;34(11):1875–83. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty014>.
109. Aitchison J. The statistical analysis of compositional data. *J R Stat Soc*. 1982;44:139–77.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more [biomedcentral.com/submissions](https://www.biomedcentral.com/submissions)





Article

Effects of Smoking and Smoking Cessation on the Intestinal Microbiota

Marcus G. Sublette ¹, Tzu-Wen L. Cross ², Claudia E. Korcarz ¹, Kristin M. Hansen ¹, Sofia M. Murga-Garrido ³ , Stanley L. Hazen ³, Zeneng Wang ⁴ , Madeline K. Oguss ¹, Federico E. Rey ³ and James H. Stein ^{1,*}

¹ Department of Medicine, University of Wisconsin School of Medicine and Public Health, Madison, WI 53792, USA; msublette@uwhealth.org (M.G.S.); ck4@medicine.wisc.edu (C.E.K.); khansen2@uwhealth.org (K.M.H.); mkoguss@medicine.wisc.edu (M.K.O.)

² Department of Nutrition Science, Purdue University, West Lafayette, IN 47907, USA; tlcross@purdue.edu

³ Department of Bacteriology, University of Wisconsin, Madison, WI 53706, USA; murgagarrido@wisc.edu (S.M.M.-G.); hazens@ccf.org (S.L.H.); ferey@wisc.edu (F.E.R.)

⁴ Department of Cardiovascular and Metabolic Sciences, Lerner Research Institute, Cleveland Clinic, Cleveland, OH 44195, USA; wangz2@ccf.org

* Correspondence: jhs@medicine.wisc.edu

Received: 17 July 2020; Accepted: 10 September 2020; Published: 14 September 2020



Abstract: We evaluated associations of smoking heaviness markers and the effects of smoking cessation on the intestinal microbiota and cardiovascular disease risk factors in current smokers undertaking a quit attempt. Participants were current smokers enrolled in a prospective randomized clinical trial of smoking cessation therapies with visits at baseline, 2, and 12 weeks. Genomic DNA was extracted from fecal samples followed by 16S rRNA gene sequencing and analysis using the QIIME2 software workflow. Relative abundances of bacterial taxa and alpha- and beta-diversity measures were used for comparisons. The 36 smokers were (mean (standard deviation)) 51.5 (11.1) years old (42% male) and smoked 15.1 (6.4) cigarettes per day for 22.7 (11.9) pack-years. Relative abundances of the phylum Actinobacteria correlated with pack-years ($\rho = -0.44$, $p = 0.008$) and Cyanobacteria correlated with CO levels ($\rho = 0.39$, $p = 0.021$). After 12 weeks, relative abundances of the phylum Bacteroidetes increased ($p_{\text{ANCOVA}} = 0.048$) and Firmicutes decreased ($p_{\text{ANCOVA}} = 0.036$) among abstainers compared to continuing smokers. Increases in alpha-diversity were associated with heart rates ($\rho = -0.59$, $p = 0.037$), systolic blood pressures ($\rho = -0.58$, $p = 0.043$), and C-reactive protein ($\rho = -0.60$, $p = 0.034$). Smoking cessation led to minor changes in the intestinal microbiota. It is unclear if the proven health benefits of smoking cessation lead to salutary changes in the intestinal microbiota.

Keywords: cardiovascular disease; gut flora; microbiome; smoking; smoking cessation

1. Introduction

The distal gut of humans is inhabited by dynamic and complex microbial communities that complement and influence human biology. Early studies implicated alterations in gut microbial composition and derived metabolic products in disease states such as inflammatory bowel disease, obesity, hypertension, diabetes mellitus, and rheumatologic conditions [1,2]. The gut microbiota appears to play a pathophysiologic role in atherosclerosis and cardiovascular disease, possibly through interactions with the immune system resulting in chronic systemic inflammation, by contributions to lipid metabolism, and/or through direct interactions of microbial-derived products such as trimethylamine N-oxide (TMAO) with vascular endothelium and platelets [3–7].

Dietary changes, antibiotics, and cigarette smoking, among several other factors, can modify the composition of the oral and gut microbiota [8–12]. Cigarette smoke may modulate gut microbiota

by upregulating oxidative stress-related enzymes in gut immune tissue, altering the gut mucin layer, expression of intestinal tight junction proteins, and local acid/base imbalance in the colon through direct toxic effects from the myriad compounds in tobacco smoke, or through the spread of bacteria directly from cigarettes [12,13]. In some reports the fecal microbiome of smokers resembled that of patients with inflammatory bowel disease, a disease state that increases cardiovascular disease risk [12,14]. Although there is evidence that the intestinal microbiota of smokers differs from non-smokers [14,15], it is not known whether smoking cessation changes the gut microbiota and how these changes may relate to pre-quit smoking heaviness, weight gain, and cardiovascular disease risk factors. A previous report described profound changes in the intestinal microbiota following smoking cessation; however, this was a very small study, and the observed microbiome changes were not integrated with vascular and inflammatory biomarkers [12,14,15].

In this study, we sought to address this knowledge gap by evaluating associations of smoking heaviness markers and the effects of smoking cessation on the gut microbiota and microbial metabolites in current smokers undertaking a quit attempt. We also measured cardiovascular disease risk factors and non-invasive arterial parameters that reflect arterial injury and function. In contrast with the previous published work [12,14,15], our results suggest that smoking cessation is associated with minor changes in the gut microbiome.

2. Materials and Methods

2.1. Participants

The University of Wisconsin Health Sciences Institutional Review Board approved this study on 7 December 2017 (identification number 2017–1013). This study was conducted in accordance with all university, state, and federal research regulations. All participants provided free informed consent. Participants were recruited from the ongoing Quitting Using Intensive Treatment Study (QUITS) Trial (NCT03176784) and enrolled from 19 February to 16 August 2019. The main QUITs inclusion criteria required that participants be at least 18 years old; smoke ≥ 10 cigarettes per day; not use pipe tobacco, cigars, snuff, e-cigarettes, or chewing tobacco in the preceding 30 days; and use an acceptable birth control method. Main exclusion criteria were as follows: stage 5 or greater chronic kidney disease; hospitalization for a stroke, heart attack, congestive heart failure, or uncontrolled diabetes mellitus within the past year; or alcohol/substance dependence. This sub-study also excluded individuals with factors known to affect the gut microbiota, including the use of systemic antibiotics, corticosteroids, immunomodulators, or commercial probiotics in the last 6 months, major gastrointestinal surgery in the past 5 years, and active inflammatory bowel disease or other gastrointestinal disorders.

2.2. Design

All participants received varenicline therapy (1 mg daily) and either placebo or nicotine patches (14 mg for 2 weeks pre-quit and then 10 weeks post-quit, then 7 mg patches for weeks 11 and 12 after the quit date). Smoking cessation was confirmed by 7-day self-report and verified by exhaled carbon monoxide (CO, Micro⁺™ Smokerlyzer[®] CO monitor, Bedfont Scientific Ltd., Maidstone, Kent, England) levels. Urinary cotinine levels were not measured since participants used nicotine patches. Participants' vital signs, smoking history, smoking heaviness markers (exhaled CO, cigarettes smoked per day), fasting laboratory tests, and stool samples were obtained at baseline (immediately prior to the quit attempt), 2 weeks post-quit attempt, and 12 weeks post-quit attempt. At each visit they completed a food-frequency questionnaire targeted at consumption and changes in consumption of foods that are rich in lecithin, choline and carnitine, as well as fat, sugar, and other nutritional components. Carotid-femoral pulse wave velocity (PWV) and brachial artery flow-mediated dilation (FMD) were measured at each visit. Carotid ultrasound to detect plaques was performed at the baseline visit.

2.3. Processing and Analysis of Fecal Samples

Fresh stool samples were collected by participants and kept refrigerated (4–8 °C) until delivery to the microbiology lab where an aliquot of feces was immediately stored at –80 °C until further processing. Fecal samples were kept refrigerated for an average of 3 h and 43 min between collection and storage, ranging from 40 min to 8 h and 5 min.

2.3.1. DNA Extraction

Genomic DNA was extracted from undiluted fecal aliquots using a bead-beating protocol [16]. Briefly, feces was re-suspended in a solution containing 500 µL of extraction buffer (200 mM Tris (pH 8.0), 200 mM NaCl, 20 mM EDTA), 210 µL of 20% SDS, 500 µL phenol:chloroform:isoamyl alcohol (pH 7.9, 25:24:1, Invitrogen, Carlsbad, CA), and 500 µL of 0.1 mm diameter zirconia/silica beads. Samples were mechanically disrupted using a bead beater (BioSpec Products, Barlesville, OK; maximum setting for 3 min at room temperature), followed by centrifugation, recovery of the aqueous phase, and precipitation with sodium acetate and isopropanol. QIAquick 96-well PCR Purification Kit (Qiagen, Germantown, MD, USA) was used to remove contaminants. Isolated DNA was eluted in Tris-EDTA buffer and stored at –80 °C until further use.

2.3.2. Sequencing

PCR was performed using universal primers flanking the variable 4 (V4) region of the bacterial 16S rRNA gene [16]. PCR products were purified with the QIAquick 96-well PCR Purification Kit (Qiagen, Germantown, MD, USA). Samples were quantified by Qubit Fluorometer (Invitrogen, Carlsbad, CA) and equimolar pooled. The pool was sequenced at the University of Wisconsin-Madison Biotechnology Center with the MiSeq 2x250 v2 kit (Illumina, San Diego, CA, USA). DNA extraction blanks, PCR blanks, and technical duplications for both extractions and PCRs were employed to ensure proper sample handling throughout the library preparation process.

2.3.3. Analysis

Sequences were processed using QIIME 2 pipeline (2019.1) [17]. Briefly, demultiplexed paired-end sequences were imported using Casava 1.8 format and denoised using DADA2 [18] to obtain amplicon sequence variant (ASV) table. Singletons (ASV that were observed fewer than 2 times) and ASVs that were present in less than 10% of the samples were discarded. A naive Bayes taxonomy classifier was trained on the Greengenes [19] reference database (clustered at 99% similarity). This classifier was used to assign taxonomy to ASV [20]. ASVs were then collapsed based on genus-level taxonomy. An even sampling depth (sequences per sample) of 4135 sequences per sample was used for assessing alpha- and beta-diversity measures. Pielou's evenness index [21], Faith's phylogenetic diversity (PD), and the Shannon diversity index were used to measure alpha-diversity. Beta-diversity was calculated using Bray–Curtis, Jaccard, and weighted and unweighted UniFrac metrics [22].

2.4. Measurements of Inflammatory Markers

Participants fasted overnight (≥8 h) and refrained from consuming fish or other seafood the day before venipuncture, after which plasma aliquots were isolated by centrifugation and frozen at –70 °C. Stable isotope dilution liquid chromatography with on-line tandem mass spectrometry (LC/MS/MS) was used for quantification of plasma TMAO as previously described [23]. Hemoglobin and white blood cell counts were measured at the University of Wisconsin Hospital and Clinics using standard lab techniques on Sysmex XE 2100 analyzers (Sysmex, Inc., Mundelein, IL, USA). High-sensitivity C-reactive protein was measured using an immunoturbidometric method on a Cobas 600 c501 analyzer (Roche Diagnostics, Inc., Indianapolis, IN, USA). Serum glucose, total cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol, and triglycerides were measured on the same analyzer, and low-density lipoprotein cholesterol was estimated using the Friedewald formula [24].

2.5. Arterial Measures

Carotid-femoral PWV was determined by applanation tonometry of the right carotid and femoral artery pulsations using a SphygmoCor system (AtCor Medical, Inc., Lisle, IL, USA) as described previously. Brachial artery reactivity testing for measurement of FMD was performed using the lower-arm occlusion technique, a linear array vascular ultrasound transducer (L12-3), and a Phillips Cx50 ultrasound system as described previously [25,26]. The right and left carotid arteries were imaged using a Siemens S2000 ultrasound system with a 9L4 transducer as described previously. Carotid plaques were defined as a discrete, focal wall thickening ≥ 1.5 cm or focal thickening at least 50% greater than the surrounding IMT and summed to create a score of 0–12 [25,26].

2.6. Statistical Analysis

This was a pilot designed to identify plausible associations between smoking heaviness, metabolic markers, and the composition of the intestinal microbiota and their changes 12 weeks after a quit attempt. All arterial measures were exploratory. All analyses were performed using XLStat software (Addinsoft, France) in R (R Core Team, 2014). All parameters were described by means and standard deviations. Distributions were inspected for frequent zero values and non-linearity. At baseline, Spearman's rank correlations were used to compare relative abundances of microbial taxonomy, smoking heaviness markers, cardiovascular disease risk factors, and arterial function measures. We confirmed all correlations by inspecting the scatterplots of the distributions for outliers and zero values. ANCOVA was used to compare temporal changes in intestinal microbiota abundances and diversity measures by eventual cessation group (abstainers vs. continuing smokers) and each baseline measure. Baseline and week 12 data are presented. Given the exploratory nature of our study, we estimated statistical power using the genus taxonomic level with up to 13 different categories. With a sample of size of 30 we would have 80% power to detect a rank correlation of 0.57 between the abundance metrics and outcome measures using a two-sided test for significance at a taxonomic family-wise 0.05 level; however, we did not perform formal adjustments for multiple comparisons. We anticipated that 50% of our participants would quit smoking by the 12-week visit.

3. Results

3.1. Participant Characteristics

A total of 36 smokers attended the baseline visit. They were 51.5 (11.1) years old, 58% were female, and they smoked 15.1 (6.4) cigarettes per day for 22.7 (11.9) pack-years. Their exhaled CO levels were 17.6 (9.3) ppm (Table 1). Relative abundances of bacteria at the phylum level, as well as alpha- and beta-diversity measures, are presented in Table 2. Greengenes classifier assigned usable raw reads to 11 phyla, 35 families, and 55 genera. The most abundant phyla included Firmicutes (66.9% of sequences), Bacteroidetes (20.3% of sequences), and Proteobacteria (10.3% of sequences).

3.2. Baseline Correlations between Bacterial Taxa Abundances, TMAO, Microbial Diversity Scores, and Smoking Measures

At baseline, pack-years of cigarettes smoked was correlated inversely with the relative abundance of Actinobacteria ($\rho = -0.44$, $p = 0.008$), and exhaled CO correlated positively with the relative abundance of Cyanobacteria ($\rho = 0.39$, $p = 0.021$). No significant associations between Actinobacteria or Cyanobacteria and smoking measures (pack-years, cigarettes smoked/day, exhaled CO) were identified, nor were taxa at the family or genus levels within these two phyla. The relative abundance of the Actinobacteria phylum was inversely correlated with age ($\rho = -0.44$, $p = 0.007$) and carotid artery plaque score ($\rho = -0.33$, $p = 0.049$) and directly correlated with fasting glucose ($\rho = 0.038$, $p = 0.021$). Actinobacteria and Cyanobacteria were not associated with TMAO levels, hsCRP levels, or any other cardiovascular disease risk factors or arterial measures. TMAO levels did not have significant correlations with any of the cardiovascular disease measures (carotid plaque score, PWV, brachial FMD;

data not shown). Exhaled CO levels were associated with the Firmicutes genera *Dorea* ($\rho = 0.43$ $p = 0.009$) and *Streptococcus* ($\rho = -0.47$, $p = 0.022$), otherwise none of the smoking heaviness measures was significantly associated with other diversity indexes or bacterial abundances at the phyla, family, or genera levels.

Table 1. Participant characteristics at baseline ($n = 36$).

	Mean	Standard Deviation	Range
Age (years)	51.4	11.2	26–71
Male/Females (%)	42.0/58.0	-	-
Cigarettes/day	15.1	6.4	5.1–35.0
Pack-years	22.7	12.0	2.5–52.0
Exhale Carbon monoxide (ppm)	17.6	9.3	5–41
Body-mass index (kg/m^2)	29.6	8.4	20.7–67.9
Heart rate (bpm)	72.3	10.7	57–100
Systolic blood pressure (mmHg)	131.4	16.5	102–162
Diastolic blood pressure (mmHg)	77.6	9.0	66–95
Non-high-density lipoprotein cholesterol	160.3	52.6	69–274
Glucose (mg/dL)	92.4	9.7	70–109
C-reactive protein (mg/L)	4.6	7.5	0.1–39.5
Trimethylamine N-oxide (microM)	3.75	2.11	1.11–13.18
White blood cell count ($\text{K}/\mu\text{L}$)	8.4	2.2	4.6–13.9
Carotid-femoral pulse wave velocity (m/s)	7.46	1.84	4.80–12.95
Brachial artery flow-mediated dilation (%)	4.57	2.91	0.55–12.05
Carotid plaque score (0–12)	3.0	2.8	0–10

Table 2. Baseline relative abundances of microbiota and diversity measures.

	Mean	Standard Deviation	Range
Microbiota Relative Abundances (%)			
Actinobacteria	4.17	4.37	0.0–15.90
Cyanobacteria	0.04	0.13	0.0–0.72
Verrucomicrobia	0.70	2.55	0.0–14.41
Euryarchaeota	0.10	0.24	0.0–0.96
Bacteroidetes	23.40	10.5	8.10–49.30
Firmicutes	70.20	10.0	46.10–88.70
Fusobacteria	0.011	0.44	0.0–2.52
Proteobacteria	1.26	1.02	0.0–5.70
Alpha-Diversity Measures (units)			
Pielou's evenness	0.77	0.06	0.58–0.84
Faith PD	8.32	1.68	4.78–12.11
Shannon	5.14	0.60	3.05–6.12

3.3. Effects of Smoking Cessation and Continued Smoking on Microbiota Abundances, Diversity Scores after 2 and 12 weeks

Of the 29 participants that returned for the week 2 visit, 17 had successfully quit smoking and 12 continued to smoke. We did not observe any significant between-group differences in relative abundances of bacteria or diversity measures at this early time point.

Of the 26 participants that returned for the week 12 visit, 14 successfully quit smoking and 12 continued to smoke. After 12 weeks, those who quit smoking had greater reductions in levels of exhaled CO than continuing smokers (−14.0 (10.4) vs. +2.1 (7.6) ppm, group effect $p_{\text{ANCOVA}} < 0.001$). Significant between-group differences in changes for the 12 week visit were not observed for cardiovascular disease risk factors, hsCRP, TMAO, PWV, and brachial artery FMD (data not shown). Significant between-group differences were not observed for relative abundances of Actinobacteria ($p_{\text{ANCOVA}} = 0.150$) or Cyanobacteria ($p_{\text{ANCOVA}} = 0.165$). However, relative abundances of Bacteroidetes increased ($p_{\text{ANCOVA}} = 0.048$) and Firmicutes decreased ($p_{\text{ANCOVA}} = 0.036$) among successful abstainers compared to continuing smokers (Table 3, Figure 1). Among the Firmicutes, we identified a small but statistically significant decrease in the genus *Ruminococcus* ($p_{\text{ANCOVA}} = 0.027$) and a small increase in an undefined genus within the order Closteridiales ($p = 0.043$). No other significant changes between groups were identified for relative abundances of bacteria at the phylum level.

Table 3. Effect of quit attempt on changes in bacterial abundance and diversity measures from baseline to week 12.

	Beta	Standard Error	p-Value
Microbiota Relative Abundances (%)			
Actinobacteria	1.2	0.8	0.15
Cyanobacteria	0.0	0.0	0.17
Verrucomicrobia	0.0	0.1	0.92
Euryarchaeota	0.0	0.4	0.99
Bacteroidetes	7.4	3.5	0.048
Firmicutes	−7.6	3.4	0.036
Fusobacteria	−0.1	0.1	0.53
Proteobacteria	0.3	0.6	0.67
Alpha-Diversity Measures (units)			
Pielou's evenness	−0.01	0.02	0.61
Faith PD	−0.10	0.85	0.91
Shannon	−0.13	0.23	0.59

Although changes in alpha- and beta-diversity measures over time did not differ between successful abstainers and continuing smokers, increases in alpha-diversity 12 weeks following a smoking cessation attempt were associated with lower heart rates ($\rho = -0.59$, $p = 0.037$), systolic blood pressures ($\rho = -0.58$, $p = 0.043$), and C-reactive protein levels ($\rho = -0.60$, $p = 0.034$).

At week 12, there were no significant differences in the gut microbiota between participants that received a placebo or a nicotine patch. As expected, the nicotine patch users were more successful at quitting with significantly greater reductions in CO levels at the week 12 visit ($p = 0.006$). Dietary changes in meat, poultry, fish or shellfish, eggs, dairy, fatty foods, sugary foods, fiber, and overall amount of daily food consumption were not different between successful abstainers and continuing smokers (data not shown). Among abstainers, changes in TMAO levels were associated with an increase in sugary foods intake ($r = 0.57$, $p = 0.045$) but not higher plasma levels of glucose.

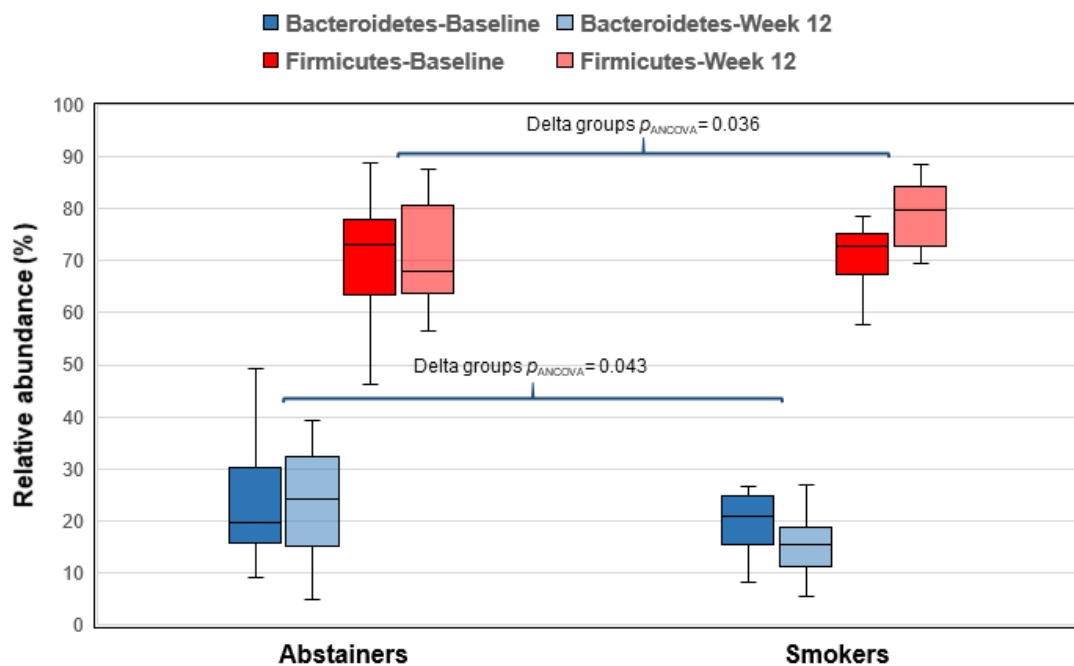


Figure 1. Changes in relative abundances of Bacteroidetes and Firmicutes from baseline to week 12 by smoking status.

4. Discussion

In this study of daily cigarette smokers, pack-years of smoking were inversely correlated with relative abundances of Actinobacteria, and exhaled CO levels were inversely correlated with the abundance of Cyanobacteria. The number of cigarettes smoked per day was not associated with any bacterial taxa at the phylum level. Relative abundances of these bacteria were not associated with plasma TMAO, cardiovascular disease risk factors, or arterial measures. After a quit attempt, successful abstainers had significantly lower exhaled CO levels, but we did not observe significant changes in TMAO levels. We also did not observe between-group differences in relative abundances of Actinobacteria or Cyanobacteria. Our primary observation was that relative abundances of Bacteroidetes increased and Firmicutes decreased in successful abstainers; however, we observed the reverse pattern in the continued smoker group, such that between-group differences in changes in the abundances of these bacteria were statistically significant. We also did not observe significant changes in alpha- or beta-diversity with smoking cessation. Overall, we observed relatively minor effects of smoking cessation on the microbiome.

An increased Bacteroidetes:Firmicutes ratio has been observed in individuals with obesity, type I diabetes mellitus, rheumatoid arthritis, and systemic lupus erythematosus. All of these disease states carry an increased risk of atherosclerotic disease [12,15,27–32]. It has been hypothesized that increases in Bacteroidetes lead to production of lipopolysaccharide which upregulates inflammatory pathways [33]; however, some strains of Bacteroidetes produce non-inflammatory lipooligosaccharide rather than lipopolysaccharide [34]. Bacteroidetes also are important producers of acetate in the gut, which is readily absorbed and can be used for cholesterol production [1,27].

Very few studies have examined the fecal microbiome of smokers after cessation. An observational study of 10 smokers suggested smoking cessation led to a decrease in the Bacteroidetes:Firmicutes ratio [15]. Our prospect study of three times as many active smokers did not confirm their findings, but it was consistent with a cross-sectional, population-based study which showed an increased Bacteroidetes:Firmicutes ratio in the fecal microbiomes of current smokers compared to never smokers and former smokers [35].

Decreases in fecal bacterial diversity have been linked to obesity, and in a small study, smoking cessation was associated with a short-term increase in alpha-diversity [15]. We did not observe

significant changes in alpha- or beta-diversity with smoking cessation, though we observed increases in alpha-diversity over time were associated with improvement in cardiovascular disease risk factors in abstainers. After a quit attempt, higher Pielou's evenness index was associated with lower heart rate, and higher Shannon diversity index was associated with lower systolic blood pressure and hsCRP.

Study Limitations

This study has some inherent limitations including a relatively small sample size, though to our knowledge this is the largest study of smoking and cessation on the fecal microbiota to date. Follow-up was only 12 weeks, and several subjects dropped out of the study, as is very common in studies of smoking cessation pharmacotherapy, so we cannot exclude a more long-term effect of smoking cessation [25,36,37]. This study was limited to current smokers making a quit attempt, so we cannot compare our findings to non-smokers. The gut microbiota is complex and susceptible to many other factors that are difficult to control in free-living individuals with inherent genetic variations. Because of this variation and the small sample size, *p*-values derived from our analyses, even when statistically significant (i.e., $p < 0.05$), no longer achieve this threshold after correction for multiple hypotheses. Our findings need to be further validated in a larger study.

5. Conclusions

Smoking cessation has minor effects on the composition of the gut microbiome. Among current smokers, relative abundances of the phylum Actinobacteria were inversely associated with pack-years of smoking, and abundance of the phylum Cyanobacteria were directly associated with CO levels. In successful abstainers, relative abundances of the phyla Bacteroidetes increased and Firmicutes decreased, a pattern of uncertain clinical significance. We did not observe significant changes in alpha- or beta-diversity with smoking cessation. It is unclear if the proven health benefits of smoking cessation lead to salutary changes in the intestinal microbiota and if such changes affect cardiovascular disease risk.

Author Contributions: Conceptualization, C.E.K., F.E.R., J.H.S.; Methodology, T.-W.L.C., C.E.K., K.M.H., S.M.M.-G.; Z.W., S.L.H.; Validation, T.-W.L.C., C.E.K., K.M.H., S.M.M.-G., J.H.S., Z.W., S.L.H., F.E.R.; Formal Analysis, T.-W.L.C., C.E.K.; Investigation, M.G.S., T.-W.L.C., C.E.K.; Resources, J.H.S., S.L.H., M.K.O., F.E.R.; Data Curation, M.G.S., T.-W.L.C., C.E.K., K.M.H.; Writing-Original Draft Preparation, M.G.S.; Writing-Review & Editing, T.-W.L.C., C.E.K., K.M.H., S.M.M.-G., J.H.S., Z.W., S.L.H., F.E.R., J.H.S.; Visualization, T.-W.L.C., C.E.K.; Project Administration, C.E.K., M.K.O.; Funding Acquisition, F.E.R., J.H.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: The QUITs study was funded by grant 2 R01 HL109031 from the National Heart, Lung, and Blood Institute. T.-W.L.C. was supported by a National Institutes of Health Ruth L. Kirschstein National Research Service Award T32 HL 007936 from the National Heart Lung and Blood Institute to the University of Wisconsin-Madison Cardiovascular Research Center. SLH and ZW were supported by grants P01HL147823 and R01HL103866 from the NIH and Office of Dietary supplements. SLH and FR were also partially supported by an award from the Leducq Foundation.

Conflicts of Interest: Stanley L. Hazen, MD, PhD: Co-inventor on pending and issued patents held by the Cleveland Clinic relating to cardiovascular diagnostics and therapeutics; royalty payments for inventions or discoveries related to cardiovascular diagnostics or therapeutics from Cleveland Heart Lab and Procter & Gamble; paid consultant for Procter & Gamble; received research funds from Procter & Gamble, Pfizer Inc., and Roche Diagnostics; Zeneng Wang, PhD: Co-inventor on pending and issued patents held by the Cleveland Clinic relating to cardiovascular diagnostics and therapeutics; royalty payments for inventions or discoveries related to cardiovascular diagnostics or therapeutics from Cleveland Heart Lab and Procter & Gamble. The rest of the authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

1. Ley, R.E. Obesity and the human microbiome. *Curr. Opin. Gastroenterol.* **2010**, *26*, 5–11. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Costea, P.I.; Hildebrand, F.; Arumugam, M.; Bäckhed, F.; Blaser, M.J.; Bushman, F.D.; De Vos, W.M.; Ehrlich, S.D.; Fraser, C.; Hattori, M.; et al. Publisher Correction: Enterotypes in the landscape of gut microbial community composition. *Nat. Microbiol.* **2018**, *3*, 388. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Wang, Z.; Klipfell, E.; Bennett, B.J.; Koeth, R.; Levison, B.; Dugar, B.; Feldstein, A.E.; Britt, E.B.; Fu, X.; Chung, Y.-M.; et al. Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease. *Nature* **2011**, *472*, 57–63. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Tang, W.H.; Wang, Z.; Levison, B.S.; Koeth, R.A.; Britt, E.B.; Fu, X.; Wu, Y.; Hazen, S.L. Intestinal microbial metabolism of phosphatidylcholine and cardiovascular risk. *N. Engl. J. Med.* **2013**, *368*, 1575–1584. [[CrossRef](#)]
5. Koeth, R.A.; Wang, Z.; Levison, B.; Buffa, J.A.; Org, E.; Sheehy, B.T.; Britt, E.B.; Fu, X.; Wu, Y.; Li, L.; et al. Intestinal microbiota metabolism of l-carnitine, a nutrient in red meat, promotes atherosclerosis. *Nat. Med.* **2013**, *19*, 576–585. [[CrossRef](#)]
6. Roberts, A.; Gu, X.; Buffa, J.A.; Hurd, A.G.; Wang, Z.; Zhu, W.; Gupta, N.; Skye, S.M.; Cody, D.B.; Levison, B.; et al. Development of a gut microbe-targeted nonlethal therapeutic to inhibit thrombosis potential. *Nat. Med.* **2018**, *24*, 1407–1417. [[CrossRef](#)]
7. Wang, Z.; Roberts, A.; Buffa, J.A.; Levison, B.; Zhu, W.; Org, E.; Gu, X.; Huang, Y.; Zamanian-Daryoush, M.; Culley, M.K.; et al. Non-lethal Inhibition of Gut Microbial Trimethylamine Production for the Treatment of Atherosclerosis. *Cell* **2015**, *163*, 1585–1595. [[CrossRef](#)]
8. Turnbaugh, P.J.; Ridaura, V.K.; Faith, J.J.; Rey, F.E.; Knight, R.; Gordon, J.I. The Effect of Diet on the Human Gut Microbiome: A Metagenomic Analysis in Humanized Gnotobiotic Mice. *Sci. Transl. Med.* **2009**, *1*, 6ra14. [[CrossRef](#)]
9. Langdon, A.; Crook, N.; Dantas, G. The effects of antibiotics on the microbiome throughout development and alternative approaches for therapeutic modulation. *Genome Med.* **2016**, *8*, 39. [[CrossRef](#)]
10. Willing, B.P.; Russell, S.L.; Finlay, B.B. Shifting the balance: Antibiotic effects on host–microbiota mutualism. *Nat. Rev. Genet.* **2011**, *9*, 233–243. [[CrossRef](#)]
11. Dill-McFarland, K.A.; Tang, Z.-Z.; Kemis, J.H.; Kerby, R.L.; Chen, G.; Palloni, A.; Sorenson, B.T.J.; Rey, F.E.; Herd, P. Close social relationships correlate with human gut microbiota composition. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 703. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Savin, Z.; Kivity, S.; Yonath, H.; Yehuda, S. Smoking and the intestinal microbiome. *Arch. Microbiol.* **2018**, *200*, 677–684. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Sapkota, A.R.; Berger, S.; Vogel, T.M. Human Pathogens Abundant in the Bacterial Metagenome of Cigarettes. *Environ. Heal. Perspect.* **2010**, *118*, 351–356. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Benjamin, J.L.; Hedin, C.R.; Koutsoumpas, A.; Ng, S.C.; McCarthy, N.E.; Prescott, N.J.; Pessoa-Lopes, P.; Mathew, C.G.; Sanderson, J.; Hart, A.L.; et al. Smokers with active Crohn’s disease have a clinically relevant dysbiosis of the gastrointestinal microbiota*. *Inflamm. Bowel Dis.* **2012**, *18*, 1092–1100. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Biedermann, L.; Zeitz, J.; Mwinyi, J.; Sutter-Minder, E.; Rehman, A.; Ott, S.J.; Steurer-Stey, C.; Frei, A.; Frei, P.; Scharl, M.; et al. Smoking Cessation Induces Profound Changes in the Composition of the Intestinal Microbiota in Humans. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e59260. [[CrossRef](#)]
16. Kreznar, J.H.; Keller, M.P.; Traeger, L.L.; Rabaglia, M.E.; Schueler, K.L.; Stapleton, D.S.; Zhao, W.; Vivas, E.I.; Yandell, B.S.; Broman, A.T.; et al. Host genotype and gut microbiome modulate insulin secretion and diet-induced metabolic phenotypes. *Cell Rep.* **2017**, *18*, 1739–1750. [[CrossRef](#)]
17. Bolyen, E.; Rideout, J.R.; Dillon, M.R.; Bokulich, N.A.; Abnet, C.C.; Al-Ghalith, G.A.; Alexander, H.; Alm, E.J.; Arumugam, M.; Asnicar, F.; et al. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nat. Biotechnol.* **2019**, *37*, 852–857. [[CrossRef](#)]
18. Callahan, B.J.; McMurdie, P.J.; Rosen, M.J.; Han, A.W.; Johnson, A.J.A.; Holmes, S. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat. Methods* **2016**, *13*, 581–583. [[CrossRef](#)]
19. McDonald, D.; Price, M.N.; Goodrich, J.; Nawrocki, E.P.; DeSantis, T.Z.; Probst, A.J.; Andersen, G.L.; Knight, R.; Hugenholtz, P. An improved Greengenes taxonomy with explicit ranks for ecological and evolutionary analyses of bacteria and archaea. *ISME J.* **2011**, *6*, 610–618. [[CrossRef](#)]

20. Bokulich, N.A.; Kaehler, B.; Rideout, J.R.; Dillon, M.; Bolyen, E.; Knight, R.; Huttley, G.; Caporaso, J.G. Optimizing taxonomic classification of marker-gene amplicon sequences with QIIME 2's q2-feature-classifier plugin. *Microbiome* **2018**, *6*, 90. [[CrossRef](#)]
21. Pielou, E. The measurement of diversity in different types of biological collections. *J. Theor. Boil.* **1966**, *13*, 131–144. [[CrossRef](#)]
22. Lozupone, C.; Knight, R. UniFrac: A New Phylogenetic Method for Comparing Microbial Communities. *Appl. Environ. Microbiol.* **2005**, *71*, 8228–8235. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Wang, Z.; Levison, B.; Hazen, J.E.; Donahue, L.; Li, X.-M.; Hazen, S.L. Measurement of trimethylamine-N-oxide by stable isotope dilution liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Anal. Biochem.* **2014**, *455*, 35–40. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Friedewald, W.T.; Levy, R.I.; Fredrickson, D.S. Estimation of the Concentration of Low-Density Lipoprotein Cholesterol in Plasma, Without Use of the Preparative Ultracentrifuge. *Clin. Chem.* **1972**, *18*, 499–502. [[CrossRef](#)]
25. Johnson, H.M.; Gossett, L.K.; Piper, M.E.; Aeschlimann, S.E.; Korcarz, C.E.; Baker, T.B.; Fiore, M.C.; Stein, J.H. Effects of smoking and smoking cessation on endothelial function: 1-year outcomes from a randomized clinical trial. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2010**, *55*, 1988–1995. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Torriani, F.J.; Komarow, L.; Parker, R.A.; Cotter, B.R.; Currier, J.S.; Dubé, M.P.; Fichtenbaum, C.J.; Gerschenson, M.; Mitchell, C.K.; Murphy, R.L.; et al. Endothelial Function in Human Immunodeficiency Virus-Infected Antiretroviral-Naive Subjects Before and After Starting Potent Antiretroviral Therapy: The actg (aids clinical trials group) study 5152s. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2008**, *52*, 569–576. [[CrossRef](#)]
27. Kasselmann, L.J.; Vernice, N.A.; DeLeon, J.; Reiss, A.B. The gut microbiome and elevated cardiovascular risk in obesity and autoimmunity. *Atherosclerosis* **2018**, *271*, 203–213. [[CrossRef](#)]
28. Battson, M.L.; Lee, D.M.; Weir, T.L.; Gentile, C.L. The gut microbiota as a novel regulator of cardiovascular function and disease. *J. Nutr. Biochem.* **2018**, *56*, 1–15. [[CrossRef](#)]
29. Ley, R.E.; Turnbaugh, P.J.; Klein, S.; Gordon, J.I. Microbial ecology: Human gut microbes associated with obesity. *Nature* **2006**, *444*, 1022–1023. [[CrossRef](#)]
30. Schwiertz, A.; Taras, D.; Schafer, K.; Beijer, S.; Bos, N.A.; Donus, C.; Hardt, P.D. Microbiota and SCFA in Lean and Overweight Healthy Subjects. *Obesity* **2010**, *18*, 190–195. [[CrossRef](#)]
31. Hevia, A.; Milani, C.; López, P.; Cuervo, A.; Arboleya, S.; Duranti, S.; Turrone, F.; González, S.; Suárez, A.; Gueimonde, M.; et al. Intestinal Dysbiosis Associated with Systemic Lupus Erythematosus. *mBio* **2014**, *5*, e01548-14. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Giongo, A.; Gano, K.A.; Crabb, D.B.; Mukherjee, N.; Novelo, L.L.; Casella, G.; Drew, J.C.; Ilonen, J.; Knip, M.; Hyöty, H.; et al. Toward defining the autoimmune microbiome for type 1 diabetes. *ISME J.* **2010**, *5*, 82–91. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Boulangé, C.L.; Neves, A.L.; Chilloux, J.; Nicholson, J.K.; Dumas, M.-E. Impact of the gut microbiota on inflammation, obesity, and metabolic disease. *Genome Med.* **2016**, *8*, 42. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Jacobson, A.N.; Choudhury, B.P.; Fischbach, M.A. The Biosynthesis of Lipooligosaccharide from *Bacteroides thetaiotaomicron*. *mBio* **2018**, *9*. [[CrossRef](#)]
35. Lee, S.H.; Yun, Y.; Kim, S.J.; Lee, E.-J.; Chang, Y.; Ryu, S.; Shin, H.; Kim, H.-L.; Kim, H.-N.; Lee, J.H. Association between Cigarette Smoking Status and Composition of Gut Microbiota: Population-Based Cross-Sectional Study. *J. Clin. Med.* **2018**, *7*, 282. [[CrossRef](#)]
36. Gonzales, D.H.; Rennard, S.I.; Nides, M.; Oncken, C.; Azoulay, S.; Billing, C.B.; Watsky, E.J.; Gong, J.; Williams, K.E.; Reeves, K.R.; et al. Varenicline, an $\alpha 4\beta 2$ Nicotinic Acetylcholine Receptor Partial Agonist, vs Sustained-Release Bupropion and Placebo for Smoking Cessation: A Randomized Controlled Trial. *JAMA* **2006**, *296*, 47. [[CrossRef](#)]
37. King, C.C.; Piper, M.E.; Gepner, A.D.; Fiore, M.C.; Baker, T.B.; Stein, J.H. Longitudinal Impact of Smoking and Smoking Cessation on Inflammatory Markers of Cardiovascular Disease Risk. *Arter. Thromb. Vasc. Biol.* **2016**, *37*, 374–379. [[CrossRef](#)]



Suplementos

Suplemento 1. Cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos (CFCA). Contiene 107 preguntas correspondientes a cada alimento agrupado en 11 secciones y con 10 opciones como respuesta que van desde nunca a 6 o más veces al día.

Suplemento 2. Código generado en Pearl para filtrar las secuencias pertenecientes al genoma humano y se separaron de las pertenecientes a los microorganismos.

Suplemento 3. Análisis taxonómico de la microbiota a través de la anotación de las lecturas de alta calidad usando el programa Kraken2 y el algoritmo de Bracken para estimar abundancia de las secuencias a nivel de género y especies.

Suplemento 4. Código generado en R para el análisis de la diversidad de la microbiota.

Suplemento 5. Código generado en R para el análisis de la diferente representación entre los factores de virulencia del microbioma perteneciente a los individuos con normopeso comparados con los que cuentan con sobrepeso y obesidad.

Suplemento 6. Código generado en R para la identificación de las asociaciones de la composición taxonómica de la microbiota con los datos antropométricos, metabólicos y las variables de dieta a través del programa MaAsLin2.

Suplemento 7. Código generado en R para la identificación de las asociaciones del perfil funcional de la microbiota con los datos antropométricos, metabólicos y las variables de dieta a través del programa MaAsLin2.

Suplemento 8. Código generado en R para la identificación de las asociaciones de los factores de virulencia identificados en la microbiota con los datos antropométricos, metabólicos y las variables de dieta a través del programa MaAsLin2.

Suplemento 9. Tabla con porcentajes de contribución de cada uno de los 27 grupos de alimentos por cada participante.

Suplemento 10. Tabla de contribución normalizados a través de z-scores de cada uno de los 27 grupos de alimentos por cada participante.

Suplemento 11. Tabla con información sobre la calidad de los ensamblados. Se obtuvieron entre 12,419 y 148,377 *contigs* con longitudes totales de entre 15,528,656 y 243,879,740 bases (promedio 132,282,896). Los valores de N50 se reportaron entre 848 y 7,940 bases. Se eliminaron los *contigs* con longitudes menores a 500 bases

Suplemento 12. Tabla de abundancia relativa de los taxa identificados con anotación taxonómica usando mOTUs

Suplemento 13. Tabla de taxa, especies y géneros, que contribuyen a la diferencia en la diversidad beta entre NP y SPOB (SIMPER).

Suplemento 14. Tabla de genes anotados (representación en KOs).

Suplemento 15. Tabla de vías sobre y sub-enriquecidas determinadas con la prueba de Fisher.

Suplemento 16. Gráfico de barras estratificado. Cada barra representa una vía (MetaCyc) que mayoritariamente explica las diferencias entre NP y SPOB determinadas por LEfSe (Linear discriminant analysis Effect Size). Los paneles muestran las estratificaciones por contribución de todas las muestras (**A & B**, n = 45).

Suplemento 17. Tabla de vías metabólicas (resumidas con MetaCyc) estratificada por las contribuciones por géneros bacterianos. Las vías se identifican por sus siglas en inglés: ARGSYN-PWY: L-arginine biosynthesis I (via L-ornithine), ARGSYNBSUB-PWY: L-arginine biosynthesis II (acetyl cycle), COA-PWY-1: coenzyme A biosynthesis II (mammalian), COA-PWY: coenzyme A biosynthesis I, GLUTORN-PWY: L-ornithine biosynthesis, PWY-4242: pantothenate and coenzyme A biosynthesis III, PWY-5686: UMP biosynthesis, PWY-6121: 5-aminoimidazole ribonucleotide biosynthesis I, PWY-6317: galactose degradation I (Leloir pathway), PWY-6527: stachyose degradation, PWY-6545: pyrimidine deoxyribonucleotides de novo biosynthesis III, PWY-7357: thiamin formation from pyrithiamine and oxythiamine (yeast), PWY-7400: L-arginine biosynthesis IV (archaeobacteria), PWY0-1296: purine ribonucleosides degradation, PWY66-422: D-galactose degradation V (Leloir pathway), ARG+POLYAMINE-SYN: superpathway of arginine and polyamine biosynthesis, NAGLIPASYN-PWY: lipid IVA biosynthesis, PWY-4041: γ-glutamyl cycle, PWY-5088: L-glutamate degradation VIII (to propanoate), PWY-5677: succinate fermentation to butanoate, PWY-5838: superpathway of menaquinol-8 biosynthesis I, PWY-5840: superpathway of menaquinol-7 biosynthesis, PWY-5845: superpathway of menaquinol-9 biosynthesis, PWY-5861: superpathway of demethylmenaquinol-8 biosynthesis, PWY-5862: superpathway of demethylmenaquinol-9 biosynthesis, PWY-5897: superpathway of menaquinol-11 biosynthesis, PWY-5898: superpathway of menaquinol-12 biosynthesis, PWY-5899: superpathway of menaquinol-13 biosynthesis.

Suplemento 18. Tabla de asociaciones entre los taxa y los datos antropométricos, parámetros metabólicos y los datos dietarios ajustados por edad y sexo.

Suplemento 19. Tabla de asociaciones entre la abundancia de las vías metabólicas (resumidas con MetaCyc) y los datos antropométricos, parámetros metabólicos y los datos dietarios ajustados por actividad física.

Suplemento 20. Anotación de los factores de virulencia en las 45 muestra.

Suplemento 21. Factores de virulencia diferencialmente representados entre los grupos de IMC.

Suplemento 22. Tabla de asociaciones entre los factores de virulencia agrupados por VFID y los datos antropométricos, parámetros metabólicos y los datos dietarios.

APARTADO II. FRECUENCIA DE CONSUMO DE ALIMENTOS



PIENSA EN QUE ALIMENTOS COMISTE EL ÚLTIMO AÑO (DIGAMOS DESDE SEMANA SANTA DEL AÑO PASADO).
¿PODRÍAS DECIR CON QUE FRECUENCIA CONSUMISTE LOS SIGUIENTES ALIMENTOS? No hay respuestas buenas o
malas, solo importa conocer lo que haces. Por favor, cualquier duda pregunta al encuestador

SECCIÓN 1.- PRODUCTOS LÁCTEOS

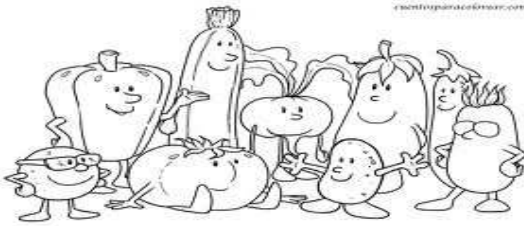


1. Un vaso de leche entera		No llenar	7. Una rebanada de Queso Amarillo		No llenar
[] Nunca (1)	[] 5-6 veces a la sem. (6)		[] Nunca (1)	[] 5-6 veces a la sem. (6)	
[] Menos de 1 vez al mes (2)	[] 1 vez al día (7)		[] Menos de 1 vez al mes (2)	[] 1 vez al día (7)	
[] 1-3 veces al mes (3)	[] 2-3 veces al día (8)		[] 1-3 veces al mes (3)	[] 2-3 veces al día (8)	
[] 1 vez a la semana (4)	[] 4-5 veces al día (9)		[] 1 vez a la semana (4)	[] 4-5 veces al día (9)	
[] 2-4 veces a la sem. (5)	[] 6 ó + veces al día (10)	[] 2-4 veces a la sem. (5)	[] 6 ó + veces al día (10)	[] 2-4 veces a la sem. (5)	[] 6 ó + veces al día (10)
2. Un vaso de leche light o descremada		No llenar	8. Una taza de yogurt		No llenar
[] Nunca (1)	[] 5-6 veces a la sem. (6)		Natural (1):		
[] Menos de 1 vez al mes (2)	[] 1 vez al día (7)		Sabor (2):		
[] 1-3 veces al mes (3)	[] 2-3 veces al día (8)		[] Nunca (1)	[] 5-6 veces a la sem. (6)	
[] 1 vez a la semana (4)	[] 4-5 veces al día (9)		[] Menos de 1 vez al mes (2)	[] 1 vez al día (7)	
[] 2-4 veces a la sem. (5)	[] 6 ó + veces al día (10)	[] 1-3 veces al mes (3)	[] 2-3 veces al día (8)		
3. Un vaso de leche con chocolate en polvo		No llenar	[] 1 vez a la semana (4)	[] 4-5 veces al día (9)	No llenar
[] Nunca (1)	[] 5-6 veces a la sem. (6)		[] 2-4 veces a la sem. (5)	[] 6 ó + veces al día (10)	
[] Menos de 1 vez al mes (2)	[] 1 vez al día (7)		9. Un Danonino o petizoo		
[] 1-3 veces al mes (3)	[] 2-3 veces al día (8)		[] Nunca (1)	[] 5-6 veces a la sem. (6)	
[] 1 vez a la semana (4)	[] 4-5 veces al día (9)		[] Menos de 1 vez al mes (2)	[] 1 vez al día (7)	
[] 2-4 veces a la sem. (5)	[] 6 ó + veces al día (10)	[] 1-3 veces al mes (3)	[] 2-3 veces al día (8)		
4. Una rebanada de Queso Oaxaca		No llenar	[] 1 vez a la semana (4)	[] 4-5 veces al día (9)	No llenar
[] Nunca (1)	[] 5-6 veces a la sem. (6)		[] 2-4 veces a la sem. (5)	[] 6 ó + veces al día (10)	
[] Menos de 1 vez al mes (2)	[] 1 vez al día (7)		10. Un Yakult o Chamyto O Lalacult u otro		
[] 1-3 veces al mes (3)	[] 2-3 veces al día (8)		[] Nunca (1)	[] 5-6 veces a la sem. (6)	
[] 1 vez a la semana (4)	[] 4-5 veces al día (9)		[] Menos de 1 vez al mes (2)	[] 1 vez al día (7)	
[] 2-4 veces a la sem. (5)	[] 6 ó + veces al día (10)	[] 1-3 veces al mes (3)	[] 2-3 veces al día (8)		
5. Una rebanada de Queso Manchego		No llenar	[] 1 vez a la semana (4)	[] 4-5 veces al día (9)	No llenar
[] Nunca (1)	[] 5-6 veces a la sem. (6)		[] 2-4 veces a la sem. (5)	[] 6 ó + veces al día (10)	
[] Menos de 1 vez al mes (2)	[] 1 vez al día (7)		11. Un Activia Flora o Actimel o Svelty Gastro Protect		
[] 1-3 veces al mes (3)	[] 2-3 veces al día (8)		[] Nunca (1)	[] 5-6 veces a la sem. (6)	
[] 1 vez a la semana (4)	[] 4-5 veces al día (9)		[] Menos de 1 vez al mes (2)	[] 1 vez al día (7)	
[] 2-4 veces a la sem. (5)	[] 6 ó + veces al día (10)	[] 1-3 veces al mes (3)	[] 2-3 veces al día (8)		
6. Una cda. de Queso crema (Philadelphia)		No llenar	[] 1 vez a la semana (4)	[] 4-5 veces al día (9)	No llenar
[] Nunca (1)	[] 5-6 veces a la sem. (6)		[] 2-4 veces a la sem. (5)	[] 6 ó + veces al día (10)	
[] Menos de 1 vez al mes (2)	[] 1 vez al día (7)		12. Una bola de helado o nieve de leche		
[] 1-3 veces al mes (3)	[] 2-3 veces al día (8)		[] Nunca (1)	[] 5-6 veces a la sem. (6)	
[] 1 vez a la semana (4)	[] 4-5 veces al día (9)		[] Menos de 1 vez al mes (2)	[] 1 vez al día (7)	
[] 2-4 veces a la sem. (5)	[] 6 ó + veces al día (10)	[] 1-3 veces al mes (3)	[] 2-3 veces al día (8)		
		[] 1 vez a la semana (4)	[] 4-5 veces al día (9)		
		[] 2-4 veces a la sem. (5)	[] 6 ó + veces al día (10)		


SECCIÓN 2.- FRUTAS

13. Un plátano		No llenar <input type="checkbox"/>	20. Un durazno o chabacano		No llenar <input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/> Nunca (1)	<input type="checkbox"/> 5-6 veces a la sem. (6)		<input type="checkbox"/> Nunca (1)	<input type="checkbox"/> 5-6 veces a la sem. (6)	
<input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2)	<input type="checkbox"/> 1 vez al día (7)	<input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2)	<input type="checkbox"/> 1 vez al día (7)		
<input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3)	<input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8)	<input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3)	<input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8)		
<input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4)	<input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9)	<input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4)	<input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9)		
<input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5)	<input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)	<input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5)	<input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)		
14. Una naranja		No llenar <input type="checkbox"/>	21. Una manzana		No llenar <input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/> Nunca (1)	<input type="checkbox"/> 5-6 veces a la sem. (6)		<input type="checkbox"/> Nunca (1)	<input type="checkbox"/> 5-6 veces a la sem. (6)	
<input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2)	<input type="checkbox"/> 1 vez al día (7)	<input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2)	<input type="checkbox"/> 1 vez al día (7)		
<input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3)	<input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8)	<input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3)	<input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8)		
<input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4)	<input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9)	<input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4)	<input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9)		
<input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5)	<input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)	<input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5)	<input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)		
15. Un vaso de jugo de naranja o toronja		No llenar <input type="checkbox"/>	22. Una pera		No llenar <input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/> Nunca (1)	<input type="checkbox"/> 5-6 veces a la sem. (6)		<input type="checkbox"/> Nunca (1)	<input type="checkbox"/> 5-6 veces a la sem. (6)	
<input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2)	<input type="checkbox"/> 1 vez al día (7)	<input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2)	<input type="checkbox"/> 1 vez al día (7)		
<input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3)	<input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8)	<input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3)	<input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8)		
<input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4)	<input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9)	<input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4)	<input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9)		
<input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5)	<input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)	<input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5)	<input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)		
16. Una rebanada de melón		No llenar <input type="checkbox"/>	23. Un mango		No llenar <input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/> Nunca (1)	<input type="checkbox"/> 5-6 veces a la sem. (6)		<input type="checkbox"/> Nunca (1)	<input type="checkbox"/> 5-6 veces a la sem. (6)	
<input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2)	<input type="checkbox"/> 1 vez al día (7)	<input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2)	<input type="checkbox"/> 1 vez al día (7)		
<input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3)	<input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8)	<input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3)	<input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8)		
<input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4)	<input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9)	<input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4)	<input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9)		
<input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5)	<input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)	<input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5)	<input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)		
17. Una rebanada sandía		No llenar <input type="checkbox"/>	24. Una mandarina		No llenar <input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/> Nunca (1)	<input type="checkbox"/> 5-6 veces a la sem. (6)		<input type="checkbox"/> Nunca (1)	<input type="checkbox"/> 5-6 veces a la sem. (6)	
<input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2)	<input type="checkbox"/> 1 vez al día (7)	<input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2)	<input type="checkbox"/> 1 vez al día (7)		
<input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3)	<input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8)	<input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3)	<input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8)		
<input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4)	<input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9)	<input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4)	<input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9)		
<input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5)	<input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)	<input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5)	<input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)		
18. Una rebanada de piña		No llenar <input type="checkbox"/>	25. Media taza de fresas		No llenar <input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/> Nunca (1)	<input type="checkbox"/> 5-6 veces a la sem. (6)		<input type="checkbox"/> Nunca (1)	<input type="checkbox"/> 5-6 veces a la sem. (6)	
<input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2)	<input type="checkbox"/> 1 vez al día (7)	<input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2)	<input type="checkbox"/> 1 vez al día (7)		
<input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3)	<input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8)	<input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3)	<input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8)		
<input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4)	<input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9)	<input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4)	<input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9)		
<input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5)	<input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)	<input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5)	<input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)		
19. Una rebanada de papaya		No llenar <input type="checkbox"/>	26. Media taza de uvas		No llenar <input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/> Nunca (1)	<input type="checkbox"/> 5-6 veces a la sem. (6)		<input type="checkbox"/> Nunca (1)	<input type="checkbox"/> 5-6 veces a la sem. (6)	
<input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2)	<input type="checkbox"/> 1 vez al día (7)	<input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2)	<input type="checkbox"/> 1 vez al día (7)		
<input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3)	<input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8)	<input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3)	<input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8)		
<input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4)	<input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9)	<input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4)	<input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9)		
<input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5)	<input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)	<input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5)	<input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)		
		No llenar <input type="checkbox"/>	27. Tres ciruelas		No llenar <input type="checkbox"/>
			<input type="checkbox"/> Nunca (1)	<input type="checkbox"/> 5-6 veces a la sem. (6)	
		<input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2)	<input type="checkbox"/> 1 vez al día (7)		
		<input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3)	<input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8)		
		<input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4)	<input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9)		
		<input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5)	<input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)		

SECCIÓN 3.- VERDURAS

28. Un jitomate		No llenar <input type="checkbox"/>	35. Un nopal		No llenar <input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/> Nunca (1)	<input type="checkbox"/> 5-6 veces a la sem. (6)		<input type="checkbox"/> Nunca (1)	<input type="checkbox"/> 5-6 veces a la sem. (6)	
<input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2)	<input type="checkbox"/> 1 vez al día (7)		<input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2)	<input type="checkbox"/> 1 vez al día (7)	
<input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3)	<input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8)		<input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3)	<input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8)	
<input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4)	<input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9)		<input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4)	<input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9)	
<input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5)	<input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)	<input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5)	<input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)		
29. Una papa		No llenar <input type="checkbox"/>	36. Medio aguacate		No llenar <input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/> Nunca (1)	<input type="checkbox"/> 5-6 veces a la sem. (6)		<input type="checkbox"/> Nunca (1)	<input type="checkbox"/> 5-6 veces a la sem. (6)	
<input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2)	<input type="checkbox"/> 1 vez al día (7)		<input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2)	<input type="checkbox"/> 1 vez al día (7)	
<input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3)	<input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8)		<input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3)	<input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8)	
<input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4)	<input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9)		<input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4)	<input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9)	
<input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5)	<input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)	<input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5)	<input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)		
30. Una jícama		No llenar <input type="checkbox"/>	37. Una taza de brócoli		No llenar <input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/> Nunca (1)	<input type="checkbox"/> 5-6 veces a la sem. (6)		<input type="checkbox"/> Nunca (1)	<input type="checkbox"/> 5-6 veces a la sem. (6)	
<input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2)	<input type="checkbox"/> 1 vez al día (7)		<input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2)	<input type="checkbox"/> 1 vez al día (7)	
<input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3)	<input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8)		<input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3)	<input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8)	
<input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4)	<input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9)		<input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4)	<input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9)	
<input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5)	<input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)	<input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5)	<input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)		
31. Un Pepino		No llenar <input type="checkbox"/>	38. Una cda. de salsa picante o chiles con tus alimentos		No llenar <input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/> Nunca (1)	<input type="checkbox"/> 5-6 veces a la sem. (6)		<input type="checkbox"/> Nunca (1)	<input type="checkbox"/> 5-6 veces a la sem. (6)	
<input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2)	<input type="checkbox"/> 1 vez al día (7)		<input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2)	<input type="checkbox"/> 1 vez al día (7)	
<input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3)	<input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8)		<input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3)	<input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8)	
<input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4)	<input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9)		<input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4)	<input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9)	
<input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5)	<input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)	<input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5)	<input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)		
32. Una zanahoria		No llenar <input type="checkbox"/>	39. Chiles de lata		No llenar <input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/> Nunca (1)	<input type="checkbox"/> 5-6 veces a la sem. (6)		<input type="checkbox"/> Nunca (1)	<input type="checkbox"/> 5-6 veces a la sem. (6)	
<input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2)	<input type="checkbox"/> 1 vez al día (7)		<input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2)	<input type="checkbox"/> 1 vez al día (7)	
<input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3)	<input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8)		<input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3)	<input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8)	
<input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4)	<input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9)		<input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4)	<input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9)	
<input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5)	<input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)	<input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5)	<input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)		
33. Una hoja de lechuga		No llenar <input type="checkbox"/>	40. Un Elote		No llenar <input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/> Nunca (1)	<input type="checkbox"/> 5-6 veces a la sem. (6)		<input type="checkbox"/> Nunca (1)	<input type="checkbox"/> 5-6 veces a la sem. (6)	
<input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2)	<input type="checkbox"/> 1 vez al día (7)		<input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2)	<input type="checkbox"/> 1 vez al día (7)	
<input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3)	<input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8)		<input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3)	<input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8)	
<input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4)	<input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9)		<input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4)	<input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9)	
<input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5)	<input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)	<input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5)	<input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)		
34. Una taza de calabacitas o chayotes		No llenar <input type="checkbox"/>			
<input type="checkbox"/> Nunca (1)	<input type="checkbox"/> 5-6 veces a la sem. (6)				
<input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2)	<input type="checkbox"/> 1 vez al día (7)				
<input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3)	<input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8)				
<input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4)	<input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9)				
<input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5)	<input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)				

SECCIÓN 4.- LEGUMINOSAS

41. Un plato de frijoles		No llenar	43. Un plato de lentejas		No llenar
<input type="checkbox"/> Nunca (1)	<input type="checkbox"/> 5-6 veces a la sem. (6)		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Nunca (1)	
<input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2)	<input type="checkbox"/> 1 vez al día (7)	<input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2)		<input type="checkbox"/> 1 vez al día (7)	
<input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3)	<input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8)	<input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3)		<input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8)	
<input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4)	<input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9)	<input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4)		<input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9)	
<input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5)	<input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)	<input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5)		<input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)	
42. 1/2 taza de chícharos		No llenar			
<input type="checkbox"/> Nunca (1)	<input type="checkbox"/> 5-6 veces a la sem. (6)				
<input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2)	<input type="checkbox"/> 1 vez al día (7)				
<input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3)	<input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8)				
<input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4)	<input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9)				
<input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5)	<input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)				



SECCIÓN 5.- HUEVOS, CARNES Y EMBUTIDOS.

44. Un huevo		No llenar	46. Una pieza de pollo		No llenar
<input type="checkbox"/> Nunca (1)	<input type="checkbox"/> 5-6 veces a la sem. (6)		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Nunca (1)	
<input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2)	<input type="checkbox"/> 1 vez al día (7)	<input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2)		<input type="checkbox"/> 1 vez al día (7)	
<input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3)	<input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8)	<input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3)		<input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8)	
<input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4)	<input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9)	<input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4)		<input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9)	
<input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5)	<input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)	<input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5)		<input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)	
45. Una rebanada de jamón		No llenar	47. Platillo de carne de res		No llenar
Pavo (1):			<input type="checkbox"/> Nunca (1)	<input type="checkbox"/> 5-6 veces a la sem. (6)	
Cerdo (2):		<input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2)	<input type="checkbox"/> 1 vez al día (7)		
<input type="checkbox"/> Nunca (1)	<input type="checkbox"/> 5-6 veces a la sem. (6)	<input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3)	<input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8)		
<input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2)	<input type="checkbox"/> 1 vez al día (7)	<input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4)	<input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9)		
<input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3)	<input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8)	<input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5)	<input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)		
<input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4)	<input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9)				
<input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5)	<input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)				

48. Platillo de carne de cerdo		No llenar <input type="checkbox"/>	53. Un bistec de hígado		No
[] Nunca (1) [] 5-6 veces a la sem. (6)			Res (1):		
[] Menos de 1 vez al mes (2) [] 1 vez al día (7)			Pollo (2):		
[] 1-3 veces al mes (3) [] 2-3 veces al día (8)			[] Nunca (1) [] 5-6 veces a la sem. (6)		
[] 1 vez a la semana (4) [] 4-5 veces al día (9)			[] Menos de 1 vez al mes (2) [] 1 vez al día (7)		
[] 2-4 veces a la sem. (5) [] 6 ó + veces al día (10)		[] 1-3 veces al mes (3) [] 2-3 veces al día (8)		<input type="checkbox"/>	
		[] 1 vez a la semana (4) [] 4-5 veces al día (9)			
		[] 2-4 veces a la sem. (5) [] 6 ó + veces al día (10)		llenar <input type="checkbox"/>	
49. Media lata de atún en aceite o agua		No llenar <input type="checkbox"/>	54. Una pieza de chorizo o longaniza		
[] Nunca (1) [] 5-6 veces a la sem. (6)			[] Nunca (1) [] 5-6 veces a la sem. (6)		
[] Menos de 1 vez al mes (2) [] 1 vez al día (7)			[] Menos de 1 vez al mes (2) [] 1 vez al día (7)		
[] 1-3 veces al mes (3) [] 2-3 veces al día (8)			[] 1-3 veces al mes (3) [] 2-3 veces al día (8)		
[] 1 vez a la semana (4) [] 4-5 veces al día (9)			[] 1 vez a la semana (4) [] 4-5 veces al día (9)		
[] 2-4 veces a la sem. (5) [] 6 ó + veces al día (10)		[] 2-4 veces a la sem. (5) [] 6 ó + veces al día (10)		No llenar <input type="checkbox"/>	
50. Un pedazo de chicharrón		No llenar <input type="checkbox"/>	55. Un filete de pescado		
[] Nunca (1) [] 5-6 veces a la sem. (6)			[] Nunca (1) [] 5-6 veces a la sem. (6)		
[] Menos de 1 vez al mes (2) [] 1 vez al día (7)			[] Menos de 1 vez al mes (2) [] 1 vez al día (7)		
[] 1-3 veces al mes (3) [] 2-3 veces al día (8)			[] 1-3 veces al mes (3) [] 2-3 veces al día (8)		
[] 1 vez a la semana (4) [] 4-5 veces al día (9)			[] 1 vez a la semana (4) [] 4-5 veces al día (9)		
[] 2-4 veces a la sem. (5) [] 6 ó + veces al día (10)		[] 2-4 veces a la sem. (5) [] 6 ó + veces al día (10)		No llenar <input type="checkbox"/>	
51. Una salchicha		No llenar <input type="checkbox"/>	56. Una sardinas enlatada		
Pavo (1):			[] Nunca (1) [] 5-6 veces a la sem. (6)		
Cerdo (2):			[] Menos de 1 vez al mes (2) [] 1 vez al día (7)		
[] Nunca (1) [] 5-6 veces a la sem. (6)			[] 1-3 veces al mes (3) [] 2-3 veces al día (8)		
[] Menos de 1 vez al mes (2) [] 1 vez al día (7)			[] 1 vez a la semana (4) [] 4-5 veces al día (9)		
[] 1-3 veces al mes (3) [] 2-3 veces al día (8)		[] 2-4 veces a la sem. (5) [] 6 ó + veces al día (10)		No llenar <input type="checkbox"/>	
[] 1 vez a la semana (4) [] 4-5 veces al día (9)					
[] 2-4 veces a la sem. (5) [] 6 ó + veces al día (10)					
52. Una rebanas de tocino		No llenar <input type="checkbox"/>			
[] Nunca (1) [] 5-6 veces a la sem. (6)					
[] Menos de 1 vez al mes (2) [] 1 vez al día (7)					
[] 1-3 veces al mes (3) [] 2-3 veces al día (8)					
[] 1 vez a la semana (4) [] 4-5 veces al día (9)					
[] 2-4 veces a la sem. (5) [] 6 ó + veces al día (10)					



SECCIÓN 6.- PLATILLOS TÍPICOS



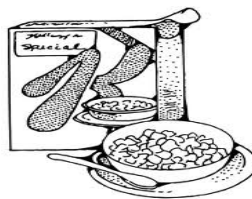
57. Un Taco de Carnitas		No llenar	64. Un hot dog		No llenar
[] Nunca (1)	[] 5-6 veces a la sem. (6)		[] Nunca (1)	[] 5-6 veces a la sem. (6)	
[] Menos de 1 vez al mes (2)	[] 1 vez al día (7)	[] Menos de 1 vez al mes (2)	[] 1 vez al día (7)		
[] 1-3 veces al mes (3)	[] 2-3 veces al día (8)	[] 1-3 veces al mes (3)	[] 2-3 veces al día (8)		
[] 1 vez a la semana (4)	[] 4-5 veces al día (9)	[] 1 vez a la semana (4)	[] 4-5 veces al día (9)		
[] 2-4 veces a la sem. (5)	[] 6 ó + veces al día (10)	[] 2-4 veces a la sem. (5)	[] 6 ó + veces al día (10)		
58. Un Taco de Barbacoa		No llenar	65. Un sandwich		No llenar
[] Nunca (1)	[] 5-6 veces a la sem. (6)		[] Nunca (1)	[] 5-6 veces a la sem. (6)	
[] Menos de 1 vez al mes (2)	[] 1 vez al día (7)	[] Menos de 1 vez al mes (2)	[] 1 vez al día (7)		
[] 1-3 veces al mes (3)	[] 2-3 veces al día (8)	[] 1-3 veces al mes (3)	[] 2-3 veces al día (8)		
[] 1 vez a la semana (4)	[] 4-5 veces al día (9)	[] 1 vez a la semana (4)	[] 4-5 veces al día (9)		
[] 2-4 veces a la sem. (5)	[] 6 ó + veces al día (10)	[] 2-4 veces a la sem. (5)	[] 6 ó + veces al día (10)		
59. Un taco al pastor		No llenar	66. Una torta		No llenar
[] Nunca (1)	[] 5-6 veces a la sem. (6)		[] Nunca (1)	[] 5-6 veces a la sem. (6)	
[] Menos de 1 vez al mes (2)	[] 1 vez al día (7)	[] Menos de 1 vez al mes (2)	[] 1 vez al día (7)		
[] 1-3 veces al mes (3)	[] 2-3 veces al día (8)	[] 1-3 veces al mes (3)	[] 2-3 veces al día (8)		
[] 1 vez a la semana (4)	[] 4-5 veces al día (9)	[] 1 vez a la semana (4)	[] 4-5 veces al día (9)		
[] 2-4 veces a la sem. (5)	[] 6 ó + veces al día (10)	[] 2-4 veces a la sem. (5)	[] 6 ó + veces al día (10)		
60. Un sope, quesadilla o gordita asada		No llenar	67. Una rebanada de pizza		No llenar
[] Nunca (1)	[] 5-6 veces a la sem. (6)		[] Nunca (1)	[] 5-6 veces a la sem. (6)	
[] Menos de 1 vez al mes (2)	[] 1 vez al día (7)	[] Menos de 1 vez al mes (2)	[] 1 vez al día (7)		
[] 1-3 veces al mes (3)	[] 2-3 veces al día (8)	[] 1-3 veces al mes (3)	[] 2-3 veces al día (8)		
[] 1 vez a la semana (4)	[] 4-5 veces al día (9)	[] 1 vez a la semana (4)	[] 4-5 veces al día (9)		
[] 2-4 veces a la sem. (5)	[] 6 ó + veces al día (10)	[] 2-4 veces a la sem. (5)	[] 6 ó + veces al día (10)		
61. Un sope, quesadilla o gordita frita		No llenar	68. Nuggets (3 piezas)		No llenar
[] Nunca (1)	[] 5-6 veces a la sem. (6)		[] Nunca (1)	[] 5-6 veces a la sem. (6)	
[] Menos de 1 vez al mes (2)	[] 1 vez al día (7)	[] Menos de 1 vez al mes (2)	[] 1 vez al día (7)		
[] 1-3 veces al mes (3)	[] 2-3 veces al día (8)	[] 1-3 veces al mes (3)	[] 2-3 veces al día (8)		
[] 1 vez a la semana (4)	[] 4-5 veces al día (9)	[] 1 vez a la semana (4)	[] 4-5 veces al día (9)		
[] 2-4 veces a la sem. (5)	[] 6 ó + veces al día (10)	[] 2-4 veces a la sem. (5)	[] 6 ó + veces al día (10)		
62. Un plato mediano de papas a la francesa		No llenar	69. Un tamal		No llenar
[] Nunca (1)	[] 5-6 veces a la sem. (6)		[] Nunca (1)	[] 5-6 veces a la sem. (6)	
[] Menos de 1 vez al mes (2)	[] 1 vez al día (7)	[] Menos de 1 vez al mes (2)	[] 1 vez al día (7)		
[] 1-3 veces al mes (3)	[] 2-3 veces al día (8)	[] 1-3 veces al mes (3)	[] 2-3 veces al día (8)		
[] 1 vez a la semana (4)	[] 4-5 veces al día (9)	[] 1 vez a la semana (4)	[] 4-5 veces al día (9)		
[] 2-4 veces a la sem. (5)	[] 6 ó + veces al día (10)	[] 2-4 veces a la sem. (5)	[] 6 ó + veces al día (10)		
63. Una hamburguesa mediana		No llenar	70. Un plato de pozole		No llenar
[] Nunca (1)	[] 5-6 veces a la sem. (6)		[] Nunca (1)	[] 5-6 veces a la sem. (6)	
[] Menos de 1 vez al mes (2)	[] 1 vez al día (7)	[] Menos de 1 vez al mes (2)	[] 1 vez al día (7)		
[] 1-3 veces al mes (3)	[] 2-3 veces al día (8)	[] 1-3 veces al mes (3)	[] 2-3 veces al día (8)		
[] 1 vez a la semana (4)	[] 4-5 veces al día (9)	[] 1 vez a la semana (4)	[] 4-5 veces al día (9)		
[] 2-4 veces a la sem. (5)	[] 6 ó + veces al día (10)	[] 2-4 veces a la sem. (5)	[] 6 ó + veces al día (10)		

SECCIÓN 7.- CEREALES



71. Una tortilla de maíz (que no sea en taco, ni quesadillas)		No llenar <input type="checkbox"/>	78. Un plato de sopa		No llenar <input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/> Nunca (1) <input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2) <input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3) <input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4) <input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5)	<input type="checkbox"/> 5-6 veces a la sem. (6) <input type="checkbox"/> 1 vez al día (7) <input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8) <input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9) <input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)		<input type="checkbox"/> Nunca (1) <input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2) <input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3) <input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4) <input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5)	<input type="checkbox"/> 5-6 veces a la sem. (6) <input type="checkbox"/> 1 vez al día (7) <input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8) <input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9) <input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)	
72. Una tortilla de harina (que no sea en taco ni quesadillas)		No llenar <input type="checkbox"/>	79. Un plato de pasta seca (espagueti)		No llenar <input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/> Nunca (1) <input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2) <input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3) <input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4) <input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5)	<input type="checkbox"/> 5-6 veces a la sem. (6) <input type="checkbox"/> 1 vez al día (7) <input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8) <input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9) <input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)		<input type="checkbox"/> Nunca (1) <input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2) <input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3) <input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4) <input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5)	<input type="checkbox"/> 5-6 veces a la sem. (6) <input type="checkbox"/> 1 vez al día (7) <input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8) <input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9) <input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)	
73. Una rebanada de pan de caja (tipo Pan Blanco Bimbo)		No llenar <input type="checkbox"/>	80. Una taza de avena		No llenar <input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/> Nunca (1) <input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2) <input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3) <input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4) <input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5)	<input type="checkbox"/> 5-6 veces a la sem. (6) <input type="checkbox"/> 1 vez al día (7) <input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8) <input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9) <input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)		<input type="checkbox"/> Nunca (1) <input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2) <input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3) <input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4) <input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5)	<input type="checkbox"/> 5-6 veces a la sem. (6) <input type="checkbox"/> 1 vez al día (7) <input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8) <input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9) <input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)	
74. Una rebanada de pan de caja integral (tipo Bimbo Integral)		No llenar <input type="checkbox"/>	81. Un plato de cereal sin azúcar (corn- flakes, cheerios, etc.)		No llenar <input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/> Nunca (1) <input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2) <input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3) <input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4) <input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5)	<input type="checkbox"/> 5-6 veces a la sem. (6) <input type="checkbox"/> 1 vez al día (7) <input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8) <input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9) <input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)		<input type="checkbox"/> Nunca (1) <input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2) <input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3) <input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4) <input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5)	<input type="checkbox"/> 5-6 veces a la sem. (6) <input type="checkbox"/> 1 vez al día (7) <input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8) <input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9) <input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)	
75. Un bolillo o telera (que no sea torta)		No llenar <input type="checkbox"/>	82. Un plato de cereal dulce (zucaritas)		No llenar <input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/> Nunca (1) <input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2) <input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3) <input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4) <input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5)	<input type="checkbox"/> 5-6 veces a la sem. (6) <input type="checkbox"/> 1 vez al día (7) <input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8) <input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9) <input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)		<input type="checkbox"/> Nunca (1) <input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2) <input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3) <input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4) <input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5)	<input type="checkbox"/> 5-6 veces a la sem. (6) <input type="checkbox"/> 1 vez al día (7) <input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8) <input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9) <input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)	
76. Una pieza de pan dulce (concha, dona)		No llenar <input type="checkbox"/>	83. Un plato de Cereal con fibra (All Bran, granola, etc.)		No llenar <input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/> Nunca (1) <input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2) <input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3) <input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4) <input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5)	<input type="checkbox"/> 5-6 veces a la sem. (6) <input type="checkbox"/> 1 vez al día (7) <input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8) <input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9) <input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)		<input type="checkbox"/> Nunca (1) <input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2) <input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3) <input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4) <input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5)	<input type="checkbox"/> 5-6 veces a la sem. (6) <input type="checkbox"/> 1 vez al día (7) <input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8) <input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9) <input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)	
77. Un plato de arroz		No llenar <input type="checkbox"/>	84. Una pieza de hot cake o pan francés		No llenar <input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/> Nunca (1) <input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2) <input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3) <input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4) <input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5)	<input type="checkbox"/> 5-6 veces a la sem. (6) <input type="checkbox"/> 1 vez al día (7) <input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8) <input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9) <input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)		<input type="checkbox"/> Nunca (1) <input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2) <input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3) <input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4) <input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5)	<input type="checkbox"/> 5-6 veces a la sem. (6) <input type="checkbox"/> 1 vez al día (7) <input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8) <input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9) <input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)	

85. Un paquete de Galletas Ritz u otras saladas		No llenar
<input type="checkbox"/> Nunca (1)	<input type="checkbox"/> 5-6 veces a la sem. (6)	
<input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2)	<input type="checkbox"/> 1 vez al día (7)	
<input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3)	<input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8)	
<input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4)	<input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9)	
<input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5)	<input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)	



SECCIÓN 8.- BEBIDAS

86. Un refresco de cola en lata (Coca-Cola, Pepsi Cola)		No llenar	90. Un vaso de agua de sabor azucarada hecha con Tang, Kool-aid, etc		No llenar
<input type="checkbox"/> Nunca (1)	<input type="checkbox"/> 5-6 veces a la sem. (6)		<input type="checkbox"/> Nunca (1)	<input type="checkbox"/> 5-6 veces a la sem. (6)	
<input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2)	<input type="checkbox"/> 1 vez al día (7)		<input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2)	<input type="checkbox"/> 1 vez al día (7)	
<input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3)	<input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8)		<input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3)	<input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8)	
<input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4)	<input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9)		<input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4)	<input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9)	
<input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5)	<input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)		<input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5)	<input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)	
87. Un refresco de sabor en lata (que no sea Coca o Pepsi)		No llenar	91. Un vaso de malteada		No llenar
<input type="checkbox"/> Nunca (1)	<input type="checkbox"/> 5-6 veces a la sem. (6)		<input type="checkbox"/> Nunca (1)	<input type="checkbox"/> 5-6 veces a la sem. (6)	
<input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2)	<input type="checkbox"/> 1 vez al día (7)		<input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2)	<input type="checkbox"/> 1 vez al día (7)	
<input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3)	<input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8)		<input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3)	<input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8)	
<input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4)	<input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9)		<input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4)	<input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9)	
<input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5)	<input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)		<input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5)	<input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)	
88. Un vaso de agua Simple o natural		No llenar	92. Un jugos industrializados (Boing, Frutsi, etc)		No llenar
<input type="checkbox"/> Nunca (1)	<input type="checkbox"/> 5-6 veces a la sem. (6)		<input type="checkbox"/> Nunca (1)	<input type="checkbox"/> 5-6 veces a la sem. (6)	
<input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2)	<input type="checkbox"/> 1 vez al día (7)		<input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2)	<input type="checkbox"/> 1 vez al día (7)	
<input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3)	<input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8)		<input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3)	<input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8)	
<input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4)	<input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9)		<input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4)	<input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9)	
<input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5)	<input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)		<input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5)	<input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)	
89. Un vaso de Agua frutas naturales (agua de naranja)		No llenar	93. Una botella de bebida hidratante (Gatorade, Powerade, Enerplex)		No llenar
<input type="checkbox"/> Nunca (1)	<input type="checkbox"/> 5-6 veces a la sem. (6)		<input type="checkbox"/> Nunca (1)	<input type="checkbox"/> 5-6 veces a la sem. (6)	
<input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2)	<input type="checkbox"/> 1 vez al día (7)		<input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2)	<input type="checkbox"/> 1 vez al día (7)	
<input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3)	<input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8)		<input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3)	<input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8)	
<input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4)	<input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9)		<input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4)	<input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9)	
<input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5)	<input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)		<input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5)	<input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)	



sección 9.- GOLOSINAS Y POSTRES

94. Una rebanada de pastel		No llenar <input type="checkbox"/>	99. Un pastelito con relleno cremoso (Gansito, Submarinos, Pingüinos, etc.)		No llenar <input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/> Nunca (1)	<input type="checkbox"/> 5-6 veces a la sem. (6)		<input type="checkbox"/> Nunca (1)	<input type="checkbox"/> 5-6 veces a la sem. (6)	
<input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2)	<input type="checkbox"/> 1 vez al día (7)	<input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2)	<input type="checkbox"/> 1 vez al día (7)		
<input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3)	<input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8)	<input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3)	<input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8)		
<input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4)	<input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9)	<input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4)	<input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9)		
<input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5)	<input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)	<input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5)	<input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)		
95. Una cda. ate, miel, mermelada, cajeta o leche condensada		No llenar <input type="checkbox"/>	100. Un paquete de Galletas (Lors, Chokis, Barritas, Canelitas, ect.)		No llenar <input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/> Nunca (1)	<input type="checkbox"/> 5-6 veces a la sem. (6)		<input type="checkbox"/> Nunca (1)	<input type="checkbox"/> 5-6 veces a la sem. (6)	
<input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2)	<input type="checkbox"/> 1 vez al día (7)	<input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2)	<input type="checkbox"/> 1 vez al día (7)		
<input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3)	<input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8)	<input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3)	<input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8)		
<input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4)	<input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9)	<input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4)	<input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9)		
<input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5)	<input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)	<input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5)	<input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)		
96. Una barra de chocolate (Carlos V, Hershey, Tin Larín, etc)		No llenar <input type="checkbox"/>	101. Un paquete de Palomitas de maiz		No llenar <input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/> Nunca (1)	<input type="checkbox"/> 5-6 veces a la sem. (6)		<input type="checkbox"/> Nunca (1)	<input type="checkbox"/> 5-6 veces a la sem. (6)	
<input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2)	<input type="checkbox"/> 1 vez al día (7)	<input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2)	<input type="checkbox"/> 1 vez al día (7)		
<input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3)	<input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8)	<input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3)	<input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8)		
<input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4)	<input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9)	<input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4)	<input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9)		
<input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5)	<input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)	<input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5)	<input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)		
97. Una bolsa chica cacahuates (salados, japoneses o enchilados)		No llenar <input type="checkbox"/>	102. Un dulce chico de chamoy, Lucas acidito o paleta enchilada		No llenar <input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/> Nunca (1)	<input type="checkbox"/> 5-6 veces a la sem. (6)		<input type="checkbox"/> Nunca (1)	<input type="checkbox"/> 5-6 veces a la sem. (6)	
<input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2)	<input type="checkbox"/> 1 vez al día (7)	<input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2)	<input type="checkbox"/> 1 vez al día (7)		
<input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3)	<input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8)	<input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3)	<input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8)		
<input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4)	<input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9)	<input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4)	<input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9)		
<input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5)	<input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)	<input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5)	<input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)		
98. Una bolsa chica de frituras (de la calle, sabritas, doritos, fritos, cheetos, sabritones, etc.)		No llenar <input type="checkbox"/>	103. Una Barra de cereal		No llenar <input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/> Nunca (1)	<input type="checkbox"/> 5-6 veces a la sem. (6)		Azúcar (1):		
<input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2)	<input type="checkbox"/> 1 vez al día (7)	Sin azúcar (2):			
<input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3)	<input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8)	<input type="checkbox"/> Nunca (1)	<input type="checkbox"/> 5-6 veces a la sem. (6)		
<input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4)	<input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9)	<input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2)	<input type="checkbox"/> 1 vez al día (7)		
<input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5)	<input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)	<input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3)	<input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8)		
		<input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4)	<input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9)		
		<input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5)	<input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)		



SECCIÓN 10 .- GRASAS

104. Una cucharadita de mantequilla o margarina (añadida a tus alimentos)		No llenar <input type="checkbox"/>	106. Una cucharada de mayonesa (añadida a tus alimentos)		No llenar <input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/> Nunca (1)	<input type="checkbox"/> 5-6 veces a la sem. (6)		<input type="checkbox"/> Nunca (1)	<input type="checkbox"/> 5-6 veces a la sem. (6)	
<input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2)	<input type="checkbox"/> 1 vez al día (7)		<input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2)	<input type="checkbox"/> 1 vez al día (7)	
<input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3)	<input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8)		<input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3)	<input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8)	
<input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4)	<input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9)		<input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4)	<input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9)	
<input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5)	<input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)		<input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5)	<input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)	
105. Una cucharada de aderezo para ensalada (añadida a tus alimentos)		No llenar <input type="checkbox"/>			
<input type="checkbox"/> Nunca (1)	<input type="checkbox"/> 5-6 veces a la sem. (6)				
<input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2)	<input type="checkbox"/> 1 vez al día (7)				
<input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3)	<input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8)				
<input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4)	<input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9)				
<input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5)	<input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)				

SECCIÓN 11 .- SUPLEMENTOS

107. ¿Consumes alguna vitamina o suplemento alimenticio?		No llenar <input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/> Nunca (1)	<input type="checkbox"/> 5-6 veces a la sem. (6)	
<input type="checkbox"/> Menos de 1 vez al mes (2)	<input type="checkbox"/> 1 vez al día (7)	
<input type="checkbox"/> 1-3 veces al mes (3)	<input type="checkbox"/> 2-3 veces al día (8)	
<input type="checkbox"/> 1 vez a la semana (4)	<input type="checkbox"/> 4-5 veces al día (9)	
<input type="checkbox"/> 2-4 veces a la sem. (5)	<input type="checkbox"/> 6 ó + veces al día (10)	

Suplemento 2. Código

```
#!/usr/bin/perl

use strict;
use warnings;

# PURPOSE:
# Takes a sam file, generates a list of all reads in it, grabs those reads
from fastq file.

# Example of why would want to use this:
# Map metagenome reads -> mouse genome
# Samtools view to grab only sam file entries that DO NOT map to
mouse genome
# now go into fastq and grab only the reads that don't map to the
mouse genome.

# usage:
# ./samtools-1.3/bin/samtools view mappedreads.sam | perl
./make_fastq_fromSAM_3.pl original.1.fq original.2.fq
unmapped.1.fq unmapped.2.fq

# WARNING!!!:
# The name of the sequence read is HARDWIRED in this script and is
different run for run. YOU NEED TO CHANGE THIS EACH TIME!!
# see line: if ($line =~ /\^@D00.*/) {

#my $sam = <STDIN>;
my $fastq1 = $ARGV[0];
my $fastq2 = $ARGV[1];
my $out1 = $ARGV[2];
my $out2 = $ARGV[3];

open (OUT1, '>', $out1) or die "can not open $out1\n";
open (OUT2, '>', $out2) or die "can not open $out2\n";

print STDERR "parsing fastq file 1\n";
my $file1 = parse_fastq ($fastq1);
print STDERR "finished parsing file 1... starting file 2\n";
my $file2 = parse_fastq ($fastq2);
print STDERR "finished parsing fastq file 2\nstarting SAM file...\n";

my %hash1 = %$file1;
my %hash2 = %$file2;

#open (SAM, $sam) or die "can not open sam: $sam\n";
while (my $line = <STDIN>) {
    chomp $line;
    next if ($line =~
/\^@HD|\^@SQ|\^@RG|\^@PG|\^@CO/);
    next if ($line =~ /\^s*$/);
    my @parts = split ("t", $line);
    my $read = $parts[0];
#    print STDERR "line: $line\n";
#    print STDERR "first part: $parts[0]\n";
    if ($hash1{$read}) {
        print OUT1 "$hash1{$read}\n";
        delete ($hash1{$read});
    }

    if ($hash2{$read}) {
        print OUT2 "$hash2{$read}\n";
        delete ($hash2{$read});
    }
}
```

```
}
else {
}

}

}

#close (SAM);
#print STDERR "parsing fastq file 1\n";
#my $file1 = parse_fastq ($fastq1);
#print STDERR "finished parsing file 1... starting file 2\n";
#my $file2 = parse_fastq ($fastq2);
#print STDERR "finished parsing fastq file 2\n";

sub parse_fastq {
    my $file = shift;
    open (FILE, $file) or die "can not open file: $file\n";

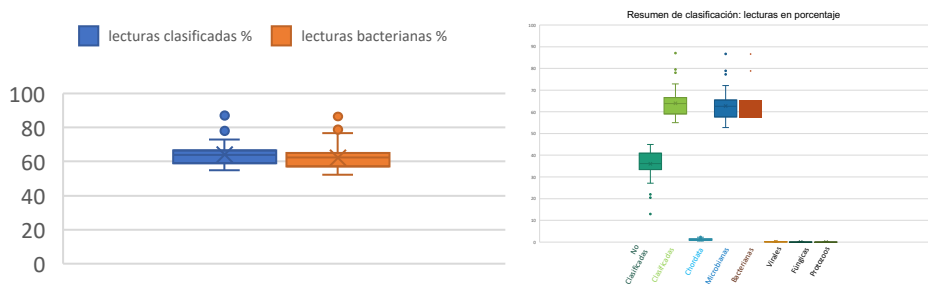
    my %hash;
    while (my $line = <FILE>) {
        chomp $line;
        next if ($line =~ /\^s*$/);
        if ($line =~ /\^@D00.*/) {
            my $IDinSAM = $line;
            $IDinSAM =~ s/\^@//;
            $IDinSAM =~ s/\s.*$/;
            print STDERR "TEST: IDinSAM:
$IDinSAM\n";

            my $line1 = $line;
            $line = <FILE>; #2
            chomp $line;
            my $line2 = $line;
            $line = <FILE>; #3
            chomp $line;
            my $line3 = $line;
            $line = <FILE>; #4
            chomp $line;
            my $line4 = $line;
            my $string = join ("n", $line1, $line2,
$line3, $line4);

            #    print STDERR "test string:\n$string\n";
            $hash{$IDinSAM} = $string;
        }
        else {
            warn "line does not begin as a
read!\n$string\n";
        }
    }
    close (FILE);
    return \%hash;
}
```

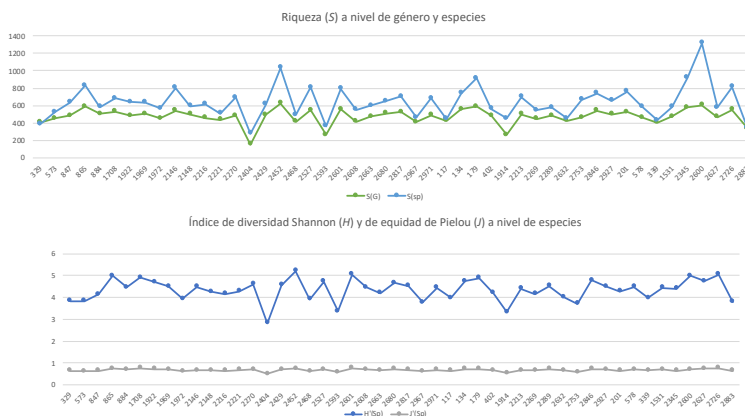
Suplemento 3. Análisis taxonómico de la microbiota

Se efectuó una clasificación taxonómica a través del programa Kraken2 (Wood, 2014). A partir del reporte del programa Kraken2, se obtuvieron las abundancias usando la herramienta Bracken (Lu, 2017). Se lograron clasificar entre el 55% y 87.1 % de las lecturas, la mayoría identificadas como parte del dominio *Bacteria*.

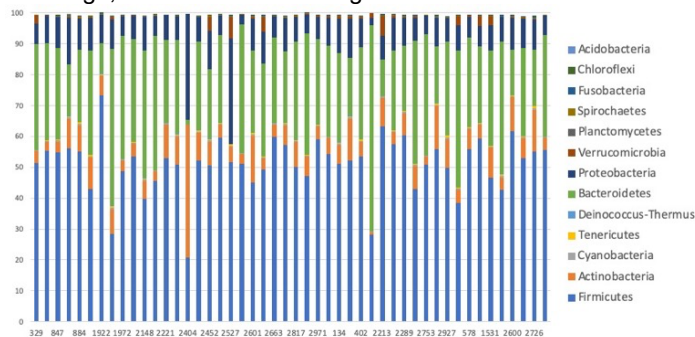


Gráfica 5. Distribución de lecturas clasificadas

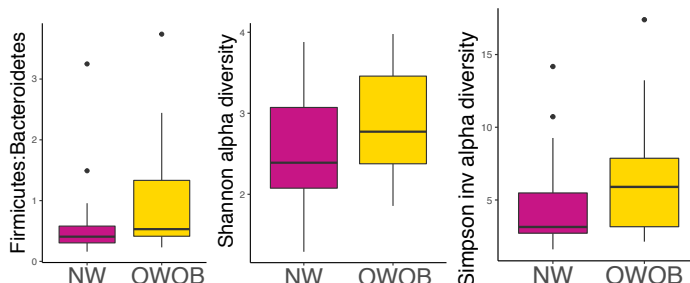
La riqueza (S) osciló entre 200 y 600 géneros y, entre 300 y 1300 especies a través de las 48 muestras. Por otro lado, el índice de la diversidad de Shannon (H) se mantuvo en un intervalo de 3 a 5 y el índice de equidad de Pielou (J) a nivel de especies se mantuvo entre 0.5 y 1.



A través de la gráfica de abundancias relativas en el nivel de *phylum*, se corroboró la dominancia de *Firmicutes* y *Bacteroidetes* en las muestras. El radio Firmicutes/Bacteroidetes, y los índices de diversidad de Shannon y Simpson inverso tuvieron valores más altos en el grupo de sobrepeso y obesidad sin embargo, la diferencia no fue significativa.

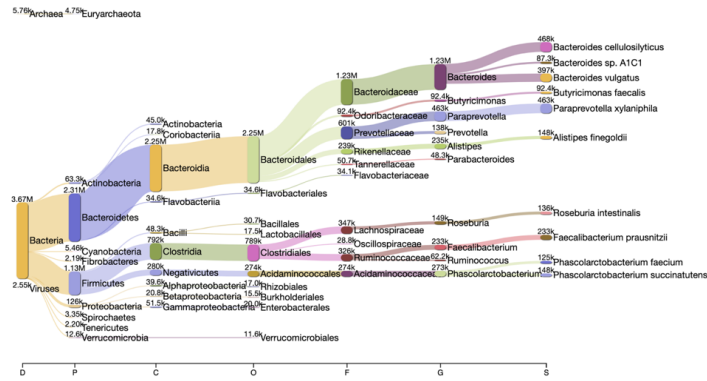


Gráfica 6. Abundancia relativa a nivel *phylum* en cada una de las 48 muestras

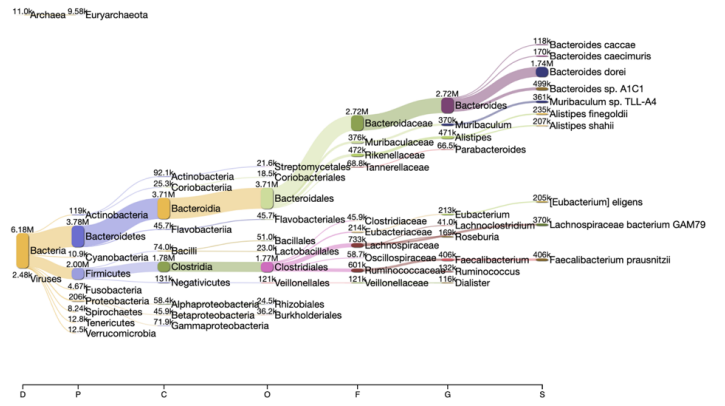


Con estas anotaciones se generaron visualizaciones Sankey (Pavian R package v1.0.0) para cada una de las 48 librerías secuenciadas. Se identificaron 122 géneros con abundancia relativa mayor a 0.05%, entre los que se incluyen *Actinomyces*, *Amycolatopsis*, *Ralstonia*, *Ornithobacterium*, *Rothia*, *Duncaniella*, *Acholeplasma*, *Stenotrophomonas*, *Nocardia* y *Virgibacillus*.

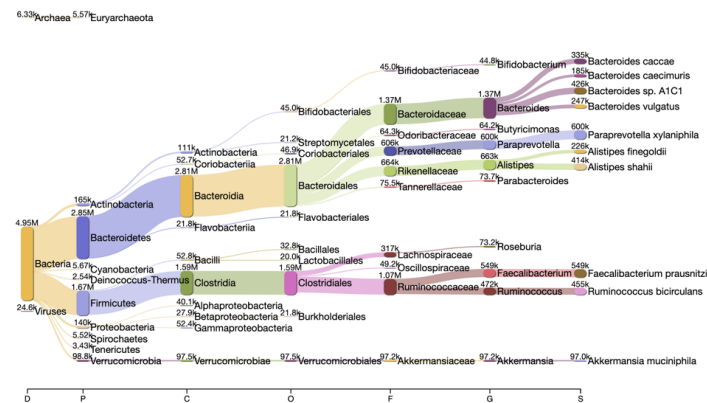
117



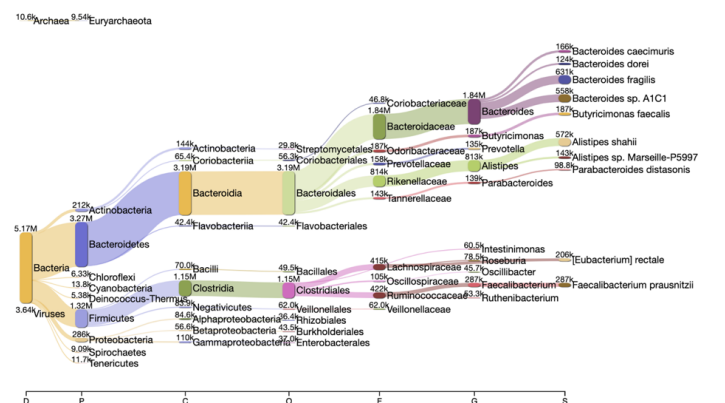
134



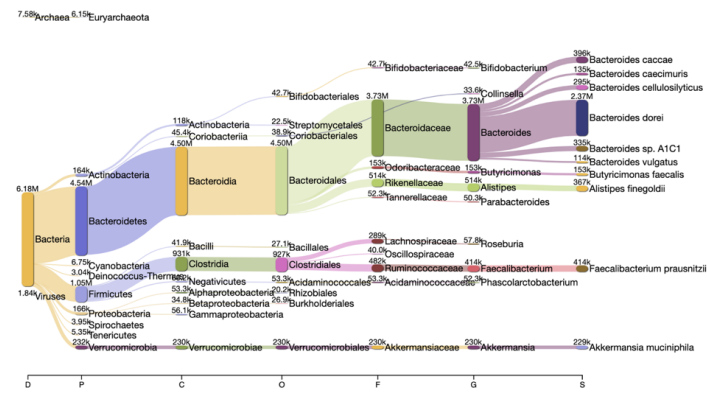
1531



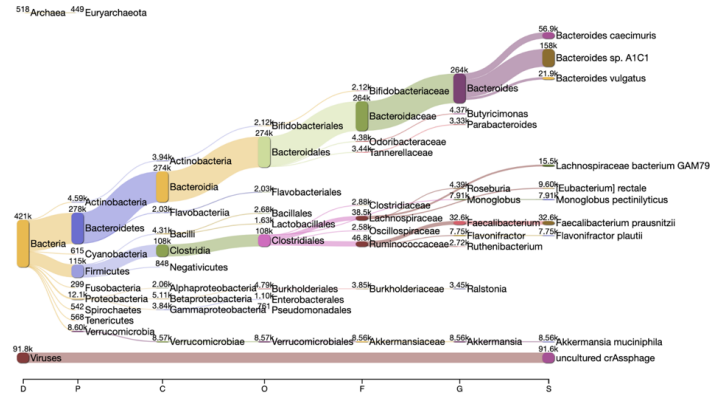
1708



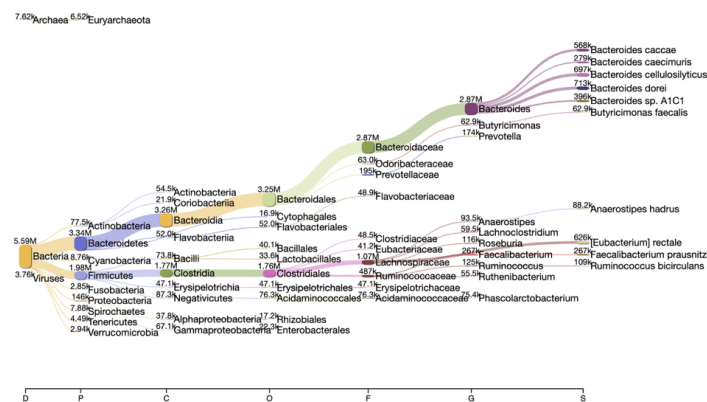
179



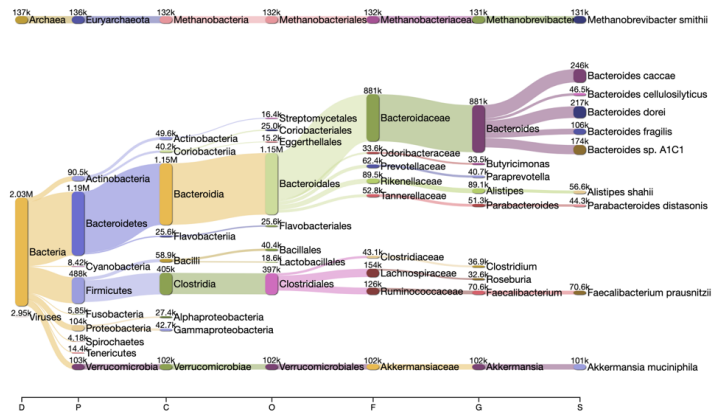
1914



1922

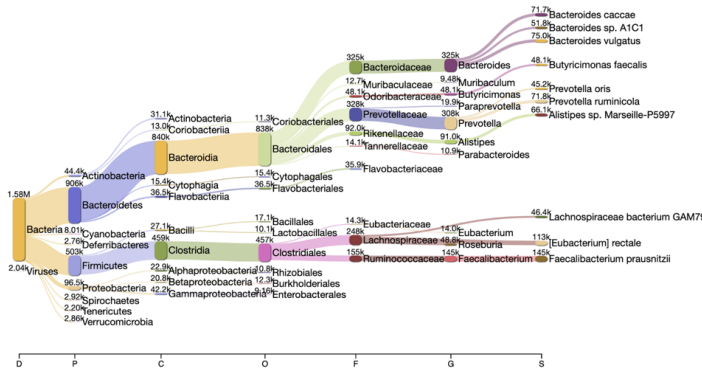


1969



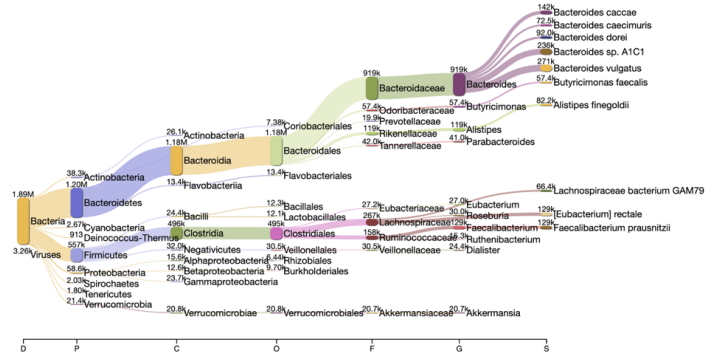
1972

7.85% Archaea 7.41% Euryarchaeota



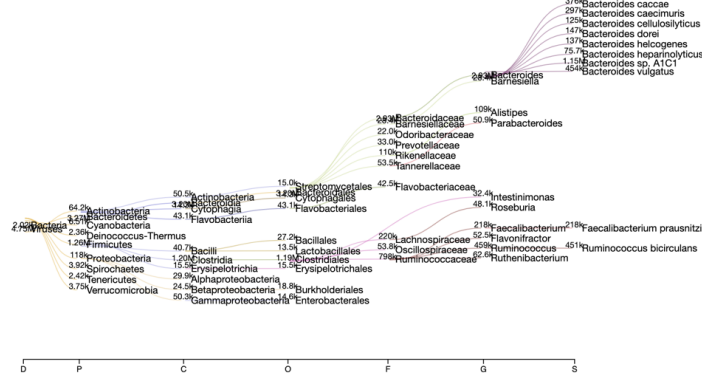
201

2.80% Archaea 2.44% Euryarchaeota



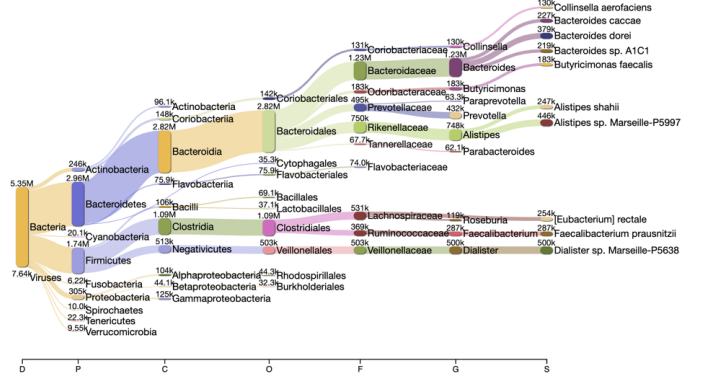
2146

5.68% Archaea 4.78% Euryarchaeota



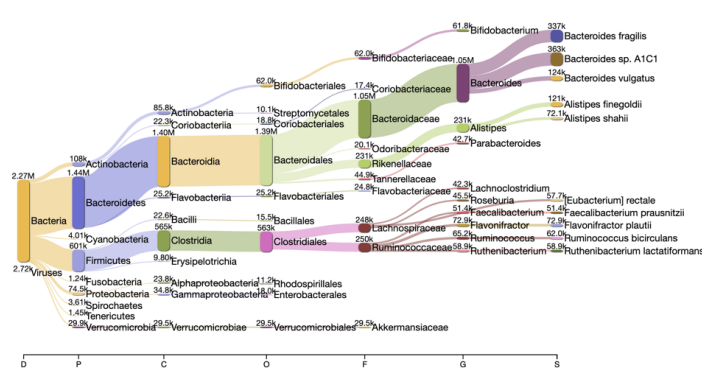
2148

15.29% Archaea 13.52% Euryarchaeota



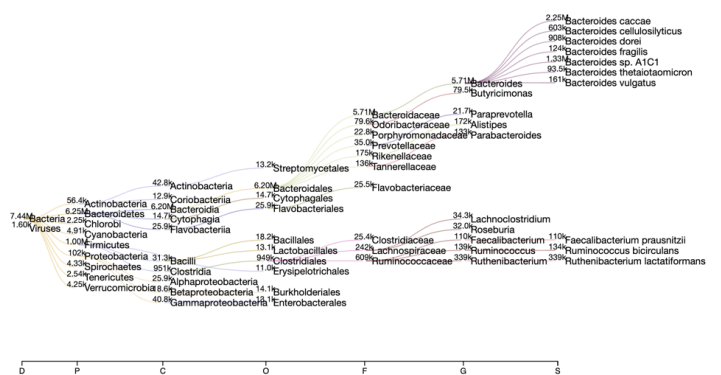
2213

2.79% Archaea 2.26% Euryarchaeota



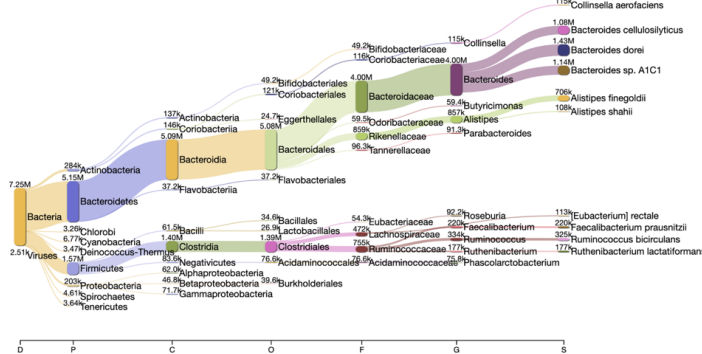
2216

4.70% Archaea 4.11% Euryarchaeota



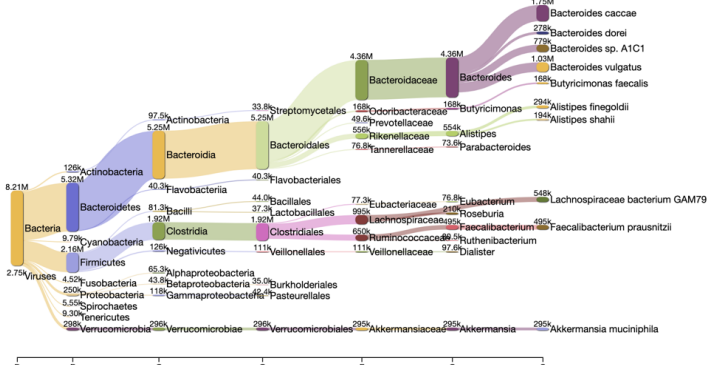
2221

7.07% Archaea 6.31% Euryarchaeota

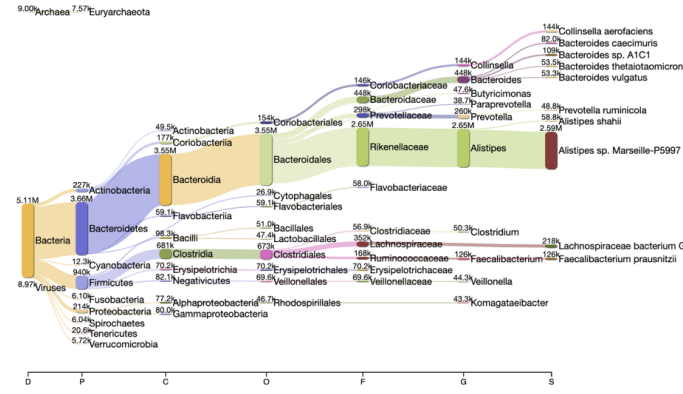


2269

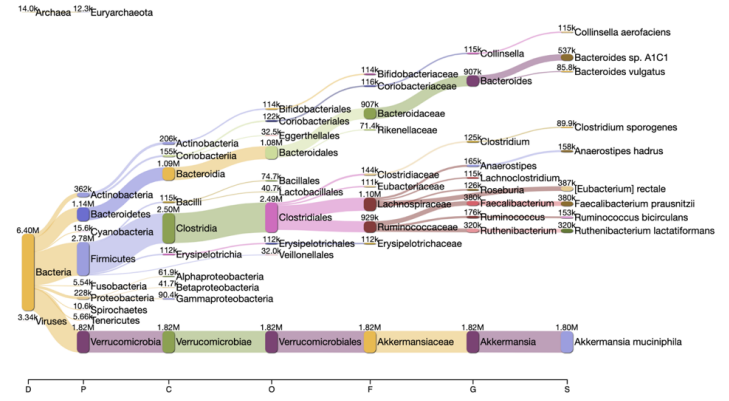
8.93% Archaea 7.40% Euryarchaeota



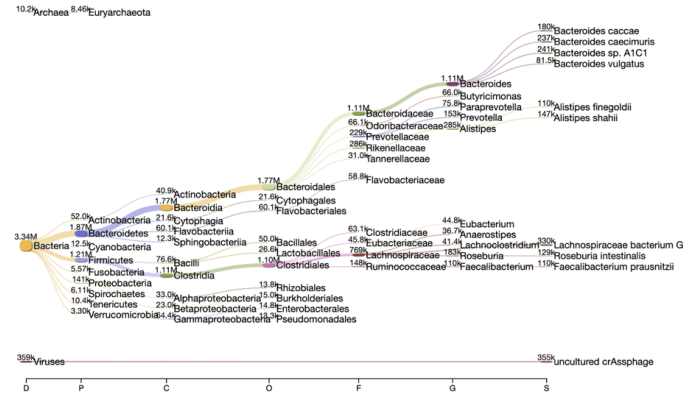
2270



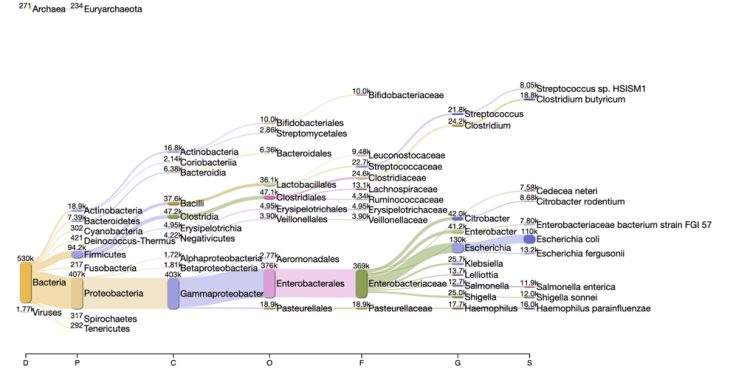
2289



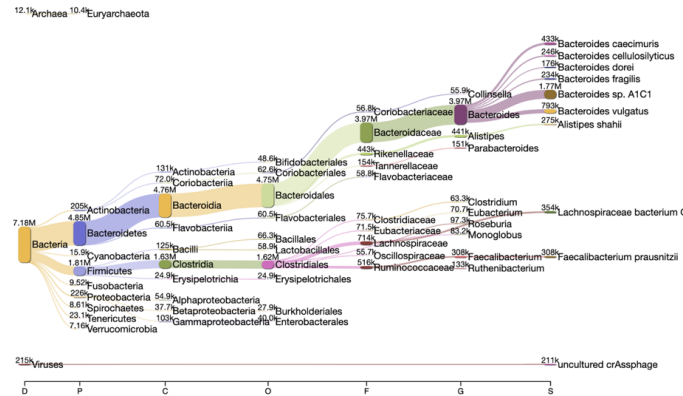
2345



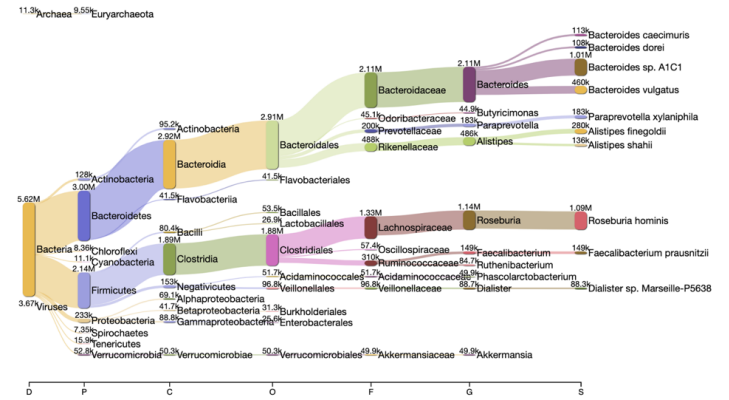
2404



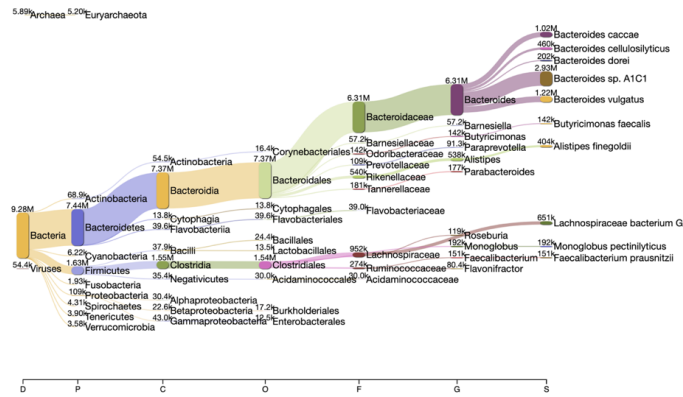
2429



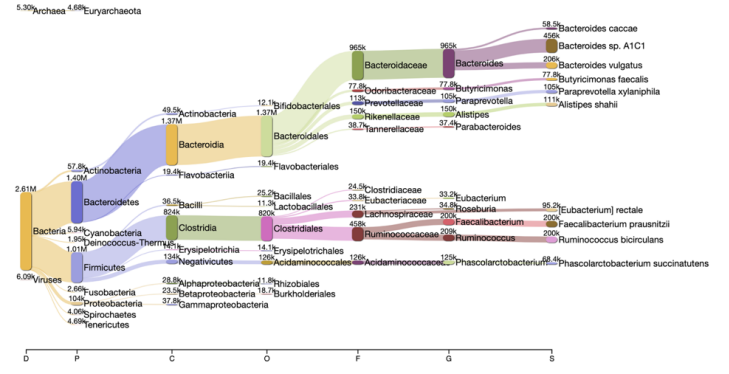
2452



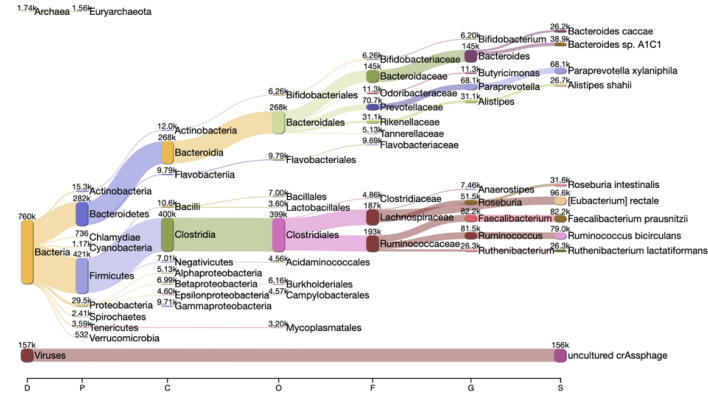
2468



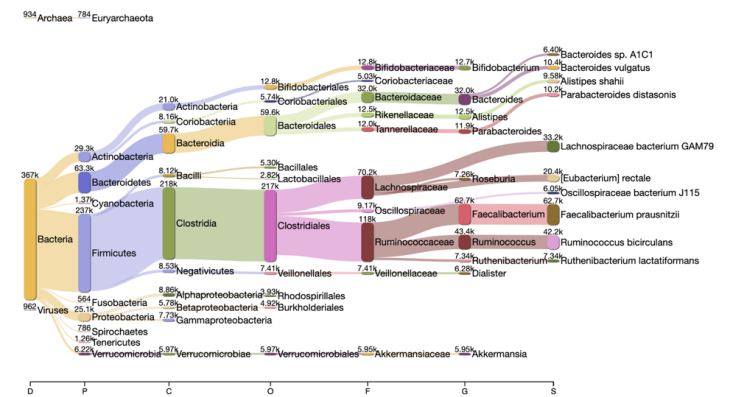
2527



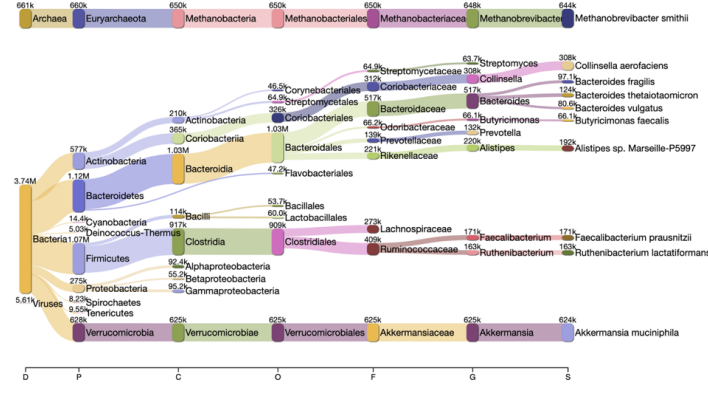
2593



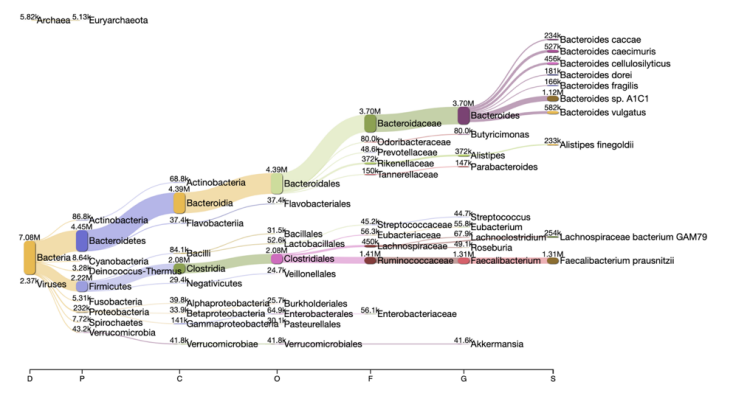
2600



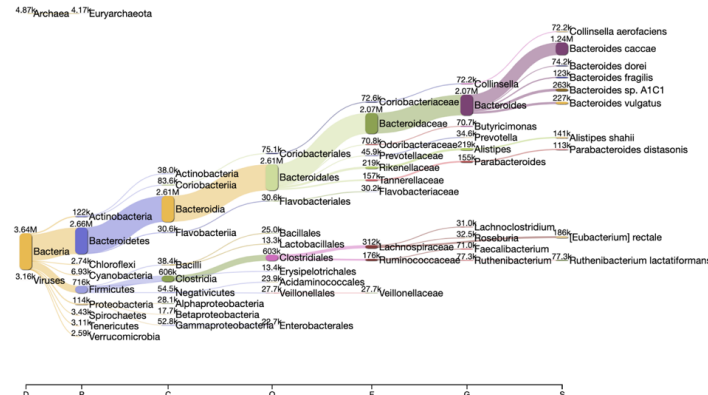
2601



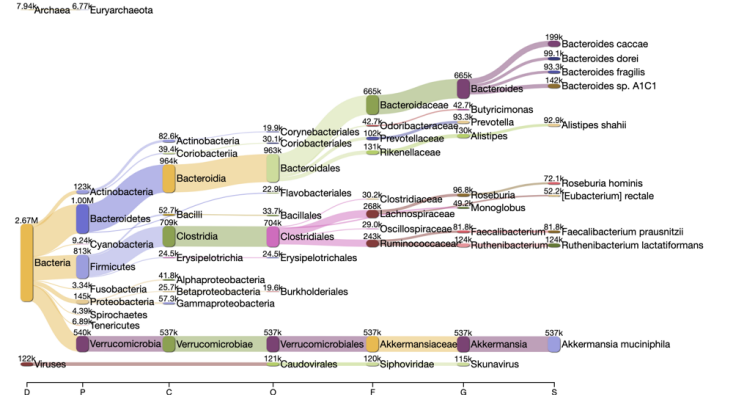
2608



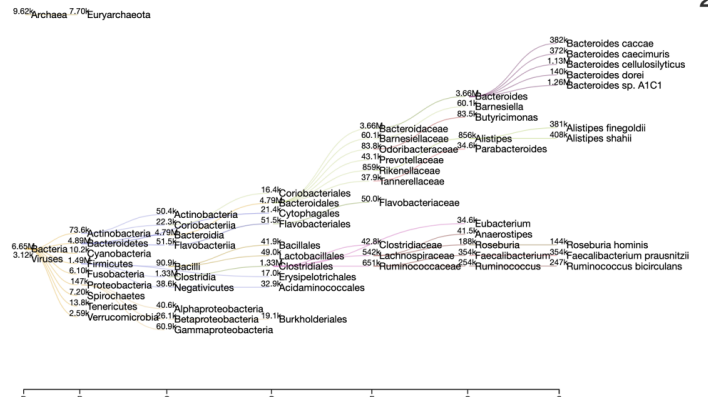
2627



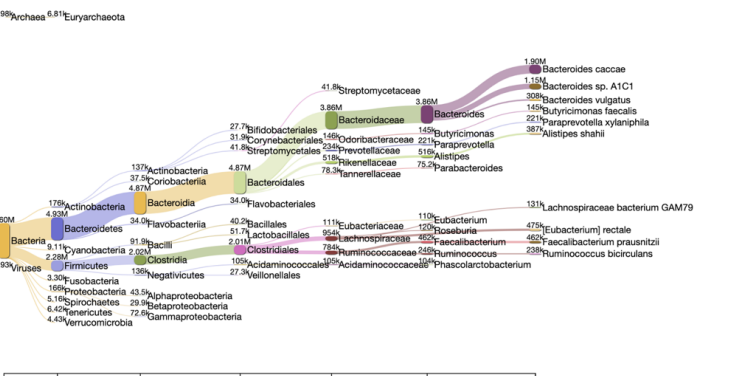
2632



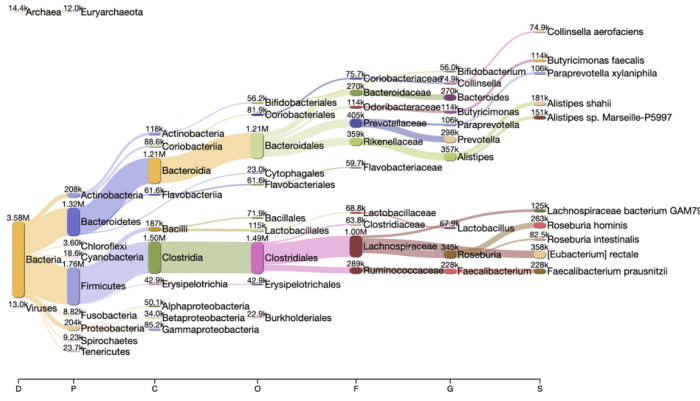
2663



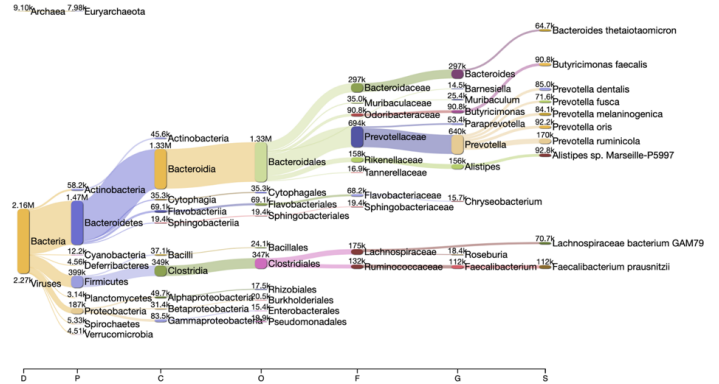
2680



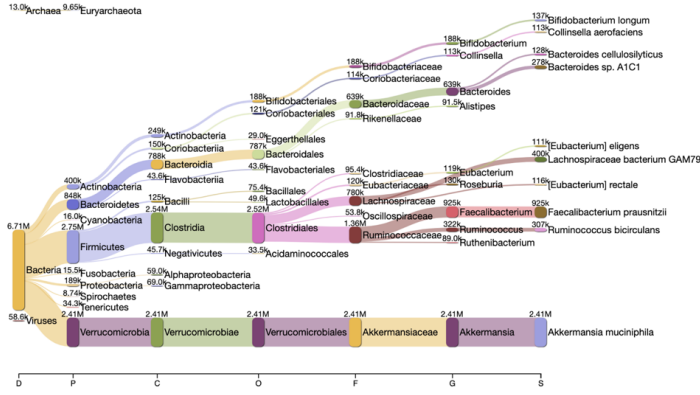
2726



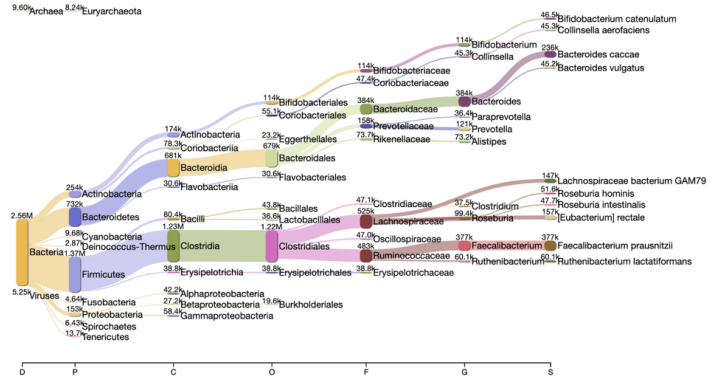
2753



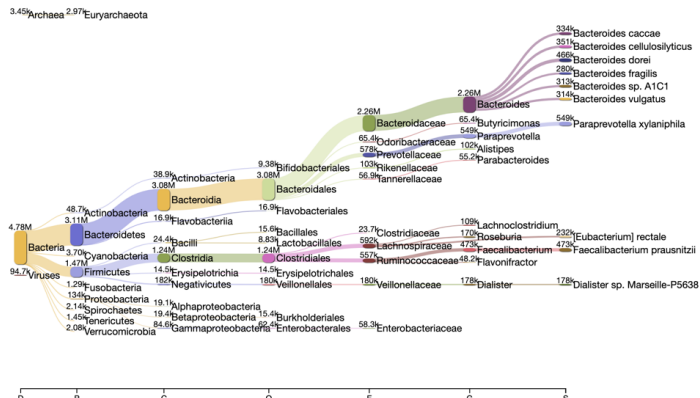
2817



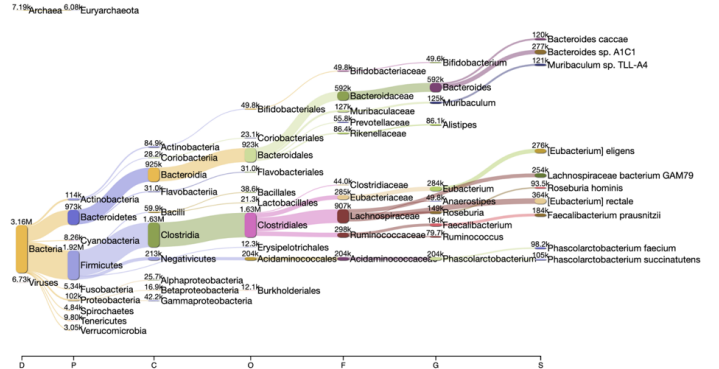
2846



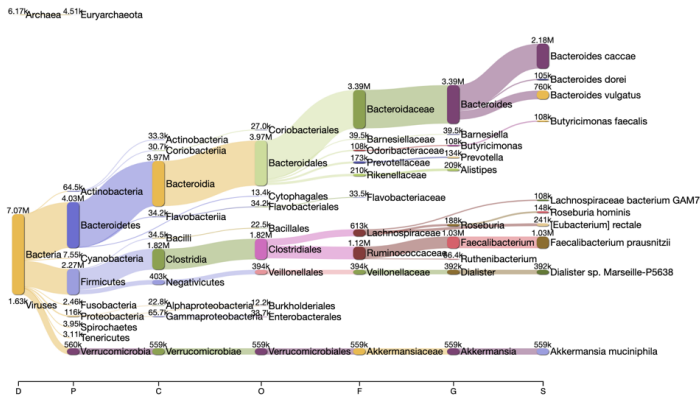
2883



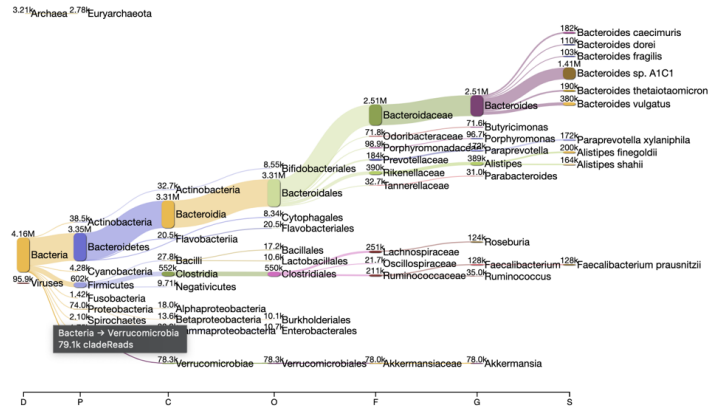
2927



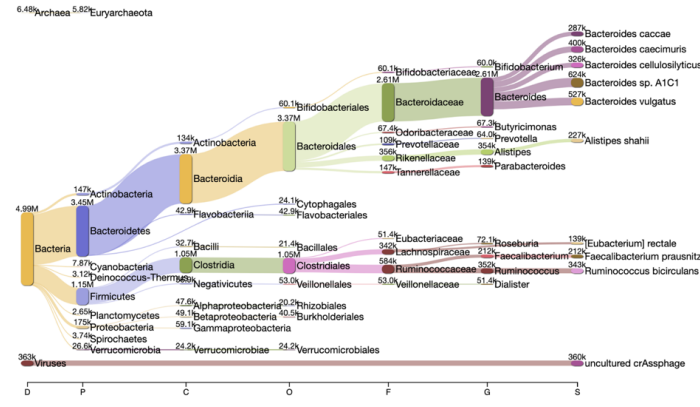
2967



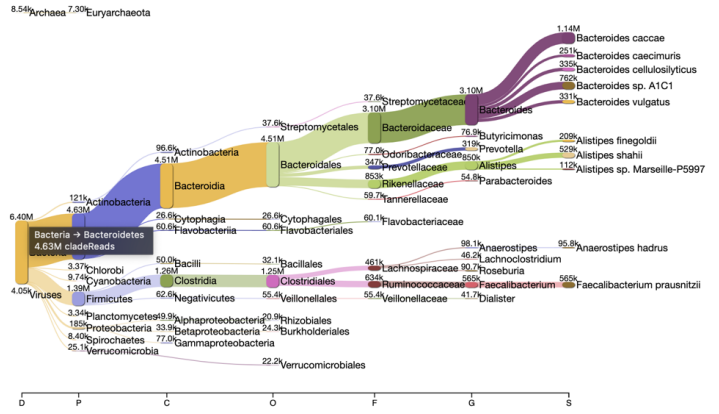
2971



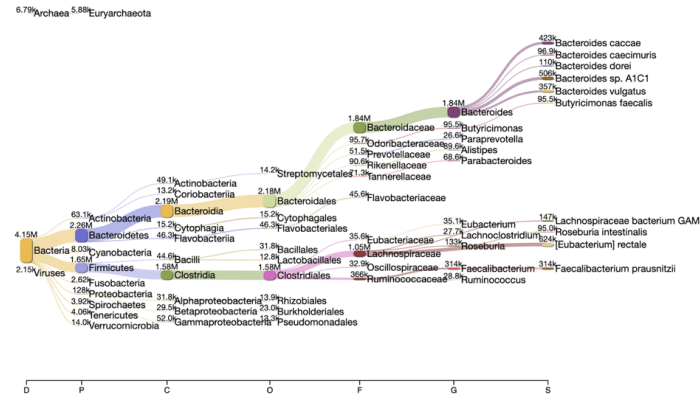
329



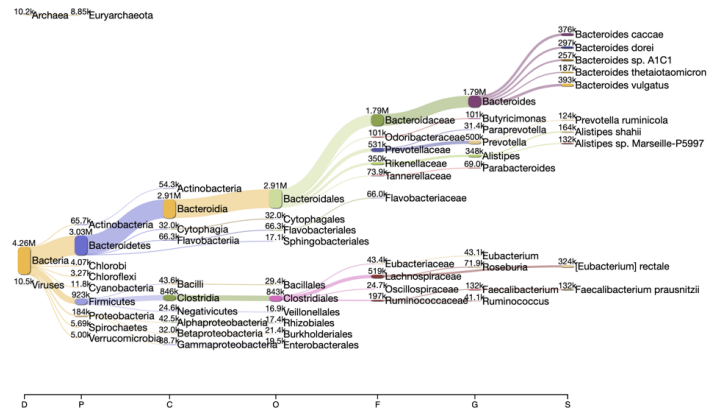
339



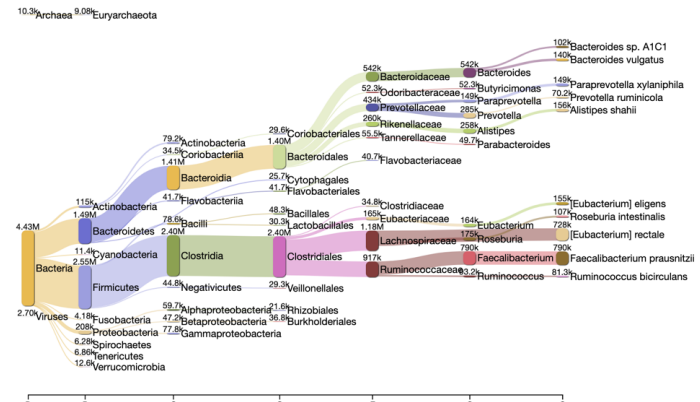
402



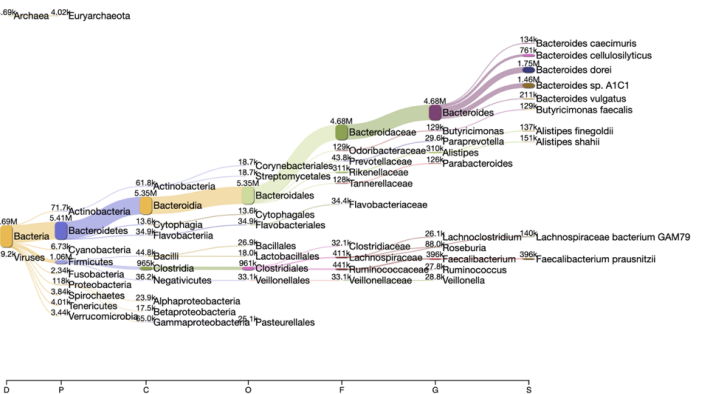
573



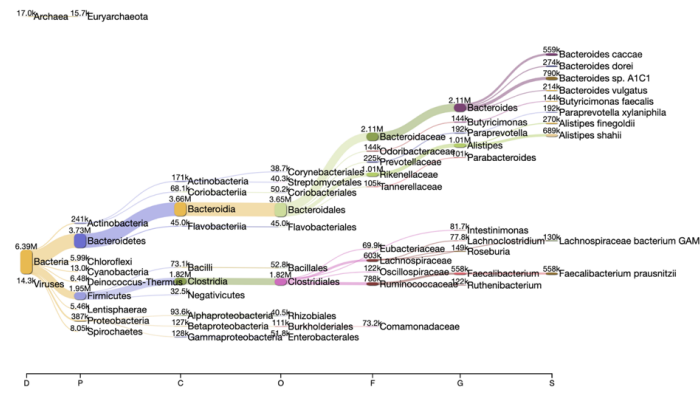
578



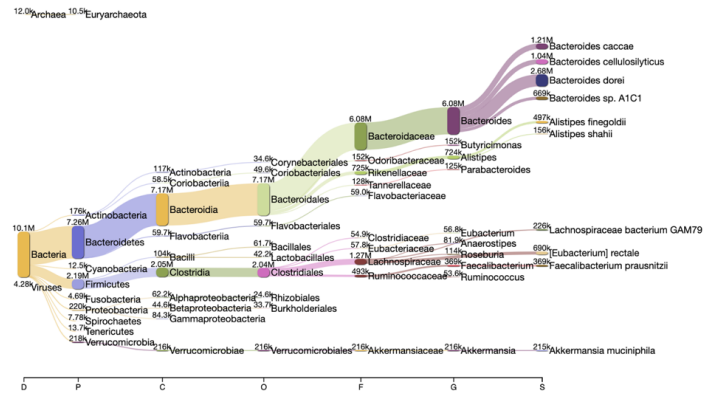
847



865



884



Suplemento 4. Código

```
# Diversity analysis metaphlan3 (through HUMAnN3) and virulence
factors (through abricate-VFDB)
# HEX colors NW "#D3C331", OWOB "#0AA0A0"

library(phyloseq)
library(vegan)
library(ggplot2)
library(reshape2)
library(ggpubr)
library(tidyverse)
library(scales)

# Import feature data
feature <- read_csv("~/FeatureDataframe.csv")
# Import metadata
meta <- read_csv("~/metadata.csv")

# order data
row.names(feature) <- feature$SampleID
row.names(meta) <- meta$SampleID
feature = feature[order(row.names(feature)),]
meta = meta[order(row.names(meta)),]

# remove columns with all 0
feature <- feature[, !apply(feature == 0, 2, all)]

# Proportions (change columns)
featureProp <-
sweep(feature[,2:ncol(feature)],1,rowSums(feature[,2:ncol(feature)]
),"/")

# remove rare taxa (>0.001%)
## apply max function to columns and return those greater than
0.0001
feature.abund=featureProp[,which(apply(featureProp,2,max)>0.000
1)]

# Graph taxa into barplots
featureRelAb <- cbind(feature[, "SampleID",drop=F], featureProp)
featureRelAb_melt <- melt(featureRelAb, id.vars = "SampleID")
# plot Phylum stacked relative abundance
ggplot(featureRelAb_melt, aes(x = SampleID, y = value, fill =
variable)) +
  geom_bar(position = "fill", stat = "identity") +
  scale_fill_brewer(palette = "Paired") +
  scale_y_continuous(labels = percent_format(), expand = c(0,0)) +
  theme(axis.text.x = element_text(angle = 90)) + labs(y = "Relative
Abundance") +
  theme(axis.title.x = element_blank(), axis.title.y = element_text(size
= 19), axis.text.x = element_text(size = 12))

# Set seed
set.seed(8765)

# Alpha diversity
Phlan.physeq =
otu_table(as.matrix(feature.abund[,1:ncol(feature.abund)])),
taxa_are_rows = FALSE)
meta.physeq = sample_data(meta)

physeq.alpha = phyloseq(Phlan.physeq, meta.physeq)

sample_data(physeq.alpha)$shannon.physeq_feature <-
estimate_richness(physeq.alpha, measures = "Shannon")
plot_richness(physeq.alpha, "percentil", measures = "Shannon")
plot_richness(physeq.alpha, "percentil", measures = "Simpson")

meta$shannon.vegan_feature <-
diversity(feature.abund[,1:ncol(feature.abund)], index = "shannon")
meta$simpson.vegan_feature <-
diversity(feature.abund[,1:ncol(feature.abund)], index = "simpson")
meta$invsimpson.vegan_feature <-
diversity(feature.abund[,1:ncol(feature.abund)], index =
"invsimpson")

hist(meta$shannon.vegan_feature, main="Shannon diversity",
xlab="", breaks=10)
hist(meta$simpson.vegan_feature, main="Simpson diversity",
xlab="", breaks=10)
hist(meta$invsimpson.vegan_feature, main="InvSimpson diversity",
xlab="", breaks=10)

# Normalcy test
shapiro.test(meta$shannon.vegan_feature)
shapiro.test(meta$simpson.vegan_feature)
shapiro.test(meta$invsimpson.vegan_feature)

pairwise.wilcox.test(meta$shannon.vegan_feature, meta$percentil,
p.adjust.method = "fdr") #species and genera
pairwise.wilcox.test(meta$simpson.vegan_feature, meta$percentil,
p.adjust.method = "fdr") #species and genera
pairwise.t.test(meta$invsimpson.vegan_feature, meta$percentil)
#species
pairwise.wilcox.test(meta$invsimpson.vegan_feature,
meta$percentil, p.adjust.method = "fdr") #genera

### PLOTS alpha
meta %>%
  filter(percentil %in% c("NW", "OWOB")) %>%
  ggplot(aes(x = percentil, y = shannon.vegan_feature, fill =
factor(percentil))) +
  geom_boxplot() +
  scale_fill_manual(values = c("#F8766D", "#01BFC4")) +
  theme(panel.background = element_blank(), panel.border =
element_blank(), panel.grid.major = element_blank(),
panel.grid.minor = element_blank(), axis.line = element_line(colour
= "black")) +
  stat_compare_means(method = "wilcox.test", aes(label =
..p.signif..), na.rm = TRUE) +
  labs(y = "shannon alpha diversity") +
  theme(legend.position = "none", axis.title.x = element_blank(),
axis.title.y = element_text(size = 19), axis.text.x = element_text(size
= 22))
meta %>%
  filter(percentil %in% c("NW", "OWOB")) %>%
  ggplot(aes(x = percentil, y = invsimpson.vegan_feature, fill =
factor(percentil))) +
  geom_boxplot() +
  scale_fill_manual(values = c("#F8766D", "#01BFC4")) +
  theme(panel.background = element_blank(), panel.border =
element_blank(), panel.grid.major = element_blank(),
panel.grid.minor = element_blank(), axis.line = element_line(colour
= "black")) +
```

```

stat_compare_means(method = "wilcox.test", aes(label =
..p.signif..), na.rm = TRUE) +
labs(y = "simpson inversed alpha diversity") +
theme(legend.position = "none", axis.title.x = element_blank(),
axis.title.y = element_text(size = 19), axis.text.x = element_text(size
= 22))

```

```

#####
#####
#####
#####
#####
#####
#####
#####
#####
## BETA diversity

```

```

#### Bray-Curtis: stress values <0.2
BC.nmds = metaMDS(feature.abund[,1:ncol(feature.abund)],
distance="bray", k=2, trymax=10000)#### PERMANOVA
BC.dist = vegdist(feature.abund[,1:ncol(feature.abund)], distance =
"bray")
adonis(BC.dist ~ meta$percentil, data = meta, permutations =
10000)
# Plot nMDS
plot(BC.nmds, type="n", main="Bray-Curtis")
ordiellipse(BC.nmds, groups=meta$percentil, display="sites",
kind="se", label=FALSE, col="blue", draw="polygon", alpha=200,
show.groups = c("NW"), border=FALSE)
ordiellipse(BC.nmds, groups=meta$percentil, display="sites",
kind="se", label=FALSE, col="red", draw="polygon", alpha=200,
show.groups = c("OWOB"), border=FALSE)

```

```

#### Jaccard: stress values <0.2
J.nmds = metaMDS(feature.abund[,1:ncol(feature.abund)],
distance="jaccard", k=2, trymax=10000)
#### PERMANOVA
J.dist = vegdist(feature.abund[,1:107], distance="jaccard")
adonis(J.dist ~ meta$percentil, data = meta, permutations = 10000)
# Plot nMDS
plot(J.nmds, type="n", main="Jaccard")
ordiellipse(J.nmds, groups=meta$percentil, display="sites",
kind="se", label=FALSE, col="blue", draw="polygon", alpha=200,
show.groups = c("NW"), border=FALSE)
ordiellipse(J.nmds, groups=meta$percentil, display="sites",
kind="se", label=FALSE, col="red", draw="polygon", alpha=200,
show.groups = c("OWOB"), border=FALSE)

```

```

#### Weighted UniFrac: stress values <0.2
wUF.dist <- read_csv("~/unifrac_metaphlanbugs.csv")
# take out column ID and add row.names
wUF.distM <- wUF.dist[,-1]
row.names(wUF.distM) <- wUF.dist$SampleID
#### PERMANOVA
adonis(wUF.distM ~ meta$percentil, permutations = 1000)
# Plot nMDS
wUF.nmds = metaMDS(wUF.distM, k=2, trymax=10000)
plot(wUF.nmds, type="n", main="Weighted UniFrac")
ordiellipse(wUF.nmds, groups=meta$percentil, display="sites",
kind="se", label=FALSE, col="pink", draw="polygon", alpha=200,
show.groups = c("NW"), border=FALSE)

```

```

ordiellipse(wUF.nmds, groups=meta$percentil, display="sites",
kind="se", label=FALSE, col="cyan", draw="polygon", alpha=200,
show.groups = c("OWOB"), border=FALSE)

```

```

### Beta dispersion
disp.imc = betadisper(BC.dist, meta$percentil)
permutest(disp.imc, pairwise=TRUE, permutations = 10000)

```

```

### SIMPER's output is a list of OTUs which cumulatively explain
70%+ of the variation between each comparison. The numbers
below the OTUs are cumulative, so to get each OTU's contribution,
you must subtract the previous OTU's value.
simper(feature.abund[,1:ncol(feature.abund)], meta$percentil,
permutations=999)
#####
#####
##### SIMPER's output pairwise comparison per NW vs.
OWOB
pairwise.wilcox.test(feature[,2:ncol(feature)]$"", meta$percentil,
p.adjust.method="fdr") #add taxa
boxplot(feature[,2:ncol(feature)]$"" ~ meta$percentil, ylab=
"Relative abundance", main="Taxa", xlab= "", col = c("#F8766D",
"#01BFC4")) #add taxa
meta$Eubacterium <-
feature$k__Bacteria|p__Firmicutes|c__Clostridia|o__Clostridiales|
f__Eubacteriaceae|g__Eubacterium`

```

```

### Vectors #####
# Bray-Curtis beta diversity
fit.BC = envfit(BC.nmds, meta)
fit.BC
# weighted UniFrac beta diversity
fit.wUF = envfit(wUF.nmds, meta)
fit.wUF

```

```

### END

```

Suplemento 5. Código

```

rm(list=ls())

```

```

library(gplots)
library(RColorBrewer)
library(edgeR)
library(limma)
library(openxlsx)

```

```

### read metadata
metadata <- read.csv("~/metadata.csv", header = T)

```

```

### read counts table (Pathway database, Virulence factor database)
countdata <- read.csv("~/countdata.csv", header = T, row.names =
"Product") #row.names = dataset rownames

```

```

## Create DGList object
x <- DGEList(counts=countdata)

```

```

##-----
## Building the experimental design information ----

```

```

###-----
# (metadata[,10]) <- grouping variable
group <- as.factor(as.character(metadata[,10]))
x <- DGEList(counts=countdata, group = group)
x$samples

x$samples$group <- group
id <- metadata[,2]
x$samples$id <- id

### Some boxplot
nomcol <- x$samples$id
par(mar=c(10,2,1,1))
boxplot(cpm(x, log=T), main="cpms in log scale (not normalized)",
names= nomcol, las=2, colours = x$samples$group)

###-----
### Normalization
### -----

x <- edgeR::calcNormFactors(x, method = "TMM")
boxplot(cpm(x, log = T), main="cpms in log scale (TMM
normalization)", names= nomcol, las=2)

#### PCA's analysis

col.group <- group
levels(col.group) <- brewer.pal(nlevels(col.group), "PuRd")
col.group <- as.character(col.group)

lcpm <- cpm(x, log = TRUE)
par(mar=c(2,2,2,2))

prcTMM <- prcomp(lcpm)

### graphics

### TMM normalization
plot(prcTMM$rotation[,1], prcTMM$rotation[,2], col=col.group,
main = "PCA (TMM normalization)")
text(prcTMM$rotation[,1],prcTMM$rotation[,2], col= col.group,
labels = nomcol)

### PCA NW
prcNW <- prcomp(lcpm[,metadata$percentil_merged=="NW"])
plot(prcNW$rotation[,1], prcNW$rotation[,2], col=col.group,
main="PCA NW community")
text(prcNW$rotation[,1],prcNW$rotation[,2], col= col.group, labels =
nomcol[c(metadata$percentil_merged=="NW")])

### PCA OWOB
prcOB <- prcomp(lcpm[,metadata$percentil_merged=="OB"])
plot(prcOB$rotation[,1], prcOB$rotation[,2], col=col.group,
main="PCA OW-OB community")
text(prcOB$rotation[,1],prcOB$rotation[,2], col= col.group, labels =
nomcol[c(metadata$percentil_merged=="OB")])

###-----
### building the design
### -----

design <- model.matrix(~0+group, data=x$samples)
colnames(design) <- levels(x$samples$group)

###-----
### estimating dispersions
###-----

x <- estimateDisp(x, design)

x <- estimateGLMTagwiseDisp(x, design)

###-----
### Testing for DE genes
###-----

Qfit <- glmQLFit(x, design)
## likelihood ratio test
fit <- glmFit(x, design)
lrt <- glmLRT(fit, coef = 2)
topTags(lrt)

### defining contrast

matrix.contr <- makeContrasts(NW.vs.OB = NW-OB,
                             OB.vs.NW = OB-NW,
                             levels = design)

### comparisons

qlf.NWvsOB <- glmQLFTest(Qfit, contrast =
matrix.contr[, "NW.vs.OB"])
qlf.OBvsNW <- glmQLFTest(Qfit, contrast =
matrix.contr[, "OB.vs.NW"])
lf.NWvsOB <- glmLRT(fit, contrast = matrix.contr[, "NW.vs.OB"])
lf.OBvsNW <- glmLRT(fit, contrast = matrix.contr[, "OB.vs.NW"])

### MD Plots
plotMD(qlf.NWvsOB, main = "NW vs OW-OB")
abline(h=c(-1, 1), col="blue")
plotMD(qlf.OBvsNW, main = "OW-OB vs NW")
abline(h=c(-1, 1), col="blue")
plotMD(lf.NWvsOB, main = "NW vs OW-OB")
abline(h=c(-1, 1), col="blue")
plotMD(lf.OBvsNW, main = "OW-OB vs NW")
abline(h=c(-1, 1), col="blue")

### DE genes summary
summary(decideTests(qlf.NWvsOB))
summary(decideTests(qlf.OBvsNW))
summary(decideTests(lf.NWvsOB))
summary(decideTests(lf.OBvsNW))

### Write tables

## Contrast
qlf.NWvsOB <- topTags(qlf.NWvsOB, n = Inf)
qlf.OBvsNW <- topTags(qlf.OBvsNW, n = Inf)
lf.NWvsOB <- topTags(lf.NWvsOB, n = Inf)
lf.OBvsNW <- topTags(lf.OBvsNW, n = Inf)

#write.csv(qlf.NWvsOB, "~/qlf.NWvsOB.csv")
#write.csv(qlf.OBvsNW, "~/qlf.OBvsNW.csv")
#write.csv(lf.NWvsOB, "~/lf.NWvsOB.csv")
#write.csv(lf.OBvsNW, "~/lf.OBvsNW.csv")

```



```

TaxaAssociationDataframe <- TaxaAssociationDataframe %>%
  select(feature.Taxa, Effect, X)

# reshape the data frame
# variable = -log(qval)*sign(coeff)

TaxaAssociationMatrix <- melt(TaxaAssociationDataframe)
TaxaAssociationMatrix <- dcast(TaxaAssociationMatrix, feature.Taxa
~ Effect + variable)
TaxaAssociationMatrix[is.na(TaxaAssociationMatrix)] <- 0
rownames(TaxaAssociationMatrix) <-
TaxaAssociationMatrix$feature.Taxa
TaxaAssociationMatrix$feature.Taxa <- NULL

##### HEATMAP ggplot
# https://www.r-graph-gallery.com/283-the-hourly-heatmap.html

ggplot(TaxaAssociationDataframe,aes(Effect,feature.Taxa,fill=X)) +
  geom_tile(color= "white",size=0.1) +
  scale_fill_gradient2(low = ("#03B089"),
    mid = "white",
    high = ("#C7048C"),
    midpoint = 0) +
  theme(panel.background = element_rect(fill = "#F9F8F8"),
    panel.grid.major = element_line(size = 1, linetype = 'solid',
    colour = "#F1F1F1"))

# convert back to a matrix to use Heatmap
TaxaAssociationMatrixHeatmap <- as.matrix(TaxaAssociationMatrix)

##### HEATMAP
library(ComplexHeatmap)
library(RColorBrewer)

GnWhPk <- colorpanel(250, "#03B089", "white", "#C7048C")

# variable = -log(qval)*sign(coeff)
heatmap(TaxaAssociationMatrixHeatmap, Colv = NA, scale = 'none',
col = GnWhPk)

#####
#####
#####
# Diet (macronutrients %)
#####
# Preprocess MaAsLin2 output to make heatmaps
#####
#####
# adjust p-values for multiple comparisons for individual MaAsLin2
association analysis: Taxa vs. each macronutrient % -all adjusted by
age & sex-
#####
#####
##### Diet %
DietChPct <- read.table(file = "~/all_results.tsv", header = TRUE, sep
= "\t", stringsAsFactors = FALSE)
DietFibPct <- read.table(file = "~/all_results.tsv", header = TRUE, sep
= "\t", stringsAsFactors = FALSE)
DietLipPct <- read.table(file = "~/all_results.tsv", header = TRUE, sep
= "\t", stringsAsFactors = FALSE)
DietMFPct <- read.table(file = "~/all_results.tsv", header = TRUE, sep
= "\t", stringsAsFactors = FALSE)
DietPPFct <- read.table(file = "~/all_results.tsv", header = TRUE, sep
= "\t", stringsAsFactors = FALSE)

```

```

DietProtPct <- read.table(file = "~/all_results.tsv", header = TRUE,
sep = "\t", stringsAsFactors = FALSE)
DietSFPct <- read.table(file = "~/all_results.tsv", header = TRUE, sep
= "\t", stringsAsFactors = FALSE)
DietSugPct <- read.table(file = "~/all_results.tsv", header = TRUE, sep
= "\t", stringsAsFactors = FALSE)
DietTFPct <- read.table(file = "~/all_results.tsv", header = TRUE, sep
= "\t", stringsAsFactors = FALSE)

DietPct <- rbind(DietChPct, DietFibPct, DietLipPct, DietMFPct,
DietPPFct, DietProtPct, DietSFPct, DietSugPct, DietTFPct)

FDR <- p.adjust(DietPct$pval, method = "fdr", n =
length(DietPct$pval))
DietPct$FDR <- FDR
#write_csv(DietPct, "DietPct-FDR.csv")
#####
# Join dataframes (AssociatonTaxaDiet-Dataframe.csv) form
separated association analysis and add column
X=(-log(qval)*sign(coeff)) to use it further for heatmaps comparison
#####
#### HEATMAPs for Diet

# input data frames and select columns
# X = -log(qval)*sign(coeff)
DietDataframe <- read.csv("AssociatonTaxaDiet-Dataframe.csv")

DietDataframe <- DietDataframe %>%
  select(feature.Taxa, Effect, X)

# reshape the data frame
# variable = -log(qval)*sign(coeff)
DietMatrix <- melt(DietDataframe)
DietMatrix <- dcast(DietMatrix, feature.Taxa ~ Effect + variable)
DietMatrix[is.na(DietMatrix)] <- 0
rownames(DietMatrix) <- DietMatrix$feature.Taxa
DietMatrix$feature.Taxa <- NULL

##### HEATMAP ggplot
# https://www.r-graph-gallery.com/283-the-hourly-heatmap.html

ggplot(DietDataframe,aes(Effect,feature.Taxa,fill=X)) +
  geom_tile(color= "white",size=0.1) +
  scale_fill_gradient2(low = ("#03B089"),
    mid = "white",
    high = ("#C7048C"),
    midpoint = 0) +
  theme(panel.background = element_rect(fill = "#F9F8F8"),
    panel.grid.major = element_line(size = 1, linetype = 'solid',
    colour = "#F1F1F1"))

# convert back to a matrix to use Heatmap
DietMatrixHeatmap <- as.matrix(DietMatrix)

##### HEATMAP
library(ComplexHeatmap)
library(RColorBrewer)

GnWhPk <- colorpanel(250, "#03B089", "white", "#C7048C")
# variable = -log(qval)*sign(coeff)
heatmap(DietMatrixHeatmap, Colv = NA, scale = 'none', col =
GnWhPk)

### END

```



```

#####Virulence Factors
#### input data frames and select columns
#### X = -log(qval)*sign(coeff)

VFIDCDataframe <- read.csv("AssociatonVirulenceFactors-
Dataframe.csv")
VFIDCDataframe <- VFIDCDataframe %>%
  select(feature.Taxa, Effect, X)

VFIDCDataframe$Effect <- factor(VFIDCDataframe$Effect, levels =
c("zBMLfa", "ind_cint_cadera", "OWOB", "glucmgdl", "trimgdl",
"coltotalmgdl", "energ_total", "Pattern1", "Pattern2", "pct_en_ch",
"pct_azucar", "pct_en_lip", "pct_agsat", "pct_agtrans",
"pct_agmono"))
VFIDCDataframe$feature.Taxa <-
factor(VFIDCDataframe$feature.Taxa, levels = c("CNF-1 (VF0240) ",
"CT (VF0128) ", "EAST1 (VF0216) ", "Heat-stable toxin (ST) (VF0211)
", "iota-toxin (VF0381) ", "HSI-I (VF0334) ", "Map (VF0195) ", "Tsh
(VF0233) ", "Tir (VF0193) ", "Paa (VF0194) ", "S fimbriae (VF0222) ",
"F1C fimbriae (VF0224) ", "TcpC (VF0413) ", "IroN (VF0230) "))

##### HEATMAP ggplot
# https://www.r-graph-gallery.com/283-the-hourly-heatmap.html
ggplot(VFIDCDataframe,aes(Effect,feature.Taxa,fill=X)) +
  geom_tile(color= "white",size=0.1) +
  scale_fill_gradient2(low = ("#03B089"),
    mid = "white",
    high = ("#C7048C"),
    midpoint = 0) +
  theme(panel.background = element_rect(fill = "#F9F8F8"),
    panel.grid.major = element_line(size = 1, linetype = 'solid',
    colour = "#F1F1F1"))

# convert back to a matrix to use Heatmap
VFIDAssociationM <- melt(VFIDCDataframe)
VFIDAssociationM <- dcast(VFIDAssociationM, feature.Taxa ~ Effect
+ variable)
VFIDAssociationM[is.na(VFIDAssociationM)] <- 0
rownames(VFIDAssociationM) <- VFIDAssociationM$feature.Taxa
VFIDAssociationM$feature.Taxa <- NULL
VFIDAssociationHP <- as.matrix(VFIDAssociationM)

##### HEATMAP
library(ComplexHeatmap)
library(RColorBrewer)

GnWhPk <- colorpanel(250, "#03B089", "white", "#C7048C")

# variable = -log(qval)*sign(coeff)
#heatmap(AnthropMatrixHP, Colv = NA, col = coul)
heatmap(VFIDAssociationHP, Colv = NA, scale = 'none', col = GnWhPk)

### END

```

Suplemento 9. Tabla con porcentajes de contribución

SampleID	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11	G12	G13	G14	G15	G16	G17	G18	G19	G20	G21	G22	G23	G24	G25	G26	G27
S117	20.6961	4.265283	0.5664819	11.7883531	6.2505374	1.50676892	0.0841577	3.79157684	0.3990326	1.47789834	0.8796451	0.312765	1.330108536	0.61315598	0.112045316	1.627750383	0.443369523	0.48475066	0.979537274	0.462616571	0.660036274	4.730649612	1.072335569	1.247621183	0.1959075	25.7728078	8.2487349
S134	3.3282	0.697316	0.1828766	11.824776	6.4458538	0.94282211	0.0393421	3.54497687	0.4765526	1.38177747	0.8223434	0.173526	1.243599747	0.27764087	0.607660733	0.772188672	0.102829947	0.021080139	0.512863485	0.017995242	3.113819509	4.487241984	0.39493128	0.51254303	0.1381778	23.231611	34.705109
S179	20.3574	2.848753	0.3715765	7.02330485	0.8859449	0.23043502	0.0100758	1.02973728	0	1.23858821	0.7372077	0	0.114729413	0.17397843	0.279402452	5.160016102	0.681223533	0.406256936	1.486305866	0.334418835	0.996746666	0.173978429	0.876805259	3.614373101	0	8.49038895	41.478303
S201	5.49872	3.283786	0.7167285	16.6127245	9.187291	1.66918101	0.0649993	1.67994077	0.0180509	0	0.4423967	0.29731	2.054621694	2.0535599	0.408800681	1.643697325	0.77783163	0.748795452	2.955040511	1.330991403	2.028076195	1.754126586	1.544948111	6.383130543	0.2389095	5.65179156	31.855499
S329	17.7818	2.920524	0.5044326	6.41064822	2.1226685	0.91188851	0.2220868	2.55431152	0.3965888	1.2895655	0.60882487	0.2460681	0.351408	1.142813657	1.147833728	2.216527006	0.380937895	0.416492083	1.914729618	0.111623656	0.881295337	0.865006173	0.61835962	3.472440694	0.1269793	7.96710412	42.523298
S339	20.9783	3.420112	0.5689332	6.62186588	1.8495692	0.12074865	0.2594612	2.78582085	0.0117299	0.24114973	0.2847784	0.90734	1.335135098	0.55337382	0.378115765	0.815570885	1.240261126	0.158422229	2.261100471	0.067619245	1.421384134	2.907975752	0.584423467	9.123422471	0.1724881	3.68183556	37.259583
S402	22.1761	2.374415	1.104379	1.982827	7.4575033	2.07770504	0	2.40450305	0.0257688	0.68126336	0.9421679	0.206151	1.424648947	0.419664004	0.103252548	0.565442057	0	0.519205387	0.546360246	1.071247633	2.978142112	0.244435882	0.206513047	2.315514672	0.1582943	1.81082811	2.208758
S573	15.5264	3.571161	0.1353689	4.1028344	3.6685811	0.64074615	0	2.2415746	0.1534181	2.77183948	0.2685719	0.76709	0.812313454	2.51657245	0.635589227	1.565767013	1.079728201	0.148003336	3.547955434	0.897947066	6.156320054	9.562201576	0.930445044	2.310295787	0	22.515347	15.470732
S578	20.9481	4.529669	0.1414213	8.30724219	7.2237768	3.99563605	0.1064835	0.20417285	0.0841577	3.79157684	0.7247451	1.104582	3.365931846	2.4213835	1.558591631	1.49075119	1.16542601	0.199694558	0.866270833	1.335066013	6.340472675	1.734281123	0.594905886	2.899657624	0.121765	11.3733416	16.490457
S847	20.0808	4.10249	0.1991097	10.6191241	2.9264813	2.23749537	0.1015708	2.70944068	0.3032275	3.27701397	1.061653	0.555848	3.73307057	0.46624858	0.514933228	2.160340367	1.157325211	0.585050701	2.430797722	0.506485348	2.58013002	3.465338601	0.817179436	2.518737849	0.174221	21.2620209	9.9554855
S865	26.3868	1.411012	0.184045	16.2291543	2.5811695	1.88427007	0.1072982	1.54241385	0	1.88427007	1.1215176	0.521461	1.695843097	0.12269665	0.503630301	1.162550822	0.184044975	0.201222516	0.495168646	0	6.428253288	0.932494572	0.460112945	0.73617993	0.3461799	2.10252984	26.292141
S884	26.0663	0.978307	0.0909407	16.747688	5.8559309	2.00769432	0.0529974	1.27480079	0.0515126	0.60603106	1.803548	0.515126	0.545427968	1.36270413	0.77519736	2.711556232	0.385262584	1.12167694	4.171225326	0.581789838	5.430211627	0.863161375	1.757057225	6.572406701	0.0259728	11.0608266	8.2073923
S1531	23.6192	1.46698	0.6874409	2.12175455	1.3108406	0.52717135	0	0.22551219	0	0.54913683	0.3268462	0.356939	0.988446315	0.96648081	0.425581036	0.697403776	0.751140713	0.090058439	2.03180626	1.09827365	1.013706595	5.516471628	1.193808384	24.08749221	0	20.5336044	9.4137741
S1708	41.1812	1.080932	0.3163685	9.69384078	3.7212345	1.53875714	0	0.107361934	0.1627663	0.95744889	0.5698736	1.17812	1.723408045	0.37203727	0.09984244	0.880852982	0.608663908	0.314043235	2.887392298	0	2.116235646	1.986022566	0.659271933	9.559442972	0.0136778	13.9774409	7.0577664
S1914	8.07727	2.16298	0.0201207	9.60930263	2.7896944	1.05432708	0.0410564	0.84985561	0.0633804	1.44196878	0.2794369	0.248156	1.509055968	0.30985949	1.160631669	1.33937099	0.794769485	0.153990775	0.551982459	3.871365788	3.807515939	0.835010977	0.450033999	0.2883974	6.87389532	48.28979	0
S1922	15.5441	1.458486	1.974638	7.23687077	3.456372	3.34548212	0.0225743	2.30707477	0.0348488	0.12906953	0.5377553	0.16779	0.813138041	1.77083389	0.649219707	6.847138371	0.174243852	0.910198306	5.188594961	0	0.603012822	8.89547173	1.241648887	1.787612983	0.6453476	18.790742	15.488343
S1969	16.1922	0.201677	0.3109856	16.0529933	2.9780133	0.66822245	0	0.741614871	0	2.89070072	0.5601775	0.55125	0.847042562	1.65643873	0.477973997	2.550539212	2.016767943	0.948149842	1.750554572	0	0.793799868	6.422733632	1.000316903	8.106062325	0.6857011	24.9215247	0
S1972	19.3898	8.238393	0.3864041	3.97944589	3.7930233	1.11735191	0	0.97935065	0.6045614	3.46153687	2.0603068	0.209302	0.104310835	4.32772623	1.616457185	2.33291485	0.338103586	0.369659938	1.811269293	0.359033827	2.330016881	2.241143903	9.00321589	7.179871303	0.1127012	22.7495377	0
S2146	9.23337	0.077639	0.2620324	5.39939452	3.9931597	1.49843695	0.1188171	1.73471897	0.5633696	0.67934317	1.241917	0.164983	0.611408875	0.0892851	0.478451683	0.645376024	0.625966238	0.222824561	0.303752538	0.782700417	3.961735366	1.370332248	1.612954825	2.200101241	0.0776392	6.91381774	52.406473
S2148	9.97896	3.13624	1.7079871	23.9770264	4.5574205	1.30255456	0.0507226	1.71928364	0.3028522	1.78148365	1.0603391	0.526159	0.520261655	0.43257267	0.758994878	0.852626352	0.693950046	0.584326641	2.601794733	1.263196195	1.049998174	5.83498038	1.07054738	13.85828505	0.0952887	10.3372746	9.9431646
S2213	29.8143	1.70322	0.1633903	7.28824091	8.8977269	1.11402491	0.0606178	1.77002879	0.0168342	0.34658553	1.267196	2.054757	1.916122875	0.31885869	1.642320253	4.415499594	1.203146094	0.698320327	0.292122085	1.386342104	1.445954815	8.196252497	3.881262787	3.539628357	0.5050246	4.17931319	11.882932
S2216	12.8107	0.840641	0.2795514	4.9915076	8.4586687	1.48602417	0.1302319	4.60054076	0.426022	4.20171471	3.1656463	0.781838	2.058308385	1.09774647	1.636009397	1.52431829	0.297843063	0.244231316	1.288171283	0.356347946	1.611800731	1.650901593	0.3094908596	1.814715207	0.3776225	9.31385788	31.911757
S2221	37.9924	0.279654	0.0364766	4.88426919	3.2925196	0.68940813	0.1488661	0.95439051	0.4444068	0.85112115	1.5559468	0.601864	2.352742075	0.34044845	0.155633583	0.026884235	0.784247378	0.279167737	1.66576568	0.185422818	1.084814721	1.139286451	0.415833466	0.75385014	0	0.60794368	36.476621
S2269	21.457	3.52415	0.5873108	10.0330194	7.7300493	0.58376614	0.0875251	0.86940903	0.0121154	1.53223894	0.9119887	0.748303	0.448981656	0.47187707	0.998449626	2.17506673	0.114027709	0.502574376	1.961265842	0.281860697	1.004863704	2.378177407	0.172645959	21.2093542	0.0391968	11.6136587	8.5520313
S2270	15.5361	1.120755	1.1453119	7.12803044	2.3224951	0.70641883	0.0631752	0.4050341	0.4386092	2.03824278	1.5356482	0.768856	1.834418465	0.84832181	1.068914631	4.161114458	0.332827009	0.66854365	2.164665439	0.013932291	2.714216991	4.946995783	1.761660983	3.551186529	0.0051601	36.5272828	6.19213
S2289	13.7479	0.690637	0.4794507	6.64957258	0.84822599	0.30479369	0.0199657	4.60896765	0	2.45433121	0.4756151	0.395958	2.208898128	0.26483945	2.209468826	0.407533127	0.062785215	0.805020641	1.366434626	0.062785215	2.209126422	5.184917394	0.561642295	1.533671528	0.0399542	10.5631713	34.246482
S2345	26.006	3.584599	0.0259128	2.91967001	2.8248192	2.4565298	0	1.05372808	0.0146839	0.30231555	0.3598764	0.272084	1.671373152	3.31510605	0.984684931	1.439885799	0.02591276	1.98319002	1.615228801	0	1.580678449	6.206106364	0.887080232	26.89960325	0.1857081	10.1730532	4.4569952
S2429	23.0014	0.30473	0.056892	13.5805489	4.3572963	1.10192618	0	2.35346038	0	1.16994632	1.2793445	0.125157	1.052951705	2.17882098	1.434952741	0.461929752	0.816241616	0.892424146	2.004145258	0.580347787	2.391587976	1.794099102	0.558853445	7.512143268	0.3890752	1.21697268	29.384698
S2452	7.24842	0.484504	0.1080654	2.29562142	2.2917426	0.77761373	0.0368434	1.07581937	0.0162504	1.29401665	0.7701987	0.222691	1.164615011	0.39843676	0.247797774	1.188388794	0.126392319	0.069094471	0.972017167	0.056876546	0.461753289	0.600602605	0.058465282	1.161304625	0.0270841	33.507414	43.34511
S2468	23.6724	1.265863	0.3298713	7.14568214	4.6614663	0.30978266	0.0137515	1.40539638	0	1.69043693	0.1637917	0.357744	1.521394549	0.29248514	0.445017718	3.49331052	0.106143798	0.090261546	1.467143248	0.07705254	0.524586262	0.783891644					

Suplemento 10. Tabla de contribución normalizados a través de z-scores

folio	G1-Milk	G2-Yogurt	G3-Cheese	G4-Fruit	G5-Vegetables	G6-Legumes	G7-Avocado	G8-Maize	G9-Chillies	G10-Rice	G11-Egg	G12-Fish	G13-Chicken	G14-Sausages	G15-RedMeat	G16-SweetBre	G17-IndCerea	G18-Potato	G19-Flours	G20-GrainsCe	G21-Mexican	G22-FastFood	G23-SaltySnac	G24-Desserts	G25-Dressing	G26-SweetBer	G27-Water
S117	0.3093678	0.8995788	0.1932307	0.4363611	0.8126044	0.5486887	0.4871234	1.312739	0.9401245	0.1633999	0.2341325	-0.4007333	-0.0666183	-0.3418659	-1.28508	-0.1754128	-0.2427166	0.5006106	-0.7561399	0.1340655	-0.9134046	0.6793544	-0.012998	-0.7082182	0.3233133	1.129884	-1.133051
S134	-1.630348	-0.8815286	-0.6679521	0.4443498	0.8992141	-0.1262129	-0.2381552	1.150974	1.259821	0.068616	0.1368751	-0.7500133	-0.1817815	-0.667149	-0.3349738	-0.7831072	-1.037153	-1.075522	-1.117138	-0.8395283	0.5334657	0.5779318	-0.497938	-0.8250176	-0.0304043	0.8673686	0.7250957
S179	0.2715441	0.1923668	-0.2444605	-0.4282054	-1.516798	-0.9804038	-0.7124673	-0.5158892	-0.6990264	-0.0747837	-0.0102666	-1.242104	-0.3560132	-0.7678769	-0.9645053	2.334966	0.3122752	0.233783	-0.3638485	-0.1466582	-0.7096909	-1.242091	-0.1530267	-0.3319869	-0.8788882	-0.666191	1.198839
S201	-1.387493	-0.0385061	0.5323445	1.314896	2.092306	0.7453896	0.1780148	-0.0842038	-0.6247977	-1.307541	-0.5153072	-0.4414586	0.9098106	1.057472	-0.715809	-0.1628376	0.5395099	1.400897	0.7755396	2.038706	-0.1487301	-0.5749919	0.3266387	0.1092278	0.5887575	-0.9605678	0.5258706
S329	-0.014974	0.2296064	0.0545586	-0.538678	-0.979246	-0.1635352	2.7227	0.4945388	0.9310488	-0.042979	-0.8527321	-0.2961199	-0.3173703	-0.425315	0.7002851	0.2439613	-0.3878649	0.2694125	-0.0313281	-0.6343843	-0.8149784	-0.9523832	-0.3378503	-0.354223	-0.0992093	-0.7200841	-1.273936
S339	0.3408889	0.4735775	0.1987354	-0.5010929	-1.098375	-1.111812	3.25277	0.6468228	-0.6508423	-1.067181	-0.7819285	1.19874	-0.0598644	-0.3998557	-0.7754187	-0.7526284	1.616694	-0.608694	0.2359621	-0.7308884	-0.4527804	-0.0914095	-0.3624154	0.5437602	1.1796598	-1.16592	0.9027901
S402	0.4800744	-0.0413871	1.407572	1.789913	1.345057	1.239121	-0.8756217	0.3984634	-0.5928993	2.365589	0.3455878	-0.6861033	0.0653567	-0.5285052	-1.474253	-0.9293566	-1.277244	0.6222942	2.014043	1.472889	0.3374239	-1.212114	-0.6239333	-0.5370593	0.0950071	-1.359878	-0.1579032
S573	-0.2602101	0.5611151	-0.773245	-0.9547192	-0.3013071	0.5852217	-1.037272	-0.8756217	-1.037272	-0.065957	-0.8122801	0.830807	-0.757543	1.515551	-0.2767005	-0.2144204	1.253538	-0.641834	1.24453	1.096253	2.154557	-0.734987	-0.1909022	-0.5376252	-0.8788882	0.8019572	-0.621325
S578	0.3417122	-0.5032235	-0.7607574	-0.1926224	1.2406668	0.3538773	0.8516433	0.2642571	0.4358093	0.7005266	-0.0284836	1.734521	2.676703	1.416244	1.491	-0.270932	1.446908	-0.467212	2.049625	2.424586	-0.5828722	-0.3541639	-0.4457541	-0.1303658	-0.36452	0.5526702	
S847	0.2406381	0.8183032	-0.6317623	0.2242175	-0.6307606	1.424124	-0.7690898	0.5962512	0.5465753	1.954046	0.5464281	0.2531879	3.162447	-0.484369	-1.471099	0.2030985	1.423178	0.8415657	0.3672863	0.2301282	0.4284273	0.1458014	-0.1957276	0.5061548	0.1902326	0.660912	-0.103279
S865	0.9540774	-0.5232676	-0.6642308	1.251157	-0.7772527	1.007894	0.8671778	-0.1733011	-0.6990264	0.5736291	0.6505668	0.1649989	0.4318132	-0.817255	-0.4800848	-0.5034878	-0.846485	-0.4610991	2.33051	-0.8789591	2.402246	-0.9210319	0.4504266	-0.7891594	1.252008	-1.329377	0.138825
S884	0.9117292	-0.7410423	-0.8745771	1.338813	0.6434625	1.150899	-0.016704	-0.3528999	-0.4872388	0.7038404	-0.9654667	0.1448433	-1.120322	0.3863563	-0.0125156	0.5965172	-0.3775203	2.66905	1.717356	0.3961318	1.923028	0.9511626	0.4854466	0.1391429	-0.7193662	0.3980622	-1.135453
S1531	0.6358702	-0.4974925	0.4648636	-1.317539	-1.332301	-0.6249033	-0.8756217	-1.048371	-0.6990264	-0.7609895	-0.7143797	-0.281892	-0.5256398	0.0008664	-0.6844983	-0.8366097	0.4754153	-0.8410864	0.0584256	1.52601	0.6994299	1.010718	0.0741178	2.922527	-0.8788882	0.5853999	-1.051294
S1708	2.603818	-0.6894901	-0.3674659	-0.4372639	-0.2834513	0.5895367	-0.8756217	-0.485861	-0.0294971	-0.3532943	-0.2960453	-0.7631154	0.4650116	-0.5752615	-1.308182	-0.705373	1.144915	-0.1134994	-0.4768457	-0.8789591	-0.1134994	-0.4768457	-0.3081661	0.6151538	-0.7948381	-0.0939597	-1.215949
S1914	-1.095211	-0.1492851	-1.03368	0.0421664	-0.689343	0.0074952	-0.2103597	-0.6346121	-0.4384971	0.1286206	-0.7954045	-0.5740896	-0.1751859	-0.6358678	0.7249925	-0.379725	0.57846	-0.6234067	1.237045	-0.6011958	0.9904539	0.2911673	-0.1825562	-0.8349587	0.8920726	-0.8337056	1.679111
S1922	-0.2638531	-0.5007923	3.361484	-0.3877592	-0.407748	2.756711	-0.5096099	0.3318166	-0.556892	-1.178913	-0.3513019	-0.7901464	-0.7598355	0.7833249	-0.2545085	3.540292	-0.8701501	1.590855	2.507298	-0.8789591	-1.025622	2.400414	0.1094046	-0.622011	3.086456	0.4067965	-0.6236055
S1969	-0.1937027	-1.129203	-0.380527	1.210135	-0.6083844	-0.4559192	-0.8756217	3.712587	-0.6990264	1.569552	-0.3140216	2.4008187	-0.7156915	0.6701395	-0.5841339	0.4804127	3.428541	2.075867	-0.1592926	-0.8789591	-0.8324761	1.392868	-0.064574	0.3820356	3.328971	1.041414	-1.711907
S1972	0.163455	2.88318	-0.2111627	-0.980481	-0.2544925	0.0821535	-0.8756217	-0.5528242	1.784399	2.137701	2.259954	-0.6790583	-0.490941	3.261342	1.59664	0.3257471	-0.4883367	0.109377	-0.1122931	-0.092757	0.0969529	-0.3704139	5.666688	0.2348034	-0.1872884	0.8156906	-1.711907
S2146	-0.9699906	-1.191092	-0.4898877	-0.7218949	-0.1659054	0.5404504	1.050223	-0.0480014	1.617438	-0.6307933	0.8578016	-0.7978489	-1.031504	-0.849947	-0.5823337	-0.8731402	0.1847605	-0.3890321	0.8633171	0.836641	1.027717	-0.3730542	0.3752876	-0.5564672	-0.4019862	-0.8293381	1.969298
S2148	-0.8867872	0.3371949	2.759844	2.651473	0.0790635	0.3053268	-0.0536026	-0.0583929	0.5460653	0.4670266	0.5456824	0.1744955	-1.151833	-0.516731	-0.0446342	-0.7257906	0.3433132	0.8407515	0.5013259	1.889446	-0.727119	1.147066	-0.0136428	1.298266	-0.2936569	-0.4733626	-1.013565
S2213	1.331153	-0.3787051	-0.7116122	-0.3788248	1.965891	0.0794905	1.0609204	-0.0245766	-0.6298063	-0.9622455	0.9012614	4.290989	0.7233338	-0.6270335	1.6493	1.80895	1.532877	1.228962	-1.288046	2.159823	-0.497018	2.144147	2.001365	-0.343311	2.223307	-1.13789	-0.8771938
S2216	-0.5698933	-0.8097495	-0.454046	-0.7958888	1.775326	0.5257314	1.235436	1.851602	1.052855	2.878847	4.16232	0.8633657	0.9147748	0.1293481	1.63743	-0.2477684	-0.3161148	-0.5516378	-0.673508	-0.0978076	-0.673508	-0.6185645	1.437824	-0.6177627	1.440089	-0.5795813	0.5298902
S2221	2.2465	-1.090103	-0.9968811	-0.8152316	-0.4700797	-0.4295326	1.537784	-0.5650074	1.128736	-0.4593955	1.397805	0.3789478	1.311295	-0.6059955	-0.2012223	0.110005	0.5548917	-0.1970824	-0.2233581	-0.4724312	-0.7292619	-0.6834575	-0.4827883	-0.7865647	-0.8788882	-1.485297	0.8509618
S2269	0.3960758	0.5308177	0.240946	0.1191732	1.457429	-0.55671	0.5382376	-0.6216328	-0.2185723	0.2907447	0.7272348	-1.250117	-0.4786702	0.4142028	0.214667	-0.1010991	0.5624181	0.0049062	-0.2613083	-0.7474945	-0.319147	-0.6573489	-0.2467537	-0.6381823	-0.3407445	-1.111339	
S2270	-0.2660999	-0.6700588	1.494414	-0.4085364	-0.8925016	-0.4097217	0.1478868	-0.92937	1.103628	0.7221538	1.361087	0.8272712	0.6122719	-0.1133254	0.5488759	1.626572	-0.5002479	1.126561	0.1621373	-0.8484349	0.2991008	0.7716597	0.4831125	-0.34174	-0.8472064	2.249502	-1.277149
S2345	-0.464973	-0.8846925	-0.0009811	-0.4946035	1.785868	0.8909022	-0.5519527	1.857425	-0.6990264	1.138028	-0.458184	-0.2736673	1.117562	-0.6794462	0.3737998	-1.042289	-1.500278	1.592448	-0.4554324	-0.7413167	-0.0438037	0.8734077	0.3827204	-0.6624675	-0.6334257	-0.4352525	0.6940919
S2349	0.9024804	0.5997426	-1.020704	-1.172766	-0.6749042	1.686535	-0.8756217	-0.5000047	-0.6387077	-1.006649	-0.6577053	-0.9101684	-0.3491923	2.79098	0.3864723	-0.3089281	-1.216781	-0.4730709	-0.2640848	-0.8789591	-0.3564055	1.301521	-0.1456682	3.369555	0.2607244	-0.4352008	-1.399137
S2425	0.5682656	-1.07767	-0.9510652	-0.7828778	-0.0084488	0.0643918	-0.8756217	0.3614032	-0.6307067	-1.1424685	-0.9211463	-0.5052348	-0.3982508	1.178011	1.250463	-1.003737	0.628354	1.888087	0.0378576	0.3925619	0.10205117	-0.5585107	-0.3805504	0.2882732	1.510002	-1.422012	0.3512916
S2452	-1.19222	-0.9878545	-0.8360705	-1.285742	-0.9057763	-0.3243037	-0.278667	0.484949	-0.6322324	-0.0188405	0.0471364	-0.6426796	-0.2800419	-0.549915	-1.068842	-0.4871583	-0.9821514	-0.9122089	-0.7615081	-0.7543375	-1.069636	-1.062268	0.7197065	-0.7218283	0.7125846	1.935799	1.33093
S2468	0.6418198	-0.5979015	-0.3381161	-0.4060014	0.122601																						

Suplemento 11. Tabla con información sobre la calidad de los ensambles

Assembly	SampleID	# contigs >= # contigs	>= # contigs	>= # contigs	>= # contigs	>= # contigs	>= # contigs	Total length	Total length	Total length	Total length	Total length	# contigs	Largest contig	Total length	GC (%)	N50	N75	L50	L75	# N's per 10G	Assembly (overall)	totalnumgen	AVlength	genes
2600contigsf S2600	16601	2587	129	84	36	14	15528656	6341543	2809255	2515029	1750243	982122	16601	100464	15528656	50.38	848	620	4138	9576	0	87.85	130626	703.49	
2404contigsf S2404	12419	4227	703	332	56	8	20638314	15055476	8921060	6298570	2075443	474650	12419	76193	20638314	52.31	2864	943	1073	4663	0	88	195586	736.32	
1914contigsf S1914	15545	5100	503	216	30	9	21236731	14162918	6131317	4146157	1346200	660024	15545	98996	21236731	44.09	1651	820	2269	7050	0	87.27	108548	771.57	
2593contigsf S2593	25257	8507	720	176	17	5	32409052	22163200	6708033	3044233	815110	422229	25257	107996	32409052	46.83	1578	792	4447	12000	0	90.26	102141	798.8	
2753contigsf S2753	32686	9410	1107	494	126	33	45522134	29973705	15697701	11386140	5735788	2612026	32686	211467	45522134	48.54	1737	791	3743	14124	0	87.13	138229	770.75	
1972contigsf S1972	51021	16457	893	255	63	13	60628289	37298465	9525756	5272176	2468868	793320	51021	87691	60628289	46.13	1327	757	10352	25924	0	69.97	125828	744.77	
2270contigsf S2270	55438	19335	2468	1077	254	38	87053762	62628462	32006984	22411522	9898579	2670080	55438	187169	87053762	44.57	2335	914	5989	22123	0	86.37	128664	756.96	
2146contigsf S2146	55357	18049	1879	871	345	182	92339659	67113932	38804821	31847924	23988170	18204934	55357	390784	92339659	47	2689	931	3942	20270	0	77.06	81429	693.2	
201contigsfil S201	55188	20731	2433	987	308	95	93067710	69743736	35437734	25563289	15335614	7954486	55188	203097	93067710	47.15	2676	998	5553	20789	0	85.1	177916	726.3	
2632contigsf S2632	64277	21658	1326	624	342	157	97147503	68243335	32664218	28029561	23651447	17203095	64277	487151	97147503	47.42	1945	879	7014	26584	0	81.36	194268	764.34	
2527contigsf S2527	58374	18216	2632	1160	439	165	101520728	74663875	46102548	35985986	24908694	15217525	58374	613175	101520728	47.12	3593	949	3737	19733	0	88.54	107825	781.44	
1969contigsf S1969	81915	23445	2309	960	302	109	112974873	73713912	37044478	27705142	17911678	10986074	81915	486969	112974873	45.99	1691	789	9740	35939	0	88.02	20747	666.5	
2216contigsf S2216	54942	22437	3452	1336	411	161	114258522	92271128	54176594	39710284	25821133	17025991	54942	383177	114258522	45.85	4420	1307	4080	16661	0	87.15	192679	762.43	
2213contigsf S2213	56011	21396	2729	1223	516	258	117039226	93623983	58346878	48126958	37343992	28272829	56011	897637	117039226	47.67	4950	1234	2764	16123	0	87.15	175257	723.51	
2345contigsf S2345	54227	22231	3648	1610	505	187	117188334	95515231	59141396	45116542	28473994	17464383	54227	497229	117188334	45.69	5130	1361	3540	15656	0	87.35	122759	774.45	
573contigsfil S573	68444	25677	3082	1468	451	135	119328242	90180518	49566696	38317386	22847564	12178188	68444	831188	119328242	46.37	2863	1017	5827	24999	0	89.15	95873	717.4	
2627contigsf S2627	64682	19745	2564	1487	652	257	119813504	89679732	60328934	52754977	39574168	25680230	64682	604410	119813504	46.54	5212	1994	2482	19927	0	84.68	30855	633.97	
1922contigsf S1922	61121	20012	2656	1588	790	352	126513703	98876196	68273024	60902986	48301159	32799298	61121	666385	126513703	45.93	7940	1139	1851	16265	0	88.65	16375	501.77	
2971contigsf S2971	57793	23156	3552	1587	618	270	127226005	103777041	66014694	52519801	37764723	25618498	57793	495421	127226005	47.01	5596	1357	3099	15930	0	92.8	161459	716.84	
847contigsfil S847	69627	27980	3286	1389	407	159	132732200	104442833	57709021	44722915	30094971	21587270	69627	529107	132732200	45.86	3446	1146	5395	23404	0	93.51	132144	781.29	
2883contigsf S2883	63144	24340	4024	2021	642	186	133344429	106926704	69426314	54899495	34402888	18747539	63144	531166	133344429	47.65	5771	1247	3510	18127	0	90.69	110994	742.69	
2468contigsf S2468	67979	26416	3027	1565	672	268	133707746	105187397	63016917	53072439	39253631	25020276	67979	651557	133707746	47.11	4009	1138	3886	21817	0	88.08	92934	667.42	
2967contigsf S2967	70815	27170	3225	1606	581	220	135345812	105473635	62774688	51597651	35835122	23379106	70815	622211	135345812	47.58	3730	1107	4366	23399	0	91.87	140810	788.08	
2927contigsf S2927	89783	30807	2826	1183	387	154	137216457	97345804	47433062	36276974	24368626	16219617	89783	718600	137216457	44.5	2068	892	9915	36799	0	81.23	175050	700.84	
117contigsfil S117	84088	29866	3183	1455	492	188	137821702	100907567	53168836	41410289	26698539	16092459	84088	351041	137821702	47.11	2433	947	7899	32393	0	76.67	169128	665.35	
2221contigsf S2221	76345	26092	3015	1420	594	253	137877686	103753220	62647185	51688120	39473911	27511957	76345	533620	137877686	47.66	3466	1007	4544	25749	0	54.04	43110	667.18	
2269contigsf S2269	69745	27645	3611	1760	622	213	138003841	109398299	64361388	51520286	33989823	19986320	69745	432886	138003841	47.56	4050	1180	4650	22009	0	86.54	139641	665.69	
339contigsfil S339	83418	31399	3226	1329	397	205	141391796	105942865	54762272	41664220	27776384	21277089	83418	502037	141391796	47.65	2565	997	7783	31501	0	90.47	149225	641.87	
2148contigsf S2148	85139	29049	4102	1771	471	141	143718410	105957277	59047552	43001595	23431537	12135834	85139	298954	143718410	46.65	2999	959	7447	30921	0	85.99	121964	782.39	
2608contigsf S2608	71474	27214	4300	2033	647	228	145668295	115765929	72613312	57014201	36002987	21530757	71474	661186	145668295	47.43	4939	1207	4345	21265	0	82.39	131933	663.65	
2817contigsf S2817	97316	35301	3230	1249	331	108	146243330	104070122	45833863	32257344	18495107	10915389	97316	370617	146243330	47.41	1997	901	12540	41217	0	90.81	126637	743.09	
1531contigsf S1531	72383	30568	5125	2058	489	148	149535633	121209338	70993485	49673869	26035769	14272366	72383	336522	149535633	49.1	4421	1308	5942	22601	0	83.33	114733	801.55	
402contigsfil S402	102218	34360	2113	1163	568	236	151735439	105619743	50367494	44047627	34374680	22551413	102218	471440	151735439	46.59	1837	870	11676	43151	0	84.06	147741	779.7	
2846contigsf S2846	106209	35159	3264	1271	356	135	151839532	103906848	46730517	33224401	19907842	12204136	106209	558256	151839532	48	1837	841	13734	40609	0	91.27	130144	725.88	
2663contigsf S2663	73255	25200	3463	1694	739	383	155002340	122575554	82874691	70748489	56168184	43603078	73255	556803	155002340	45.78	6655	1201	2529	19411	0	85.83	144440	669.25	
578contigsfil S578	75286	30280	4102	1958	728	282	155988328	125446309	75734957	61006797	42087278	26463374	75286	354165	155988328	47.54	4538	1258	4577	22737	0	80.09	108593	737.11	
179contigsfil S179	74098	27016	4157	2088	812	335	156203664	124442947	82073072	67773358	48125904	31709502	74098	463258	156203664	48.37	6055	1230	3434	20417	0	90.82	146038	757.88	
329contigsfil S329	84899	32337	5106	2402	646	187	164834952	128983647	78681447	59818750	32898488	17510012	84899	344155	164834952	47.03	4325	1131	5912	27292	0	77.42	119932	760.62	
2601contigsf S2601	95358	32651	4687	2055	606	226	169689064	127319067	75873583	57680890	35985154	23161717	95358	571141	169689064	47.71	3541	1000	6832	32599	0	91.97	236951	692.32	
2726contigsf S2726	114184	38965	4160	1821	557	171	175657476	124628566	63011165	46938203	27915622	14735598	114184	354228	175657476	44.22	2117	895	12269	46497	0	89.78	190784	781.06	
2452contigsf S2452	99884	36663	4594	2096	669	272	182226733	139287388	80835831	63575634	42088734	28752247	99884	541376	182226733	48.95	3394	1052	7113	34110	0	90.36	145459	773.5	
2680contigsf S2680	111903	42536	4255	1849	604	198	186204379	138879178	69052753	52694356	33762656	19771772	111903	395398	186204379	46.76	2443	987	11474	43316	0	88.15	18646	684.3	
2289contigsf S2289	103669	38959	4808	2017	646	273	189525540	145488671	82430114	63168363	42565903	29797760	103669	532028	189525540	47.13	3348	1063	7851	35713	0	86.03	117009	777.31	
134contigsfil S134	106406	44151	5587	2276	686	276	206012386	163612774	89923871	67274685	43347350	29257061	106406	506807	206012386	47.2	3543	1184	8713	35760	0	92.57	107863	659.05	
2429contigsf S2429	102955	42799	5879	2483	819																				

Suplemento 13. Tabla de taxa, especies y géneros, que contribuyen a la diferencia en la diversidad beta entre NP y SPOB (SIMPER).

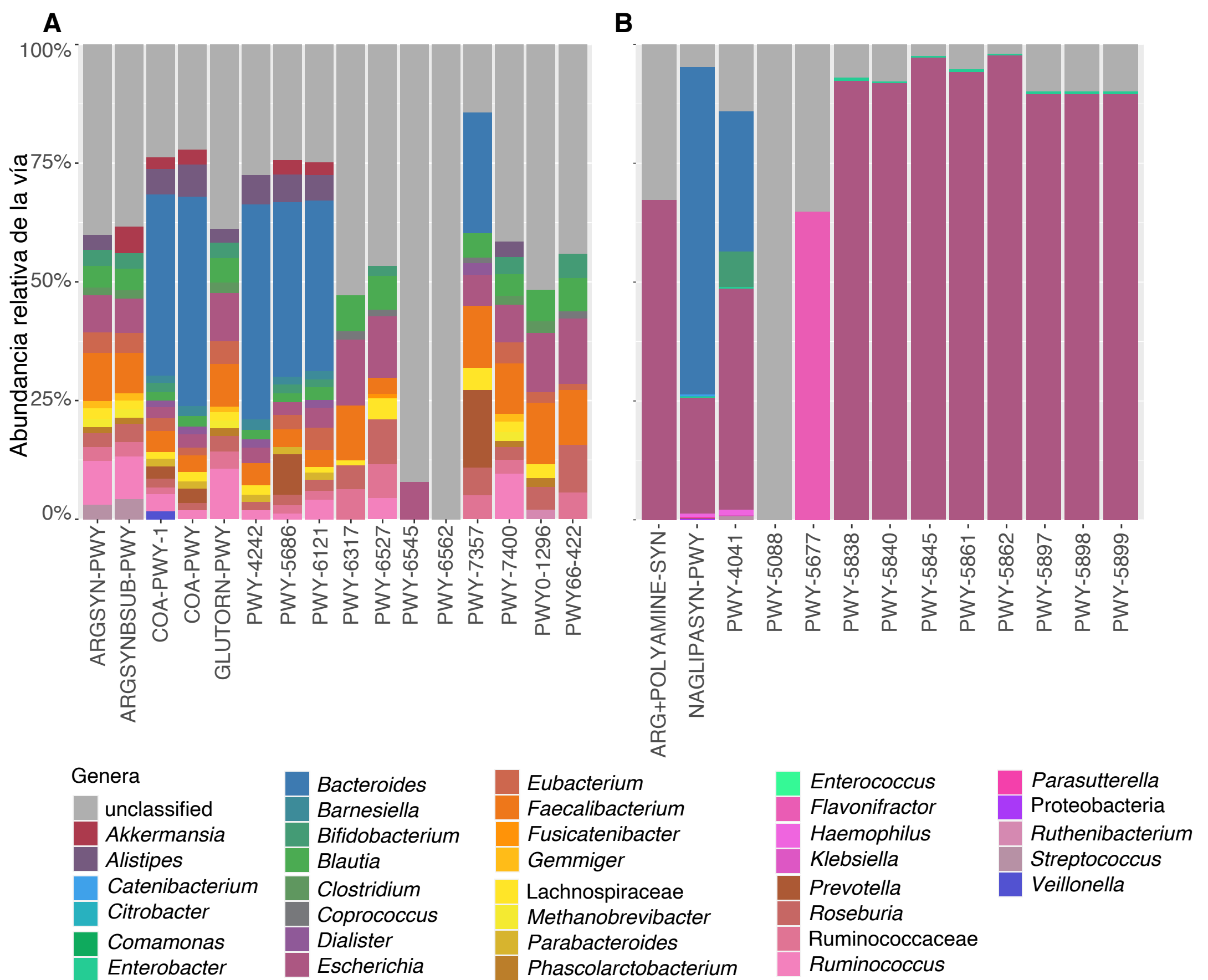
Taxa	Cumulative Relative Ab Taxa	Cumulative Relative Ab Taxa	Cumulative Relative Abundance
<i>Prevotella copri</i>	0.05639512	[<i>Eubacterium</i>] <i>siraeum</i>	0.43754507
<i>Bacteroides dorei/vulgatus</i>	0.09469867	<i>Ruminococcus</i> sp. CAG:177	0.45489865
<i>Bacteroides stercoris</i>	0.12424528	<i>Ruminococcus bicirculans</i>	0.46307388
<i>Bacteroides rodentium/uniformis</i> *	0.15170272	<i>Rikenellaceae</i> sp.	0.47121856
<i>Bacteroides cellulosilyticus/fragilis</i>	0.17562738	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	0.48728578
<i>Eubacterium</i> sp. CAG:202	0.19898182	<i>Barnesiella intestinihominis</i>	0.49515177
<i>Eubacterium</i> sp. CAG:180*	0.2209676	<i>Faecalibacterium</i> sp.	0.50239242
<i>Bacteroides caccae</i>	0.24095906	<i>Bacteroides caecimuris</i>	0.50961052
<i>Ruminococcus bromii</i>	0.25849825	<i>Bacteroides plebeius</i>	0.51682632
<i>Prevotella species incertae sedis</i>	0.27540254	<i>Firmicutes</i> sp.	0.52392848
<i>Alistipes putredinis</i>	0.29225987	<i>Alistipes shahii</i>	0.5307857
<i>Bacteroides</i> sp.	0.30876689	<i>Bacteroides coprocola</i>	0.53762254
<i>Dialister invisus</i>	0.32493854	<i>Parabacteroides merdae</i>	0.55100433
<i>Akkermansia muciniphila</i>	0.33908238	<i>Bacteroides fragilis</i>	0.55758635
<i>Bacteroides massiliensis</i>	0.353011	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	0.56388264
[<i>Eubacterium</i>] <i>rectale</i>	0.36521315	<i>Clostridium</i> sp. CAG:510	0.57597579
<i>Clostridium</i> sp. CAG:302	0.3768737	<i>Bifidobacterium longum</i>	0.58179301
<i>Proteobacteria</i> sp.	0.40918866	<i>Akkermansia species incertae sedis</i>	0.58756496
<i>Alistipes finegoldii/onderdonkii</i>	0.41935951	<i>Clostridium</i> sp. CAG:594	0.59331688
		<i>Bacteroides sp.</i>	0.59895415
		<i>Clostridium</i> sp. CAG:217	0.61009154
		<i>Bacteroides intestinalis</i> **	0.62093356
		<i>Clostridium</i> sp. CAG:343	0.62623611
		<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	0.64193336
		<i>Dehalococcoidales species incertae sedis</i>	0.63151148
		<i>Clostridium</i> sp. CAG:127	0.6367464
		<i>Ruminococcaceae species incertae sedis</i>	0.64704771
		<i>Roseburia inulinivorans</i>	0.65714674
		<i>Clostridium</i> sp. CAG:465	0.65211104
		<i>Clostridium</i> sp. CAG:567	0.66716776
		<i>Alistipes finegoldii</i>	0.67194751
		<i>Methanobrevibacter smithii</i> *	0.67654813
		<i>Firmicutes species incertae sedis</i>	0.68109163
		<i>Anaerotruncus</i> sp. CAG:528	0.68548795
		<i>Bacteroides eggertii</i> *	0.68972822
		<i>Roseburia species incertae sedis</i> *	0.69395928
		<i>Clostridiales species incertae sedis</i>	0.70223109

Suplemento 14. Tabla de genes anotados (representación en KOs).

KO_entry	Name	Definition	logFC	logCPM	F	PValue	FDR	Diferencia by represente d
K15907	K15907	fluoroquinol	4.402	5.316	20.845	0.000	0.002	UP
K02838	frf, MRFR, R	ribosome re	1.094	12.078	9.320	0.003	0.041	UP
K02864	RP-L10, MRP	large subuni	1.186	11.944	9.792	0.003	0.034	UP
K14731	mHb, chnC	epsilon-lact	1.414	9.023	8.652	0.005	0.051	UP
K00949	thk1, TPX1, T	thiamine py	1.549	11.710	11.700	0.001	0.017	UP
K09775	K09775	uncharacteri	1.715	10.331	10.579	0.002	0.026	UP
K01841	pepM	phosphono	1.793	8.446	8.914	0.004	0.045	UP
K03366	bactA, bactC	meso-lacta	1.971	4.421	10.554	0.002	0.030	UP
K19714	ldhB	3-deoxy-ald	2.022	4.427	10.660	0.002	0.029	UP
K16872	E2.3.1.207	beta-ketode	2.080	4.435	10.793	0.002	0.028	UP
K21400	orb8	2-amino-4-k	2.226	4.531	9.831	0.003	0.034	UP
K18284	K18284	adenosynth	2.291	4.467	11.953	0.001	0.018	UP
K03821	phbC, phaC	polyhydroxy	2.307	4.468	11.498	0.001	0.021	UP
K15363	FAN1, MTFM	fanconi-assc	2.330	4.472	11.566	0.001	0.021	UP
K15216	RRN3, TRF4	rRNA polyem	2.402	4.484	11.778	0.001	0.015	UP
K00587	ICMT, STE14	protein-S-isc	2.473	4.497	12.945	0.001	0.014	UP
K00814	GPT, ALT	alanine tran	2.486	4.498	12.018	0.001	0.018	UP
K07110	ramB	XTC family t	2.487	4.498	12.022	0.001	0.015	UP
K23160	wa58B, rfbU	GlcNAc tran	2.661	4.777	9.073	0.004	0.043	UP
K05499	cytR	Laci family t	2.676	5.493	8.991	0.004	0.044	UP
K01228	MKG5	mammoyl-ol	2.684	4.534	12.561	0.001	0.015	UP
K15311	plvG	polyketide b	2.722	4.544	12.737	0.001	0.015	UP
K03528	zipA	cell division	2.803	5.809	9.673	0.003	0.036	UP
K13070	pimF	putative gly	2.822	5.320	9.143	0.004	0.042	UP
K10917	aphA	PsstR family	2.844	4.941	9.720	0.003	0.035	UP
K22255	ATP8.1	ATPase inh1	2.857	4.572	13.606	0.001	0.011	UP
K10795	prfD	D-proline rei	2.877	4.778	11.360	0.001	0.019	UP
K00682	GGCT	gamma-gluc	2.897	4.582	14.437	0.000	0.002	DN
K19713	tsdA	thiosulfate c	2.966	4.719	11.890	0.001	0.016	UP
K21405	acor	sigma-54 de	2.972	4.751	12.096	0.001	0.015	UP
K18262	mhc	glucose-EpF	3.030	4.864	10.077	0.002	0.032	UP
K11940	hspQ	heat shock c	3.033	6.083	8.928	0.004	0.045	UP
K00143	LYS2	L-2-aminoac	3.050	4.618	13.564	0.001	0.011	UP
K14989	tsiR	two-compor	3.127	6.817	11.971	0.001	0.016	UP
K21206	pefA	polysacchar	3.146	4.838	11.908	0.001	0.016	UP
K13498	trpCF	indole-3-gly	3.185	7.696	10.179	0.002	0.030	UP
K01363	CTS8	cathelin B	3.188	4.647	13.794	0.001	0.010	UP
K04546	CLC	chloride chan	3.239	4.662	13.908	0.001	0.010	UP
K20179	VPS11, PEP5	vacuolar pro	3.508	4.735	14.474	0.000	0.008	DN
K23661	tscl	type III secre	3.599	4.766	15.272	0.000	0.006	UP
K08568	CTS2	cathelin N	4.262	5.005	15.800	0.000	0.005	UP
K02656	phf	type V phas	4.837	5.269	17.925	0.000	0.002	UP
K16906	K16906	fluoroquinol	5.019	6.684	19.739	0.000	0.002	UP
K15868	babB	bile acid-coe	5.087	6.446	17.150	0.000	0.003	UP
K16905	K16905	fluoroquinol	5.387	6.998	20.560	0.000	0.002	UP
K19161	yafN	antitoxin Yaf	5.831	7.197	27.412	0.000	0.000	DN
K21488	yobK	antitoxin Yob	-4.432	6.307	27.426	0.000	0.000	DN
K01414	prfC	oligopeptid	-5.292	7.108	32.832	0.000	0.000	DN
K19266	E1.2.1.22	lactaldehyd	-4.321	4.859	23.561	0.000	0.002	DN
K07728	K07728	putative tra	-4.148	4.800	22.977	0.000	0.002	DN
K18967	rgf1	diglycinate	-4.139	4.799	21.987	0.000	0.002	DN
K13942	hmdJ	5,10-meth	-4.128	4.793	23.174	0.000	0.002	DN
K17717	pld	phospholipa	-3.987	4.753	24.440	0.000	0.002	DN
K10738	acC	accessory co	-3.933	4.744	21.642	0.000	0.002	DN
K06061	RR81	ribosomal R	-3.923	4.860	25.111	0.000	0.002	DN
K11176	purO	IMP cycloly	-3.869	4.715	22.134	0.000	0.002	DN
K03413	cheY	two-compor	-3.794	11.959	34.839	0.000	0.000	DN
K05739	mgpD	hydrogenase	-3.768	4.687	21.772	0.000	0.002	DN
K23264	pur5	phosphoribo	-3.760	4.685	21.006	0.000	0.002	DN
K00368	nirK	nitrite reduc	-3.747	4.687	21.712	0.000	0.002	DN
K09139	K09139	uncharacteri	-3.740	4.680	23.004	0.000	0.002	DN
K07072	mfrF	[E-(4-12)-en	-3.729	4.677	21.931	0.000	0.002	DN
K19175	dptH	DNA phosph	-3.713	5.080	18.077	0.000	0.003	DN
K18974	suJ	dihydropter	-3.672	4.666	23.685	0.000	0.002	DN
K22447	ctf, ths	actin-like ch	-3.644	4.650	21.676	0.000	0.002	DN
K01001	ALG7	UDP-N-acety	-3.638	4.653	21.418	0.000	0.002	DN
K00021	HRMGCR	hydroxymet	-3.621	4.649	21.610	0.000	0.002	DN
K18975	ehv, qacAEd1	small multib	-3.617	4.653	23.157	0.000	0.002	DN
K16509	spaA	regulatory p	-3.607	5.506	16.305	0.000	0.003	DN
K22081	mgxA	methylamin	-3.557	4.634	21.277	0.000	0.002	DN
K18284	lprB	ribosyltrans	-3.516	4.624	21.241	0.000	0.002	DN
K02910	RP-131c, RPL	large subuni	-3.508	4.649	19.485	0.000	0.000	DN
K02243	comGA	competence	-3.455	4.775	20.232	0.000	0.002	DN
K07765	M8P52	S2P endope	-3.450	4.608	20.954	0.000	0.002	DN
K01512	aypE	acylphospha	-3.449	10.520	27.566	0.000	0.000	DN
K22223	pgp	phosphogly	-3.428	4.885	16.593	0.000	0.003	DN
K14094	ehaC	energy-com	-3.411	4.600	20.860	0.000	0.002	DN
K01170	endA	RNA-intera	-3.390	4.595	20.737	0.000	0.002	DN
K06875	POCD5, TFAR	programmei	-3.349	4.586	20.567	0.000	0.002	DN
K14096	ehaE	energy-com	-3.316	4.579	20.489	0.000	0.002	DN
K12243	pcrR	AraC family	-3.288	4.577	19.535	0.000	0.003	DN
K09738	K09738	uncharacteri	-3.282	4.571	20.296	0.000	0.003	DN
K00340	nuoK	NADH-quin	-3.262	11.259	40.744	0.000	0.000	DN
K02709	pbH	phosphotest	-3.254	4.566	19.315	0.000	0.003	DN
K03167	top6B	DNA topois	-3.250	4.760	17.187	0.000	0.003	DN
K22224	acdB	acetate-Co	-3.238	4.563	21.686	0.000	0.002	DN
K02966	RP-519e, RPL	small subun	-3.235	4.562	20.072	0.000	0.003	DN
K14168	CTU1, NCG5	cytoplasmic	-3.228	4.560	20.923	0.000	0.003	DN
K03166	top6A	DNA topois	-3.164	4.836	14.378	0.000	0.007	DN
K00584	mtH	tetrahydrom	-3.151	4.918	12.927	0.001	0.011	DN
K03299	TC-GNTP	glucosylate-P	-3.147	12.010	31.230	0.000	0.000	DN
K00094	E1.1.1.251, g	galactidol-L	-3.141	4.790	16.076	0.000	0.004	DN
K16793	alsE	methanogen	-3.130	4.542	18.855	0.000	0.003	DN
K14097	ehaF	energy-com	-3.125	4.541	19.634	0.000	0.003	DN
K17884	E2.18.2.9	archaealdehy	-3.121	4.538	19.607	0.000	0.003	DN
K02530	lacR	Deaf family	-3.112	5.270	13.206	0.001	0.010	DN
K06914	mfnD	tyramine-L	-3.106	4.537	18.764	0.000	0.003	DN
K12178	ada-1, mnt1	autotranspe	-3.068	4.456	11.539	0.000	0.003	DN
K14080	mtaA	[methyl-CoI	-3.063	4.529	19.389	0.000	0.003	DN
K21306	agIB	dolichyl-pho	-3.048	4.526	18.539	0.000	0.003	DN
K14085	ehaD	energy-com	-3.029	4.523	19.194	0.000	0.003	DN
K04480	mtaB	methanol-co	-3.024	4.522	19.309	0.000	0.003	DN
K16792	alsD	methanogen	-3.021	4.521	19.340	0.000	0.003	DN
K14109	ehaR	energy-com	-2.993	4.516	19.122	0.000	0.003	DN
K02029	RP-144c, RPL	large subuni	-2.921	4.504	18.776	0.000	0.003	DN
K09728	K09728	uncharacteri	-2.921	4.504	18.857	0.000	0.003	DN
K08093	hntA	3-hexose-t	-2.914	5.319	10.351	0.002	0.029	DN
K11600	RRM1, EXOS	exosome-co	-2.899	4.500	18.724	0.000	0.003	DN
K00537	arsC	arsenate red	-2.892	11.295	31.761	0.000	0.000	DN
K14587	sgtE	protein sgtE	-2.859	4.496	19.456	0.000	0.003	DN
K04797	pfkA, PFND5	prefoldin alg	-2.836	4.490	18.653	0.000	0.003	DN
K02877	RP-115c, RPL	large subun	-2.826	4.669	14.508	0.000	0.006	DN
K04802	PCNA	proliferating	-2.825	4.488	18.225	0.000	0.003	DN
K19665	psaA	archaealdehy	-2.810	4.485	18.240	0.000	0.003	DN
K00264	msvA	hydroxymet	-2.796	5.064	9.879	0.003	0.034	DN
K14108	ehaQ	energy-com	-2.795	4.483	18.293	0.000	0.003	DN
K22579	rph	rifampicin p	-2.788	4.718	13.348	0.001	0.010	DN
K08971	K08971	putative me	-2.743	4.475	17.292	0.000	0.004	DN
K01058	pldA	phospholipa	-2.743	9.597	16.817	0.000	0.003	DN
K07101	K07101	uncharacteri	-2.709	5.021	9.830	0.003	0.034	DN
K11212	cofD	LPG-FD-2-p	-2.705	4.681	11.986	0.001	0.016	DN
K09776	K09776	uncharacteri	-2.697	4.468	17.095	0.000	0.004	DN
K00579	mtc	tetrahydrom	-2.694	4.595	14.487	0.000	0.006	DN
K07463	K07463	archaea-spe	-2.677	4.539	17.236	0.000	0.003	DN
K18214	trbB	putative-ina	-2.671	9.120	14.714	0.000	0.006	DN
K18320	IS15, IS26	transposase	-2.656	6.329	9.092	0.004	0.043	DN
K07799	mdsA	membrane f	-2.593	5.585	8.838	0.004	0.047	DN
K13125	rip	major intrac	-2.573	4.453	17.292	0.000	0.004	DN
K07739	ELP1, KAP1	elongator co	-2.541	5.801	9.278	0.003	0.041	DN
K22227	ahbD	AdaMet-dep	-2.525	4.749	9.587	0.003	0.037	DN
K22397	yHh, yagE	2-dehydro-3	-2.524	4.877	9.873	0.003	0.034	DN
K07467	rtkA1	tyrosine recip	-2.488	11.141	22.980	0.000	0.002	DN
K00442	rhdD	coenzyme F1	-2.468	4.476	18.383	0.000	0.003	DN
K05937	K05937	uncharacteri	-2.418	4.432	16.135	0.000	0.005	DN
K05698	K05698	uncharacteri	-2.362	5.971	8.425	0.005	0.056	DN
K03264	E1F6	translation i	-2.348	4.608	9.930	0.002	0.034	DN
K00320	mer	5,10-methyl	-2.336	4.648				

Suplemento 15. Tabla de vías sobre y sub-enriquecidas determinadas con la prueba de Fisher.

path	allFreq	myFreq	pathInt	pathNoInt	backInt	backNoInt	pval	bonferroni	bh	Representat ion NW vs OWOB
ABC transporters	83	3	3	80	74	2774	0.37327499	1	0.46964551	over
Apoptosis	3	2	2	1	75	2853	0.00200939	0.0221033	0.00736777	over
Butanoate metabolism	24	2	2	22	75	2832	0.12979932	1	0.27068601	over
Chromosome and associated proteins	26	2	2	24	75	2830	0.14790293	1	0.27068601	over
Enzymes with EC numbers	122	4	4	118	73	2736	0.4000396	1	0.46964551	over
Exosome	24	3	3	21	74	2833	0.0237308	0.26103878	0.06525969	over
Lysosome	9	3	3	6	74	2848	0.00130709	0.01437797	0.00718899	over
Membrane trafficking	8	3	3	5	74	2849	0.00088814	0.00976954	0.00718899	over
Peptidases	55	2	2	53	75	2801	0.42695046	1	0.46964551	over
Transcription factors	83	4	4	79	73	2775	0.17225473	1	0.27068601	over
Transporters	284	3	3	281	74	2573	0.98421195	1	0.98421195	over
Chaperones and folding catalysts	31	3	3	28	166	2734	0.26382009	1	0.42320006	under
DNA repair and recombination proteins	46	2	2	44	167	2718	0.75407444	1	0.86578918	under
DNA replication proteins	15	3	3	12	166	2750	0.05133777	1	0.18308884	under
Energy metabolism	18	7	7	11	162	2751	3.47E-05	0.00107624	0.00053812	under
Enzymes with EC numbers	122	5	5	117	164	2645	0.84382502	1	0.90201985	under
Ether lipid metabolism	4	2	2	2	167	2760	0.01836051	0.56917579	0.11383516	under
Folate biosynthesis	15	2	2	13	167	2749	0.21290617	1	0.41250571	under
Function unknown	98	7	7	91	162	2671	0.33489834	1	0.45138472	under
Glycerolipid metabolism	15	2	2	13	167	2749	0.21290617	1	0.41250571	under
Glycerophospholipid metabolism	15	4	4	11	165	2751	0.0088208	0.27344465	0.07847071	under
Glycolysis / Gluconeogenesis	18	2	2	16	167	2746	0.27846123	1	0.42320006	under
Glycosyltransferases	24	3	3	21	166	2741	0.15738499	1	0.34849533	under
Glyoxylate and dicarboxylate metabolis	19	2	2	17	167	2745	0.30033553	1	0.42320006	under
Lipid biosynthesis proteins	17	2	2	15	167	2747	0.25654577	1	0.42320006	under
Lysine biosynthesis	10	2	2	8	167	2754	0.10969305	1	0.26157573	under
Methane metabolism	37	15	15	22	154	2740	4.33E-10	1.34E-08	1.34E-08	under
Nucleotide excision repair	5	2	2	3	167	2759	0.02944864	0.91290799	0.15215133	under
Peptidases	55	3	3	52	166	2710	0.62370322	1	0.80561666	under
Porphyrin and chlorophyll metabolism	31	3	3	28	166	2734	0.26382009	1	0.42320006	under
Prokaryotic defense system	45	2	2	43	167	2719	0.74305535	1	0.86578918	under
Purine metabolism	33	3	3	30	166	2732	0.29590391	1	0.42320006	under
Pyruvate metabolism	29	4	4	25	165	2737	0.08221778	1	0.21239593	under
Replication and repair	13	3	3	10	166	2752	0.03510594	1	0.15546916	under
Ribosome	26	4	4	22	165	2740	0.05906092	1	0.18308884	under
Ribosome biogenesis	33	6	6	27	163	2735	0.01012525	0.31388286	0.07847071	under
Secretion system	75	3	3	72	166	2690	0.81781991	1	0.90201985	under
Terpenoid backbone biosynthesis	8	2	2	6	167	2756	0.07357207	1	0.20733946	under
Transcription factors	83	4	4	79	165	2683	0.71554804	1	0.86578918	under
Transfer RNA biogenesis	37	5	5	32	164	2730	0.0586114	1	0.18308884	under
Transporters	284	7	7	277	162	2485	0.99825834	1	0.99825834	under
Two-component system	91	3	3	88	166	2674	0.90508105	1	0.93525042	under



1. The first part of the document discusses the importance of maintaining accurate records in a business setting. It highlights how proper record-keeping can lead to better decision-making and financial stability. The text emphasizes the need for consistency and thoroughness in data collection and reporting.

2. In the second section, the author explores various methods for organizing and analyzing data. It suggests using spreadsheets and databases to manage large volumes of information efficiently. The importance of regular updates and backups is also mentioned to ensure data integrity.

3. The third part of the document focuses on the role of technology in modern business operations. It discusses how software solutions can streamline processes and reduce manual errors. The author also touches upon the challenges of data security and the importance of implementing robust cybersecurity measures.

4. Finally, the document concludes by summarizing the key points discussed. It reiterates that effective record-keeping and data management are essential for the long-term success of any organization. The author encourages businesses to invest in the right tools and training to optimize their data handling practices.

5. The following section delves into the specific requirements for different types of records. It provides a detailed overview of the standards and regulations that businesses must adhere to, particularly in industries with strict compliance requirements. The text offers practical advice on how to structure records to meet these standards.

6. Another key aspect discussed is the importance of accessibility and transparency. The author explains how well-organized records can facilitate internal audits and external reporting. It also touches upon the legal implications of data retention and the need for clear policies regarding data access and control.

7. The document also addresses the issue of data privacy, especially in light of recent regulatory changes. It discusses the importance of obtaining consent and providing users with control over their personal information. The author provides insights into how businesses can implement privacy-by-design principles.

8. In the final part of this section, the author discusses the benefits of cloud-based record management systems. It highlights the advantages of scalability, flexibility, and remote access. However, it also notes the potential risks associated with cloud storage and offers strategies to mitigate these risks.

9. The next section provides a comprehensive guide to selecting the right record management software. It outlines the key features to look for, such as integration capabilities, user interface, and reporting tools. The author also provides a comparison of different software options available in the market.

10. This part of the document focuses on the implementation phase. It offers a step-by-step approach to rolling out a new record management system. Key considerations include training staff, migrating existing data, and establishing a clear governance framework. The author emphasizes the importance of communication and stakeholder buy-in throughout the process.

11. The following section discusses the ongoing maintenance and optimization of the record management system. It highlights the need for regular reviews and updates to ensure the system remains effective and secure. The author also provides tips on how to monitor system performance and address any issues that may arise.

12. Finally, the document concludes with a call to action, encouraging businesses to take a proactive approach to their record management. It stresses that a well-maintained record system is not just a cost center but a strategic asset that can drive business growth and innovation.

13. The next section explores the integration of record management with other business systems. It discusses how a unified data ecosystem can improve operational efficiency and provide a more holistic view of the organization's performance. The author provides examples of successful integration scenarios.

14. This part of the document focuses on the importance of data quality. It explains how poor data quality can lead to inaccurate reporting and flawed decision-making. The author provides strategies for ensuring data accuracy, such as implementing data validation rules and regular data audits.

15. The following section discusses the role of data in customer relationship management (CRM). It highlights how analyzing customer data can help businesses identify trends, improve service quality, and increase customer loyalty. The author provides insights into how to leverage CRM data effectively.

16. This part of the document addresses the issue of data governance. It explains the importance of having clear policies and procedures in place to manage data throughout its lifecycle. The author provides a framework for developing a robust data governance strategy.

17. The next section discusses the importance of data literacy for all employees. It explains how training and education can help staff understand the value of data and how to use it responsibly. The author provides suggestions for developing a data-driven culture within the organization.

18. Finally, the document concludes with a summary of the key takeaways. It reiterates that effective record management and data management are essential for business success. The author encourages businesses to embrace a data-driven mindset and invest in the right tools and practices to achieve their goals.

19. The following section provides a detailed overview of the legal and regulatory requirements for record management. It covers various international and regional regulations, such as the GDPR in Europe and the CCPA in California. The author provides a clear explanation of the requirements and offers practical advice on how to comply with these regulations.

20. This part of the document focuses on the importance of data retention and archiving. It explains how to determine the appropriate retention periods for different types of data and how to implement a secure archiving strategy. The author also discusses the challenges of data migration and the importance of testing the process.

21. The following section discusses the role of data in business intelligence (BI). It highlights how BI tools can help businesses analyze historical data to identify trends and make data-driven decisions. The author provides insights into how to integrate BI with record management systems.

22. This part of the document addresses the issue of data security and access control. It explains how to implement role-based access control (RBAC) and other security measures to protect sensitive data. The author also discusses the importance of regular security audits and incident response plans.

23. The next section discusses the importance of data backup and recovery. It explains how to create a robust backup strategy and how to test the recovery process. The author provides a checklist of key considerations for a successful backup and recovery plan.

24. Finally, the document concludes with a call to action, encouraging businesses to take a proactive approach to their record management. It stresses that a well-maintained record system is not just a cost center but a strategic asset that can drive business growth and innovation.

1. The first part of the document discusses the importance of maintaining accurate records of all transactions. It emphasizes that every entry, no matter how small, should be recorded to ensure the integrity of the financial data. This includes not only sales and purchases but also expenses and income. The document also highlights the need for regular reconciliation to identify any discrepancies early on.

2. The second part of the document focuses on the importance of having a clear and concise set of accounting policies. These policies should be established at the beginning of the fiscal year and should be consistently applied throughout the year. This helps in ensuring that the financial statements are prepared in a uniform manner, making them more reliable and comparable over time.

3. The third part of the document discusses the importance of having a strong internal control system. This system should be designed to prevent and detect errors and fraud. It should include procedures for authorization, segregation of duties, and regular audits. The document also emphasizes the need for a strong culture of ethics and integrity within the organization.

4. The fourth part of the document discusses the importance of having a clear and concise set of financial statements. These statements should be prepared in a timely and accurate manner, and should be reviewed by management and the board of directors. The document also emphasizes the need for a strong communication strategy to ensure that all stakeholders are kept informed of the organization's financial performance.

5. The fifth part of the document discusses the importance of having a clear and concise set of financial goals. These goals should be established at the beginning of the fiscal year and should be regularly reviewed and updated. The document also emphasizes the need for a strong performance management system to ensure that all employees are working towards the organization's financial goals.

6. The sixth part of the document discusses the importance of having a clear and concise set of financial reports. These reports should be prepared in a timely and accurate manner, and should be reviewed by management and the board of directors. The document also emphasizes the need for a strong communication strategy to ensure that all stakeholders are kept informed of the organization's financial performance.

7. The seventh part of the document discusses the importance of having a clear and concise set of financial forecasts. These forecasts should be prepared in a timely and accurate manner, and should be reviewed by management and the board of directors. The document also emphasizes the need for a strong communication strategy to ensure that all stakeholders are kept informed of the organization's financial performance.

8. The eighth part of the document discusses the importance of having a clear and concise set of financial budgets. These budgets should be prepared in a timely and accurate manner, and should be reviewed by management and the board of directors. The document also emphasizes the need for a strong communication strategy to ensure that all stakeholders are kept informed of the organization's financial performance.

9. The ninth part of the document discusses the importance of having a clear and concise set of financial statements. These statements should be prepared in a timely and accurate manner, and should be reviewed by management and the board of directors. The document also emphasizes the need for a strong communication strategy to ensure that all stakeholders are kept informed of the organization's financial performance.

10. The tenth part of the document discusses the importance of having a clear and concise set of financial reports. These reports should be prepared in a timely and accurate manner, and should be reviewed by management and the board of directors. The document also emphasizes the need for a strong communication strategy to ensure that all stakeholders are kept informed of the organization's financial performance.

11. The eleventh part of the document discusses the importance of having a clear and concise set of financial forecasts. These forecasts should be prepared in a timely and accurate manner, and should be reviewed by management and the board of directors. The document also emphasizes the need for a strong communication strategy to ensure that all stakeholders are kept informed of the organization's financial performance.

12. The twelfth part of the document discusses the importance of having a clear and concise set of financial budgets. These budgets should be prepared in a timely and accurate manner, and should be reviewed by management and the board of directors. The document also emphasizes the need for a strong communication strategy to ensure that all stakeholders are kept informed of the organization's financial performance.

13. The thirteenth part of the document discusses the importance of having a clear and concise set of financial statements. These statements should be prepared in a timely and accurate manner, and should be reviewed by management and the board of directors. The document also emphasizes the need for a strong communication strategy to ensure that all stakeholders are kept informed of the organization's financial performance.

14. The fourteenth part of the document discusses the importance of having a clear and concise set of financial reports. These reports should be prepared in a timely and accurate manner, and should be reviewed by management and the board of directors. The document also emphasizes the need for a strong communication strategy to ensure that all stakeholders are kept informed of the organization's financial performance.

15. The fifteenth part of the document discusses the importance of having a clear and concise set of financial forecasts. These forecasts should be prepared in a timely and accurate manner, and should be reviewed by management and the board of directors. The document also emphasizes the need for a strong communication strategy to ensure that all stakeholders are kept informed of the organization's financial performance.

16. The sixteenth part of the document discusses the importance of having a clear and concise set of financial budgets. These budgets should be prepared in a timely and accurate manner, and should be reviewed by management and the board of directors. The document also emphasizes the need for a strong communication strategy to ensure that all stakeholders are kept informed of the organization's financial performance.

17. The seventeenth part of the document discusses the importance of having a clear and concise set of financial statements. These statements should be prepared in a timely and accurate manner, and should be reviewed by management and the board of directors. The document also emphasizes the need for a strong communication strategy to ensure that all stakeholders are kept informed of the organization's financial performance.

18. The eighteenth part of the document discusses the importance of having a clear and concise set of financial reports. These reports should be prepared in a timely and accurate manner, and should be reviewed by management and the board of directors. The document also emphasizes the need for a strong communication strategy to ensure that all stakeholders are kept informed of the organization's financial performance.

19. The nineteenth part of the document discusses the importance of having a clear and concise set of financial forecasts. These forecasts should be prepared in a timely and accurate manner, and should be reviewed by management and the board of directors. The document also emphasizes the need for a strong communication strategy to ensure that all stakeholders are kept informed of the organization's financial performance.

20. The twentieth part of the document discusses the importance of having a clear and concise set of financial budgets. These budgets should be prepared in a timely and accurate manner, and should be reviewed by management and the board of directors. The document also emphasizes the need for a strong communication strategy to ensure that all stakeholders are kept informed of the organization's financial performance.

21. The twenty-first part of the document discusses the importance of having a clear and concise set of financial statements. These statements should be prepared in a timely and accurate manner, and should be reviewed by management and the board of directors. The document also emphasizes the need for a strong communication strategy to ensure that all stakeholders are kept informed of the organization's financial performance.

22. The twenty-second part of the document discusses the importance of having a clear and concise set of financial reports. These reports should be prepared in a timely and accurate manner, and should be reviewed by management and the board of directors. The document also emphasizes the need for a strong communication strategy to ensure that all stakeholders are kept informed of the organization's financial performance.

23. The twenty-third part of the document discusses the importance of having a clear and concise set of financial forecasts. These forecasts should be prepared in a timely and accurate manner, and should be reviewed by management and the board of directors. The document also emphasizes the need for a strong communication strategy to ensure that all stakeholders are kept informed of the organization's financial performance.

24. The twenty-fourth part of the document discusses the importance of having a clear and concise set of financial budgets. These budgets should be prepared in a timely and accurate manner, and should be reviewed by management and the board of directors. The document also emphasizes the need for a strong communication strategy to ensure that all stakeholders are kept informed of the organization's financial performance.

25. The twenty-fifth part of the document discusses the importance of having a clear and concise set of financial statements. These statements should be prepared in a timely and accurate manner, and should be reviewed by management and the board of directors. The document also emphasizes the need for a strong communication strategy to ensure that all stakeholders are kept informed of the organization's financial performance.

ID	Name	Age	Gender	Address	Phone	Email	Notes
001	John Doe	35	Male	123 Main St, New York, NY	212-555-1234	john.doe@example.com	Regular customer
002	Jane Smith	28	Female	456 Park Ave, New York, NY	212-555-5678	jane.smith@example.com	Regular customer
003	Michael Johnson	42	Male	789 Broadway, New York, NY	212-555-9012	michael.johnson@example.com	Regular customer
004	Sarah Williams	31	Female	1010 5th Ave, New York, NY	212-555-3456	sarah.williams@example.com	Regular customer
005	David Brown	48	Male	1111 6th Ave, New York, NY	212-555-7890	david.brown@example.com	Regular customer

ID	Name	Age	Gender	Address	Phone	Email	Notes
006	Emily Davis	25	Female	1212 7th Ave, New York, NY	212-555-2345	emily.davis@example.com	Regular customer
007	Robert Miller	55	Male	1313 8th Ave, New York, NY	212-555-6789	robert.miller@example.com	Regular customer
008	Amanda Wilson	33	Female	1414 9th Ave, New York, NY	212-555-0123	amanda.wilson@example.com	Regular customer
009	Christopher Lee	40	Male	1515 10th Ave, New York, NY	212-555-4567	christopher.lee@example.com	Regular customer

ID	Name	Age	Gender	Address	Phone	Email	Notes
010	Olivia Taylor	22	Female	1616 11th Ave, New York, NY	212-555-8901	olivia.taylor@example.com	Regular customer
011	Benjamin White	50	Male	1717 12th Ave, New York, NY	212-555-2345	benjamin.white@example.com	Regular customer
012	Sophia Garcia	30	Female	1818 13th Ave, New York, NY	212-555-6789	sophia.garcia@example.com	Regular customer
013	Lucas Martinez	45	Male	1919 14th Ave, New York, NY	212-555-0123	lucas.martinez@example.com	Regular customer

ID	Name	Age	Gender	Address	Phone	Email	Notes
014	Mia Hernandez	27	Female	2020 15th Ave, New York, NY	212-555-4567	mia.hernandez@example.com	Regular customer
015	Ethan King	52	Male	2121 16th Ave, New York, NY	212-555-8901	ethan.king@example.com	Regular customer
016	Ava Lopez	34	Female	2222 17th Ave, New York, NY	212-555-2345	ava.lopez@example.com	Regular customer
017	Noah Scott	41	Male	2323 18th Ave, New York, NY	212-555-6789	noah.scott@example.com	Regular customer

ID	Name	Age	Gender	Address	Phone	Email	Notes
018	Isabella Adams	29	Female	2424 19th Ave, New York, NY	212-555-0123	isabella.adams@example.com	Regular customer
019	Liam Baker	47	Male	2525 20th Ave, New York, NY	212-555-4567	liam.baker@example.com	Regular customer
020	Charlotte Nelson	36	Female	2626 21st Ave, New York, NY	212-555-8901	charlotte.nelson@example.com	Regular customer
021	Oliver Hill	53	Male	2727 22nd Ave, New York, NY	212-555-2345	oliver.hill@example.com	Regular customer

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	-----

101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

201	202	203	204	205	206	207	208	209	210	211	212	213	214	215	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240	241	242	243	244	245	246	247	248	249	250	251	252	253	254	255	256	257	258	259	260	261	262	263	264	265	266	267	268	269	270	271	272	273	274	275	276	277	278	279	280	281	282	283	284	285	286	287	288	289	290	291	292	293	294	295	296	297	298	299	300
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

301	302	303	304	305	306	307	308	309	310	311	312	313	314	315	316	317	318	319	320	321	322	323	324	325	326	327	328	329	330	331	332	333	334	335	336	337	338	339	340	341	342	343	344	345	346	347	348	349	350	351	352	353	354	355	356	357	358	359	360	361	362	363	364	365	366	367	368	369	370	371	372	373	374	375	376	377	378	379	380	381	382	383	384	385	386	387	388	389	390	391	392	393	394	395	396	397	398	399	400
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

401	402	403	404	405	406	407	408	409	410	411	412	413	414	415	416	417	418	419	420	421	422	423	424	425	426	427	428	429	430	431	432	433	434	435	436	437	438	439	440	441	442	443	444	445	446	447	448	449	450	451	452	453	454	455	456	457	458	459	460	461	462	463	464	465	466	467	468	469	470	471	472	473	474	475	476	477	478	479	480	481	482	483	484	485	486	487	488	489	490	491	492	493	494	495	496	497	498	499	500
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

501	502	503	504	505	506	507	508	509	510	511	512	513	514	515	516	517	518	519	520	521	522	523	524	525	526	527	528	529	530	531	532	533	534	535	536	537	538	539	540	541	542	543	544	545	546	547	548	549	550	551	552	553	554	555	556	557	558	559	560	561	562	563	564	565	566	567	568	569	570	571	572	573	574	575	576	577	578	579	580	581	582	583	584	585	586	587	588	589	590	591	592	593	594	595	596	597	598	599	600
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	-----

101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

201	202	203	204	205	206	207	208	209	210	211	212	213	214	215	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240	241	242	243	244	245	246	247	248	249	250	251	252	253	254	255	256	257	258	259	260	261	262	263	264	265	266	267	268	269	270	271	272	273	274	275	276	277	278	279	280	281	282	283	284	285	286	287	288	289	290	291	292	293	294	295	296	297	298	299	300
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

301	302	303	304	305	306	307	308	309	310	311	312	313	314	315	316	317	318	319	320	321	322	323	324	325	326	327	328	329	330	331	332	333	334	335	336	337	338	339	340	341	342	343	344	345	346	347	348	349	350	351	352	353	354	355	356	357	358	359	360	361	362	363	364	365	366	367	368	369	370	371	372	373	374	375	376	377	378	379	380	381	382	383	384	385	386	387	388	389	390	391	392	393	394	395	396	397	398	399	400
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

401	402	403	404	405	406	407	408	409	410	411	412	413	414	415	416	417	418	419	420	421	422	423	424	425	426	427	428	429	430	431	432	433	434	435	436	437	438	439	440	441	442	443	444	445	446	447	448	449	450	451	452	453	454	455	456	457	458	459	460	461	462	463	464	465	466	467	468	469	470	471	472	473	474	475	476	477	478	479	480	481	482	483	484	485	486	487	488	489	490	491	492	493	494	495	496	497	498	499	500
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

501	502	503	504	505	506	507	508	509	510	511	512	513	514	515	516	517	518	519	520	521	522	523	524	525	526	527	528	529	530	531	532	533	534	535	536	537	538	539	540	541	542	543	544	545	546	547	548	549	550	551	552	553	554	555	556	557	558	559	560	561	562	563	564	565	566	567	568	569	570	571	572	573	574	575	576	577	578	579	580	581	582	583	584	585	586	587	588	589	590	591	592	593	594	595	596	597	598	599	600
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	-----

101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

201	202	203	204	205	206	207	208	209	210	211	212	213	214	215	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240	241	242	243	244	245	246	247	248	249	250	251	252	253	254	255	256	257	258	259	260	261	262	263	264	265	266	267	268	269	270	271	272	273	274	275	276	277	278	279	280	281	282	283	284	285	286	287	288	289	290	291	292	293	294	295	296	297	298	299	300
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

301	302	303	304	305	306	307	308	309	310	311	312	313	314	315	316	317	318	319	320	321	322	323	324	325	326	327	328	329	330	331	332	333	334	335	336	337	338	339	340	341	342	343	344	345	346	347	348	349	350	351	352	353	354	355	356	357	358	359	360	361	362	363	364	365	366	367	368	369	370	371	372	373	374	375	376	377	378	379	380	381	382	383	384	385	386	387	388	389	390	391	392	393	394	395	396	397	398	399	400
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

401	402	403	404	405	406	407	408	409	410	411	412	413	414	415	416	417	418	419	420	421	422	423	424	425	426	427	428	429	430	431	432	433	434	435	436	437	438	439	440	441	442	443	444	445	446	447	448	449	450	451	452	453	454	455	456	457	458	459	460	461	462	463	464	465	466	467	468	469	470	471	472	473	474	475	476	477	478	479	480	481	482	483	484	485	486	487	488	489	490	491	492	493	494	495	496	497	498	499	500
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

501	502	503	504	505	506	507	508	509	510	511	512	513	514	515	516	517	518	519	520	521	522	523	524	525	526	527	528	529	530	531	532	533	534	535	536	537	538	539	540	541	542	543	544	545	546	547	548	549	550	551	552	553	554	555	556	557	558	559	560	561	562	563	564	565	566	567	568	569	570	571	572	573	574	575	576	577	578	579	580	581	582	583	584	585	586	587	588	589	590	591	592	593	594	595	596	597	598	599	600
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

1. The first part of the document discusses the importance of maintaining accurate records of all transactions and activities. It emphasizes the need for transparency and accountability in financial reporting.

2. The second part of the document outlines the various methods and techniques used to collect and analyze data. It includes a detailed description of the experimental procedures and the tools used for data collection.

3. The third part of the document presents the results of the study. It includes a series of tables and graphs that illustrate the findings of the research. The data shows a clear trend in the relationship between the variables being studied.

4. The fourth part of the document discusses the implications of the findings. It highlights the potential applications of the research in various fields and the need for further investigation in this area.

5. The fifth part of the document provides a conclusion and a summary of the key points. It reiterates the main findings and the significance of the research.

6. The final part of the document includes a list of references and a bibliography. It cites the works of other researchers in the field and provides a comprehensive overview of the literature related to the study.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	-----

101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

201	202	203	204	205	206	207	208	209	210	211	212	213	214	215	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240	241	242	243	244	245	246	247	248	249	250	251	252	253	254	255	256	257	258	259	260	261	262	263	264	265	266	267	268	269	270	271	272	273	274	275	276	277	278	279	280	281	282	283	284	285	286	287	288	289	290	291	292	293	294	295	296	297	298	299	300
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

301	302	303	304	305	306	307	308	309	310	311	312	313	314	315	316	317	318	319	320	321	322	323	324	325	326	327	328	329	330	331	332	333	334	335	336	337	338	339	340	341	342	343	344	345	346	347	348	349	350	351	352	353	354	355	356	357	358	359	360	361	362	363	364	365	366	367	368	369	370	371	372	373	374	375	376	377	378	379	380	381	382	383	384	385	386	387	388	389	390	391	392	393	394	395	396	397	398	399	400
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

401	402	403	404	405	406	407	408	409	410	411	412	413	414	415	416	417	418	419	420	421	422	423	424	425	426	427	428	429	430	431	432	433	434	435	436	437	438	439	440	441	442	443	444	445	446	447	448	449	450	451	452	453	454	455	456	457	458	459	460	461	462	463	464	465	466	467	468	469	470	471	472	473	474	475	476	477	478	479	480	481	482	483	484	485	486	487	488	489	490	491	492	493	494	495	496	497	498	499	500
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

501	502	503	504	505	506	507	508	509	510	511	512	513	514	515	516	517	518	519	520	521	522	523	524	525	526	527	528	529	530	531	532	533	534	535	536	537	538	539	540	541	542	543	544	545	546	547	548	549	550	551	552	553	554	555	556	557	558	559	560	561	562	563	564	565	566	567	568	569	570	571	572	573	574	575	576	577	578	579	580	581	582	583	584	585	586	587	588	589	590	591	592	593	594	595	596	597	598	599	600
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	-----

101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

201	202	203	204	205	206	207	208	209	210	211	212	213	214	215	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240	241	242	243	244	245	246	247	248	249	250	251	252	253	254	255	256	257	258	259	260	261	262	263	264	265	266	267	268	269	270	271	272	273	274	275	276	277	278	279	280	281	282	283	284	285	286	287	288	289	290	291	292	293	294	295	296	297	298	299	300
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

301	302	303	304	305	306	307	308	309	310	311	312	313	314	315	316	317	318	319	320	321	322	323	324	325	326	327	328	329	330	331	332	333	334	335	336	337	338	339	340	341	342	343	344	345	346	347	348	349	350	351	352	353	354	355	356	357	358	359	360	361	362	363	364	365	366	367	368	369	370	371	372	373	374	375	376	377	378	379	380	381	382	383	384	385	386	387	388	389	390	391	392	393	394	395	396	397	398	399	400
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

401	402	403	404	405	406	407	408	409	410	411	412	413	414	415	416	417	418	419	420	421	422	423	424	425	426	427	428	429	430	431	432	433	434	435	436	437	438	439	440	441	442	443	444	445	446	447	448	449	450	451	452	453	454	455	456	457	458	459	460	461	462	463	464	465	466	467	468	469	470	471	472	473	474	475	476	477	478	479	480	481	482	483	484	485	486	487	488	489	490	491	492	493	494	495	496	497	498	499	500
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

501	502	503	504	505	506	507	508	509	510	511	512	513	514	515	516	517	518	519	520	521	522	523	524	525	526	527	528	529	530	531	532	533	534	535	536	537	538	539	540	541	542	543	544	545	546	547	548	549	550	551	552	553	554	555	556	557	558	559	560	561	562	563	564	565	566	567	568	569	570	571	572	573	574	575	576	577	578	579	580	581	582	583	584	585	586	587	588	589	590	591	592	593	594	595	596	597	598	599	600
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

1. Introduction
2. Methodology
3. Results
4. Discussion
5. Conclusion

The first section of the document provides a detailed overview of the research objectives and the scope of the study. It outlines the key questions that the research aims to address and the significance of the findings. The methodology section describes the research design, data collection methods, and the analytical techniques used to process the data. The results section presents the findings of the study, including statistical analyses and graphical representations. The discussion section interprets the results in the context of existing literature and theoretical frameworks. Finally, the conclusion summarizes the main findings and offers suggestions for future research.

The second section of the document focuses on the methodology employed in the study. It details the research design, which includes the selection of participants, the development of the research instruments, and the procedures for data collection. The data collection methods are described in detail, including the use of surveys, interviews, and observations. The analytical techniques used to process the data are also outlined, including statistical analyses and content analysis. This section provides a clear and concise description of the research process, ensuring that the study can be replicated by other researchers.

The third section of the document presents the results of the study. It includes a detailed description of the data collected, including the distribution of responses and the identification of key themes. The results are presented in a clear and concise manner, using tables and graphs to illustrate the findings. The statistical analyses are described in detail, including the use of descriptive statistics, inferential statistics, and regression analysis. This section provides a comprehensive overview of the results of the study, highlighting the key findings and their implications.

The fourth section of the document discusses the results of the study in the context of existing literature and theoretical frameworks. It compares the findings of the study with those of other researchers and discusses the implications of the results for theory and practice. The discussion also addresses the limitations of the study and offers suggestions for future research. This section provides a critical and thoughtful analysis of the results, ensuring that the study's contributions are clearly articulated.

The final section of the document is the conclusion, which summarizes the main findings of the study and offers suggestions for future research. It highlights the key contributions of the study and discusses the implications of the results for theory and practice. The conclusion also addresses the limitations of the study and offers suggestions for future research. This section provides a clear and concise summary of the study's findings and their implications, ensuring that the key messages are effectively communicated.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	-----

101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

201	202	203	204	205	206	207	208	209	210	211	212	213	214	215	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240	241	242	243	244	245	246	247	248	249	250	251	252	253	254	255	256	257	258	259	260	261	262	263	264	265	266	267	268	269	270	271	272	273	274	275	276	277	278	279	280	281	282	283	284	285	286	287	288	289	290	291	292	293	294	295	296	297	298	299	300
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

301	302	303	304	305	306	307	308	309	310	311	312	313	314	315	316	317	318	319	320	321	322	323	324	325	326	327	328	329	330	331	332	333	334	335	336	337	338	339	340	341	342	343	344	345	346	347	348	349	350	351	352	353	354	355	356	357	358	359	360	361	362	363	364	365	366	367	368	369	370	371	372	373	374	375	376	377	378	379	380	381	382	383	384	385	386	387	388	389	390	391	392	393	394	395	396	397	398	399	400
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

401	402	403	404	405	406	407	408	409	410	411	412	413	414	415	416	417	418	419	420	421	422	423	424	425	426	427	428	429	430	431	432	433	434	435	436	437	438	439	440	441	442	443	444	445	446	447	448	449	450	451	452	453	454	455	456	457	458	459	460	461	462	463	464	465	466	467	468	469	470	471	472	473	474	475	476	477	478	479	480	481	482	483	484	485	486	487	488	489	490	491	492	493	494	495	496	497	498	499	500
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

501	502	503	504	505	506	507	508	509	510	511	512	513	514	515	516	517	518	519	520	521	522	523	524	525	526	527	528	529	530	531	532	533	534	535	536	537	538	539	540	541	542	543	544	545	546	547	548	549	550	551	552	553	554	555	556	557	558	559	560	561	562	563	564	565	566	567	568	569	570	571	572	573	574	575	576	577	578	579	580	581	582	583	584	585	586	587	588	589	590	591	592	593	594	595	596	597	598	599	600
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

SECRET

SECRET

SECRET

feature-Path Effect	coef	stdevr	pval	qual	adjusted	Fixed_effects	feature-Path Effect	coef	stdevr	pval	qual	adjusted	Fixed_effects	feature-Path Effect	coef	stdevr	pval	qual	adjusted	Fixed_effects
PWY.7371.1.Trans FA %	0.0001006	0.0000000	0.0230663	0.027523	TT	TFA_TTT	PWY.720A.p.TC-mgd	0.0001263	5.11E-05	0.0276623	0.027523	TT	GLUCGTCTT	feature-Path Effect	coef	stdevr	pval	qual	adjusted <td>Fixed_effects</td>	Fixed_effects
PWY.45041_sBM	-0.0000725	0.0001779	0.003038	0.0860135	TT	TC	PWY.708B.sTC-mgd	-0.0004648	0.0001843	0.01430826	0.027523	TT	GLUCGTCTT	PWY.6124_sTC-mgd	0.0001888	8.01E-05	0.0230663	0.02547785	BMfM-TT	TC_BM-TT
PWY.6527.sTC-mgd	0.0006873	0.0001786	0.0006377	0.0908824	TT	GT_TT	PWY.7209.sTC-mgd	5.48E-05	1.87E-05	0.0057379	0.027523	TT	GLUCGTCTT	UBSYN.PWTC-mgd	3.28E-05	1.40E-05	0.02382165	0.02547785	BMfM-TT	TC_BM-TT
PWY.6737.sFiber %	0.0013804	0.0004033	0.0012921	0.1581757	TT	Fiber_TT	PWY.7234_sTC-mgd	-0.0004609	0.0001898	0.01363665	0.027523	TT	GLUCGTCTT	GLUCDEG.PTC-mgd	0.00029546	0.00012598	0.02393658	0.02547785	BMfM-TT	TC_BM-TT
KETOGLUCIDTC-mgd	0.0005548	0.0001744	0.0002749	0.15892052	TT	GLUCGTCTT	PWY.7205.sTC-mgd	6.02E-05	2.98E-05	0.0012684	0.027523	TT	GLUCGTCTT	RIBOSYN.PTC-mgd	0.00029686	0.00013462	0.0163811	0.02713161	BMfM-TT	TC_BM-TT
PWY.5173.sTC-mgd	0.0001833	0.0001005	0.0008933	0.15892052	TT	GLUCGTCTT	PWY.7392.sTC-mgd	0.0001479	6.71E-05	0.0179967	0.027523	TT	GLUCGTCTT	PWY.7323.sTC-mgd	-0.0000128	0.0001384	0.0243952	0.02547785	BMfM-TT	TC_BM-TT
TC_A.TC-ycp.TC-mgd	0.0004038	0.0001203	0.0008269	0.15892052	TT	GLUCGTCTT	PWY.7446.sTC-mgd	2.78E-05	1.12E-05	0.01747466	0.027523	TT	GLUCGTCTT	PWY.7446.sTC-mgd	2.57E-05	1.10E-05	0.02455175	0.02547785	BMfM-TT	TC_BM-TT
PWY.5173.sTC-mgd	0.0001793	0.0001005	0.0008933	0.15894813	BMfM-TT	TC_BM-TT	PWY.821.sTC-mgd	-0.0001959	7.84E-05	0.0163567	0.027523	TT	GLUCGTCTT	PWY.821.sTC-mgd	0.00014016	0.00007495	0.0163567	0.02547785	BMfM-TT	TC_BM-TT
KETOGLUCIDTC-mgd	0.0001579	4.63E-05	0.0014907	0.1636085	BMfM-TT	TC_BM-TT	PWY.1277_TG-mgd	0.0001033	3.79E-05	0.0093964	0.027523	TT	GLUCGTCTT	PWY.5004.sTC-mgd	7.31E-05	9.90E-06	0.02484257	0.02547785	BMfM-TT	TC_BM-TT
PWY.6703.sTC-mgd	-0.0006111	0.0001808	0.0015840	0.1636085	BMfM-TT	TC_BM-TT	PWY.1277_TG-mgd	0.0001033	3.79E-05	0.0093964	0.027523	TT	GLUCGTCTT	PWY.5005.sTC-mgd	-0.0002055	0.0001142	0.02850526	0.02547785	BMfM-TT	TC_BM-TT
PWY.710.TC-mgd	0.0003867	0.0001706	0.0009870	0.17421624	BMfM-TT	TC_BM-TT	PWY.1296_TG-mgd	0.0001246	6.07E-05	0.01124974	0.027523	TT	GLUCGTCTT	PWY.5355.sTC-mgd	-2.30E-05	3.24E-05	0.02976075	0.02547785	BMfM-TT	TC_BM-TT
THS.NAAAT.TC-mgd	-0.000716	0.0002218	0.0024073	0.17421624	BMfM-TT	TC_BM-TT	PWY.1319_TG-mgd	-0.0000416	0.0002029	0.0145939	0.027523	TT	GLUCGTCTT	GLUCARCDEG.TC-mgd	9.18E-05	3.97E-05	0.02580888	0.02713161	BMfM-TT	TC_BM-TT
PWY.5973.sTC-mgd	-0.000662	0.0002607	0.0026347	0.17421624	BMfM-TT	TC_BM-TT	PWY.1533_TG-mgd	2.14E-05	8.13E-06	0.0126666	0.027523	TT	GLUCGTCTT	PWY.6628.sTC-mgd	0.00029726	0.00012079	0.0258738	0.02713161	BMfM-TT	TC_BM-TT
PRYNOCAS4.TC-mgd	0.0005548	0.0001744	0.0002749	0.17421624	BMfM-TT	TC_BM-TT	PWY.1533_TG-mgd	2.14E-05	8.13E-06	0.0126666	0.027523	TT	GLUCGTCTT	PWY.6628.sTC-mgd	0.00029726	0.00012079	0.0258738	0.02713161	BMfM-TT	TC_BM-TT
PRYNOCAS4.TC-mgd	0.0003792	0.0001599	0.00341758	0.17460387	BMfM-TT	TC_BM-TT	PWY.781.sTC-mgd	0.0001484	0.0001196	0.00574705	0.027523	TT	GLUCGTCTT	LPSSYN.PWTC-mgd	6.53E-05	2.83E-05	0.0243776	0.02713161	BMfM-TT	TC_BM-TT
PWY442.257.TC-mgd	0.00019245	6.30E-05	0.0039307	0.17460387	BMfM-TT	TC_BM-TT	PWY442.257.TC-mgd	-0.0001621	6.23E-05	0.012953	0.027523	TT	GLUCGTCTT	ANAGLYCOL.TC-mgd	-0.0004529	0.0001979	0.02667419	0.02713161	BMfM-TT	TC_BM-TT
PWY.241.TC-mgd	0.0003708	0.0001239	0.0024036	0.17460387	BMfM-TT	TC_BM-TT	PWY66.40L.TC-mgd	0.0005874	0.0002459	0.00789304	0.027523	TT	GLUCGTCTT	PWY.821.sTC-mgd	0.00018045	0.0001256	0.02739516	0.02713161	BMfM-TT	TC_BM-TT
PWY.6630.sTC-mgd	0.0002963	6.92E-05	0.0024428	0.17460387	BMfM-TT	TC_BM-TT	PRYNOCAS4.TC-mgd	0.0003629	0.0001218	0.00495769	0.027523	TT	GLUCGTCTT	SO4ASSM.PTC-mgd	0.0001835	0.0001395	0.02766895	0.02713161	BMfM-TT	TC_BM-TT
PWY.7663.sTC-mgd	-0.000627	0.0002066	0.0044704	0.17460387	BMfM-TT	TC_BM-TT	SO4ASSM.PTC-mgd	0.0003651	0.0001885	0.01039833	0.027523	TT	GLUCGTCTT	PWY.7269.N.TC-mgd	5.50E-05	2.41E-05	0.02769719	0.02713161	BMfM-TT	TC_BM-TT
P4.PWY.sup.TC-mgd	0.0006385	0.00014075	0.0045179	0.17460387	BMfM-TT	TC_BM-TT	SULFATE.CTCTC-mgd	0.0005485	0.0001724	0.01158408	0.027523	TT	GLUCGTCTT	P4.PWY.sup.TC-mgd	0.00018135	7.98E-05	0.02828427	0.02713161	BMfM-TT	TC_BM-TT
PWY.5656.sTC-mgd	0.0001421	4.81E-05	0.0051199	0.17460387	BMfM-TT	TC_BM-TT	TC.A.GLYOXETC-mgd	0.0003979	0.0001101	0.0105687	0.027523	TT	GLUCGTCTT	PWY.5136.sTC-mgd	0.00026689	0.0001172	0.0268331	0.02713161	BMfM-TT	TC_BM-TT
FERMENTAT.TC-mgd	0.0003292	0.0001128	0.00521415	0.17460387	BMfM-TT	TC_BM-TT	UBSYN.PWTC-mgd	3.69E-05	1.39E-05	0.0134701	0.027523	TT	GLUCGTCTT	GLUCOCED1.TC-mgd	0.0003758	0.0001651	0.02888443	0.02713161	BMfM-TT	TC_BM-TT
ORNDGEC.PTC-mgd	0.0002681	9.15E-05	0.0045748	0.17460387	BMfM-TT	TC_BM-TT	P44.PWY.sTC-mgd	0.0003312	0.0001247	0.0107878	0.0280709	BMfM-TT	TC_BM-TT	PWY0.1479.TC-mgd	0.00021351	9.42E-05	0.0278888	0.02713161	BMfM-TT	TC_BM-TT
PWY1297.TC-mgd	0.0002569	8.97E-05	0.0054298	0.17460387	BMfM-TT	TC_BM-TT	PWY.5104.L.Patent2	0.0004209	0.0001347	0.00132447	0.0212438	TT	TC_TT	PWY0.1455.TC-mgd	7.86E-05	3.47E-05	0.0209264	0.02713161	BMfM-TT	TC_BM-TT
TC_A.TC-ycp.TC-mgd	0.0004108	0.0001204	0.0025957	0.18021408	TT	TC_TT	AST.PWY.La.TC-mgd	-6.48E-05	2.67E-05	0.0186164	0.02157155	TT	GLUCGTCTT	PWY0.1533.TC-mgd	1.82E-05	8.04E-06	0.0292371	0.02713161	BMfM-TT	TC_BM-TT
PWY.5173.sTC-mgd	0.0006107	5.07E-05	0.0027856	0.18021408	TT	TC_TT	COA.PWY.sTC-mgd	0.00061025	0.0002163	0.01909785	0.02157155	TT	GLUCGTCTT	PWY.5189.N.TC-mgd	0.00012	5.34E-05	0.02996599	0.02713161	BMfM-TT	TC_BM-TT
PWY.5973.sTC-mgd	0.0001943	0.0001005	0.0008933	0.18021408	TT	TC_TT	GALACT.GLU.TC-mgd	0.00019522	8.27E-05	0.0230663	0.02157155	TT	GLUCGTCTT	PWY.6123.sTC-mgd	0.00013876	6.21E-05	0.0230663	0.02713161	BMfM-TT	TC_BM-TT
PWY.5973.sTC-mgd	-0.0001419	-0.0000333	0.0035344	0.18021408	TT	TC_TT	GLUCARCDEG.TC-mgd	-9.42E-05	3.93E-05	0.02132046	0.02157155	TT	GLUCGTCTT	-0.0005223	0.0002369	0.03002171	0.02713161	BMfM-TT	TC_BM-TT	
PRYNOCAS4.TC-mgd	-0.0005174	0.0001889	0.0037519	0.18021408	TT	TC_TT	GLUCARCDEG.TC-mgd	9.58E-05	4.04E-05	0.0226314	0.02157155	TT	GLUCGTCTT	PWY0.1338.TC-mgd	3.78E-05	1.69E-05	0.030904	0.02713161	BMfM-TT	TC_BM-TT
KETOGLUCIDTC-mgd	0.0001596	8.60E-05	0.0021561	0.18021408	TT	TC_TT	GLUCALC.PWTC-mgd	0.0001261	6.00E-05	0.0115808	0.02157155	TT	GLUCGTCTT	PWY0.1918.TC-mgd	0.00019189	5.79E-05	0.02444257	0.0270745	BMfM-TT	TC_BM-TT
KETOGLUCIDTC-mgd	0.0001936	4.68E-05	0.004589	0.18112893	TT	TC_TT	HOMOSER.MTC-mgd	0.0002442	0.0001428	0.02252349	0.02157155	TT	GLUCGTCTT	LPSSYN.PWTC-mgd	-6.24E-05	2.77E-05	0.0218838	0.02809526	TT	TC_TT
PWY.7663.sTrans FA %	0.0001707	3.22E-05	0.0018521	0.18923097	TT	TFA_TT	KETOGLUCIDTC-mgd	-0.0001805	4.53E-05	0.0213003	0.02157155	TT	GLUCGTCTT	PWY.7371.1.Trans FA %	0.0001671	2.77E-05	0.0137173	0.02818486	TT	MacOpT_
-0.000592	0.00019946	0.0043054	0.1898164	TT	TC_TT	LPSSYN.PWTC-mgd	6.87E-05	2.85E-05	0.0208137	0.02157155	TT	GLUCGTCTT	PWY.7392.sPUFA %	-0.0002039	6.26E-05	0.0204214	0.02849381	TT	PPA_TT	
PWY.5656.sTC-mgd	0.0001944	8.97E-05	0.0054298	0.1898164	TT	TC_TT	P44.PWY.sTC-mgd	0.0001384	6.00E-05	0.0119126	0.02157155	TT	GLUCGTCTT	PWY.8003.sTC-mgd	0.00019135	0.0001261	0.02157155	0.02849381	TT	PRNOCAS4.TC-mgd
PWY.5973.sTC-mgd	-0.000707	0.00021462	0.0022850	0.19112417	TT	GLUCGTCTT	PANTO.PWY.TC-mgd	-0.0005246	0.0002215	0.02281483	0.02157155	TT	GLUCGTCTT	P44.PWY.sup.TC-mgd	0.0003073	0.0001496	0.00788346	0.02914623	TT	TC_TT
PWY.6121.sTC-mgd	0.0006678	0.0002066	0.0034567	0.19112417	TT	GLUCGTCTT	PWY.241.GLU.TC-mgd	0.0002897	0.0001881	0.0190314	0.02157155	TT	GLUCGTCTT	0.00011169	4.97E-05	0.0379134	0.0297097	TT	GLUCGTCTT	
PWY.1297.TC-mgd	0.0001596	8.60E-05	0.0021561	0.19112417	TT	GLUCGTCTT	PWY.5121.sTC-mgd	9.61E-05	4.19E-05	0.0146562	0.02157155	TT	GLUCGTCTT	PWY.8003.sTC-mgd	0.00019135	0.0001261	0.02157155	0.0297097	TT	GLUCGTCTT
PWY.1319.TC-mgd	0.0007691	0.0002359	0.0032099	0.19112417	TT	GLUCGTCTT	PWY.5345.sTC-mgd	0.0004475	0.0001895	0.02017450	0.02157155	TT	GLUCGTCTT	GALACTARIDT.TC-mgd	-0.0001196	5.36E-05	0.0313209	0.03174218	TT	GLUCGTCTT
PWY442.257.TC-mgd	0.0002089	6.41E-05	0.0023121	0.19112417	TT	GLUCGTCTT	PWY.5367.sTC-mgd	-6.89E-05	2.89E-05	0.02187688	0.02157155	TT	GLUCGTCTT	GLUCARCALG.TC-mgd	-0.0001396	5.36E-05	0.0313209	0.03174218	TT	GLUCGTCTT
ORNDGEC.PTC-mgd	0.0001598	8.60E-05	0.0021561	0.19112417	TT	GLUCGTCTT	PWY.5367.sTC-mgd	-6.89E-05	2.89E-05	0.02187688	0.02157155	TT	GLUCGTCTT	GLUCARCALG.TC-mgd	-0.0001396	5.36E-05	0.0313209	0.03174218	TT	GLUCGTCTT
PWY.5173.sTC-mgd	0.0001707	3.22E-05	0.0018521	0.19112417	TT	GLUCGTCTT	PWY.6124.sTC-mgd	-0.0004041	0.0001693	0.02219197	0.02157155	TT	GLUCGTCTT	ORNDGEC.PTC-mgd	0.0001598	8.60E-05	0.0021561	0.19112417	TT	GLUCGTCTT
PWY.5173.sTC-mgd	-0.0001771	8.22E-05	0.0016991	0.1914886	TT	PPA_TT	PWY.6163.sTC-mgd	0.0003674	0.0001986	0.0185897	0.02157155	TT	GLUCGTCTT	P44.PWY.sTC-m						

Departamento	Actividad	Unidad	1514	1515	1516	1517	1518	1519	1520	1521	1522	1523	1524	1525	1526	1527	1528	1529	1530	1531	1532	1533	1534	1535	1536	1537	1538	1539	1540	1541	1542	1543	1544	1545	1546	1547	1548	1549	1550	1551	1552	1553	1554	1555	1556	1557	1558	1559	1560
1514	1515	1516	1517	1518	1519	1520	1521	1522	1523	1524	1525	1526	1527	1528	1529	1530	1531	1532	1533	1534	1535	1536	1537	1538	1539	1540	1541	1542	1543	1544	1545	1546	1547	1548	1549	1550	1551	1552	1553	1554	1555	1556	1557	1558	1559	1560			
1514	1515	1516	1517	1518	1519	1520	1521	1522	1523	1524	1525	1526	1527	1528	1529	1530	1531	1532	1533	1534	1535	1536	1537	1538	1539	1540	1541	1542	1543	1544	1545	1546	1547	1548	1549	1550	1551	1552	1553	1554	1555	1556	1557	1558	1559	1560			

Suplemento 21.

VF	logFC	logCPM	F	PValue	FDR	DEG-UP
LOS (CVF494	8.29420048	17.1288367	13.7132553	0.0006323	0.0335118	OWOB
Salmochelins	1.92011623	13.8286815	11.1043069	0.00305921	0.07294042	Nsig
S fimbriae (\	2.25241205	13.8570317	10.2727469	0.0041287	0.07294042	Nsig
F1C fimbriae	1.54209837	13.7959805	8.78804977	0.00722443	0.09572373	Nsig
HSI-I (VF033	0.87166646	13.7634648	6.40624611	0.07200512	0.76325425	Nsig
Capsule (VFC	-0.7130264	13.7638661	6.69545116	0.12474726	0.81201081	Nsig
EspA(VF0198	-1.069399	14.0039115	2.15281792	0.14999067	0.81201081	Nsig
CNF-1 (VF02	0.47461273	13.7450161	5.32355159	0.20332484	0.81201081	Nsig
IroN (VF0230	0.47461273	13.7450161	5.32355159	0.20332484	0.81201081	Nsig
TcpC (VF041	0.47461273	13.7450161	5.32355159	0.20332484	0.81201081	Nsig
Tsh (VF0233	0.47461273	13.7450161	5.32355159	0.20332484	0.81201081	Nsig
Tir (VF0193)	0.47461273	13.7450161	5.32355159	0.20332484	0.81201081	Nsig
iota-toxin (V	0.63365144	13.8393427	1.65610445	0.21167836	0.81201081	Nsig
Paa (VF0194	-0.3831233	13.7450161	4.79480573	0.27769727	0.81201081	Nsig
Map (VF0191	-0.3913787	13.7461642	4.67827037	0.27769728	0.81201081	Nsig
Pet (VF0217)	-0.3913787	13.7461642	4.67827037	0.27769728	0.81201081	Nsig
CT (VF0128)	-0.437377	13.7563348	3.95598225	0.27769731	0.81201081	Nsig
Heat-stable t	-0.5050326	13.8393427	1.54408858	0.27772227	0.81201081	Nsig
LPS (CVF383,	0.63123775	13.9721813	1.09608846	0.3013014	0.81201081	Nsig
TTSS (VF019	-0.8730351	14.2717208	1.07283195	0.30641917	0.81201081	Nsig
Hemolysin (\	0.60096947	14.0017744	0.98317962	0.3272712	0.82597016	Nsig
EAST1 (VF02	-0.6600046	14.0529359	0.63931695	0.42848765	0.98838703	Nsig
P5 protein (v	0.61731694	13.868913	0.96909097	0.44010651	0.98838703	Nsig
Sat (VF0231)	0.46447503	13.8011861	1.16188974	0.4876302	0.98838703	Nsig
Aerobactin (\	0.37725451	14.5168917	0.48951535	0.48812169	0.98838703	Nsig
Dispersin (Vf	-0.3486788	13.8199263	0.60261129	0.57643458	0.98838703	Nsig
curli fibers/tl	0.34567449	13.9995242	0.56798657	0.64103943	0.98838703	Nsig
ShET2 (VF02	-0.2148389	13.850982	0.2227195	0.68738104	0.98838703	Nsig
Shu (VF0256	-0.2575224	13.7819669	0.4329682	0.69285031	0.98838703	Nsig
T2SS (VF033	0.28392859	15.3287121	0.15519464	0.69562629	0.98838703	Nsig
Type 1 fimbr	0.23909688	15.5284043	0.14194105	0.70826851	0.98838703	Nsig
AAFs (VF021	0.21466675	13.8329492	0.12392318	0.75592943	0.98838703	Nsig
AsIA (VF023)	0.15205548	14.027663	0.12907676	0.77562183	0.98838703	Nsig
Agf (VF0103)	-0.2190481	14.8068229	0.13786662	0.78109243	0.98838703	Nsig
Hyaluronic ac	-0.3679068	14.1222224	0.07494509	0.78565228	0.98838703	Nsig
LEE encoded	-0.1390864	14.8988482	0.05873066	0.8097301	0.98838703	Nsig
P fimbriae (C	0.16289511	14.1863765	0.05495674	0.81582714	0.98838703	Nsig
K1 capsule (\	-0.2114343	14.0270917	0.0961026	0.83182148	0.98838703	Nsig
SigA (VF011)	-0.1260479	13.801761	0.08914333	0.83813877	0.98838703	Nsig
ECP (VF0404	0.16768586	14.9601325	0.03671211	0.84898193	0.98838703	Nsig
peritrichous	-0.0946968	14.147939	0.05126717	0.85913791	0.98838703	Nsig
Enterobactin	-0.1144483	15.680146	0.0569245	0.86029747	0.98838703	Nsig
Yersiniabacti	0.09959331	14.8771514	0.02973698	0.86394268	0.98838703	Nsig
Chu (VF0227	-0.1380904	14.3237309	0.02668746	0.87104082	0.98838703	Nsig
Ibes (VF0237	0.09148949	13.7579437	0.08899115	0.87649416	0.98838703	Nsig
Colonization	0.09148949	13.7579437	0.08899115	0.87649416	0.98838703	Nsig
Pic (VF0218)	0.09148949	13.7579437	0.08899115	0.87649416	0.98838703	Nsig
Flagella (VFC	-0.0398053	15.1916434	0.00978745	0.92833769	0.9999028	Nsig
FdeC (VF050	0.0751009	13.869967	0.02212984	0.95039883	0.9999028	Nsig
OmpA (VF02	-0.0193525	13.9817904	0.00155031	0.99473183	0.9999028	Nsig
MgtBC (VF01	-1.00E-07	13.7319599	4.78E-07	0.9999028	0.9999028	Nsig
O-antigen (V	-1.00E-07	13.7319599	4.78E-07	0.9999028	0.9999028	Nsig
xcp secretior	-1.00E-07	13.7319599	4.78E-07	0.9999028	0.9999028	Nsig

Suplemento 22.

VFID cluster	VF functional cluster1	VF functional cluster2	Effect	coef	stderr	pval	qval	-log(qval)*s
F1C fimbriae (VF0224)	Adherence	Fimbrial adhesin	TC-mgdl	-12.948166	0.67440164	4.20E-22	2.25E-21	-20.64813
S fimbriae (VF0222)	Adherence	Fimbrial adhesin	TC-mgdl	-13.414181	0.68110298	1.63E-22	9.07E-22	-21.04253
Paa (VF0194)	Adherence	Non-fimbrial adhesin	TC-mgdl	71.3219577	0.71307686	1.31E-50	7.65E-49	48.11618
Paa (VF0194)	Adherence	Non-fimbrial adhesin	Total Energy	-76.108773	0.77415937	3.02E-52	1.51E-50	-49.82129
F1C fimbriae (VF0224)	Adherence	Fimbrial adhesin	Glu-mgdl	-17.051029	0.4941806	6.43E-32	5.67E-31	-30.2463
S fimbriae (VF0222)	Adherence	Fimbrial adhesin	Glu-mgdl	-17.618472	0.49887274	2.55E-32	2.39E-31	-40.62144
Paa (VF0194)	Adherence	Non-fimbrial adhesin	Glu-mgdl	25.3801522	0.67196392	1.76E-33	1.76E-32	31.75451
F1C fimbriae (VF0224)	Adherence	Fimbrial adhesin	Pattern1	1.5568923	0.31331814	1.18E-05	0.00014726	3.831916
P fimbriae (CVF425,VF0220)	Adherence	Fimbrial adhesin	Pattern1	-1.6856341	0.50886786	0.00190858	0.02120644	-1.673532
S fimbriae (VF0222)	Adherence	Fimbrial adhesin	Pattern1	1.55689276	0.31333538	1.18E-05	0.00014726	3.831916
F1C fimbriae (VF0224)	Adherence	Fimbrial adhesin	Sugar %	-40.498048	0.33852961	6.73E-56	1.35E-53	-52.87112
S fimbriae (VF0222)	Adherence	Fimbrial adhesin	Sugar %	-41.991556	0.33884169	1.48E-56	5.92E-54	-53.22731
F1C fimbriae (VF0224)	Adherence	Fimbrial adhesin	TG-mgdl	13.74137	0.17300169	1.58E-46	2.64E-45	44.57868
S fimbriae (VF0222)	Adherence	Fimbrial adhesin	TG-mgdl	14.2424342	0.17326244	3.91E-47	7.33E-46	45.13471
Paa (VF0194)	Adherence	Non-fimbrial adhesin	TG-mgdl	-18.502369	0.23553209	2.48E-46	3.73E-45	-44.42879
Map (VF0195)	Effector delivery system	Type III secretion system (T3SS)	TC-mgdl	-179.02514	1.84953884	4.98E-50	1.49E-48	-47.82575
Tsh (VF0233)	Effector delivery system	Type V secretion system (T5SS)	TC-mgdl	-11.875142	0.65379937	3.23E-21	1.51E-20	-19.81978
Map (VF0195)	Effector delivery system	Type III secretion system (T3SS)	Glu-mgdl	-6.3682925	0.25519021	2.07E-26	1.20E-25	-24.9219
Tir (VF0193)	Effector delivery system	Type III secretion system (T3SS)	Glu-mgdl	20.7336558	0.20810329	1.53E-50	7.65E-49	48.11618
Tsh (VF0233)	Effector delivery system	Type V secretion system (T5SS)	TG-mgdl	-15.721627	0.47975397	4.95E-31	3.53E-30	-29.45162
HSI-I (VF0334)	Effector delivery system	Type VI secretion system (T6SS)	W:H	-75.927064	0.76326617	1.63E-50	1.22E-48	-47.91247
Tsh (VF0233)	Effector delivery system	Type V secretion system (T5SS)	Pattern1	1.5568927	0.31333342	1.18E-05	0.00014726	3.831916
Sat (VF0231)	Effector delivery system	Type V secretion system (T5SS)	Sat FA %	1.00209311	0.27851015	8.23E-04	0.02992033	1.524034
Tsh (VF0233)	Effector delivery system	Type V secretion system (T5SS)	Sugar %	-36.979564	0.33770632	2.98E-54	1.99E-52	-51.70169
Map (VF0195)	Effector delivery system	Type III secretion system (T3SS)	TG-mgdl	51.279604	0.55495381	3.31E-49	7.10E-48	47.1489
Tir (VF0193)	Effector delivery system	Type III secretion system (T3SS)	TG-mgdl	-13.526973	0.50656093	1.51E-27	9.86E-27	-26.00616
Tsh (VF0233)	Effector delivery system	Type V secretion system (T5SS)	TG-mgdl	12.5792605	0.17227345	4.87E-45	5.22E-44	43.28259
HSI-I (VF0334)	Effector delivery system	Type VI secretion system (T6SS)	BMI	-55.884894	1.11826436	2.32E-38	3.86E-37	-36.41353
CNF-1 (VF0240)	Exotoxin	Intracellularly active toxin	TC-mgdl	-11.875142	0.65379937	3.23E-21	1.51E-20	-19.81978
CT (VF0128)	Exotoxin	Intracellularly active toxin	TC-mgdl	2.3832271	0.73114144	0.00224759	0.00991584	2.00367
Heat-stable toxin (ST) (VF0211)	Exotoxin	Membrane-acting toxin	TC-mgdl	6.84430312	0.23649637	6.57E-29	4.48E-28	27.34867
CNF-1 (VF0240)	Exotoxin	Intracellularly active toxin	Glu-mgdl	-15.721627	0.47975397	4.95E-31	3.53E-30	-29.45162
Heat-stable toxin (ST) (VF0211)	Exotoxin	Membrane-acting toxin	Glu-mgdl	-13.365635	0.12074428	2.07E-52	3.11E-50	-49.50703
iota-toxin (VF0381)	Exotoxin	Intracellularly active toxin	W:H	-12.016873	0.18007684	1.89E-43	4.06E-42	-41.39141
Heat-stable toxin (ST) (VF0211)	Exotoxin	Membrane-acting toxin	W:H	29.4504786	0.33072023	1.50E-48	5.61E-47	46.25074
CNF-1 (VF0240)	Exotoxin	Intracellularly active toxin	Pattern1	1.5568927	0.31333342	1.18E-05	0.00014726	3.831916
EAST1 (VF0216)	Exotoxin	Membrane-acting toxin	Pattern1	-2.1017275	0.67061182	0.00314103	0.03141025	-1.502929
Heat-stable toxin (ST) (VF0211)	Exotoxin	Membrane-acting toxin	Pattern1	7.84815308	0.24776021	6.02E-31	3.01E-29	28.52146
CT (VF0128)	Exotoxin	Intracellularly active toxin	Pattern2	-4.1753843	1.41131567	0.00506004	0.04600037	-1.337239
Heat-stable toxin (ST) (VF0211)	Exotoxin	Membrane-acting toxin	Pattern2	-31.949266	0.22208023	3.34E-58	3.34E-56	-55.47604
EAST1 (VF0216)	Exotoxin	Membrane-acting toxin	Trans FA %	1.44012968	0.16891971	8.65E-11	4.33E-09	8.363828
CNF-1 (VF0240)	Exotoxin	Intracellularly active toxin	Sugar %	-36.979564	0.33770632	2.98E-54	1.99E-52	-51.70169
CT (VF0128)	Exotoxin	Intracellularly active toxin	Carbs %	-68.665347	0.66655834	4.08E-53	2.33E-51	-50.63238
CT (VF0128)	Exotoxin	Intracellularly active toxin	Carbs %	2.60715047	0.51292456	7.71E-06	3.43E-04	3.465015
CNF-1 (VF0240)	Exotoxin	Intracellularly active toxin	TG-mgdl	12.5792605	0.17227345	4.87E-45	5.22E-44	43.28259
CT (VF0128)	Exotoxin	Intracellularly active toxin	TG-mgdl	-7.47402	2.82643818	0.01154705	0.04948737	-1.305506
EAST1 (VF0216)	Exotoxin	Membrane-acting toxin	TG-mgdl	1.2391023	0.28336979	8.21E-05	0.00037303	3.428251
Heat-stable toxin (ST) (VF0211)	Exotoxin	Membrane-acting toxin	TG-mgdl	5.60654149	0.21805166	6.55E-27	4.09E-26	25.38797
iota-toxin (VF0381)	Exotoxin	Intracellularly active toxin	BMI	61.4607425	0.51120828	7.09E-54	1.06E-51	50.97357
Heat-stable toxin (ST) (VF0211)	Exotoxin	Membrane-acting toxin	BMI	31.2338155	0.42054652	2.44E-45	6.10E-44	43.21474
TcpC (VF0413)	Immune modulation	Immune modulation	TC-mgdl	-11.875142	0.65379937	3.23E-21	1.51E-20	-19.81978
LPS (CVF383,VF0124)	Immune modulation	Inflammatory signaling pathwa	Total Energy	1.50955351	0.42878333	0.00103289	0.02582236	1.588004
TcpC (VF0413)	Immune modulation	Immune modulation	Glu-mgdl	-15.721627	0.47975397	4.95E-31	3.53E-30	-29.45162
TcpC (VF0413)	Immune modulation	Immune modulation	Pattern1	1.5568927	0.31333342	1.18E-05	0.00014726	3.831916
LPS (CVF383,VF0124)	Immune modulation	Inflammatory signaling pathwa	MUFA %	-2.1914218	0.49943258	7.30E-05	0.00291907	-2.534755
TcpC (VF0413)	Immune modulation	Immune modulation	Sugar %	-36.979564	0.33770632	2.98E-54	1.99E-52	-51.70169
LPS (CVF383,VF0124)	Immune modulation	Inflammatory signaling pathwa	Carbs %	1.60901465	0.46496235	0.00122998	0.04099935	1.387223
TcpC (VF0413)	Immune modulation	Immune modulation	TG-mgdl	12.5792605	0.17227345	4.87E-45	5.22E-44	43.28259
IroN (VF0230)	Nutritional/Metabolic factor	Metal uptake	TC-mgdl	-11.875142	0.65379937	3.23E-21	1.51E-20	-19.81978
IroN (VF0230)	Nutritional/Metabolic factor	Metal uptake	Glu-mgdl	-15.721627	0.47975397	4.95E-31	3.53E-30	-29.45162
IroN (VF0230)	Nutritional/Metabolic factor	Metal uptake	Pattern1	1.5568927	0.31333342	1.18E-05	0.00014726	3.831916
IroN (VF0230)	Nutritional/Metabolic factor	Metal uptake	Sugar %	-36.979564	0.33770632	2.98E-54	1.99E-52	-51.70169
IroN (VF0230)	Nutritional/Metabolic factor	Metal uptake	TG-mgdl	12.5792605	0.17227345	4.87E-45	5.22E-44	43.28259

CUADRO DE VARIABLES

Nombre de la variable	Tipo	Característica	Estimador
Índice de masa corporal (IMC)	independiente	cuantitativa	media y mediana
Factores de virulencia (FV)	dependiente	cuantitativa	riqueza y abundancia relativa
Patrón dietario (P1 y P2)	covariable	cualitativa	PCA
Composición taxonómica de la microbiota	dependiente	cuantitativa	riqueza y abundancia relativa
Capacidad funcional	dependiente	cuantitativa	riqueza y abundancia relativa
Edad, sexo, actividad física	covariable	cuantitativa	media y mediana
antecedentes familiares de obesidad	covariable	cualitativa binominal	proporciones

DEFINICIONES

Sobrepeso Infantil

Índice de masa corporal de acuerdo al percentil de edad entre el 85 – 95 (10).

Obesidad Infantil

Índice de masa corporal de acuerdo al percentil de edad igual o por encima de 95 (10).

Obesidad Grave Infantil

Índice de masa corporal de acuerdo al percentil de edad por encima de 99 (10).

Microbiota humana

Comunidad ecológica de microorganismos comensales, simbioses y patógenos que habitan dentro del cuerpo (57). Este último es hospedero de 100×10^{12} microorganismos que incluyen bacterias anaerobias, archaeas, levaduras y parásitos (57). Las comunidades individuales de la microbiota son únicas, complejas, dinámicas y dependientes en una multitud de patrones nutricionales, ambientales y genéticos (57).

Disbiosis

Perturbación en la composición y función de la microbiota asociada a la pérdida de la salud del hospedero (96).

Patogenicidad

Capacidad de un parásito para causar daño en un hospedero (Brock, 10ªed).

Virulencia

Capacidad del patógeno de producir una enfermedad o grado de patogenicidad que es capaz de producir (Brock, 10ªed).

Factores de virulencia

Componentes de los microorganismos que determinan su capacidad para enfermar: toxinas y estructurales (Davis et al., Microbiology, 4th ed).

Abreviaciones

1/D: Índice de diversidad de Simpson inverso

A/E: lesiones de acoplamiento y borramiento (Attaching and effacing lesions)

AP-1: Proteína activadora 1 (activator protein 1)

IMC: Índice de Masa Corporal

BCFAs: Ácidos grasos de cadena ramificada (Branched-chain fatty acids)

CoA: coenzima A

COX-2: Ciclooxygenasa-2

CNF-1: Factor necrotizante citotóxico 1 (Cytotoxic necrotizing factor 1)

CT: Toxina de cólera

ENSANUT: Encuesta Nacional de Salud y Nutrición

EHEC & EPEC: E. coli Enterohemorrágica y Enteropatógena (Enterohemorrhagic and Enteropathogenic *E. coli*)

F/B: Relación Firmicutes: Bacteroidetes

FDR: Tasa falsa de descubrimiento (False discovery rate)

CFCA: Cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos

GEFs: Factores de intercambio de nucleótidos de guanina (Guanine nucleotide exchange factors)

H: Índice de diversidad de Shannon

HGT: Transferencia horizontal de genes (Horizontal gene transfer)

IL-6: Interleucina 6

LDA: Análisis lineal discriminante (Linear discriminant analysis)

LEE: Locus de borramiento de enterocitos (Locus of enterocyte effacement)

LEfSe: Análisis de tamaño de efecto lineal discriminante (Linear discriminant analysis effect size)

LOS: Lipooligosacáridos

LPS: Lipopolisacáridos

MaAsLin2: Asociaciones multivariadas con modelos lineales (Multivariate Association with Linear Models)

MUFAs: Ácidos grasos monoinsaturados (monounsaturated fatty acids)

NF- κ B: factor nuclear κ B

NMDS: Escalas multidimensionales no métricas (Non-metric multidimensional scaling)

NP: Normopeso

SPOB: Sobrepeso y obesidad

PAI: Isla de patogenicidad (Pathogenicity island)

PCA: Análisis de componentes principales

PUFA: Ácidos grasos poliinsaturados (Polyunsaturated fatty acids)

SCMG: genes marcadores de copia única (single copy marker genes)

S-FA: Ácidos grasos saturados (Saturated-fatty acids)

SPATEs: Autotransportadores de serin proteasa de Enterobacteriaceae (Serine protease autotransporters of Enterobacteriaceae)

AGCC/ SCFA: Ácidos grasos de cadena corta (Short chain fatty acids)

SIMPER: Análisis de similitud de porcentajes (Similarity of percentages analysis)

ST: Toxina termo-estable (Heat-stable toxin)

T-FA: Ácidos grasos trans (Trans-fatty acids)

T3SS: Sistema de secreción tipo III (Type III secretion system)

T5SS: Sistema de secreción tipo V (Type V secretion system)

T6SS: Sistema de secreción tipo VI (Type VI secretion system)

Tir: Receptor de intimina (Intimin receptor)

TLR4: Receptor parecido a Toll 4 (Toll-like receptor 4)

TMA: Trimetilamine

TMAO: Trimetilamine N-oxido

TNF- α : Factor de necrosis tumoral alpha

Tsh: hemaglutinina sensible a temperatura (Temperature-sensitive hemagglutinin)

VFDB: Virulence Factor Data Base

W:H: Índice cintura-cadera

OMS (WHO): Organización Mundial de la Salud (World Health Organization)

WRST: Wilcoxon Rank Sum Test

wUF: weighted Unifrac

Bibliografía

1. Subramanian S, Huq S, Yatsunenkov T, Haque R, Mahfuz M, Alam MA, et al. Persistent gut microbiota immaturity in malnourished Bangladeshi children. *Nature*. 2014 Jun;510(7505):417–21.
2. The GBD 2015 Obesity Collaborators. Health Effects of Overweight and Obesity in 195 Countries over 25 Years. *N Engl J Med*. 2017 Jul 6;377(1):13–27.
3. Turta O, Rautava S. Antibiotics, obesity and the link to microbes - what are we doing to our children? *BMC Med*. 2016 Dec;14(1):57, s12916-016-0605–7.
4. Hruby A, Hu FB. The Epidemiology of Obesity: A Big Picture. *Pharmacoeconomics*. 2015 Jul;33(7):673–89.
5. Haqq AM, Kebbe M, Tan Q, Manco M, Salas XR. The Complexity and Stigma of Pediatric Obesity. *Child Obes*. 2021 Jun 1;17(4):229–40.
6. Bertran Vilà M. Acercamiento antropológico de la alimentación y salud en México. *Physis*. 2010;20:387–411.
7. Guerra JF, López RMV. Antecedentes históricos sociales de la obesidad en México. 2006;4.
8. Barrera-Cruz A, Rodríguez-González A, Ayala MAM. Escenario actual de la obesidad en México. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*. 2013;51(3):292–9.
9. Bahreynian M, Qorbani M, Khaniabadi BM, Motlagh ME, Safari O, Asayesh H, et al. Association between Obesity and Parental Weight Status in Children and Adolescents. *J Clin Res Pediatr Endocrinol*. 2017 Jun;9(2):111–7.
10. Krebs N, Primak L, Marcdante K, Kliegman R, Jenson H, Behrman R. Sección 6: Nutrición pediátrica y trastornos nutricionales. Capítulo 29: Obesidad. Capítulo 30: Desnutrición pediátrica. In: Nelson: *Pediatría esencial*. 6ªed. Elsevier Saunders; 2011. p. 835 (109-114).
11. Kanaya A, Vaisse C, Gardner D, Shoback D. Capítulo 20: Obesidad. In: *Greenspan Endocrinología Básica y Clínica*. 9th ed. McGrawHill Lange; 2012. p. 897(699-710).
12. Tsujimoto T, Kajio H, Sugiyama T. Obesity, diabetes, and length of time in the United States: Analysis of National Health and Nutrition Examination Survey 1999 to 2012. *Medicine (Baltimore)*. 2016 Aug;95(35):e4578.
13. Romero-Martínez M, Shamah-Levy T, Vielma-Orozco E, Heredia-Hernández O, Mojica-Cuevas J, Cuevas-Nasu L, et al. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición

- 2018-19: metodología y perspectivas. *Salud Publica Mex.* 2019 Dec 5;61(6, nov-dic):917–23.
14. Di Cesare M, Sorić M, Bovet P, Miranda JJ, Bhutta Z, Stevens GA, et al. The epidemiological burden of obesity in childhood: a worldwide epidemic requiring urgent action. *BMC Medicine.* 2019 Nov 25;17(1):212.
 15. Corcoran MP, Lamon-Fava S, Fielding RA. Skeletal muscle lipid deposition and insulin resistance: effect of dietary fatty acids and exercise. *Am J Clin Nutr.* 2007 Mar;85(3):662–77.
 16. Liria R. Consecuencias De La Obesidad En El Niño Y El Adolescente: Un Problema Que Requiere Atención. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública.* 2012;29(3):357–60.
 17. Abbasi A, Juszczak D, van Jaarsveld CHM, Gulliford MC. Body Mass Index and Incident Type 1 and Type 2 Diabetes in Children and Young Adults: A Retrospective Cohort Study. *J Endocr Soc.* 2017 May 1;1(5):524–37.
 18. Ipsen DH, Tveden-Nyborg P, Lykkesfeldt J. Dyslipidemia: Obese or Not Obese—That Is Not the Question. *Curr Obes Rep.* 2016 Dec 1;5(4):405–12.
 19. Reaven GM. The metabolic syndrome: is this diagnosis necessary? *The American Journal of Clinical Nutrition.* 2006 Jun 1;83(6):1237–47.
 20. Alberti KGMM, Zimmet P, Shaw J. Metabolic syndrome--a new world-wide definition. A Consensus Statement from the International Diabetes Federation. *Diabet Med.* 2006 May;23(5):469–80.
 21. Simmons RK, Alberti KGMM, Gale EAM, Colagiuri S, Tuomilehto J, Qiao Q, et al. The metabolic syndrome: useful concept or clinical tool? Report of a WHO Expert Consultation. *Diabetologia.* 2010 Apr 1;53(4):600–5.
 22. Assadi F. Prehypertension: A Warning Sign of Future Cardiovascular Risk. *Int J Prev Med.* 2014 Mar;5(Suppl 1):S4–9.
 23. Wiechert M, Holzapfel C. Nutrition Concepts for the Treatment of Obesity in Adults. *Nutrients.* 2022 Jan;14(1):169.
 24. Actividad física [Internet]. 2020 [cited 2022 May 10]. Available from: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/physical-activity>
 25. Wang Y, Kassab GS. Efficacy and Mechanisms of Gastric Volume-Restriction Bariatric Devices. *Frontiers in Physiology* [Internet]. 2021 [cited 2022 Mar 7];12. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fphys.2021.761481>

26. Billeter AT, Fischer L, Wekerle AL, Senft J, Müller-Stich B. Malabsorption as a Therapeutic Approach in Bariatric Surgery. *Viszeralmedizin*. 2014 Jun;30(3):198–204.
27. Abdelaal M, le Roux CW, Docherty NG. Morbidity and mortality associated with obesity. *Ann Transl Med*. 2017 Apr;5(7):161.
28. Freedman DS, Dietz WH, Srinivasan SR, Berenson GS. The relation of overweight to cardiovascular risk factors among children and adolescents: the Bogalusa Heart Study. *Pediatrics*. 1999 Jun;103(6 Pt 1):1175–82.
29. Hawkes C, Smith TG, Jewell J, Wardle J, Hammond RA, Friel S, et al. Smart food policies for obesity prevention. *The Lancet*. 2015 Jun;385(9985):2410–21.
30. Kong AS, Sussman AL, Yahne C, Skipper BJ, Burge MR, Davis SM. School-based health center intervention improves body mass index in overweight and obese adolescents. *J Obes*. 2013;2013:575016.
31. Lakshman R, Elks CE, Ong KK. Childhood Obesity. *Circulation*. 2012 Oct 2;126(14):1770–9.
32. Shamah-Levy T, Vielma-Orozco E, Heredia-Hernández O, Romero-Martínez M, Mojica-Cuevas J, Cuevas-Nasu L, et al. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2018-19: Resultados Nacionales. [Internet]. Cuernavaca, México: Instituto Nacional de Salud Pública. 2020 [cited 2022 Mar 7]. Available from: <https://ensanut.insp.mx/encuestas/ensanut2018/informes.php>
33. Clifton PM. Dietary treatment for obesity. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2008 Dec;5(12):672–81.
34. Martinez JA, Navas-Carretero S, Saris WHM, Astrup A. Personalized weight loss strategies—the role of macronutrient distribution. *Nat Rev Endocrinol*. 2014 Dec;10(12):749–60.
35. Gorkiewicz G, Moschen A. Gut microbiome: a new player in gastrointestinal disease. *Virchows Arch*. 2018 Jan 1;472(1):159–72.
36. Shkoporov AN, Hill C. Bacteriophages of the Human Gut: The “Known Unknown” of the Microbiome. *Cell Host & Microbe*. 2019 Feb 13;25(2):195–209.
37. Haynes M, Rohwer F. The Human Virome. *Metagenomics of the Human Body*. 2010 Oct 11;63–77.
38. Whitman WB, Coleman DC, Wiebe WJ. Prokaryotes: the unseen majority. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Jun 9;95(12):6578–83.
39. van Schaik W. The human gut resistome. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2015 Jun 5;370(1670):20140087.

40. Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*. 2010 Mar;464(7285):59–65.
41. Clemente JC, Ursell LK, Parfrey LW, Knight R. The Impact of the Gut Microbiota on Human Health: An Integrative View. *Cell*. 2012 Mar;148(6):1258–70.
42. Wu GD, Chen J, Hoffmann C, Bittinger K, Chen YY, Keilbaugh SA, et al. Linking Long-Term Dietary Patterns with Gut Microbial Enterotypes. *Science*. 2011 Oct 7;334(6052):105–8.
43. O'Hara AM, Shanahan F. The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Rep*. 2006 Jul;7(7):688–93.
44. Turnbaugh PJ, Hamady M, Yatsunencko T, Cantarel BL, Duncan A, Ley RE, et al. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature*. 2009 Jan;457(7228):480–4.
45. Sonnenburg JL, Bäckhed F. Diet-microbiota interactions as moderators of human metabolism. *Nature*. 2016 Jul 7;535(7610):56–64.
46. David LA, Materna AC, Friedman J, Campos-Baptista MI, Blackburn MC, Perrotta A, et al. Host lifestyle affects human microbiota on daily timescales. *Genome Biology*. 2014 Jul 25;15(7):R89.
47. Jiménez E, Marín ML, Martín R, Odriozola JM, Olivares M, Xaus J, et al. Is meconium from healthy newborns actually sterile? *Res Microbiol*. 2008 Apr;159(3):187–93.
48. Stinson LF, Boyce MC, Payne MS, Keelan JA. The Not-so-Sterile Womb: Evidence That the Human Fetus Is Exposed to Bacteria Prior to Birth. *Frontiers in Microbiology* [Internet]. 2019 [cited 2022 Mar 10];10. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2019.01124>
49. Walter J, Hornef MW. A philosophical perspective on the prenatal in utero microbiome debate. *Microbiome*. 2021 Enero;9(1):5.
50. Kim G, Bae J, Kim MJ, Kwon H, Park G, Kim SJ, et al. Delayed Establishment of Gut Microbiota in Infants Delivered by Cesarean Section. *Frontiers in Microbiology* [Internet]. 2020 [cited 2022 Mar 10];11. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2020.02099>
51. Renz H, Holt PG, Inouye M, Logan AC, Prescott SL, Sly PD. An exposome perspective: Early-life events and immune development in a changing world. *J Allergy Clin Immunol*. 2017 Jul;140(1):24–40.

52. Stinson LF, Payne MS, Keelan JA. A Critical Review of the Bacterial Baptism Hypothesis and the Impact of Cesarean Delivery on the Infant Microbiome. *Front Med (Lausanne)*. 2018;5:135.
53. Blaser MJ. The theory of disappearing microbiota and the epidemics of chronic diseases. *Nat Rev Immunol*. 2017 Jul 27;17(8):461–3.
54. Belkaid Y, Tamoutounour S. The influence of skin microorganisms on cutaneous immunity. *Nat Rev Immunol*. 2016 May 27;16(6):353–66.
55. Barton ES, White DW, Cathelyn JS, Brett-McClellan KA, Engle M, Diamond MS, et al. Herpesvirus latency confers symbiotic protection from bacterial infection. *Nature*. 2007 May 17;447(7142):326–9.
56. Zuo ZT, Ma Y, Sun Y, Bai CQ, Ling CH, Yuan FL. The Protective Effects of *Helicobacter pylori* Infection on Allergic Asthma. *Int Arch Allergy Immunol*. 2021 Jan;182(1):53–64.
57. Murray E, Manary M. Possible role of the microbiome in the development of acute malnutrition and implications for food-based strategies to prevent and treat acute malnutrition. *Food Nutr Bull*. 2015 Mar;36(1 Suppl):S72-75.
58. Francino MP. Antibiotics and the Human Gut Microbiome: Dysbioses and Accumulation of Resistances. *Front Microbiol*. 2015;6:1543.
59. Scott KP, Gratz SW, Sheridan PO, Flint HJ, Duncan SH. The influence of diet on the gut microbiota. *Pharmacological Research*. 2013 Mar;69(1):52–60.
60. Wu G, Zhang C, Wang J, Zhang F, Wang R, Shen J, et al. Diminution of the gut resistome after a gut microbiota-targeted dietary intervention in obese children. *Sci Rep*. 2016 Apr;6(1):24030.
61. Riva A, Borgo F, Lassandro C, Verduci E, Morace G, Borghi E, et al. Pediatric obesity is associated with an altered gut microbiota and discordant shifts in *Firmicutes* populations. *Environ Microbiol*. 2017 Jan;19(1):95–105.
62. Tseng CH, Wu CY. The gut microbiome in obesity. *Journal of the Formosan Medical Association*. 2019 Mar;118:S3–9.
63. Hollister EB, Foster BA, Dahdouli M, Ramirez J, Lai Z. Characterization of the Stool Microbiome in Hispanic Preschool Children by Weight Status and Time. *Childhood Obesity*. 2018 Feb;14(2):122–30.
64. Martinez JE, Kahana DD, Ghuman S, Wilson HP, Wilson J, Kim SCJ, et al. Unhealthy Lifestyle and Gut Dysbiosis: A Better Understanding of the Effects of Poor Diet and Nicotine on the Intestinal Microbiome. *Frontiers in Endocrinology [Internet]*. 2021 [cited 2022 Jun 26];12. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fendo.2021.667066>

65. Zeng MY, Inohara N, Nuñez G. Mechanisms of inflammation-driven bacterial dysbiosis in the gut. *Mucosal Immunology*. 2017 Jan;10(1):18–26.
66. Kitamoto S, Nagao-Kitamoto H, Kuffa P, Kamada N. Regulation of virulence: the rise and fall of gastrointestinal pathogens. *J Gastroenterol*. 2016 Mar;51(3):195–205.
67. Ellulu MS, Patimah I, Khaza'ai H, Rahmat A, Abed Y. Obesity and inflammation: the linking mechanism and the complications. *Arch Med Sci*. 2017 Jun;13(4):851–63.
68. Stecher B, Maier L, Hardt WD. “Blooming” in the gut: how dysbiosis might contribute to pathogen evolution. *Nat Rev Microbiol*. 2013 Apr;11(4):277–84.
69. Casadevall A, Pirofski L. Virulence factors and their mechanisms of action: the view from a damage–response framework. *Journal of Water and Health*. 2009 Aug 1;7(S1):S2–18.
70. Casadevall A, Pirofski L. Host-Pathogen Interactions: Basic Concepts of Microbial Commensalism, Colonization, Infection, and Disease. *Infection and Immunity*. 2000 Dec;68(12):6511–8.
71. Cox GM, Mukherjee J, Cole GT, Casadevall A, Perfect JR. Urease as a Virulence Factor in Experimental Cryptococcosis. *Infection and Immunity*. 2000 Feb;68(2):443–8.
72. Ball LM, Criss AK. Constitutively Opa-Expressing and Opa-Deficient *Neisseria gonorrhoeae* Strains Differentially Stimulate and Survive Exposure to Human Neutrophils. *J Bacteriol*. 2013 Jul;195(13):2982–90.
73. Hoyer LL. The ALS gene family of *Candida albicans*. *Trends Microbiol*. 2001 Apr;9(4):176–80.
74. Sillanpää J, Xu Y, Nallapareddy SR, Murray BE, Höök M. A family of putative MSCRAMMs from *Enterococcus faecalis*. *Microbiology (Reading)*. 2004 Jul;150(Pt 7):2069–78.
75. Wann ER, Gurusiddappa S, Hook M. The fibronectin-binding MSCRAMM FnbpA of *Staphylococcus aureus* is a bifunctional protein that also binds to fibrinogen. *J Biol Chem*. 2000 May 5;275(18):13863–71.
76. Avalos Vizcarra I, Hosseini V, Kollmannsberger P, Meier S, Weber SS, Arnoldini M, et al. How type 1 fimbriae help *Escherichia coli* to evade extracellular antibiotics. *Sci Rep*. 2016 Jan 5;6(1):18109.
77. Soutourina OA, Bertin PN. Regulation cascade of flagellar expression in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. 2003 Oct 1;27(4):505–23.

78. Goldberg MB. Actin-Based Motility of Intracellular Microbial Pathogens. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2001 Dec;65(4):595–626.
79. Bäumler AJ, Sperandio V. Interactions between the microbiota and pathogenic bacteria in the gut. *Nature*. 2016 Jul 7;535(7610):85–93.
80. Garsin DA. Ethanolamine utilization in bacterial pathogens: roles and regulation. *Nat Rev Microbiol*. 2010 Apr;8(4):290–5.
81. Mattoo S, Foreman-Wykert AK, Cotter PA, Miller JF. Mechanisms of *Bordetella* pathogenesis. *Frontiers in Bioscience-Landmark*. 2001 Nov 1;6(4):168–86.
82. Remaut H, Waksman G. Structural biology of bacterial pathogenesis. *Current Opinion in Structural Biology*. 2004 Abril;14(2):161–70.
83. Sandkvist M. Biology of type II secretion. *Molecular Microbiology*. 2001;40(2):271–83.
84. McKenney ES, Kendall MM. Microbiota and pathogen “pas de deux”: setting up and breaking down barriers to intestinal infection. *Pathog Dis*. 2016 Jul;74(5):ftw051.
85. Christie PJ. Type IV secretion: intercellular transfer of macromolecules by systems ancestrally related to conjugation machines. *Molecular Microbiology*. 2001;40(2):294–305.
86. Collier RJ, Young JAT. Anthrax Toxin. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 2003;19(1):45–70.
87. Peterson JW. Bacterial Pathogenesis. In: Baron S, editor. *Medical Microbiology* [Internet]. 4th ed. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996 [cited 2022 Mar 14]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8526/>
88. Henderson B, Poole S, Wilson M. Bacterial modulins: a novel class of virulence factors which cause host tissue pathology by inducing cytokine synthesis. *Microbiol Rev*. 1996 Jun;60(2):316–41.
89. Lau GW, Ran H, Kong F, Hassett DJ, Mavrodi D. *Pseudomonas aeruginosa* Pyocyanin Is Critical for Lung Infection in Mice. *Infection and Immunity*. 2004 Jul;72(7):4275–8.
90. Lyke KE, Diallo DA, Dicko A, Kone A, Coulibaly D, Guindo A, et al. ASSOCIATION OF INTRALEUKOCYtic PLASMODIUM FALCIPARUM MALARIA PIGMENT WITH DISEASE SEVERITY, CLINICAL MANIFESTATIONS, AND PROGNOSIS IN SEVERE MALARIA. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2003 Sep 1;69(3):253–9.

91. Rautemaa R, Meri S. Complement-resistance mechanisms of bacteria. *Microbes and Infection*. 1999 Agosto;1(10):785–94.
92. Jarva H, Jokiranta TS, Würzner R, Meri S. Complement resistance mechanisms of streptococci. *Molecular Immunology*. 2003 Sep 1;40(2):95–107.
93. Ram S, Mackinnon FG, Gulati S, McQuillen DP, Vogel U, Frosch M, et al. The contrasting mechanisms of serum resistance of *Neisseria gonorrhoeae* and group B *Neisseria meningitidis*. *Molecular Immunology*. 1999 Sep 1;36(13):915–28.
94. Estrada-Velasco BI, Cruz M, García-Mena J, Salgado AV, Romero JP, Serrano MDLRG, et al. Childhood obesity is associated to the interaction between firmicutes and high energy food consumption. *Nutricion hospitalaria*. 2015 Oct 3;1074–81.
95. Orbe-Orihuela YC, Lagunas-Martínez A, Bahena-Román M, Madrid-Marina V, Torres-Poveda K, Flores-Alfaro E, et al. High relative abundance of firmicutes and increased TNF- α levels correlate with obesity in children. *Salud Publica Mex*. 2018;60(1, ene-feb):5–11.
96. Francino MP. Antibiotics and the Human Gut Microbiome: Dysbioses and Accumulation of Resistances. *Frontiers in Microbiology* [Internet]. 2016 [cited 2022 Feb 24];6. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2015.01543>
97. Stecher B, Denzler R, Maier L, Bernet F, Sanders MJ, Pickard DJ, et al. Gut inflammation can boost horizontal gene transfer between pathogenic and commensal Enterobacteriaceae. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Jan 24;109(4):1269–74.
98. Winter SE, Thiennimitr P, Winter MG, Butler BP, Huseby DL, Crawford RW, et al. Gut inflammation provides a respiratory electron acceptor for *Salmonella*. *Nature*. 2010 Sep 23;467(7314):426–9.
99. Hu FB. Dietary pattern analysis: a new direction in nutritional epidemiology: *Current Opinion in Lipidology*. 2002 Feb;13(1):3–9.
100. Hu FB, Rimm E, Smith-Warner SA, Feskanich D, Stampfer MJ, Ascherio A, et al. Reproducibility and validity of dietary patterns assessed with a food-frequency questionnaire. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 1999 Feb 1;69(2):243–9.
101. de Onis M. Development of a WHO growth reference for school-aged children and adolescents. *Bull World Health Organ*. 2007 Sep 1;85(09):660–7.
102. Van de Peer Y, Chapelle S, De Wachter R. A quantitative map of nucleotide substitution rates in bacterial rRNA. *Nucleic Acids Res*. 1996 Sep 1;24(17):3381–91.

103. Thomas T, Gilbert J, Meyer F. Metagenomics - a guide from sampling to data analysis. *Microbial Informatics and Experimentation*. 2012 Feb 9;2(1):3.
104. Sharpton TJ. An introduction to the analysis of shotgun metagenomic data. *Frontiers in Plant Science* [Internet]. 2014 [cited 2022 May 10];5. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2014.00209>
105. Quince C, Walker AW, Simpson JT, Loman NJ, Segata N. Shotgun metagenomics, from sampling to analysis. *Nat Biotechnol*. 2017 Sep;35(9):833–44.
106. Andrews S. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. [Internet]. 2010. Available from: Available online at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>
107. Martin M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.journal*. 2011 May 2;17(1):10–2.
108. Langmead B, Salzberg SL. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods*. 2012 Apr;9(4):357–9.
109. Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, et al. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*. 2009 Aug 15;25(16):2078–9.
110. Nurk S, Meleshko D, Korobeynikov A, Pevzner PA. metaSPAdes: a new versatile metagenomic assembler. *Genome Res*. 2017 May;27(5):824–34.
111. Gurevich A, Saveliev V, Vyahhi N, Tesler G. QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics*. 2013 Apr 15;29(8):1072–5.
112. Mikheenko A, Saveliev V, Gurevich A. MetaQUAST: evaluation of metagenome assemblies. *Bioinformatics*. 2016 Apr 1;32(7):1088–90.
113. Tamames J, Cobo-Simón M, Puente-Sánchez F. Assessing the performance of different approaches for functional and taxonomic annotation of metagenomes. *BMC Genomics*. 2019 Dec;20(1):960.
114. Wood DE, Lu J, Langmead B. Improved metagenomic analysis with Kraken 2. *Genome Biol*. 2019 Dec;20(1):257.
115. Escobar-Zepeda A, Godoy-Lozano EE, Raggi L, Segovia L, Merino E, Gutiérrez-Rios RM, et al. Analysis of sequencing strategies and tools for taxonomic annotation: Defining standards for progressive metagenomics. *Sci Rep*. 2018 Dec;8(1):12034.
116. Beghini F, McIver LJ, Blanco-Míguez A, Dubois L, Asnicar F, Maharjan S, et al. Integrating taxonomic, functional, and strain-level profiling of diverse microbial

- communities with bioBakery 3. Turnbaugh P, Franco E, Brown CT, editors. *eLife*. 2021 May 4;10:e65088.
117. Milanese A, Mende DR, Paoli L, Salazar G, Ruscheweyh HJ, Cuenca M, et al. Microbial abundance, activity and population genomic profiling with mOTUs2. *Nat Commun*. 2019 Dec;10(1):1014.
 118. Sunagawa S, Mende DR, Zeller G, Izquierdo-Carrasco F, Berger SA, Kultima JR, et al. Metagenomic species profiling using universal phylogenetic marker genes. *Nat Methods*. 2013 Dec;10(12):1196–9.
 119. McIntyre ABR, Ounit R, Afshinnekoo E, Prill RJ, Hénaff E, Alexander N, et al. Comprehensive benchmarking and ensemble approaches for metagenomic classifiers. *Genome Biol*. 2017 Dec;18(1):182.
 120. Meyer F, Bremges A, Belmann P, Janssen S, McHardy AC, Koslicki D. Assessing taxonomic metagenome profilers with OPAL. *Genome Biology*. 2019 Mar 4;20(1):51.
 121. Sczyrba A, Hofmann P, Belmann P, Koslicki D, Janssen S, Dröge J, et al. Critical Assessment of Metagenome Interpretation—a benchmark of metagenomics software. *Nat Methods*. 2017 Nov;14(11):1063–71.
 122. Truong DT, Tett A, Pasolli E, Huttenhower C, Segata N. Microbial strain-level population structure and genetic diversity from metagenomes. *Genome Res*. 2017 Apr 1;27(4):626–38.
 123. Ye SH, Siddle KJ, Park DJ, Sabeti PC. Benchmarking Metagenomics Tools for Taxonomic Classification. *Cell*. 2019 Aug;178(4):779–94.
 124. McMurdie PJ, Holmes S. phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. Watson M, editor. *PLoS ONE*. 2013 Apr 22;8(4):e61217.
 125. Oksanen J. *Vegan: ecological diversity*. 2020;1–17.
 126. Segata N, Izard J, Waldron L, Gevers D, Miropolsky L, Garrett WS, et al. Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biol*. 2011;12(6):R60.
 127. Fu L, Niu B, Zhu Z, Wu S, Li W. CD-HIT: accelerated for clustering the next-generation sequencing data. *Bioinformatics*. 2012 Dec 1;28(23):3150–2.
 128. Aramaki T, Blanc-Mathieu R, Endo H, Ohkubo K, Kanehisa M, Goto S, et al. KofamKOALA: KEGG Ortholog assignment based on profile HMM and adaptive score threshold. Valencia A, editor. *Bioinformatics*. 2020 Apr 1;36(7):2251–2.

129. McCarthy DJ, Chen Y, Smyth GK. Differential expression analysis of multifactor RNA-Seq experiments with respect to biological variation. *Nucleic Acids Res.* 2012 May;40(10):4288–97.
130. Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics.* 2010 Jan 1;26(1):139–40.
131. Franzosa EA, Mclver LJ, Rahnavard G, Thompson LR, Schirmer M, Weingart G, et al. Species-level functional profiling of metagenomes and metatranscriptomes. *Nat Methods.* 2018 Nov;15(11):962–8.
132. Chen L, Zheng D, Liu B, Yang J, Jin Q. VFDB 2016: hierarchical and refined dataset for big data analysis—10 years on. *Nucleic Acids Res.* 2016 Jan 4;44(D1):D694–7.
133. Liu B, Zheng D, Jin Q, Chen L, Yang J. VFDB 2019: a comparative pathogenomic platform with an interactive web interface. *Nucleic Acids Research.* 2019 Jan 8;47(D1):D687–92.
134. Mallick H, Rahnavard A, Mclver LJ, Ma S, Zhang Y, Nguyen LH, et al. Multivariable association discovery in population-scale meta-omics studies. *PLOS Computational Biology.* 2021 Nov 16;17(11):e1009442.
135. Falony G, Joossens M, Vieira-Silva S, Wang J, Darzi Y, Faust K, et al. Population-level analysis of gut microbiome variation. *Science.* 2016 Apr 29;352(6285):560–4.
136. Thingholm LB, Rühlemann MC, Koch M, Fuqua B, Laucke G, Boehm R, et al. Obese Individuals with and without Type 2 Diabetes Show Different Gut Microbial Functional Capacity and Composition. *Cell Host & Microbe.* 2019 Aug;26(2):252–264.e10.
137. Zhernakova A, Kurilshikov A, Bonder MJ, Tigchelaar EF, Schirmer M, Vatanen T, et al. Population-based metagenomics analysis reveals markers for gut microbiome composition and diversity. *Science.* 2016 Apr 29;352(6285):565–9.
138. Bairoch A. The ENZYME database in 2000. *Nucleic Acids Research.* 2000 Enero;28(1):304–5.
139. Caspi R, Billington R, Ferrer L, Foerster H, Fulcher CA, Keseler IM, et al. The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes and the BioCyc collection of pathway/genome databases. *Nucleic Acids Res.* 2016 Jan 4;44(D1):D471–480.
140. Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, Bastelica D, et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes.* 2007 Jul;56(7):1761–72.

141. Cani PD, Bibiloni R, Knauf C, Waget A, Neyrinck AM, Delzenne NM, et al. Changes in Gut Microbiota Control Metabolic Endotoxemia-Induced Inflammation in High-Fat Diet-Induced Obesity and Diabetes in Mice. *Diabetes*. 2008 Jun 1;57(6):1470–81.
142. González-Muniesa P, Martínez-González MA, Hu FB, Després JP, Matsuzawa Y, Loos RJF, et al. Obesity. *Nature Reviews Disease Primers*. 2017 Jun 15;3(1):1–18.
143. Barquera S, Rivera JA. Obesity in Mexico: rapid epidemiological transition and food industry interference in health policies. *The Lancet Diabetes & Endocrinology*. 2020 Sep 1;8(9):746–7.
144. NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC). Trends in adult body-mass index in 200 countries from 1975 to 2014: a pooled analysis of 1698 population-based measurement studies with 19·2 million participants. *The Lancet*. 2016 Apr 2;387(10026):1377–96.
145. Hwang YC, Hayashi T, Fujimoto WY, Kahn SE, Leonetti DL, McNeely MJ, et al. Visceral abdominal fat accumulation predicts the conversion of metabolically healthy obese subjects to an unhealthy phenotype. *Int J Obes (Lond)*. 2015 Sep;39(9):1365–70.
146. Maya-Lucas O, Murugesan S, Nirmalkar K, Alcaraz LD, Hoyo-Vadillo C, Pizano-Zárata ML, et al. The gut microbiome of Mexican children affected by obesity. *Anaerobe*. 2019 Feb;55:11–23.
147. Leeming ER, Johnson AJ, Spector TD, Roy CIL. Effect of diet on the gut microbiota: Rethinking intervention duration. *Nutrients*. 2019;11(12):undefined-undefined.
148. Bowyer RCE, Jackson MA, Pallister T, Skinner J, Spector TD, Welch AA, et al. Use of dietary indices to control for diet in human gut microbiota studies. *Microbiome*. 2018 Apr 25;6(1):77.
149. Heiman ML, Greenway FL. A healthy gastrointestinal microbiome is dependent on dietary diversity. *Mol Metab*. 2016 May;5(5):317–20.
150. McDonald D, Hyde E, Debelius JW, Morton JT, Gonzalez A, Ackermann G, et al. American Gut: an Open Platform for Citizen Science Microbiome Research. *mSystems*. 2018 Jun;3(3):e00031-18.
151. Shikany JM, Demmer RT, Johnson AJ, Fino NF, Meyer K, Ensrud KE, et al. Association of dietary patterns with the gut microbiota in older, community-dwelling men. *Am J Clin Nutr*. 2019 Oct 1;110(4):1003–14.

152. Claesson MJ, Jeffery IB, Conde S, Power SE, O'Connor EM, Cusack S, et al. Gut microbiota composition correlates with diet and health in the elderly. *Nature*. 2012 Aug;488(7410):178–84.
153. Berding K, Holscher HD, Arthur AE, Donovan SM. Fecal microbiome composition and stability in 4- to 8-year old children is associated with dietary patterns and nutrient intake. *J Nutr Biochem*. 2018 Jun;56:165–74.
154. Razquin C, Martinez JA, Martinez-Gonzalez MA, Mitjavila MT, Estruch R, Marti A. A 3 years follow-up of a Mediterranean diet rich in virgin olive oil is associated with high plasma antioxidant capacity and reduced body weight gain. *European Journal of Clinical Nutrition*. 2009 Dec;63(12):1387–93.
155. Chassard C, Lacroix C. Carbohydrates and the human gut microbiota. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*. 2013 Jul;16(4):453–60.
156. Murga-Garrido SM, Hong Q, Cross TWL, Hutchison ER, Han J, Thomas SP, et al. Gut microbiome variation modulates the effects of dietary fiber on host metabolism. *Microbiome*. 2021 May 20;9(1):117.
157. Ferretti F, Mariani M. Simple vs. Complex Carbohydrate Dietary Patterns and the Global Overweight and Obesity Pandemic. *Int J Environ Res Public Health* [Internet]. 2017 Oct [cited 2021 May 27];14(10). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5664675/>
158. Payne AN, Chassard C, Lacroix C. Gut microbial adaptation to dietary consumption of fructose, artificial sweeteners and sugar alcohols: implications for host–microbe interactions contributing to obesity. *Obesity Reviews*. 2012;13(9):799–809.
159. Castaner O, Goday A, Park YM, Lee SH, Magkos F, Shioh SATE, et al. The Gut Microbiome Profile in Obesity: A Systematic Review. *International Journal of Endocrinology*. 2018;2018:1–9.
160. Bai J, Hu Y, Bruner DW. 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*. 2019 Apr;14(4):e12480.
161. Yun Y, Kim HN, Kim SE, Heo SG, Chang Y, Ryu S, et al. Comparative analysis of gut microbiota associated with body mass index in a large Korean cohort. *BMC Microbiology*. 2017 Jul 4;17(1):151.
162. Filippo CD, Cavalieri D, Paola MD, Ramazzotti M, Poullet JB, Massart S, et al. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *PNAS*. 2010 Aug 17;107(33):14691–6.

163. Bervoets L, Van Hoorenbeeck K, Kortleven I, Van Noten C, Hens N, Vael C, et al. Differences in gut microbiota composition between obese and lean children: a cross-sectional study. *Gut Pathog.* 2013;5(1):10.
164. Gallardo-Becerra L, Cornejo-Granados F, García-López R, Valdez-Lara A, Bikel S, Canizales-Quinteros S, et al. Metatranscriptomic analysis to define the Secrebiome, and 16S rRNA profiling of the gut microbiome in obesity and metabolic syndrome of Mexican children. *Microb Cell Fact.* 2020 Mar 6;19(1):61.
165. Houtman TA, Eckermann HA, Smidt H, de Weerth C. Gut microbiota and BMI throughout childhood: the role of firmicutes, bacteroidetes, and short-chain fatty acid producers. *Sci Rep.* 2022 Feb 24;12(1):3140.
166. Kasai C, Sugimoto K, Moritani I, Tanaka J, Oya Y, Inoue H, et al. Comparison of the gut microbiota composition between obese and non-obese individuals in a Japanese population, as analyzed by terminal restriction fragment length polymorphism and next-generation sequencing. *BMC Gastroenterol.* 2015 Aug 11;15(1):100.
167. Magne F, Gotteland M, Gauthier L, Zazueta A, Pesoa S, Navarrete P, et al. The Firmicutes/Bacteroidetes Ratio: A Relevant Marker of Gut Dysbiosis in Obese Patients? *Nutrients.* 2020 May 19;12(5):1474.
168. Sze MA, Schloss PD. Looking for a Signal in the Noise: Revisiting Obesity and the Microbiome. *mBio.* 2016 Aug 23;7(4).
169. Murugesan S, Ulloa-Martínez M, Martínez-Rojano H, Galván-Rodríguez FM, Miranda-Brito C, Romano MC, 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.* 2015 Jul;34(7):1337–46.
170. Andoh A, Nishida A, Takahashi K, Inatomi O, Imaeda H, Bamba S, et al. Comparison of the gut microbial community between obese and lean peoples using 16S gene sequencing in a Japanese population. *J Clin Biochem Nutr.* 2016 Jul;59(1):65–70.
171. Duan M, Wang Y, Zhang Q, Zou R, Guo M, Zheng H. Characteristics of gut microbiota in people with obesity. *PLOS ONE.* 2021 ago;16(8):e0255446.
172. Schwartz A, Taras D, Schäfer K, Beijer S, Bos NA, Donus C, et al. Microbiota and SCFA in Lean and Overweight Healthy Subjects. *Obesity.* 2010 Jan;18(1):190–5.
173. Vazquez-Moreno M, Perez-Herrera A, Locia-Morales D, Dizzel S, Meyre D, Stearns JC, et al. Association of gut microbiome with fasting triglycerides, fasting insulin and obesity status in Mexican children. *Pediatric Obesity.* 2021;16(5):e12748.

174. Nirmalkar K, Murugesan S, Pizano-Zárate M, Villalobos-Flores L, García-González C, Morales-Hernández R, et al. Gut Microbiota and Endothelial Dysfunction Markers in Obese Mexican Children and Adolescents. *Nutrients*. 2018 Dec 19;10(12):2009.
175. Yan H, Qin Q, Chen J, Yan S, Li T, Gao X, et al. Gut Microbiome Alterations in Patients With Visceral Obesity Based on Quantitative Computed Tomography. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* [Internet]. 2022 [cited 2022 Mar 1];11. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fcimb.2021.823262>
176. Dominguez-Bello MG, Godoy-Vitorino F, Knight R, Blaser MJ. Role of the microbiome in human development. *Gut*. 2019 Jun;68(6):1108–14.
177. Rodríguez JM, Murphy K, Stanton C, Ross RP, Kober OI, Juge N, et al. The composition of the gut microbiota throughout life, with an emphasis on early life. *Microb Ecol Health Dis*. 2015;26:26050.
178. Round JL, Mazmanian SK. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nat Rev Immunol*. 2009 May;9(5):313–23.
179. Boulangé CL, Neves AL, Chilloux J, Nicholson JK, Dumas ME. Impact of the gut microbiota on inflammation, obesity, and metabolic disease. *Genome Medicine*. 2016 Abril;8(1):42.
180. David LA, Maurice CF, Carmody RN, Gootenberg DB, Button JE, Wolfe BE, et al. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature*. 2014 Jan;505(7484):559–63.
181. Rashid T, Ebringer A, Wilson C. The Role of Klebsiella in Crohn's Disease with a Potential for the Use of Antimicrobial Measures. *International Journal of Rheumatology*. 2013 Oct 10;2013:e610393.
182. Zhang Q, Zhao H, Wu D, Cao D, Ma W. A comprehensive analysis of the microbiota composition and gene expression in colorectal cancer. *BMC Microbiol*. 2020 Dec;20(1):308.
183. Arias N, Arboleya S, Allison J, Kaliszewska A, Higarza SG, Gueimonde M, et al. The Relationship between Choline Bioavailability from Diet, Intestinal Microbiota Composition, and Its Modulation of Human Diseases. *Nutrients*. 2020 Aug 5;12(8):2340.
184. Dumas ME, Barton RH, Toye A, Cloarec O, Blancher C, Rothwell A, et al. Metabolic profiling reveals a contribution of gut microbiota to fatty liver phenotype in insulin-resistant mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Aug 15;103(33):12511–6.

185. Zmora N, Suez J, Elinav E. You are what you eat: diet, health and the gut microbiota. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2019 Jan;16(1):35–56.
186. Hentges DJ, Maier BR, Burton GC, Flynn MA, Tsutakawa RK. Effect of a high-beef diet on the fecal bacterial flora of humans. *Cancer Res*. 1977 Feb;37(2):568–71.
187. Singh RK, Chang HW, Yan D, Lee KM, Ucmak D, Wong K, et al. Influence of diet on the gut microbiome and implications for human health. *J Transl Med*. 2017 Dec;15(1):73.
188. Million M, Maraninchi M, Henry M, Armougom F, Richet H, Carrieri P, et al. Obesity-associated gut microbiota is enriched in *Lactobacillus reuteri* and depleted in *Bifidobacterium animalis* and *Methanobrevibacter smithii*. *Int J Obes*. 2012 Jun;36(6):817–25.
189. Fricke WF, Seedorf H, Henne A, Krüer M, Liesegang H, Hedderich R, et al. The Genome Sequence of *Methanosphaera stadtmanae* Reveals Why This Human Intestinal Archaeon Is Restricted to Methanol and H₂ for Methane Formation and ATP Synthesis. *J Bacteriol*. 2006 Jan;188(2):642–58.
190. Samuel BS, Gordon JI. A humanized gnotobiotic mouse model of host–archaeal–bacterial mutualism. *PNAS*. 2006 Jun 27;103(26):10011–6.
191. Duncan SH, Belenguer A, Holtrop G, Johnstone AM, Flint HJ, Lobley GE. Reduced dietary intake of carbohydrates by obese subjects results in decreased concentrations of butyrate and butyrate-producing bacteria in feces. *Appl Environ Microbiol*. 2007 Feb;73(4):1073–8.
192. Newman TM, Shively CA, Register TC, Appt SE, Yadav H, Colwell RR, et al. Diet, obesity, and the gut microbiome as determinants modulating metabolic outcomes in a non-human primate model. *Microbiome*. 2021 May 5;9(1):100.
193. Gomes AC, Hoffmann C, Mota JF. The human gut microbiota: Metabolism and perspective in obesity. *Gut Microbes*. 2018 Apr 18;1–18.
194. Ravaut G, Légiot A, Bergeron KF, Mounier C. Monounsaturated Fatty Acids in Obesity-Related Inflammation. *Int J Mol Sci [Internet]*. 2020 Dec 30 [cited 2021 Jun 3];22(1). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7795523/>
195. Calder PC, Ahluwalia N, Brouns F, Buetler T, Clement K, Cunningham K, et al. Dietary factors and low-grade inflammation in relation to overweight and obesity. *Br J Nutr*. 2011 Dec;106 Suppl 3:S5-78.
196. Cnop M. Fatty acids and glucolipotoxicity in the pathogenesis of Type 2 diabetes. *Biochemical Society Transactions*. 2008 May 21;36(3):348–52.

197. Lundman P, Boquist S, Samnegård A, Bennermo M, Held C, Ericsson CG, et al. A high-fat meal is accompanied by increased plasma interleukin-6 concentrations. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2007 Mar;17(3):195–202.
198. Shively CA, Appt SE, Vitolins MZ, Uberseder B, Michalson KT, Silverstein-Metzler MG, et al. Mediterranean versus Western Diet Effects on Caloric Intake, Obesity, Metabolism, and Hepatosteatois in Nonhuman Primates. *Obesity (Silver Spring)*. 2019 May;27(5):777–84.
199. De Filippis F, Pasolli E, Tett A, Tarallo S, Naccarati A, De Angelis M, et al. Distinct Genetic and Functional Traits of Human Intestinal Prevotella copri Strains Are Associated with Different Habitual Diets. *Cell Host & Microbe*. 2019 Mar;25(3):444-453.e3.
200. Raatz SK, Conrad Z, Jahns L, Belury MA, Picklo MJ. Modeled replacement of traditional soybean and canola oil with high-oleic varieties increases monounsaturated fatty acid and reduces both saturated fatty acid and polyunsaturated fatty acid intake in the US adult population. *Am J Clin Nutr*. 2018 Sep 1;108(3):594–602.
201. Oliphant K, Allen-Vercoe E. Macronutrient metabolism by the human gut microbiome: major fermentation by-products and their impact on host health. *Microbiome*. 2019 Dec;7(1):91.
202. Smits SA, Leach J, Sonnenburg ED, Gonzalez CG, Lichtman JS, Reid G, et al. Seasonal cycling in the gut microbiome of the Hadza hunter-gatherers of Tanzania. *Science*. 2017 Aug 25;357(6353):802–6.
203. Wu GD, Compher C, Chen EZ, Smith SA, Shah RD, Bittinger K, et al. Comparative metabolomics in vegans and omnivores reveal constraints on diet-dependent gut microbiota metabolite production. *Gut*. 2016 Jan;65(1):63–72.
204. Azcarate-Peril MA, Ritter AJ, Savaiano D, Monteagudo-Mera A, Anderson C, Magness ST, et al. Impact of short-chain galactooligosaccharides on the gut microbiome of lactose-intolerant individuals. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017 Jan 17;114(3):E367–75.
205. Passel MWJ van, Kant R, Palva A, Lucas S, Copeland A, Lapidus A, et al. Genome Sequence of *Victivallis vadensis* ATCC BAA-548, an Anaerobic Bacterium from the Phylum Lentisphaerae, Isolated from the Human Gastrointestinal Tract. *Journal of Bacteriology* [Internet]. 2011 Mar 11 [cited 2022 Mar 1]; Available from: <http://journals.asm.org/doi/abs/10.1128/JB.00271-11>
206. Rosario D, Bidkhorji G, Lee S, Bedarf J, Hildebrand F, Le Chatelier E, et al. Systematic analysis of gut microbiome reveals the role of bacterial folate and homocysteine metabolism in Parkinson’s disease. *Cell Reports*. 2021 Mar 2;34(9):108807.

207. Zoetendal EG, Plugge CM, Akkermans ADL, de Vos WM. *Victivallis vadensis* gen. nov., sp. nov., a sugar-fermenting anaerobe from human faeces. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2003 Jan;53(Pt 1):211–5.
208. Biddle A, Stewart L, Blanchard J, Leschine S. Untangling the Genetic Basis of Fibrolytic Specialization by Lachnospiraceae and Ruminococcaceae in Diverse Gut Communities. *Diversity.* 2013 Sep;5(3):627–40.
209. Khaliq A, Ravindran R, Afzal S, Jena PK, Akhtar MW, Ambreen A, et al. Gut microbiome dysbiosis and correlation with blood biomarkers in active-tuberculosis in endemic setting. *PLoS One.* 2021 Jan 22;16(1):e0245534.
210. Parker BL, Calkin AC, Seldin MM, Keating MF, Tarling EJ, Yang P, et al. An integrative systems genetic analysis of mammalian lipid metabolism. *Nature.* 2019 Mar;567(7747):187–93.
211. Parker BJ, Wearsch PA, Veloo ACM, Rodriguez-Palacios A. The Genus *Alistipes*: Gut Bacteria With Emerging Implications to Inflammation, Cancer, and Mental Health. *Front Immunol.* 2020 Jun 9;11:906.
212. Fyhrquist N, Ruokolainen L, Suomalainen A, Lehtimäki S, Veckman V, Vendelin J, et al. *Acinetobacter* species in the skin microbiota protect against allergic sensitization and inflammation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 2014 Dec 1;134(6):1301-1309.e11.
213. Le Chatelier E, Nielsen T, Qin J, Prifti E, Hildebrand F, Falony G, et al. Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature.* 2013 Aug;500(7464):541–6.
214. Palmas V, Pisanu S, Madau V, Casula E, Deledda A, Cusano R, et al. Gut microbiota markers associated with obesity and overweight in Italian adults. *Sci Rep.* 2021 Mar 9;11(1):5532.
215. Xiao S, Fei N, Pang X, Shen J, Wang L, Zhang B, et al. A gut microbiota-targeted dietary intervention for amelioration of chronic inflammation underlying metabolic syndrome. *FEMS Microbiology Ecology.* 2014 Feb 1;87(2):357–67.
216. Nawaz F, Khan MN, Javed A, Ahmed I, Ali N, Ali MI, et al. Genomic and Functional Characterization of *Enterococcus mundtii* QAUEM2808, Isolated From Artisanal Fermented Milk Product Dahi. *Frontiers in Microbiology [Internet].* 2019 [cited 2022 Mar 1];10. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2019.00434>
217. Hird FJ, Weidemann MJ. Oxidative phosphorylation accompanying oxidation of short-chain fatty acids by rat-liver mitochondria. *Biochem J.* 1966 Feb;98(2):378–88.

218. Kalantar-Zadeh K, Berean KJ, Burgell RE, Muir JG, Gibson PR. Intestinal gases: influence on gut disorders and the role of dietary manipulations. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2019 Dec;16(12):733–47.
219. Pimentel M, Mathur R, Chang C. Gas and the Microbiome. *Curr Gastroenterol Rep*. 2013 Dec;15(12):356.
220. Marthinsen D, Fleming SE. Excretion of breath and flatus gases by humans consuming high-fiber diets. *J Nutr*. 1982 Jun;112(6):1133–43.
221. Sonnenburg ED, Sonnenburg JL. Starving our Microbial Self: The Deleterious Consequences of a Diet Deficient in Microbiota-Accessible Carbohydrates. *Cell Metabolism*. 2014 Nov;20(5):779–86.
222. Basseri RJ, Basseri B, Pimentel M, Chong K, Youdim A, Low K, et al. Intestinal methane production in obese individuals is associated with a higher body mass index. *Gastroenterol Hepatol (N Y)*. 2012 Jan;8(1):22–8.
223. Mathur R, Amichai M, Chua KS, Mirocha J, Barlow GM, Pimentel M. Methane and hydrogen positivity on breath test is associated with greater body mass index and body fat. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013 Apr;98(4):E698-702.
224. Peters BA, Shapiro JA, Church TR, Miller G, Trinh-Shevrin C, Yuen E, et al. A taxonomic signature of obesity in a large study of American adults. *Sci Rep*. 2018 Dec;8(1):9749.
225. Kao CC, Cope JL, Hsu JW, Dwarkanath P, Karnes JM, Luna RA, et al. The Microbiome, Intestinal Function, and Arginine Metabolism of Healthy Indian Women Are Different from Those of American and Jamaican Women. *The Journal of Nutrition*. 2016 April;146(4):706–13.
226. Chávez-Carbajal A, Nirmalkar K, Pérez-Lizaur A, Hernández-Quiroz F, Ramírez-del-Alto S, García-Mena J, et al. Gut Microbiota and Predicted Metabolic Pathways in a Sample of Mexican Women Affected by Obesity and Obesity Plus Metabolic Syndrome. *IJMS*. 2019 Jan 21;20(2):438.
227. Yuan X, Chen R, Zhang Y, Lin X, Yang X, McCormick KL. Gut Microbiota of Chinese Obese Children and Adolescents With and Without Insulin Resistance. *Frontiers in Endocrinology [Internet]*. 2021 [cited 2022 Mar 1];12. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fendo.2021.636272>
228. Zhu Q, Jiang S, Du G. Effects of exercise frequency on the gut microbiota in elderly individuals. *Microbiologyopen*. 2020 May 1;9(8):e1053.
229. Flint HJ, Scott KP, Duncan SH, Louis P, Forano E. Microbial degradation of complex carbohydrates in the gut. *Gut Microbes*. 2012 Jul 1;3(4):289–306.

230. Heimann E, Nyman M, Pålbrink AK, Lindkvist-Petersson K, Degerman E. Branched short-chain fatty acids modulate glucose and lipid metabolism in primary adipocytes. *Adipocyte*. 2016 Dec;5(4):359–68.
231. Zhang H, Kovacs-Nolan J, Kodera T, Eto Y, Mine Y. γ -Glutamyl cysteine and γ -glutamyl valine inhibit TNF- α signaling in intestinal epithelial cells and reduce inflammation in a mouse model of colitis via allosteric activation of the calcium-sensing receptor. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 2015 May;1852(5):792–804.
232. Dash NR, Al Bataineh MT. Metagenomic Analysis of the Gut Microbiome Reveals Enrichment of Menaquinones (Vitamin K2) Pathway in Diabetes Mellitus. *Diabetes Metab J*. 2021 Jan;45(1):77–85.
233. Wang S, Li N, Li N, Zou H, Wu M. A Comparative Analysis of Biosynthetic Gene Clusters in Lean and Obese Humans. *Biomed Res Int*. 2019;2019:6361320.
234. Meredith TC, Aggarwal P, Mamat U, Lindner B, Woodard RW. Redefining the requisite lipopolysaccharide structure in *Escherichia coli*. *ACS Chem Biol*. 2006 Feb 17;1(1):33–42.
235. Cech DL, Markin K, Woodard RW. Identification of a d-Arabinose-5-Phosphate Isomerase in the Gram-Positive *Clostridium tetani*. *J Bacteriol*. 2017 Sep 1;199(17):e00246-17.
236. Hughes DT, Sperandio V. Inter-kingdom signalling: communication between bacteria and their hosts. *Nat Rev Microbiol*. 2008 Feb;6(2):111–20.
237. Kamada N, Kim YG, Sham HP, Vallance BA, Puente JL, Martens EC, et al. Regulated virulence controls the ability of a pathogen to compete with the gut microbiota. *Science*. 2012 Jun 8;336(6086):1325–9.
238. Cameron EA, Sperandio V. Frenemies: Signaling and Nutritional Integration in Pathogen-Microbiota-Host Interactions. *Cell Host & Microbe*. 2015 Sep;18(3):275–84.
239. Hartland EL, Daniell SJ, Delahay RM, Neves BC, Wallis T, Shaw RK, et al. The type III protein translocation system of enteropathogenic *Escherichia coli* involves EspA-EspB protein interactions. *Mol Microbiol*. 2000 Mar;35(6):1483–92.
240. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HLT. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol*. 2004 Feb;2(2):123–40.
241. Rolhion N, Chassaing B. When pathogenic bacteria meet the intestinal microbiota. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2016 Nov 5;371(1707):20150504.
242. Curtis MM, Hu Z, Klimko C, Narayanan S, Deberardinis R, Sperandio V. The gut commensal *Bacteroides thetaiotaomicron* exacerbates enteric infection through

- modification of the metabolic landscape. *Cell Host Microbe*. 2014 Dec 10;16(6):759–69.
243. Ng KM, Ferreyra JA, Higginbottom SK, Lynch JB, Kashyap PC, Gopinath S, et al. Microbiota-liberated host sugars facilitate post-antibiotic expansion of enteric pathogens. *Nature*. 2013 Oct;502(7469):96–9.
244. Kostakioti M, Stathopoulos C. Functional Analysis of the Tsh Autotransporter from an Avian Pathogenic *Escherichia coli* Strain. *Infect Immun*. 2004 Oct;72(10):5548–54.
245. Provence DL, Curtiss R. Isolation and characterization of a gene involved in hemagglutination by an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. *Infect Immun*. 1994 Apr;62(4):1369–80.
246. Dautin N. Serine Protease Autotransporters of Enterobacteriaceae (SPATEs): Biogenesis and Function. *Toxins (Basel)*. 2010 May 28;2(6):1179–206.
247. Wong ARC, Clements A, Raymond B, Crepin VF, Frankel G. The Interplay between the *Escherichia coli* Rho Guanine Nucleotide Exchange Factor Effectors and the Mammalian RhoGEF Inhibitor EspH. *mBio* [Internet]. 2012 Jan 17 [cited 2022 Mar 2]; Available from: <http://journals.asm.org/doi/abs/10.1128/mBio.00250-11>
248. Berger CN, Crepin VF, Jepson MA, Arbeloa A, Frankel G. The mechanisms used by enteropathogenic *Escherichia coli* to control filopodia dynamics. *Cell Microbiol*. 2009 Feb;11(2):309–22.
249. Monjarás Feria J, Valvano MA. An Overview of Anti-Eukaryotic T6SS Effectors. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* [Internet]. 2020 [cited 2022 Mar 2];10. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fcimb.2020.584751>
250. Batisson I, Guimond MP, Girard F, An H, Zhu C, Oswald E, et al. Characterization of the Novel Factor Paa Involved in the Early Steps of the Adhesion Mechanism of Attaching and Effacing *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* [Internet]. 2003 Aug [cited 2022 Mar 3]; Available from: <https://journals.asm.org/doi/abs/10.1128/IAI.71.8.4516-4525.2003>
251. Johnson JR. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. *Clin Microbiol Rev*. 1991 Jan;4(1):80–128.
252. Mohammad S, Thiemermann C. Role of Metabolic Endotoxemia in Systemic Inflammation and Potential Interventions. *Frontiers in Immunology* [Internet]. 2021 [cited 2022 Apr 19];11. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2020.594150>

253. Neal MD, Leaphart C, Levy R, Prince J, Billiar TR, Watkins S, et al. Enterocyte TLR4 mediates phagocytosis and translocation of bacteria across the intestinal barrier. *J Immunol.* 2006 Mar 1;176(5):3070–9.
254. Ghanim H, Abuaysheh S, Sia CL, Korzeniewski K, Chaudhuri A, Fernandez-Real JM, et al. Increase in Plasma Endotoxin Concentrations and the Expression of Toll-Like Receptors and Suppressor of Cytokine Signaling-3 in Mononuclear Cells After a High-Fat, High-Carbohydrate Meal. *Diabetes Care.* 2009 Dec;32(12):2281–7.
255. Di Guida R, Casillo A, Stellavato A, Di Meo C, Kawai S, Kawamoto J, et al. Complete Lipooligosaccharide Structure from *Pseudoalteromonas nigrifaciens* Sq02-Rifr and Study of Its Immunomodulatory Activity. *Marine Drugs.* 2021 Nov;19(11):646.
256. John CM, Phillips NJ, Stein DC, Jarvis GA. Innate immune response to lipooligosaccharide: pivotal regulator of the pathobiology of invasive *Neisseria meningitidis* infections. *Pathogens and Disease.* 2017 Abril;75(3):ftx030.
257. Fukuda S, Toh H, Hase K, Oshima K, Nakanishi Y, Yoshimura K, et al. Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. *Nature.* 2011 Jan;469(7331):543–7.
258. Sakurai J, Nagahama M, Oda M, Tsuge H, Kobayashi K. Clostridium perfringens Iota-Toxin: Structure and Function. *Toxins (Basel).* 2009 Dec 23;1(2):208–28.
259. Choi C, Kwon D, Chae C. Prevalence of the Enteraggregative *Escherichia Coli* Heat-Stable Enterotoxin 1 Gene and Its Relationship with Fimbrial and Enterotoxin Genes in *E. Coli* Isolated from Diarrheic Piglets. *J VET Diagn Invest.* 2001 Enero;13(1):26–9.
260. Qin Z, Yang X, Chen G, Park C, Liu Z. Crosstalks Between Gut Microbiota and *Vibrio Cholerae*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology [Internet].* 2020 [cited 2022 Mar 3];10. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fcimb.2020.582554>
261. Fabbri A, Travaglione S, Fiorentini C. *Escherichia coli* Cytotoxic Necrotizing Factor 1 (CNF1): Toxin Biology, in Vivo Applications and Therapeutic Potential. *Toxins (Basel).* 2010 Feb 23;2(2):283–96.
262. Schmidt G, Sehr P, Wilm M, Selzer J, Mann M, Aktories K. Gln 63 of Rho is deamidated by *Escherichia coli* cytotoxic necrotizing factor-1. *Nature.* 1997 Jun;387(6634):725–9.
263. Bueno E, Sit B, Waldor MK, Cava F. Anaerobic nitrate reduction divergently governs population expansion of the enteropathogen *Vibrio cholerae*. *Nat Microbiol.* 2018 Dec;3(12):1346–53.

264. Behnsen J, Raffatellu M. Siderophores: More than Stealing Iron. *mBio* [Internet]. 2016 Nov 15 [cited 2022 Mar 3]; Available from: <http://journals.asm.org/doi/abs/10.1128/mBio.01906-16>
265. Feldmann F, Sorsa LJ, Hildinger K, Schubert S. The salmochelin siderophore receptor IroN contributes to invasion of urothelial cells by extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* in vitro. *Infect Immun*. 2007 Jun;75(6):3183–7.
266. Pasi S, Kant R, Surolia A. Toll/Interleukin-1 Receptor Domain Derived from TcpC (TIR-TcpC) Ameliorates Experimental Autoimmune Arthritis by Down-modulating Th17 Cell Response. *J Biol Chem*. 2016 Jun 3;291(23):12358–69.
267. Frazier TH, DiBaise JK, McClain CJ. Gut Microbiota, Intestinal Permeability, Obesity-Induced Inflammation, and Liver Injury. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*. 2011;35(5S):14S-20S.
268. Rath S, Rud T, Karch A, Pieper DH, Vital M. Pathogenic functions of host microbiota. *Microbiome*. 2018 Sep 28;6(1):174.
269. Vayssier-Taussat M, Albina E, Citti C, Cosson JF, Jacques MA, LEBRUN MH, et al. Shifting the paradigm from pathogens to pathobiome: new concepts in the light of meta-omics. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* [Internet]. 2014 [cited 2022 Mar 3];4. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fcimb.2014.00029>
270. Kopelman PG. Obesity as a medical problem. *Nature*. 2000 Apr;404(6778):635–43.
271. Koleva PT, Bridgman SL, Kozyrskyj AL. The Infant Gut Microbiome: Evidence for Obesity Risk and Dietary Intervention. *Nutrients*. 2015 Apr;7(4):2237–60.
272. Martínez ME, Marshall JR, Sechrest L. Invited commentary: Factor analysis and the search for objectivity. *Am J Epidemiol*. 1998 Jul 1;148(1):17–9.