

CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**Estudio de Asociación del Microbioma del Colon Distal
en Niños Mexicanos con Obesidad**

T E S I S

Que presenta

M. EN C. OTONIEL MAYA LUCAS

para obtener el Grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

**EN LA ESPECIALIDAD DE
Genética y Biología Molecular**

Director de la Tesis:

Dr. Jaime García Mena

COMITÉ TUTORIAL

ASESORES INTERNOS

Dr. José Efraín Garrido Guerrero
Departamento de Genética y Biología Molecular
Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN

Dr. Bulmaro Cisneros Vega
Departamento de Genética y Biología Molecular
Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN

ASESOR CINVESTAV

Dr. Carlos Hoyo Vadillo
Departamento de Farmacología
Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN

ASESOR EXTERNO

Dr. Luis David Alcaraz
Departamento de Biología Celular
Facultad de Ciencias
Universidad Nacional Autónoma de México

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Genómica Ambiental del Departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional Unidad Zacatenco, bajo la dirección del Dr. Jaime García Mena.



Se agradece el apoyo del Biol. Alberto Piña Escobedo por su asistencia con los reactivos y al Sr. Rodrigo García Gutiérrez por su asistencia con el material del laboratorio.

Este trabajo fue financiado por Cinvestav y los apoyos de la Fundación Miguel Alemán A. C. 2015, CONACyT 163235 INFR-2011-01 y FONSEC SS/IMSS/ISSSTE-CONACYT-233361.

Durante el desarrollo de este trabajo Otoniel Maya Lucas fue becario de doctorado del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) beca 346907 durante el período de Septiembre del año 2012 a Agosto del año 2016.

AGRADECIMIENTOS

GRACIAS:

A Dios, el dador de vida.

A Beatriz Martínez, mi esposa, el viento bajo mis alas.

A Gabriel y Sofía, mis hijos, por la educación que me han brindado.

A Any Elías, por su compasión, amor fraternal y espíritu afable.

Al Dr. Jaime García, por brindarme la oportunidad de hacer ciencia.

A Selvasankar Murugesan, por su paciencia y apoyo experimental.

A Sixta Lucas, mi madre, por su amor incondicional.

A Sandra, Marco Antonio, Angélica, Alejandra, Diana,

por la mejor flor que me han regalado

la más constante, la más lozana: Su Amistad.

RESUMEN

La obesidad es un proceso inflamatorio de baja intensidad, un desorden metabólico y un asunto de salud pública a nivel mundial. En México, el 34.4% de niños entre 5 y 11 años de edad tienen sobrepeso u obesidad. Este trabajo de tesis abordó el estudio del microbioma de colon distal de un grupo de niños mexicanos afectados por obesidad. Se realizó secuenciación metagenómica tipo *shot-gun* a partir de DNA obtenido de muestras fecales de una cohorte de niños con normopeso y niños obesos. Se examinó, además, sus parámetros metabólicos así como la concentración de ácidos grasos de cadena corta. Los resultados muestran una notable disbiosis de bacterias, arqueas y virus que no se observó en el grupo de niños obesos respecto al grupo con normopeso, sin embargo, la comunidad de arqueas mostró un incremento de *Methanobrevibacter* spp. en niños obesos. Las comunidades bacterianas de todos los participantes fueron agrupadas mediante clústeres en tres diferentes enterotipos. La mayoría de los niños con normopeso tienen una comunidad bacteriana del colon dominada por *Suminococcus* spp. (Enterotipo 3), mientras que la mayoría de los niños obesos muestran una comunidad dominada por *Prevotella* spp. (Enterotipo 2). Las especies *Megamonas* spp. estuvieron sobrerrepresentadas en niños obesos mientras que, en los mismos individuos, algunos miembros de la familia Oscillospiraceae fueron depletados y corelacionaron negativamente con los niveles de colesterol sérico. Por otro lado, se correlacionó cambios en el microbioma del colon con metadatos clínicos para poder estratificar individuos basados en su fenotipo. Una comparación de las rutas metabólicas del microbioma mostró que dos rutas del MetaCyc, módulos de glicólisis, *Glycolysis I* (de Glucosa 6- Fosfato), y *Glycolysis II* (de Fructosa 6-Fosfato) estuvieron significativamente sobrerrepresentadas en niños con normopeso. Los resultados planteados en este trabajo establece alteraciones específicas en el microbioma de un grupo de niños mexicanos afectados por obesidad, permitiendo que esta información pueda ser utilizada en un futuro para definir estrategias de prognosis, diagnóstico y tratamiento.

ABSTRACT

Obesity is a metabolic disorder and global health issue. In Mexico 34.4% of children between 5 and 11 years of age are overweight or obese. Here we address this issue studying the gut microbiome in a sample of Mexican children affected by obesity. We performed metagenomic shotgun-sequencing of DNA isolated from fecal samples from a cohort of normal weight and Mexican children with obesity using Illumina platform with HiSeq 2500. We also examined their metabolic factors and fecal short-chain fatty acids concentration. The results show that a remarkable dysbiosis of bacteria, archaea and viruses was not observed in the obese children group with respect to the normal weight group; however, the archaeal community exhibited an increase of unclassified *Methanobrevibacter* spp. in obese children. The bacterial communities of all participants were clustered into three different enterotypes. Most normal weight children have a gut bacterial community dominated by *Ruminococcus* spp. (Enterotype 3), while most 2 obese children had a community dominated by *Prevotella* spp. (Enterotype 2). The species *Megamonas* spp. were over-represented in the obese children, whereas members of the family Oscillospiraceae were depleted in the same individuals and negatively correlated with levels of serum cholesterol. On the other hand, changes in the gut microbiome were correlated with clinical metadata and could be used to stratify individuals based on their phenotype. A microbiome comparative metabolic pathway analysis showed that two MetaCyc pathway modules of glycolysis, Glycolysis I (from Glucose 6- Phosphate), and Glycolysis II (from Fructose 6- Phosphate) were significantly overrepresented in normal weight children. Our results establish specific alterations in the gut microbiome of Mexican children affected of obesity, along with clinical alterations, providing information on the microbiome composition that may be useful for prognosis, diagnosis, and treatment.

ÍNDICE

• AGRADECIMIENTO CONACYT	i
• AGRADECIMIENTOS	ii
• RESUMEN	iii
• ABSTRACT	iv
• ÍNDICE	v
• ÍNDICE DE TABLAS	vii
• ÍNDICE DE FIGURAS	vii
• NOTACIÓN	ix
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. ¿Qué es la obesidad?	1
1.2. Clasificación de la obesidad	1
1.3. Riesgos de la obesidad en adultos	2
1.4. Obesidad infantil	2
1.5. Obesidad infantil en México	4
1.6. Riesgos de la obesidad en niños	5
1.7. Causas de la obesidad	5
1.8. Microbiota y obesidad	7
2. ANTECEDENTES	10
2.1. Estudio de asociación de genoma completo	10
2.2. Estudio de asociación de metagenómica	12
3. JUSTIFICACIÓN	15
4. HIPÓTESIS	16
5. OBJETIVOS	16
5.1. Objetivo General	16
5.2. Objetivos Particulares	16
5.2.1. Obtención de sujetos de estudio de la cohorte y muestras	16
5.2.2. Implementación del flujo de trabajo bioinformático en cluster	16
5.2.3. Análisis de datos	17

5.2.4. Análisis estadístico de datos	17
6. ALCANCE	17
7. METODOLOGÍA	18
7.1. Participantes del estudio y recolección de especímenes	18
7.2. Evaluación de diversidad dietética	18
7.3. Evaluación Clínica	19
7.4. Estudios bioquímicos	19
7.5. Determinación de la concentración de SCFAs por HPLC	19
7.6. Recolección y procesamiento de muestras fecales	20
7.7. Extracción de ADN de muestras fecales y secuenciación metagenómica tipo <i>shot-gun</i>	20
7.8. Procesamiento de archivos FASTQ	20
7.9. Ensamble metagenómico, predicción de genes, ensamble y determinación de ortólogos	20
7.10. Análisis de secuencias metagenómicas tipo <i>shot-gun</i>	21
7.11. Análisis estadístico de abundancia relativa de bacterias, arqueas y virus	22
8. RESULTADOS	24
8.1. Datos antropométricos, dietarios, clínicos y de muestras fecales	24
8.2. Control de calidad de lecturas	27
8.3. Diversidad taxonómica y enterotipos	29
8.4. Composición taxonómica y funcional del microbioma de niños con normopeso y obesidad	33
8.5. Diversidad filogenética y diversidad funcional en microbiomas de niños con normopeso y niños obesos	38
9. DISCUSIÓN	40
10. CONCLUSIONES	49
11. PERSPECTIVAS	49
12. REFERENCIAS	50
13. APÉNDICE	59
14. ANEXO	66

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Clasificación de la obesidad en adultos según la OMS.	1
Tabla 2.	Características clínicas de los niños de este estudio.	24
Tabla 3.	Bacterias del colon aumentadas o disminuidas significativamente en este estudio.	44

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Clasificación de la obesidad infantil según la OMS.	3
Figura 2.	Prevalencia nacional de sobrepeso y obesidad.	5
Figura 3.	Microbiota intestinal modula el metabolismo en ratones.	10
Figura 4.	Loci significativos en estudios GWAS.	12
Figura 5.	Identificación de asociaciones con metodología MGWAS.	14
Figura 6.	Diagrama de caja y bigote de Peso, Altura y pIMC.	25
Figura 7.	Diagrama de caja y bigote de los parámetros bioquímicos.	26
Figura 8.	Diagrama de caja y bigote de los ácidos grasos de cadena corta.	27
Figura 9.	Análisis de calidad de lecturas.	28
Figura 10.	Distribución del número de lecturas por muestra, porcentaje de lecturas correspondiente a humano y porcentaje de lecturas no pareadas.	29
Figura 11.	Gráfica con error extendido para abundancia a relativa a nivel de <i>phylum</i> .	30
Figura 12.	Abundancia relativa de las especies más representativas.	31
Figura 13.	Gráfica de Coordinados Principales a nivel de género para identificación de Enterotipos.	33
Figura 14.	Análisis LEfSe de los taxa bacterianos representativos.	34
Figura 15.	Análisis LEfSe de la abundancia de rutas metabólicas.	35
Figura 16.	Análisis LEfSe de la cobertura de rutas metabólicas.	35

Figura 17.	Análisis LEfSe de la abundancia de familias de genes.	36
Figura 18.	Beta diversidad funcional.	37
Figura 19.	Asociación multivariada con modelo lineal.	38
Figura 20.	Mapa de calor de perfil taxonómico, funcional y de variables de estudio.	39

ANOTACIÓN

IMC: Índice de masa corporal

T2D: Type 2 diabetes

EggNOG: Evolutionary genealogy of genes: Non-supervised Orthologous Groups

HUMAnN2: Human Microbiome Project Unified Metabolic Analysis Network 2

KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes

LDA: Linear discrimination analysis

MaAsLin: Multivariate microbial association by the linear model

MetaPhlAn2: Metagenomic Phylogenetic Analysis

MGWAS: Microbial Genome-Wide Association Studies / Metagenome-wide Association Studies

SCFAs: Short-chain fatty acids

Microbioma: colección de genomas de microbios en un sistema.

Microbiota: colección de organismos en un sistema.

1. INTRODUCCIÓN

La obesidad y el sobrepeso son enfermedades globales, actualmente mueren aproximadamente 2.8 millones de personas en el mundo debido a sus complicaciones. [1,2].

1.1. ¿Qué es la obesidad?

La obesidad se define como una acumulación anormal o excesiva de grasa [3], una enfermedad crónica inflamatoria de origen multifactorial que se desarrolla a través de diferentes variables tales como el comportamiento y la interacción social, factores psicosociales, metabólicos, celulares y moleculares. [4]. Una forma simple de cuantificar la obesidad es el índice de masa corporal (IMC), esto es el peso de una persona en kilogramos dividido por el cuadrado de la talla en metros. Una persona con un IMC igual o superior a 30 kg/m² es considerada obesa y con un IMC igual o superior a 25 kg/m² es considerada con sobrepeso, mientras que en un rango entre 18.5 y 24.9 se considera con un peso normal. [3].

1.2. Clasificación de la obesidad

La clasificación actual de Obesidad propuesta por la OMS está basada en el IMC (Tabla 1).

Tabla 1. Clasificación de la obesidad en adultos según la OMS

Clasificación	IMC (kg/m²)
Normopeso	18.5 – 24.9
Exceso de peso	≥ 25
Sobrepeso	25 - 29.9
Obesidad Grado I o moderada	30 – 34.9
Obesidad Grado II o severa	35 - 39.9
Obesidad Grado III o mórbida	≥ 40

Datos de la OMS indican que desde el año 1980 la obesidad ha aumentado a más del doble en todo el mundo por lo cual ha declarado a la obesidad y al

sobrepeso con el carácter de epidemia mundial. La obesidad incrementa considerablemente el riesgo de comorbilidades, una amplia gama de enfermedades crónicas, tales como la diabetes y enfermedades cardiovasculares. El incremento acelerado de obesidad en las décadas recientes no puede ser explicado por cambios en la genética humana [5].

1.3. Riesgos de la obesidad en adultos

A medida que aumenta el peso hasta alcanzar los niveles de sobrepeso y obesidad, también aumentan los riesgos de las siguientes afecciones: Enfermedades coronarias, diabetes tipo 2 (DT2), cáncer (endometrial, mama, colon, riñón, vesícula biliar e hígado), hipertensión (presión arterial alta), dislipidemia (niveles altos de colesterol total o de triglicéridos), accidente cerebrovascular, enfermedad del hígado y de la vesícula, apnea del sueño y problemas respiratorios, artrosis (degeneración del cartílago y el hueso subyacente de una articulación), problemas ginecológicos (menstruación anómala, infertilidad).[6].

1.4. Obesidad infantil

El incremento de la obesidad infantil ha ganado particular interés en los últimos años ya que los niños con sobrepeso u obesidad de hoy serán los obesos del mañana destinados a sufrir todos los problemas de salud y los costos en salud asociados con la obesidad, así como la disminución de la calidad de vida [7].

En adolescentes y niños, la relación entre IMC y sobrepeso u obesidad está afectada por variaciones en edad, género y altura. Por esta razón se han desarrollado tablas de percentiles dependiendo de la edad y el género con puntos de referencia específicos para el incremento de IMC [8].

En el caso de los niños menores de 5 años el sobrepeso es el peso para la estatura con más de dos desviaciones típicas por encima de la mediana establecida en los patrones de crecimiento infantil de la OMS; y la obesidad es el peso para la estatura con más de tres desviaciones típicas por encima de la mediana establecida en los patrones de crecimiento infantil de la OMS.

En el caso de los niños de 5 a 19 años, el sobrepeso es el IMC para la edad con más de una desviación típica por encima de la mediana establecida en los patrones de crecimiento infantil de la OMS, y la obesidad es mayor que dos desviaciones típicas por encima de la mediana establecida en los patrones de crecimiento infantil de la OMS. **Figura1.**

A pesar de dichos criterios, la obesidad en niños y adolescentes ha mostrado seguir un patrón similar al de los adultos y está asociada con las mismas consecuencias que para los adultos, comorbilidades tales como diabetes tipo 2, marcadores tempranos de enfermedades cardiovasculares, deterioro psicológico evidente a una edad cada vez más joven [9].

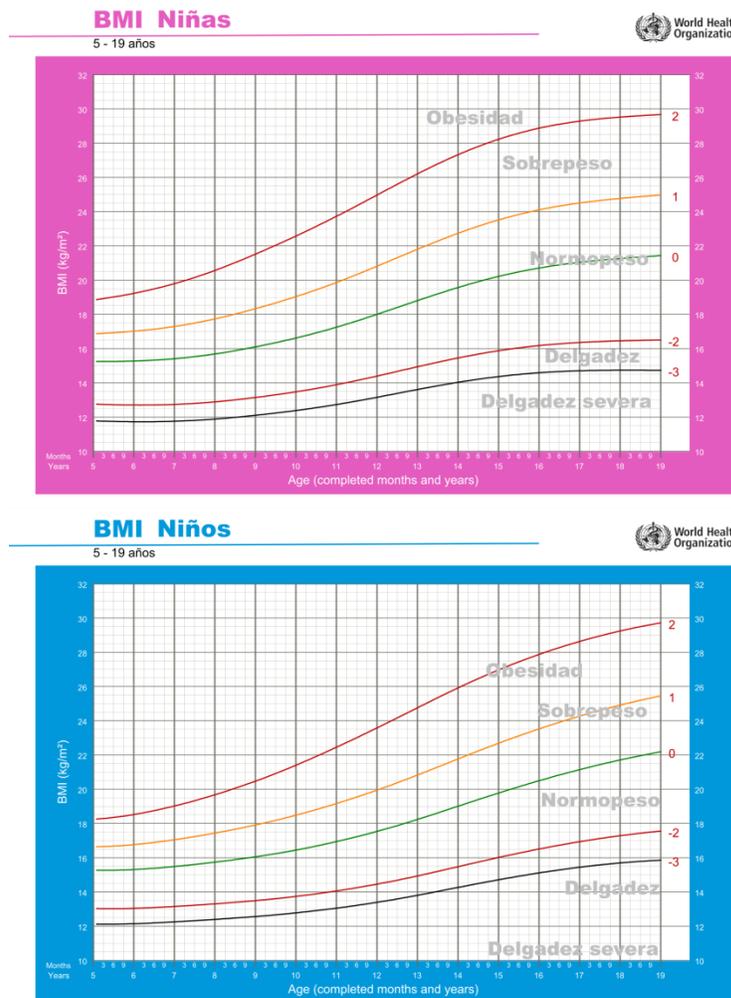


Figura 1. Clasificación de la obesidad infantil según la OMS

1.5. Obesidad infantil en México

Actualmente México es segundo país con población obesa, luego de EE. UU. en experimentar esta epidemia [10]. Aproximadamente, el 70% de la población mexicana adulta tiene sobrepeso. La prevalencia de la obesidad y el sobrepeso en población escolar mexicana entre 5-11 años de edad también es alta: uno de cada cuatro niños tiene sobrepeso [11]. La obesidad infantil es un tema preocupante en lo que respecta a la salud y al bienestar de los niños. La prevalencia de la obesidad infantil tiende a incrementar tanto en países desarrollados como en subdesarrollados. Según resultados de la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2016 Medio Camino (ENSANUT MC), la prevalencia nacional combinada de sobrepeso y obesidad de 5 - 11 años de edad, utilizando los criterios de la OMS, disminuyó de 34.4% en 2012 a 33.2% en 2016, una reducción de 1.2 puntos porcentuales; sin embargo, la diferencia no fue estadísticamente significativa. Las prevalencias de sobrepeso (20.6%) y de obesidad (12.2%) en niñas en 2016 fueron muy similares a las observadas en 2012 (sobrepeso 20.2% y obesidad 11.8%). En niños hubo una reducción estadísticamente significativa de sobrepeso entre 2012 (19.5%) y 2016 (15.4%) que resultó estadísticamente significativa; mientras que las prevalencias de obesidad en 2012 (17.4%) y 2016 (18.6%) no fueron estadísticamente diferentes, **Figura 2.** La prevalencia combinada de sobrepeso y obesidad fue mayor en localidades urbanas que en las rurales (34.9% vs 29.0%) y las diferencias entre regiones no fueron estadísticamente significativas. [12].

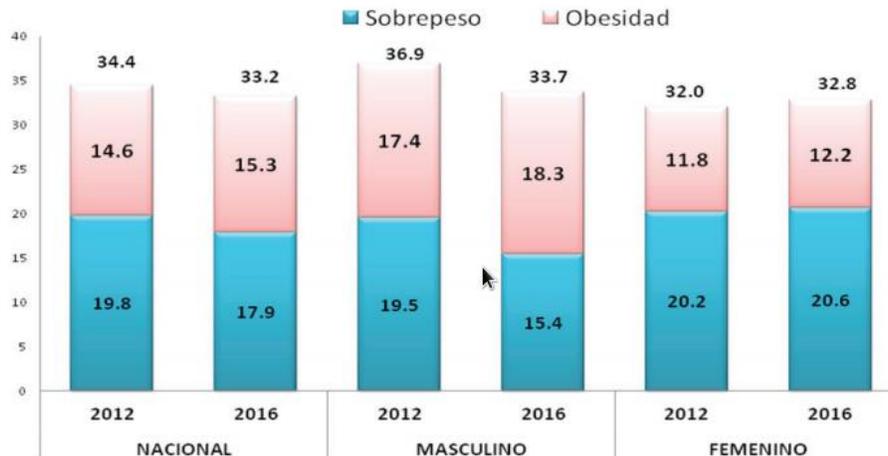


Figura 2. Prevalencia nacional de sobrepeso y obesidad en población de 5 a 11 años, de la ENSANUT 2012 y ENSANUT MC 2016, por sexo.

1.6. Riesgos de la obesidad en niños

La obesidad en la infancia se asocia fuertemente con la obesidad en la edad adulta, de tal manera que entre el 60 - 80% de los niños obesos se convertirán en adultos obesos [13]. Si las comorbilidades están presentes en la infancia, y la obesidad persiste en la edad adulta la duración de la enfermedad se prolonga y por lo tanto el pronóstico se agrava.

1.7. Causas de la obesidad

La causa fundamental de la obesidad es un desequilibrio energético entre calorías consumidas y calorías gastadas. Otro aspecto de relevancia es la disminución de la actividad física producto del estilo de vida sedentario. Al ser una enfermedad multifactorial, se reconoce que hay factores genéticos, ambientales, metabólicos y endocrinológicos que pueden llevar al desarrollo de esta. Por lo tanto, podemos considerar a la obesidad una enfermedad crónica, multifactorial en su origen y que se presenta con una amplia gama de fenotipos. Los estudios epidemiológicos han detectado una serie de factores asociados con la obesidad en la población, entre los cuales se encuentran:

- Dieta: La dieta ha sido implicada desde hace tiempo como el mayor contribuyente al desarrollo de la obesidad donde el consumo total de la dieta y

su composición juegan un papel importante. El cambio en patrones de consumo de alimentos puede contribuir al desarrollo de la obesidad a través del incremento de consumo energético. Igualmente, factores como consumo de aperitivos, así como el consumo de bebidas azucaradas y los edulcorantes artificiales están implicados en el desarrollo de obesidad [14].

- Sedentarismos: se refiere a las actividades que no incrementan el gasto de energía por encima del reposo, pero en la literatura a menudo se confunde con bajos niveles de actividad física. Los comportamientos sedentarios son actividades que no requieren mucho esfuerzo de músculo esquelético implicados en el control del movimiento y la postura, el ejemplo más común es el estar sentado.
- Factores de entorno: el entorno moderno no permite hábitos de vida saludables; De hecho, pareciera que promueve la obesidad. Algunas de las razones son la falta de lugares para la recreación ya que al no tener zonas de parques, senderos y aceras asequibles se hace más difícil que las personas sean físicamente activas. [15].
- Condiciones médicas: algunos problemas hormonales pueden causar sobrepeso y obesidad, tales como tiroides hipoactiva (hipotiroidismo), síndrome de Cushing, entre otros. El hipotiroidismo es una condición en la cual la glándula tiroides no produce suficiente hormona tiroidea. La falta de la hormona tiroidea ralentizará el metabolismo y causará aumento de peso, además de causar cansancio y debilidad. El síndrome de Cushing es una condición en la cual las glándulas suprarrenales del cuerpo producen demasiado de la hormona cortisol. Las personas que tienen el síndrome de Cushing aumentan de peso, presentan obesidad en la parte superior del cuerpo, una cara redondeada, grasa alrededor del cuello y brazos y piernas delgadas.
- Genéticos: Estudios de gemelos idénticos que han sido criados por separado muestran que los genes tienen una influencia en el peso de una persona [16]. Por ejemplo, polimorfismos en genes candidatos como FTO, NPC1, ENPP1, NEGR1, GNPDA2, y MC4R [17], los cuales afectan su expresión y contribuyen

al desarrollo de obesidad [18]. El sobrepeso y la obesidad tienden a darse en familia. La probabilidad de tener sobrepeso es mayor si uno o ambos padres tienen sobrepeso o son obesos. Debido a que las familias también comparten alimentos y hábitos de actividad física existe un vínculo entre los genes y el medio ambiente. Los niños adoptan los hábitos de sus padres, por lo que un niño con padres con sobrepeso, que consumen alimentos con alto contenido calórico y que no realizan actividad física probablemente se convertirá en alguien con sobrepeso [13]

- Microbiota: la microbiota se refiere a todos los microorganismos que se encuentran en el tracto gastrointestinal. Estas bacterias juegan un papel importante en procesos fisiológicos tales como la digestión, síntesis de vitaminas y metabolismo. Además, está relacionado con algunos procesos inmunológicos. Importantes estudios sobre la relación de la flora microbiana intestinal con obesidad han descubierto profundos cambios en la composición y función metabólica de la microbiota intestinal en personas obesas [19, 20, 21]

A diferencia de los adultos los factores que causan mayormente obesidad en niños son los genéticos, conductuales (sedentarismo y dieta) y ambientales [22, 23].

1.8. Microbiota y obesidad

El término microbiota se refiere al conjunto de todos los microorganismos (arqueas, hongos, bacterias y virus) que están presentes en un entorno definido. El término fue usado en ese contexto por primera vez por Lederberg y McCray en 2001 [24], quienes enfatizaron la importancia en la salud y en la enfermedad de los microorganismos que habitan, en el cuerpo humano y sobre el cuerpo humano.

A menudo se hace referencia a que la cantidad de bacterias respecto al número de células humanas guarda una proporción 10:1, sin embargo, esto es un mito que debe descartarse. Estimaciones recientes sugieren una relación 1.3:1, esto es que en un “hombre de referencia” (70 kilogramos, 20–30 años de edad y

1.7 metros de altura) tiene en promedio 30 trillones de células humanas y 39 trillones de bacteria [25].

Respecto al hospedante, los microorganismos son simbioses, y juegan un papel importante en la digestión, interviniendo en el metabolismo, ya que pueden incrementar la producción de energía a partir de la dieta y toman parte en la regulación de la composición de ácidos grasos de los tejidos pudiendo generar un estado de baja inflamación. Tanto la inflamación como la composición de ácidos grasos son procesos involucrados en la obesidad y otros desórdenes metabólicos [26].

La caracterización microbiana se realiza mediante métodos moleculares basados en marcadores, predominantemente genes de 16S rRNA, genes 18S rRNA u otros genes marcadores y regiones genómicas. Avances en secuenciación masiva de nueva generación ha permitido estudiar la microbiota y ha hecho posible realizar asociaciones entre la composición y ciertos fenotipos, dentro de ellos la obesidad. Si bien es cierto que la microbiota incluye a otros microorganismos como hongos y virus, la acepción más común es referirse a microbiota como un sinónimo de población bacteriana. Dicho lo anterior, se sabe que la microbiota humana está compuesta, principalmente, por 5 *phyla* de bacterias: Bacteroidetes, Firmicutes, Actinobacteria, Proteobacteria, y Verrucomicrobia, siendo Bacteroidetes y Firmicutes los que pueden representar alrededor del 90% del total de especies bacterianas, el conjunto de genes de la microbiota se le denomina microbioma y en su totalidad, contiene 150 veces más genes que el genoma del hospedante, unos 9,879,896 genes bacterianos [27].

Aunque actualmente no se conoce el mecanismo exacto que vincule la microbiota del colon distal con la obesidad está bien documentado que la microbiota puede incrementar la producción de energía de la dieta, contribuyendo a la inflamación de bajo impacto y a regular la composición de los ácidos grasos de los tejidos. Se ha observado que la microbiota conduce el desarrollo de la mucosa y el sistema inmune sistémico y controla la regeneración del epitelio intestinal [28, 29].

Algunos factores que dificultan la elucidar contribución de la microbiota al desarrollo de la obesidad incluyen la complejidad y diversidad de las bacterias del colon, variación étnica en las poblaciones estudiadas y grandes variaciones entre individuos estudiados [30]. La microbiota podría modular la salud humana a través de la extracción de energía, a través de la dieta, en forma de ácidos grasos de cadena corta (SCFAs, por sus siglas en inglés), a través de la fermentación de carbohidratos de fibras no digeridas, el mantenimiento del sistema inmune, y en su actividad antipatogénica [31, 32].

La composición de la diversidad bacteriana cambia entre personas con normopeso y personas obesas, incrementando el número de Firmicutes respecto al de Bacteroidetes en pacientes con obesidad y con DT2, patologías estrechamente relacionadas con obesidad [27, 33]. Aunque algunos estudios recientes han encontrado resultados controversiales [33, 20, 34, 35]: existen asociaciones positivas y negativas en estudios de asociación entre los phyla de la microbiota del colon y los diferentes fenotipos estudiados. Se ha estudiado muchos posibles mecanismos acerca de la contribución de la microbiota a la obesidad principalmente en modelo murinos [36]. Uno de los hallazgos más interesantes en este tipo de modelo murino fue que realizó Ridaura y colaboradores en 2013 [37], donde realizaron un trasplante fecal de microbiota de gemelos adultos femeninos a ratones libres de gérmenes alimentados con una dieta baja en grasa, así como en otros que llevaban una dieta que representa los niveles de grasa saturada y el consumo de frutas y verduras típico de la diara de EE. UU. El resultado del experimento fue que los ratones que les fue transplantada la microbiota de una persona obesa mostró un aumento de la masa corporal y grasa total, así como los fenotipos metabólicos asociados a la obesidad excepto cuando el compañero de jaula no hubiera recibido el trasplante de microbiota de la gemela magra. **Figura 3.**

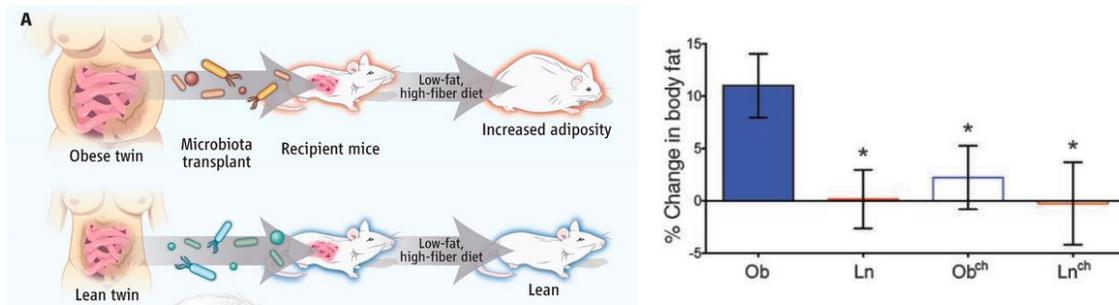


Figura 3. Microbiota intestinal de gemelos discordantes modula el metabolismo en ratones. Izquierda: Esquema de transplante de microbiota de gemelos magro y obeso a ratones libre de gérmenes. Derecha: Cohabitar ratones magros y obesos previene el fenotipo obeso con compañeros de jaula obesos (Ob-ch, Ln-ch).

2. ANTECEDENTES

En el año 2015 Murugesan y colaboradores realizó una descripción de obesidad en una población infantil mexicana, donde se caracterizó la diversidad microbiana en niños con normopeso, sobrepeso y obesidad desde una perspectiva taxonómica y de ácidos grasos de cadena corta (SCFA) [38]. A pesar de que se ha reportado una relación entre el incremento en el *phylum* Firmicutes y una baja abundancia en el *phylum* Bacteroidetes con la obesidad dicha diferencia no se observa en la población analizada, aunque existen diferencias significativas de SCFA entre los niños con normopeso y los obesos. Esto puede dar a entender que existe algo inherente en la composición genómica de las poblaciones bacterianas que afectan el balance energético del hospedante. Existen análisis que pueden ayudar a caracterizar un conjunto de genes, o marcadores que permitan correlacionar dichos datos con un fenotipo determinado.

2.1. Estudio de asociación de genoma completo

Los estudios de asociación de genoma completo (GWAS por sus siglas en inglés) son proyectos que investigan la asociación estadística entre fenotipos y un conjunto grande de marcadores genéticos que captura una cantidad substancial de variaciones genéticas en el genoma. Los fenotipos pueden ser rasgos cualitativos como el estado de una enfermedad o rasgos cuantitativos como la

presión sanguínea. La asociación estadística entre el estado de la enfermedad y los alelos de un marcador genético se lleva a cabo mediante análisis de datos categóricos [39]. Los marcadores genéticos son generalmente determinados por microarreglos y secuenciación masiva. Este tipo de estudios permite describir las fuerzas subyacentes a la variación observada en las enfermedades multifactoriales, principalmente las variantes genéticas humanas que dan forma a la microbiota humana. La **Figura 4** muestra una descripción general de los loci significativos en todo el genoma humano descubiertos en cuatro estudios recientes de GWAS [40, 41, 42, 43]. Por simplicidad, solo se muestran las regiones que albergan un gen codificador. Hasta ahora, la única superposición encontrada en los tres estudios es el locus SLIT3.

o estudios de asociación de microbioma (MGWAS, Metagenome-wide association study, Microbiome-wide association study) [44]. La metagenómica, la técnica de caracterización, es el estudio del metagenoma, el genoma colectivo de microorganismos de una muestra ambiental, para proporcionar información sobre la diversidad microbiana y la ecología de un entorno específico. El término microbioma por otra parte se refiere a la colección de genomas de microbios en un sistema, pudiendo incluir virus, bacterias, hongos, arqueas, aunque la acepción que se hace de la palabra es para referirse a bacterias, generalmente.

El objetivo de un estudio MGWAS es identificar marcadores metagenómicos tanto en nivel taxonómico y funcional. El análisis de tipo MGWAS incluye cuatro pasos, principalmente: En primer lugar, la secuenciación masiva tipo *shot-gun* de las comunidades microbianas de los individuos de casos y controles, las lecturas resultantes se ensamblan para obtener un armazón genético microbiano. En segundo lugar, se mapea las lecturas obtenidas en la secuenciación contra el armazón previamente construido y se estiman los niveles de abundancia de genes. En tercer lugar, los genes microbianos son mapeados adicionalmente contra una base de datos de secuencias conocidas o contra un catálogo de genes para obtener niveles de abundancia de genes de organismos o grupos de genes. En cuarto lugar, se utilizan métodos estadísticos para analizar los niveles de abundancia tanto para los datos del caso y del control y se obtienen los candidatos a marcadores microbianos (sean microorganismos o genes). En quinto lugar tenemos la validación de los marcadores en otra cohorte con secuenciación, ya sea de tipo *shot-gun* o de 16S rRNA [45]. **Figura 5.**

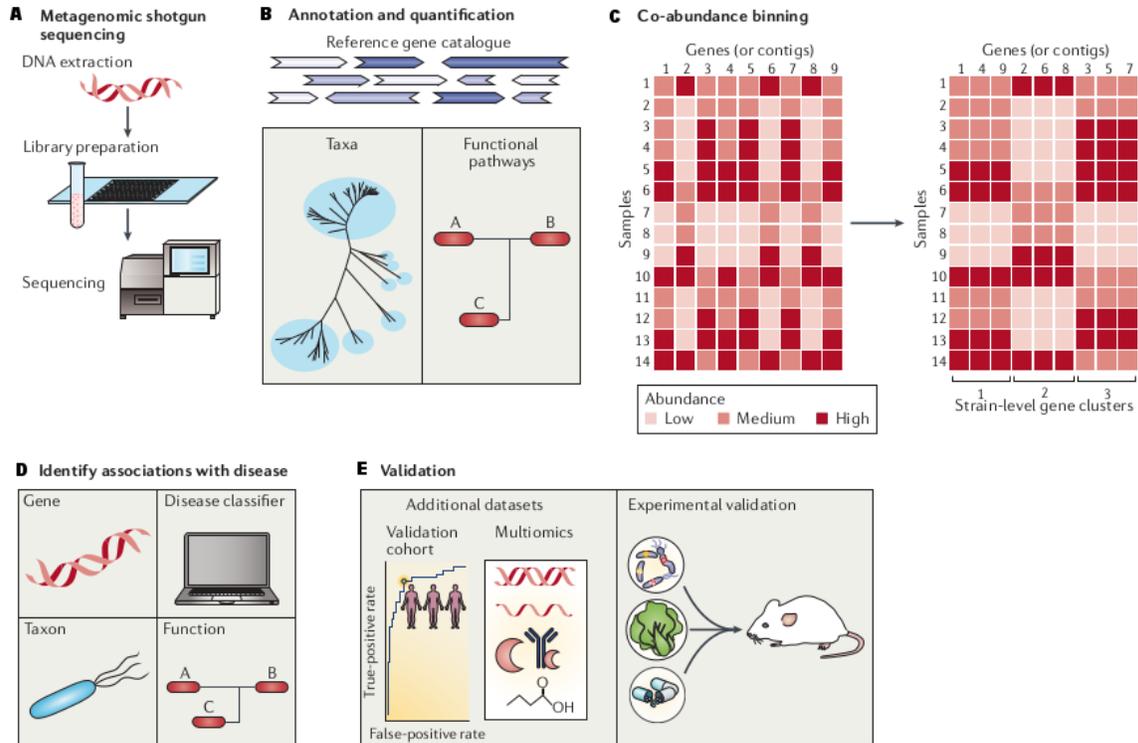


Figura 5. Identificación de asociaciones con metodología MGWAS. A. Extracción de ADN para secuenciación tipo *shot-gun*. B. Ensamble metagenómico, asignación taxonómica y predicción funcional de genes. C Clusters de abundancia de taxonómica funcional. D. Identificación de genes-taxa-función marcadores. E. Validación usando un set de datos adicional.

Los estudios MGWAS sólo han explorado enfermedades tales como T2D, cáncer colorrectal y artritis reumatoide [45, 46, 47]. Existen reportes MGWAS en daneses obesos y en adultos franceses, explorando algunos marcadores metabólicos y dieta vinculándolos con obesidad. [48, 49].

En un estudio reciente llevado a cabo en 2015 por Murugesan y colaboradores en un grupo de niños mexicanos con normopeso, sobrepeso y obesidad, no se encontró diferencias significativas entre phyla [38]. A pesar de eso, varios géneros y familias, del *phylum* Firmicutes y algunas Enterobacteriaceae, aumentaron en niños obesos y con sobrepeso: el género *Faecalibacterium* sp., la familia Lachnospiraceae y el género *Roseburia* sp. Se observó también una disminución en el género *Succinivibrio* sp. y el género *Erwinia* sp. del *phylum* Proteobacteria, y del género *Oscillospira* sp. del *phylum*

Firmicutes. El género *Blautia* sp., el género *Coprococcus* sp. y la familia Enterobacteriaceae del *phylum* Firmicutes aumentaron claramente en el fenotipo de sobrepeso.

Una hipótesis interesante es que alberga una microbiota con una gran capacidad de fermentación de almidón resistente. Entonces, es posible que exista la selección de microbiota en niños obesos, con una alta abundancia de rutas metabólicas con capacidad de fermentación de polisacáridos solubles. En este estudio, realizamos un estudio de asociación metagenómica del colon distal para identificar marcadores metagenómicos asociados con una enfermedad, resaltando cómo la composición de la microbiota, y sus rutas metabólicas difieren entre niños mexicanos con obesidad y sobrepeso. A la fecha no se ha realizado una caracterización tipo MGWAS de niños obesos mexicanos que pueda establecer parámetros bacterianos se asociación en una comunidad tan particular como lo es la infantil mexicana.

3. JUSTIFICACIÓN

Los principales estudios metagenómicos de la microbiota intestinal se han realizado utilizando principalmente genes marcadores como el 16S rDNA lo que ha proporcionado una visión panorámica de las comunidades microbianas comensales y de su *status quo*. Entender el extenso catálogo de microorganismos intestinales nos ayudará en nuestra comprensión de las enfermedades humanas multifactoriales, por lo que es necesario conocer la composición no sólo taxonómica sino funcional ya que existen evidencias que la microbiota puede ser asociada y contribuye a dichas enfermedades. Este trabajo desarrolló un estudio metagenómico de asociación que brinda información detallada acerca de la composición taxonómica y génica de las comunidades bacterianas de niños obesos mexicanos.

4. HIPÓTESIS

Existen clados, organismos específicos, o rutas metabólicas relacionadas con ácidos grasos y metabolismo de azúcares que, como biomarcadores, diferencian el microbioma de una población mexicana infantil obesa del de una población mexicana infantil con normo peso, aun cuando no existan características evidentes de disbiosis a nivel taxonómico.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo General

Determinar si existen biomarcadores, a partir de datos de secuenciación masiva tipo *shot-gun*, que diferencian el microbioma de niños mexicanos con obesidad del microbioma de niños mexicanos con normo peso.

5.2. Objetivos Particulares

5.2.1. *Obtención de sujetos de estudio de la cohorte y muestras.*

- 5.1.1.1. Seleccionar de manera aleatoria 10 individuos con normo peso y 10 individuos con obesidad de la base de datos de Murugesan, *et al.*, 2015 para su caracterización fenotípica y perfil bioquímico.
- 5.1.1.2. Colectar muestras de copro de los individuos seleccionados y extraer DNA total.
- 5.1.1.3. Secuenciación masiva tipo *shot-gun* mediante la tecnología de Illumina

5.2.2. *Implementación del flujo de trabajo bioinformático en cluster*

- 5.2.2.1. Obtención de bases de datos de referencia para la anotación y clasificación de genes.
- 5.2.2.2. Optimización de la línea de procesos (pipeline) para clasificación taxonómica, ensamble metagenómico y anotación de genes.

5.2.2.3. Generación de scripts PBS para automatización de procesos en cluster.

5.2.3. Análisis de datos

5.2.3.1. Control de calidad de lecturas

5.2.3.2. Ensamble metagenómico

5.2.3.3. Anotación de genes por COG

5.2.3.3. Clusters de genes

5.2.3.4. Asignación taxonómica

5.2.3.5. Abundancia relativa de rutas metabólicas

5.2.4. Análisis estadístico de datos.

5.2.4.1. Alfa diversidad taxonómica y funcional

5.2.4.2. Beta diversidad taxonómica y funcional

5.2.4.3. Identificación de marcadores

5.2.4.4. Correlación de variables.

6. ALCANCE

En el presente trabajo se utilizó secuenciación masiva tipo *shot-gun* y estadística multivariada para analizar comparativamente la diversidad del microbioma del colon distal de una muestra de niños mexicanos, diez niños obesos y diez niños con normopeso, para determinar biomarcadores metagenómicos asociados a obesidad. El análisis se limita a un número de muestra de 20, los cuales fueron elegidos mediante muestreo por conveniencia, una técnica no probabilística y no aleatoria utilizada para crear muestras de acuerdo con la facilidad de acceso y la disponibilidad de los niños de formar parte del estudio.

7. METODOLOGÍA

7.1. Participantes del estudio y recolección de especímenes.

Nuestro flujo general de trabajo se describe en la Fig. 1. Seleccionamos 20 niños sin relación alguna entre ellos, en una edad entre 9 y 11 años (10 normopeso y 10 obesos) de una base de datos interna [38]. Los niños asistían a una escuela pública de educación primaria en el área metropolitana de la ciudad de México en el Estado de México. Se notificó a los padres de los niños y se firmó el consentimiento informado de acuerdo con la Declaración de Helsinki, versión de 2013. El protocolo de investigación fue aprobado por la Junta del Comité de Ética del Instituto Mexicano del Seguro Social con el número R-2011–1402 1402–10 en la Ciudad de México. Las muestras fecales fueron tomadas en conjunto con una inspección médica, y almacenadas inmediatamente a -80° C. Las muestras de sangre se obtuvieron por punción de vena y, después de un almacenamiento de una sola noche se envió a laboratorio central para la medición de los factores bioquímicos, medidas antropométricas, pruebas bioquímicas y detección de ácidos grasos de cadena corta (SCFA) fueron medidas como se escribió previamente [38].

7.2. Evaluación de diversidad dietética

La diversidad en la dieta fue estimada usando un recordatorio de 7 días. Se recolectó la información de los niños, supervisado por los padres, en una base de datos. Se seleccionó siete indicadores de alimentos/diversidad de grupos de alimentos: (1) alimentos procesados, (2) legumbres; (3) lácteos; (4) carne; (5) frutas y verduras ricas en vitamina A; (6) otras frutas y verduras o jugos de frutas; y (7) alimentos hechos con aceite, grasa o mantequilla. Los alimentos / grupos de alimentos que el niño consumió ≥ 3 días en la semana anterior recibieron una puntuación de 1, y los que el niño consumió < 3 días en la semana anterior se calificaron con 0. Se calculó una puntuación final para cada niño al sumar los valores de todos los grupos consumidos; por lo tanto, el valor máximo posible de puntuación para cada individuo fue 7.

7.3. Evaluación Clínica

Los niños fueron pesados usando una báscula y medidos con un estadiómetro. El IMC fue calculado y clasificado usando las normas de la Organización Mundial de la Salud (OMS) [29]. De acuerdo a esto, para las edades entre 2 y 20 años, los niños con normopeso tienen un IMC entre el 10° y 85° percentiles, los de sobrepeso entre el 85° y hasta el percentil 95°, mientras que los niños con obesidad tienen un IMC superior al 95° percentil.

7.4. Estudios bioquímicos

Se tomó dos muestras de sangre considerando 12 horas de ayuno, en un tubo con EDTA y en un Tubo BD Vacutainer® RST para obtención rápida de suero. Los parámetros de glucosa, colesterol total, lipoproteína de alta densidad (HDL), lipoproteína de baja densidad (LDL) y triglicéridos fueron determinadas en mg/mL usando iLab 350 System.

7.5. Determinación de la concentración de SCFAs por HPLC

Para la determinación de ácidos grasos de cadena corta (SCFA) fue necesario que las muestras fecales fueran deshidratadas a peso constante y subsecuentemente procesadas utilizando el método de fase sólida de extracción para analizar vía cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés) modelo Agilent Technologies 1260. Para ello se suspendió en agua desionizada 100 mg de heces deshidratadas y se mezcló vigorosamente en un vortex a máxima velocidad durante 5 minutos. La suspensión fue centrifugada a 15800 rcf (relative centrifugal field) por 5 minutos, el sobrenadante fue transferido a un tubo nuevo, determinando posteriormente el pH y ajustándolo a 6 utilizando HCl a 0.1 M. Esta solución se corrió a través de una columna de carbón activado C-18 con 100 mg/1 mL de la marca GracePure™ Reversed-Phase SPE. Los ácidos grasos de cadena corta (SCFA) fueron eluidos usando 1 mL de etanol absoluto y analizado con un HPLC [39], usando 0.1 M de HCl-Glisina como la fase móvil. Se utilizó metimazol a 10 mM como estándar interno.

7.6. Recolección y procesamiento de muestras fecales

Las muestras fecales se recolectaron de manera aséptica en un contenedor estéril de todos los grupos de niños participantes, normopeso y con obesidad. Las muestras fueron transportadas al laboratorio utilizando paquetes de gel frío en hieleras, alicuotadas e inmediatamente almacenadas a -70° C hasta su posterior procesamiento.

7.7. Extracción de ADN de muestras fecales y secuenciación metagenómica tipo *shot-gun*

Se extrajo el ADN total a partir de 250.0 mg de muestras fecales homogeneizada (71.5% contenido de agua ± 7.26 SD) usando el MoBio Power Soil DNA Isolation kit (MoBio, Solana Beach, CA, USA) de acuerdo a la sinstrucciones del fabricante, y almacenándolo posteriormente a -80° C hasta su secuenciación. Todas las muestras fueron secuenciadas con 250 ciclos *paired-end* utilizando el equipo HiSeq 2500 de la plataforma Illumina (OtoGenetics Corporation, USA),

7.8. Procesamiento de archivos FASTQ

Se utilizó FastQC para evaluar la calidad de cada nucleótido de las lecturas pareadas de 125 pb [23] y determinar los parámetros para recortar en caso de ser necesario. Las regiones de baja calidad fueron recortadas utilizando Trimmomatic con las opciones SLIDINGWINDOW:4:20 MINLEN:100 CROP:125 [49]. Después del recorte de lecturas las lecturas fueron alineadas contra el genoma humano versión hg19 obtenido de UCSC Genome Browser [50] usando Bowtie2 [51] con los parámetros por defecto para remover potenciales lecturas provenientes de humano. Las posibles secuencias de DNA humano fueron identificadas y descartadas con Samtools utilizando el flag requerido 4 (*read unmapped*) [52]

7.9. Ensamble metagenómico, predicción de genes, ensamble y determinación de ortólogos.

A partir de las secuencias filtradas se utilizó la línea de procesos MOCAT2 [54] para el ensamble, predicción de genes y determinación de ortólogos,

utilizando SOAPDenovo2 [55], MetaGeneMark [56] y la base de datos de ortólogos EggNOG [57], respectivamente. Los genes fueron agrupados con un 70% de identidad mediante CD-HIT a nivel de aminoácidos y con un 95% de identidad a nivel de nucleótidos con CD-HIT-EST [58].

7.10. Análisis de secuencias metagenómicas tipo *shot-gun*.

La abundancia relativa de bacterias, arqueas del colon distal por muestra fue determinada por el programa MetaPhlan2 a partir de lecturas previamente recortadas y filtradas [59]. MetaPhlan2 utiliza una base de datos (mpa_v20_m200) de genes marcadores clado-específicos construida a partir de ~17,000 genomas de referencia (~13,500 bacterianos y de arqueas, ~3,500 virales, y ~110 eucariotas).

Las abundancias relativas de las familias de genes, abundancia y cobertura de rutas metabólicas de las muestras secuenciadas fueron obtenidas por el programa HUMAnN2 [60]. Las predicciones funcionales realizadas están basadas en una base de datos de familias de genes del UniRef90 (UniProt Reference Clusters), la cual provee clusters con un 90% de identidad de un grupo de secuencias de proteínas, y de la base de datos de rutas metabólicas MetaCyc [61], la cual es una base de datos basada en evidencia a partir de > 54000 publicaciones, que a diferencia de la base de datos del KEGG en su versión más reciente es gratuita.

El perfil de la abundancia relativa viral fue obtenido con ViromeScan el cual utiliza una base de datos jerárquica de virus (92 genomas de virus humanos de ADN, 664 virus de humano de ADN/ARN, 1646 virus de ADN de eucariotas y 4370 virus de ADN/ARN de eucariotas) para la asignación taxonómica [62].

La abundancia relativa de bacteriófagos o fagos (virus que infectan bacterias) se obtuvo mapeando, con Bowtie2, las lecturas filtradas versus 1390 genomas completos presentes en RefSeq. La frecuencia de mapeo se generó con el subcomando `idxstats` de Samtools. Se diseñó un script para poder crear una tabla de abundancia con base en el número de lecturas mapeadas respecto a la referencia.

7.11. Análisis estadístico de abundancia relativa de bacterias, arqueas y virus.

Para poder hacer una reducción de la dimensión de los datos e identificar la distribución y la magnitud de las diferencias entre los taxas (bacteria, arquea y virus) presentes a nivel de familia, género y especie, así como de las funciones, se realizó estadística descriptiva y métodos multivariados de ordenación, linealización, clusterización y de asociación.

Estadística descriptiva e inferencial: se calculó media, varianza y desviación estándar para los datos antropométricos y bioquímicos. Se realizó una prueba de normalidad de los datos. Además, se utilizó Ji-cuadrada, análisis de varianza (ANOVA) de una vía como parte de la estadística inferencial paramétrica y para los datos no paramétricos se usó el análisis de varianza Kruskal-Wallis para identificar diferencias a nivel de medias de los metadatos antropométricos y bioquímicos. Para evaluar si existía diferencia significativa entre los resultados de los niños con normopeso y obesidad se utilizó la prueba de estadística no paramétrica Mann Whitney/Wilcoxon Rank-sum test (en la función de R `wilcox.test` con la opción `paired=FALSE`) que a diferencia de la prueba Wilcoxon signed-rank test (en la función de R `wilcox.test` con la opción `paired=TRUE`), sirve para dos poblaciones independientes, es decir, una comparación no pareada.

Estadística multivariada de ordenación: Se utilizó análisis de ordenación o gradientes para obtener la distribución de las abundancias relativas a nivel de género y especie, así como de los perfiles funcionales de MetaCyc. Para el análisis de componentes principales (PCA, por sus siglas en inglés), análisis de coordenadas principales, también llamado escalamiento multidimensional métrico (PCoA/MDS, por sus siglas en inglés) y escalamiento multidimensional no métrico (NMDS, por sus siglas en inglés) se utilizó el paquete *ade4* y *vegan* de R.

Estadística multivariada de linealización: El análisis discriminante lineal (LDA, Linear discriminant analysis, por sus siglas en inglés) del efecto de tamaño se

utilizó LEfSE para determinar las especies/rutas metabólicas más discriminantes entre los niños con normopeso y obesidad. Los índices de diversidad y graficas se realizaron utilizando los paquetes vegan y ggplot2, respectivamente.

Estadística multivariada de asociación: Para el análisis multivariado de asociación con modelo lineal se utilizó el paquete de R Maaslin el cual identifica asociaciones entre composición bacteriana y variables fenotípicas [63]. Todos los metadatos (datos y descripciones de la muestra que provee contexto para los datos de secuenciación) fueron usados en un modelo lineal generalizado (GLM) como predictores lineales. La abundancia relativa de los microorganismos y rutas metabólicas fue transformada con la raíz cuadrada del arco-seno (arcsin-square root) y se usó como variable de respuesta.

Estadística multivariada de clusterización: Los enterotipos del microbioma son clusters obtenidos a partir de una tabla de abundancia relativa y fueron asignados mediante el tutorial de la publicación original de Arumugam y colaboradores en el 2011 el cual se encuentra disponible en: <http://enterotyping.embl.de/enterotypes.html>) [64]. Se utilizó el algoritmo de clusterización llamado Partición Alrededor de Medoides (PAM, Partitioning around methods, por sus siglas en inglés) para clusterizar los perfiles de abundancia. El método PAM deriva del algoritmo básico k-medias (k-means), pero tiene la ventaja de que soporta cualquier medida de distancia arbitraria y es más robusto ya que utiliza medianas en vez de medias para limitar la influencia de los outliers, toma como referencia un objeto ya existente en el cluster, el objeto más central [65]. Posteriormente se determinó el número óptimo de clusters usando el Índice Calinski-Harabasz (CH), esta medida implementa la idea de que la clusterización es más robusta cuando la distancia entre cluster es sustancialmente más larga que las distancias intra clusters. Posteriormente se usó la técnica de validación de clusters, el Índice Silhouette. Los perfiles de abundancia de géneros y funciones fueron normalizados para generar una probabilidad de distribuciones. Se utilizó una métrica de distancia de distribución de probabilidad relacionada a la Divergencia

de Jensen-Shannon (JSD) para agrupar las muestras. Finalmente, los clústers fueron visualizados con un gráfico de Análisis de Coordinados Principales utilizando los paquetes de R *clusterSim* y *ade4*.

8. RESULTADOS

8.1. Datos antropométricos, dietarios, clínicos y de muestras fecales.

La Tabla 2 presenta un resumen de las características antropométricas y clínicas y de los factores metabólicos de los individuos seleccionados para el estudio. Los registros antropométricos de todos los individuos se encuentran en la Tabla Suplementaria 1; los datos del recordatorio dietario y de factores metabólicos de la evaluación clínica se encuentran en la Tabla Suplementaria 2; la concentración de ADN de cada una de las muestras fecales, el porcentaje de humedad, la relación 260/280 y la concentración de ácidos grasos de cadena corta de cada una de las muestras se encuentra en la Tabla Suplementaria 3.

Tabla 2. Características clínicas de los niños de este estudio

Características	Normal	Obeso	Valor p
Número de niños	n=10 (50%)	n=10 (50%)	nd
Femenino (%)	50%	50%	1.00 ^a
Edad (años)	9.9 ±0.30	10.0 ±0.24	0.78 ^b
Antropométrica			
Peso (kg)	32.97 ±1.57	45.93 ±1.36	<0.001 ^b
Altura (cm)	1.38 ±0.02	1.371 ±0.02	0.889 ^b
IMC (kg/m ²)	17.41 ±0.50	24.58 ±0.84	<0.001 ^b
IMC (percentil)	61.49 ±7.37	99.03 ±0.32	<0.001 ^c
IMC	<85 pc	>95 pc	nd
Factores Metabólicos			
Glucosa en ayunas (mg/dL)	92.86 ±2.32	95.3 ±1.64	0.426 ^b
Triglicéridos (mg/dL)	55.59 ±4.63	218.68 ±6.78	<0.001 ^c
Colesterol Total (mg/dL)	140.10 ±5.81	187.26 ±11.29	0.002 ^b
HDL (mg/dL)	49.75 ±3.87	39.70 ±1.93	0.041 ^b
LDL (mg/dL)	79.28 ±6.02	103.83 ±9.93	0.060 ^b
Ácidos Grasos de Cadena Corta			
Ácido acético (mM)	203.91 ±45.32	169.56 ±36.34	0.650 ^c
Ácido propiónico (mM)	132.69 ±34.39	87.64 ±28.50	0.257 ^c
Ácido butírico (mM)	50.42 ±17.59	22.47 ±4.77	0.406 ^c

IMC: índice de masa corporal; HDL high-density lipoprotein, lipoproteína de alta densidad; LDL low-density lipoprotein, lipoproteína de baja densidad; pc percentil; nd no determinado. Los datos son las medias ± desviación estándar. p-values fueron calculados de acuerdo con: ^aTest de Ji-cuadrada, ^bPrueba de ANOVA para varianzas iguales, y ^cPrueba de Kruskal–Wallis para varianzas diferentes. p<0.05 es considerado estadísticamente significativo.

La evaluación antropométrica, **Figura 6**, no indica diferencia en edad y altura entre los dos grupos, pero se identifica una diferencia significativa entre el peso y los percentiles de IMC ($p < 0.001$), lo que concuerda con el fenotipo observado.

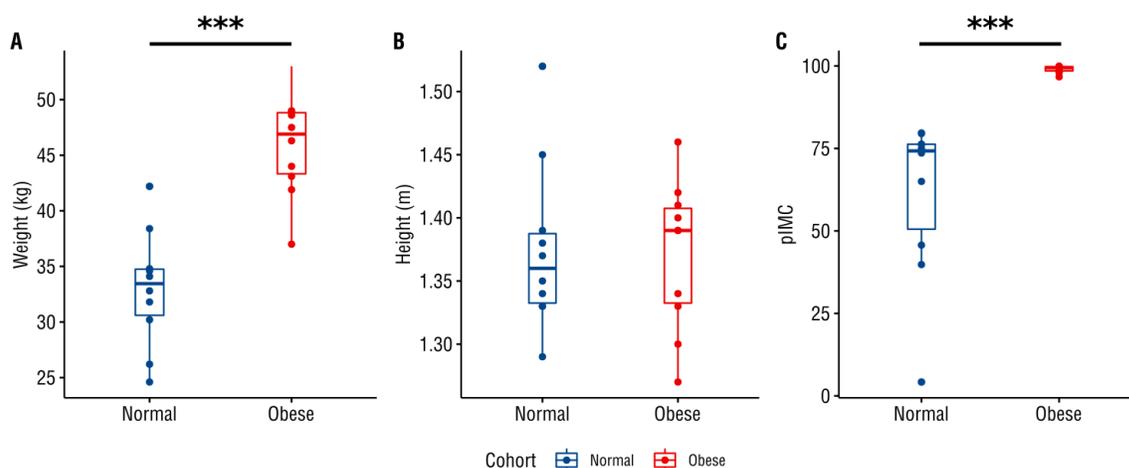


Figura 6. Diagrama de caja y bigote de Peso, Altura y percentiles del Índice de Masa Corporal. Esta gráfica permite ver la dispersión de los puntos con la mediana, los percentiles 25 y 75 y los valores máximos y mínimos. Se realizó una prueba ANOVA para obtener diferencia significativa. Valores de (*) $P < 0.05$, (**) $P < 0.01$, (***) $P < 0.0001$ son considerados significativos.

En el caso de los parámetros bioquímicos, **Figura 7**, los niños con obesidad muestran diferencia significativa en los niveles séricos de colesterol total, y triglicéridos, aunque la lipoproteína de baja densidad mostró un incremento en concentración en los niños obesos esta diferencia no fue significativa. De la misma manera la lipoproteína de alta densidad estuvo significativamente disminuida en los niños obesos respecto a los de normopeso. Mientras que el nivel de glucosa entre los dos grupos no presentó diferencia.

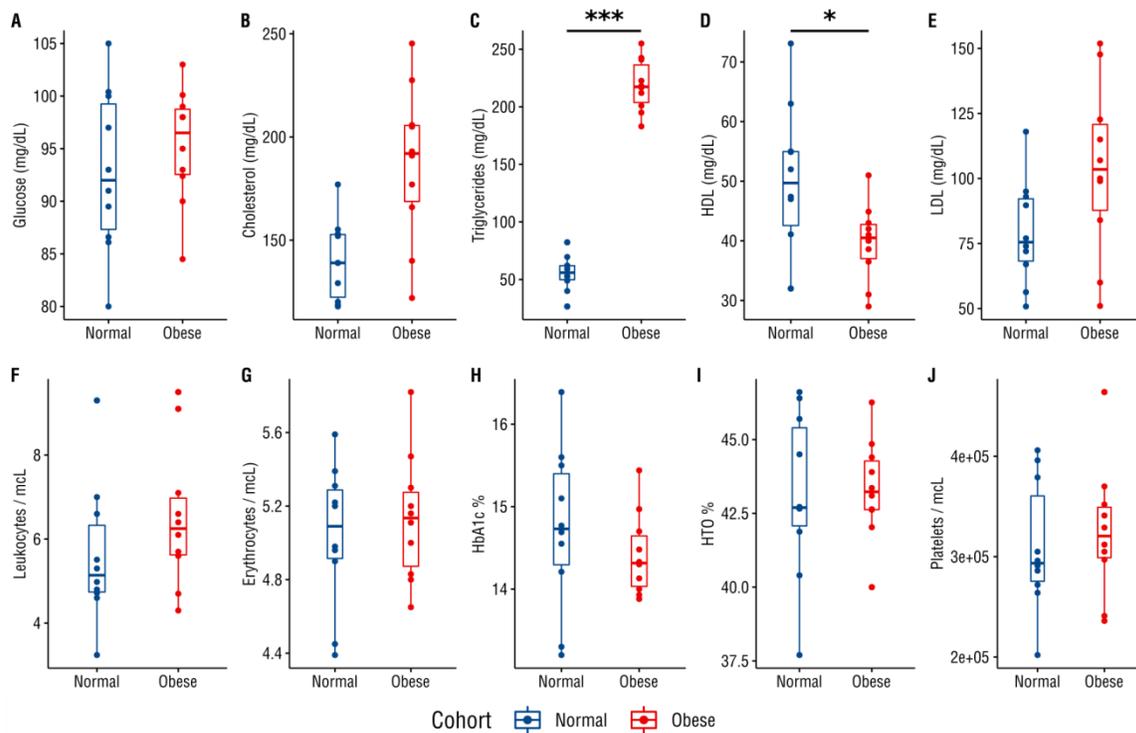


Figura 7. Diagrama de caja y bigote de los parámetros bioquímicos: Glucosa, colesterol, HDL, LDL, Leucocitos, Eritrocitos, Hemoglobina glicosilada, hematocrito y plaquetas. Esta gráfica permite ver la dispersión de los puntos con la mediana, los percentiles 25 y 75 y los valores máximos y mínimos. Se realizó una prueba ANOVA, para varianzas iguales y Kruskal-Wallis para varianzas diferentes para obtener diferencia significativa. Valores de (*) $P < 0.05$, (**) $P < 0.01$, (***) $P < 0.0001$ son considerados significativos.

La concentración de los ácidos grasos de cadena corta, **Figura 8**, no muestra diferencia entre los niños con normopeso y los niños con obesidad. Aunque los participantes fueron seleccionados aleatoriamente de una base de datos mayor donde previamente se había reportado una disminución significativa de ácido propiónico y ácido butírico en niños obesos [38].

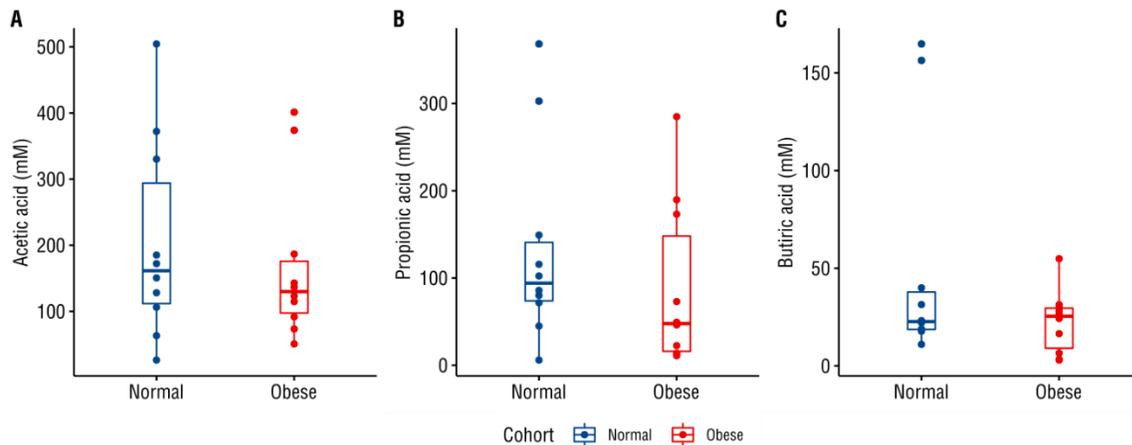


Figura 8. Diagrama de caja y bigote de los ácidos grasos de cadena corta: Ácido acético, ácido propiónico y ácido butírico. Esta gráfica permite ver la dispersión de los puntos con la mediana, los percentiles 25 y 75 y los valores máximos y mínimos. Se realizó una prueba Kruskal-Wallis para varianzas diferentes para obtener diferencia significativa. Valores de (*) $P < 0.05$, (**) $P < 0.01$, (***) $P < 0.0001$ son considerados significativos.

8.2 Control de calidad de lecturas

Se obtuvieron lecturas de 126 nt, con más de 48 Millones de lecturas pareadas en total, 7.2 Gb de datos por muestra en promedio, los datos completos de lectura por individuo se muestran en la Tabla Suplementaria 4.

El análisis metagenómico comienza con la comprobación de la calidad de las muestras en consideración. Aunque la calidad es esencial, no siempre produce un cambio significativo en los perfiles taxonómicos y funcionales obtenidos durante el análisis, aunque esto está en función del número de ciclos y la tecnología de secuenciación utilizada. Un panorama general de los datos utilizados en este estudio se encuentra en la **Figura 9**, una gráfica de calidad para 2 de las muestras, una con datos crudos (izquierda) y otra con los datos recortados (derecha).

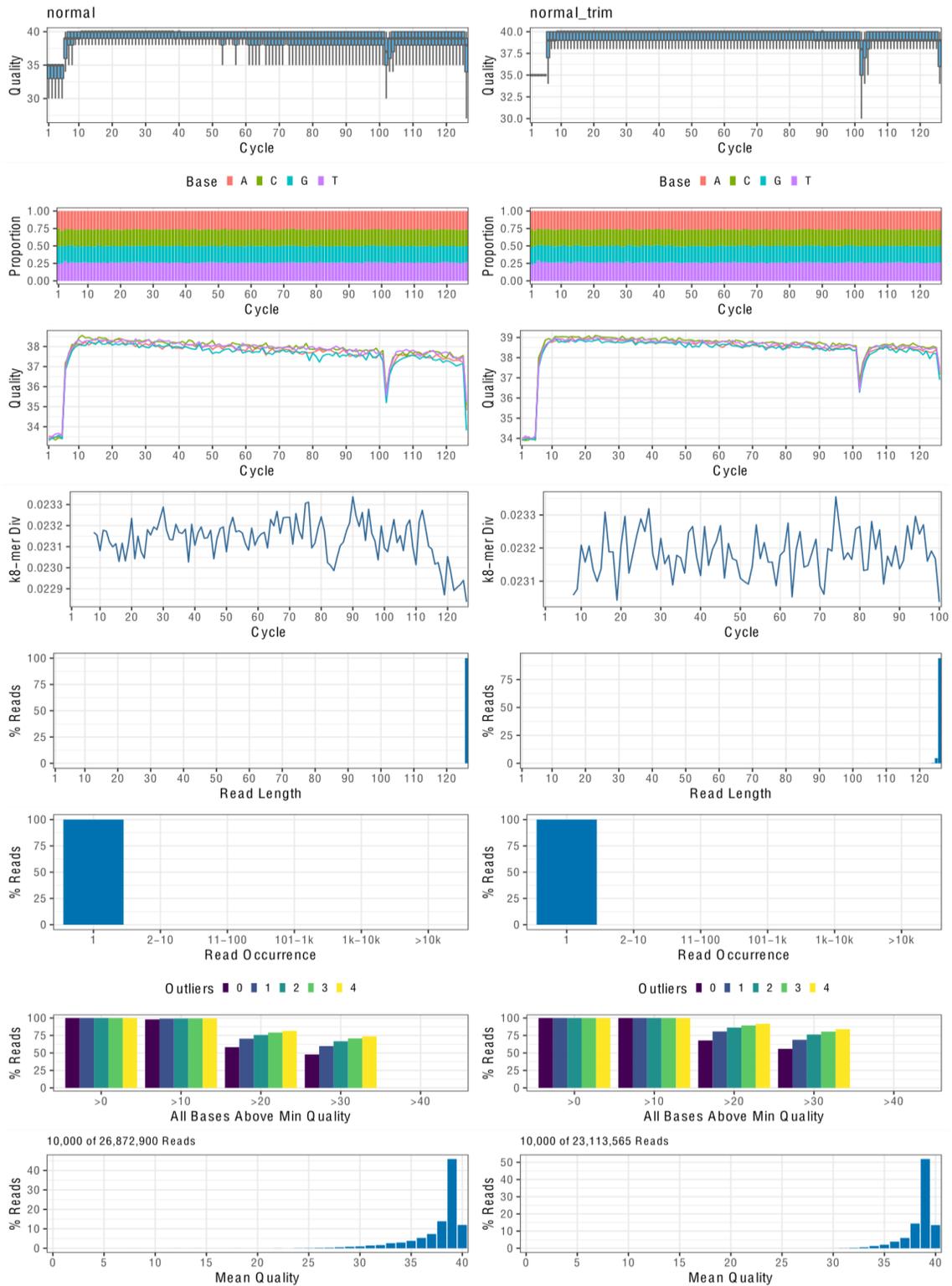


Figura 9. Análisis de calidad de lecturas. A) Distribución del score Phred por ciclo. B) Proporción GC por ciclo. C) Distribución de k-mer de 8nt por ciclo. D) Distribución de porcentaje de longitud de lecturas. D) Porcentaje de reads repetidos por ciclo. E) Porcentaje de reads por encima de la calidad mínima. F) Distribución de calidad media de reads.

La **Figura 10** muestra la distribución del número de reads, porcentaje de reads que mapean contra el genoma humano y el porcentaje de reads impares para cada una de las muestras. El promedio de lecturas impares fue de 1.26 % por muestra y el porcentaje de lecturas correspondientes a humana fue del 0.17 % en promedio. Las lecturas utilizadas fueron de gran calidad, con un porcentaje muy alto de lecturas pareadas con bajo contenido de contaminación de lecturas provenientes de humano.

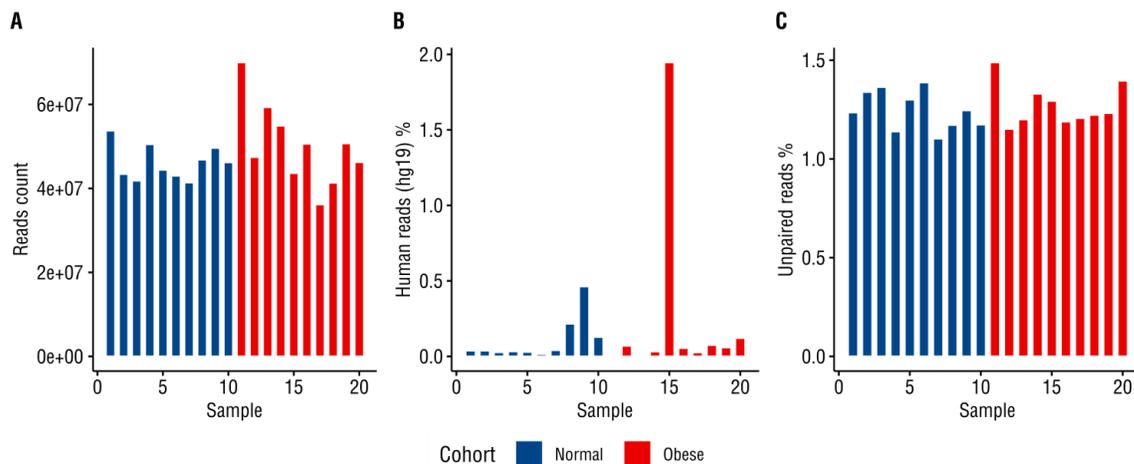


Figura 10. Distribución del número de lecturas por muestra, porcentaje de lecturas correspondiente a humano y porcentaje de lecturas no pareadas.

8.3 Diversidad taxonómica y enterotipos

Los datos de abundancia relativa de bacterias se encuentran en el repositorio Gist de Github disponible en el siguiente enlace <https://git.io/fjssF>. La asignación taxonómica con Metaphlan2 mostró una diferencia a nivel de medias en la abundancia relativa en los *phylum* Actinobacteria, Verrucomicrobia, Candidatus Saccharibacteria, Proteobacteria, Firmicutes y Bacteroidetes en la comunidad microbiana identificada en los niños con normopeso comparado con los niños con normopeso.

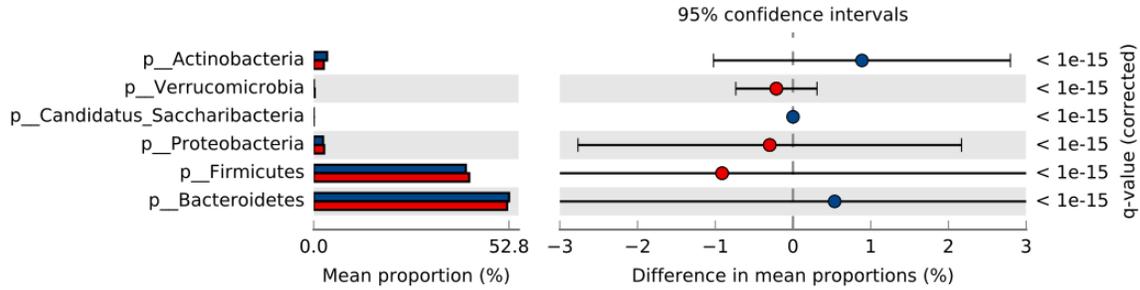


Figura 11. Gráfica con error extendido para abundancia a relativa a nivel de *phylum*. La prueba de Welch's t-test con corrección Storey FDR mostró diferencias altamente significativas. El valor q , representa el valor p corregido. El *phylum* Firmicutes sobrerrepresentado en las muestras de niños obesos (rojo) tienen una diferencia negativa respecto a la abundancia relativa de los niños con normopeso (azul). El *phylum* Bacteroidetes sobrerrepresentado en las muestras con normopeso tienen una diferencia significativa positiva en sus abundancias.

Por ejemplo, aunque la abundancia relativa de *Prevotella copri*, una bacteria perteneciente al filo Bacteroidetes, ha sido reportado a estar asociado a artritis reumatoide en humanos, que aunque se incrementó en un 3.08% en niños con normo peso a un 13.63% en niños obesos, dicha diferencia no fue estadísticamente significativa. ($p = 0.440$). Por otra parte, la abundancia de la especie *Bacteroides coprocola*, otro miembro del filo Bacteroidetes asociado a diabetes tipo 2 (T2D, por sus siglas en inglés) disminuyó su abundancia de un 5.28% en normopeso a 0.54% en niños obesos, pero sin que esta diferencia sea significativa ($p = 0.286$) **Figura 12.**

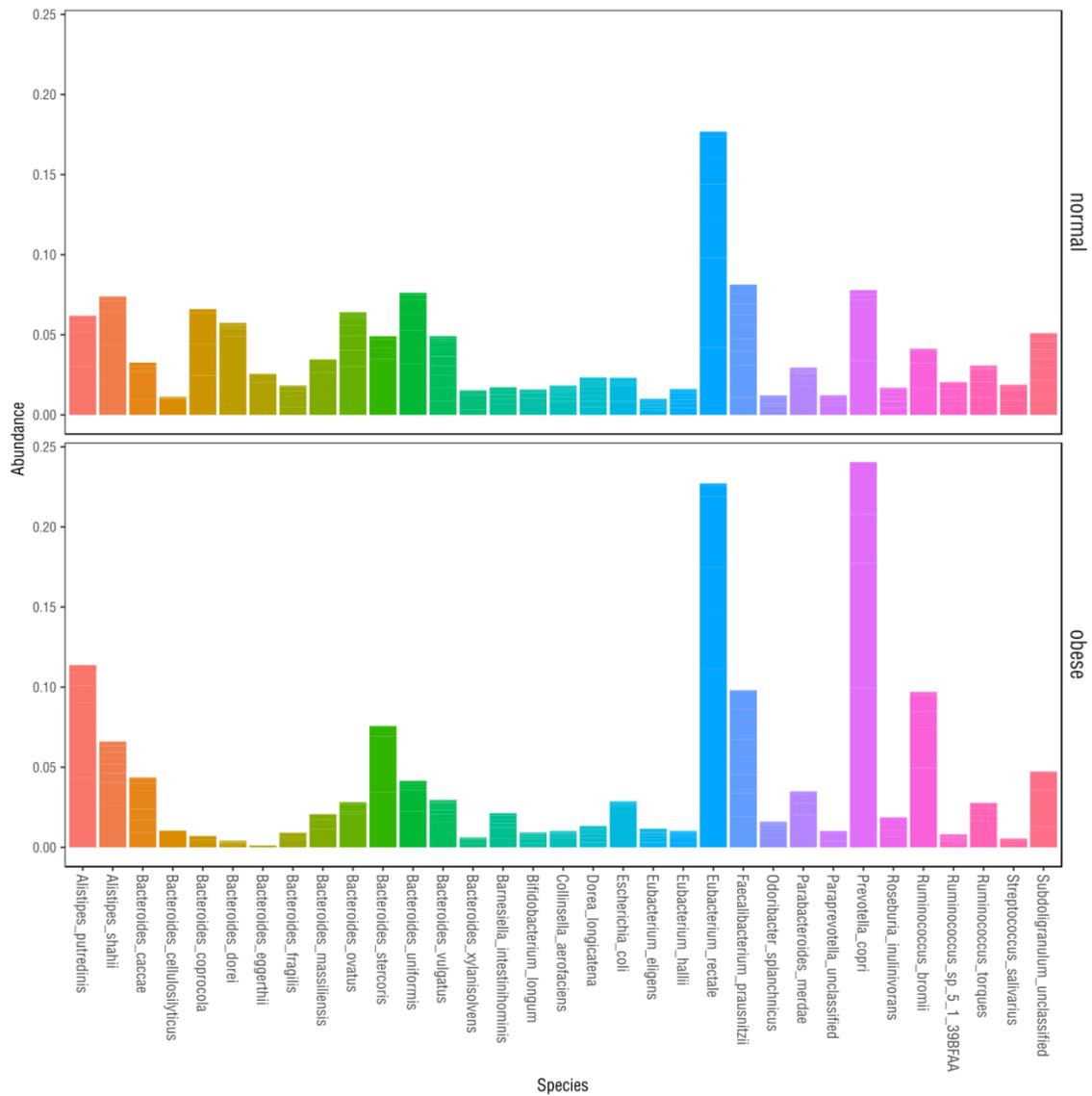


Figura 12. Abundancia relativa de las especies más representativas. La abundancia relativa de las especies debía estar presente en menos 20% de las muestras y tener una abundancia relativa superior a 0.01.

La comunidad de arqueas presentó un incremento en *unclassified species of Methanobrevibacter* en niños obesos. Para la comunidad viral, el análisis metagenómico no encontró diferencia significativa en la abundancia relativa en niños obesos comparado con niños con normopeso. Sin embargo, la abundancia relativa del virus Human herpesvirus 4 (NC_007605.1) presentó un incremento significativo de 0.08% en niños con normopeso a un 1.53% en niños obesos ($p = 0.017$), mientras que la abundancia del Torque teno midi virus 1 (NC_009225.1)

disminuyó de 2.21% en normopeso a 0.72% en niños obesos sin que este cambio sea significativo ($p = 0.282$).

En la exploración de la abundancia relativa de fagos, logramos identificar el fago más abundante de la microbiota hasta ahora reportado en la literatura, CrAssphage, cuyo número de lecturas fue de 29,748 en normopeso y 78,111 en niños con obesidad, esta diferencia no es estadísticamente significativa ($p = 0.473$), **Figura 3B**, y la abundancia de lecturas bien puede ser debida a la secuenciación, sin embargo es importante plantear una estrategia que ayude a esclarecer el papel de ese fago en la dinámica microbiana.

Un análisis de clusters de los datos provenientes de secuenciación revelan la presencia en nuestros datos de tres enterotipos previamente reportados: Enterotipo 1, enriquecido en *Bacteroides* spp.; Enterotipo 2, enriquecido en *Prevotella* spp. con un 50% de niños obesos y Enterotipo 3, enriquecido en *Ruminococcus* spp. con 50% con niños con normopeso, **Figura 13**.

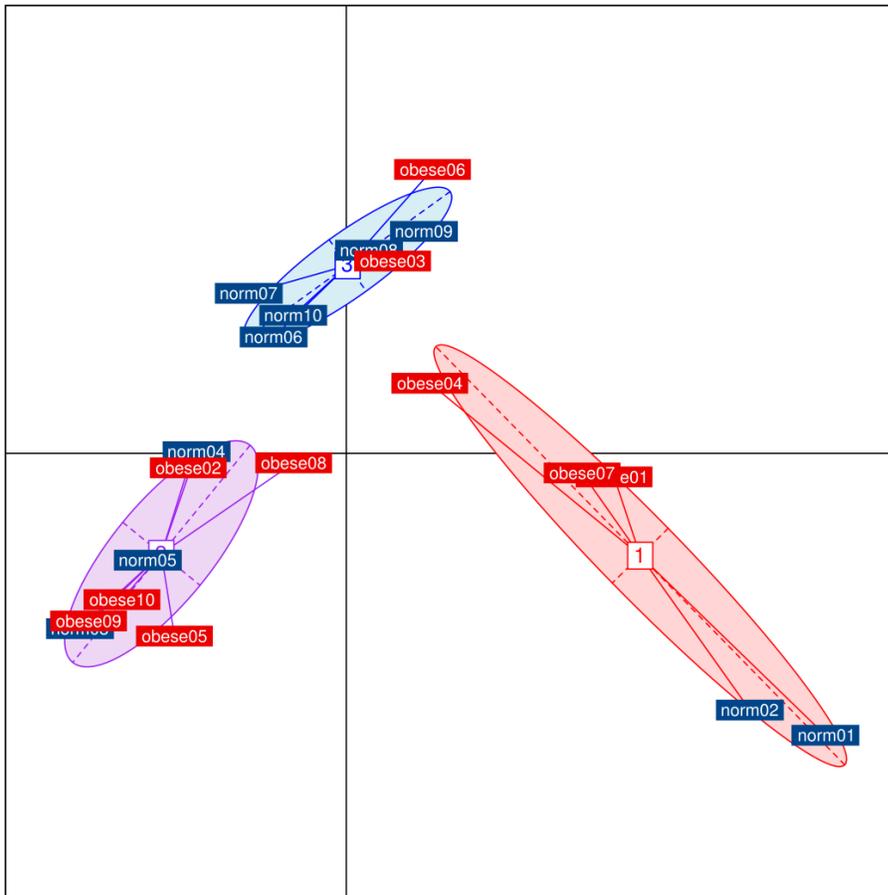


Figura 13. Gráfica de Coordenados Principales a nivel de género para identificación de Enterotipos. Las líneas conectan a cada individuo que tienen el mismo enterotipo (utilizando el método de clusterización PAM). El centro de gravedad de cada clúster está coloreado para cada enterotipo: Enterotipo 1 (azul), Enterotipo 2 (rojo), Enterotipo 3 (lila).

8.4 Composición taxonómica y funcional del microbioma de niños con normopeso y obesidad.

Se realizó un análisis con MetaPhlan2 y HUMAnN2 a los datos obtenidos mediante secuenciación masiva tipo *shot-gun*. Se observó que *Megamonas* spp., una bacteria Firmicutes estaba al menos 2-fold más significativamente abundante en niños obesos que en niños con normopeso. Por otra parte, la abundancia relativa de algunos miembros del filo Firmicutes, Bacteroidetes y Proteobacteria estaban al menos 2-fold más abundantes de manera significativa en niños con normopeso que en niños con obesidad. El Filo firmicutes incluía en nuestras muestras a bacterias tales como *Ruminococcus* spp., *Clostridium citroniae*, *Coprococcus comes*, *Streptococcus thermophilus*, *Dorea formicigenerans*,

Oscillibacter spp, y otros miembros de la Familia Oscillospiraceae. El filo Bacteroidetes incluía las especies *Bacteroides ovatus*, *B. xylanisolvens*, *B. salyersiae*, y *B. faecis*, mientras que el filo Proteobacteria incluyó los miembros de la Familia Desulfovibrionaceae, **Figura 14.**

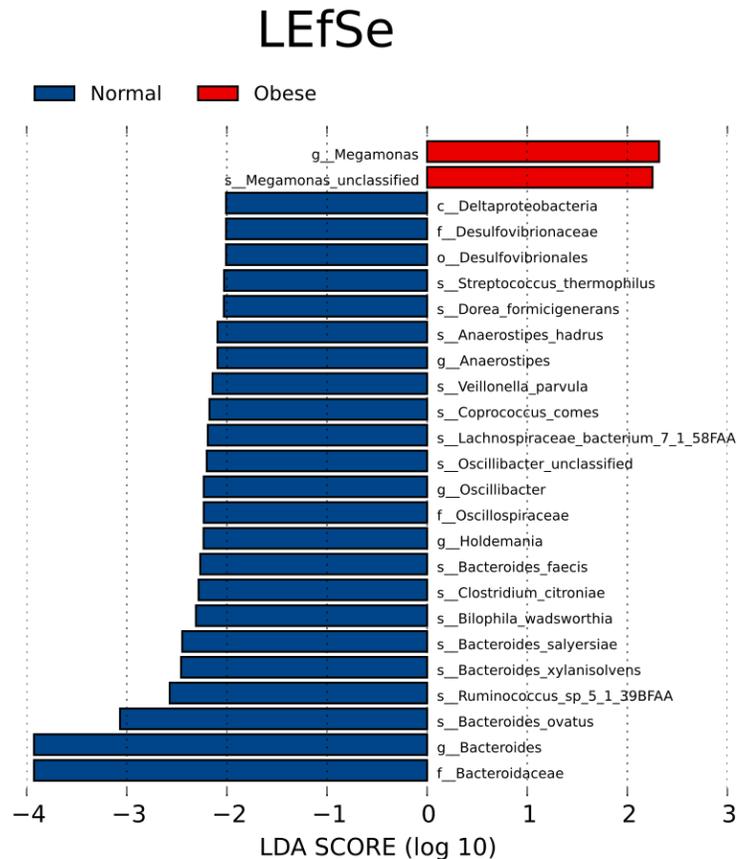


Figura 14. Análisis Linear discriminant analysis (LDA) Effect Size (LEfSe) de los taxa bacterianos representativos. El LDA score muestra el tamaño del efecto de la abundancia relativa correspondiente a cada fenotipo.

Adicionalmente, para explorar la diversidad de la microbiota, caracterizamos el microbioma de nuestros sujetos de estudio. El análisis de abundancia de rutas metabólicas mostró que los módulos KEGG de la ruta de la glucólisis, Glycolysis I (de Glucosa 6-Fosfato) ($p=0.013$), y Glycolysis II (de Fructosa 6-Fosfato) ($p=0.016$) estaban significativamente sobrerrepresentados en niños con normopeso, **Figura 15.**

Path abundance

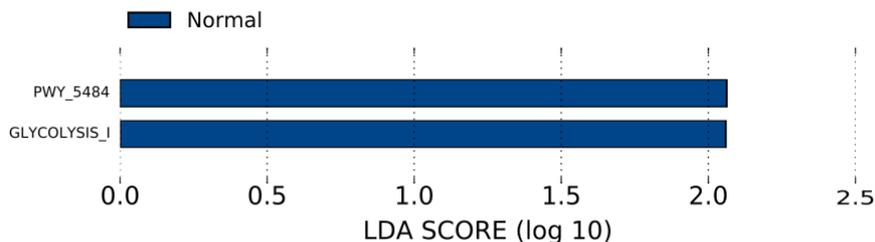


Figura 15. Análisis Linear discriminant analysis (LDA) Effect Size (LEfSe) de la abundancia de rutas metabólicas. El LDA score muestra el tamaño del efecto de la abundancia relativa correspondiente a cada fenotipo.

Los resultados del análisis de la cobertura de las rutas metabólicas del KEGG mostraron 4-fold más abundancia de tres rutas de síntesis anabólica de nucleótidos como pirimidina, guanósina en niños con normopeso, y abundancia en cuatro rutas de síntesis anabólica de aminoácidos o azúcar en niños obesos, **Figura 16.**

Path coverage

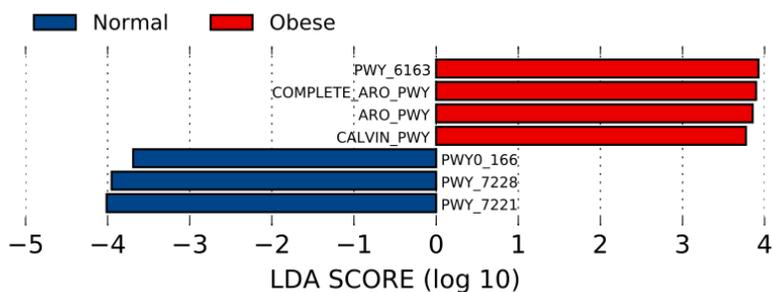


Figura 16. Análisis Linear discriminant analysis (LDA) Effect Size (LEfSe) de la cobertura de rutas metabólicas. El LDA score muestra el tamaño del efecto de la abundancia relativa correspondiente a cada fenotipo.

En lo que respecta a las familias de genes del KEGG, los datos analizados mostraron un incremento significativo en la abundancia relativa de al menos 2-fold, en genes como 4-O- β -d-mannosyl-d-glucose phosphorylase (RXN_12977) en normopeso y en genes catabólicos como el α -amylase (ALPHA_AMYL_RXN), una enzima para la hidrólisis de enlaces (1 \rightarrow 4)- α -D-glucosídicos de polisacáridos en niños obesos, **Figura 17.**

Gene families

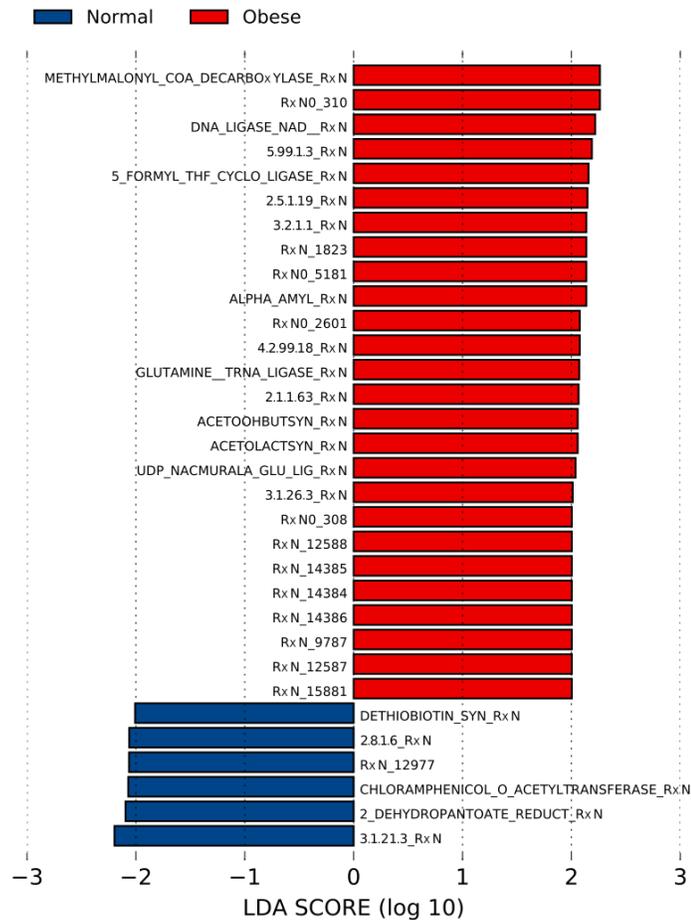


Figura 17. Análisis Linear discriminant analysis (LDA) Effect Size (LEfSe) de la abundancia de familias de genes. El LDA score muestra el tamaño del efecto de la abundancia relativa correspondiente a cada fenotipo.

Sin embargo, cuando se realizó una gráfica PCoA con la distancia Bray-Curtis de la abundancia de las rutas metabólicas, de cobertura y de abundancia relativa de genes no se observó un clúster funcional evidente entre los dos grupos de niños, **Figura 18.**

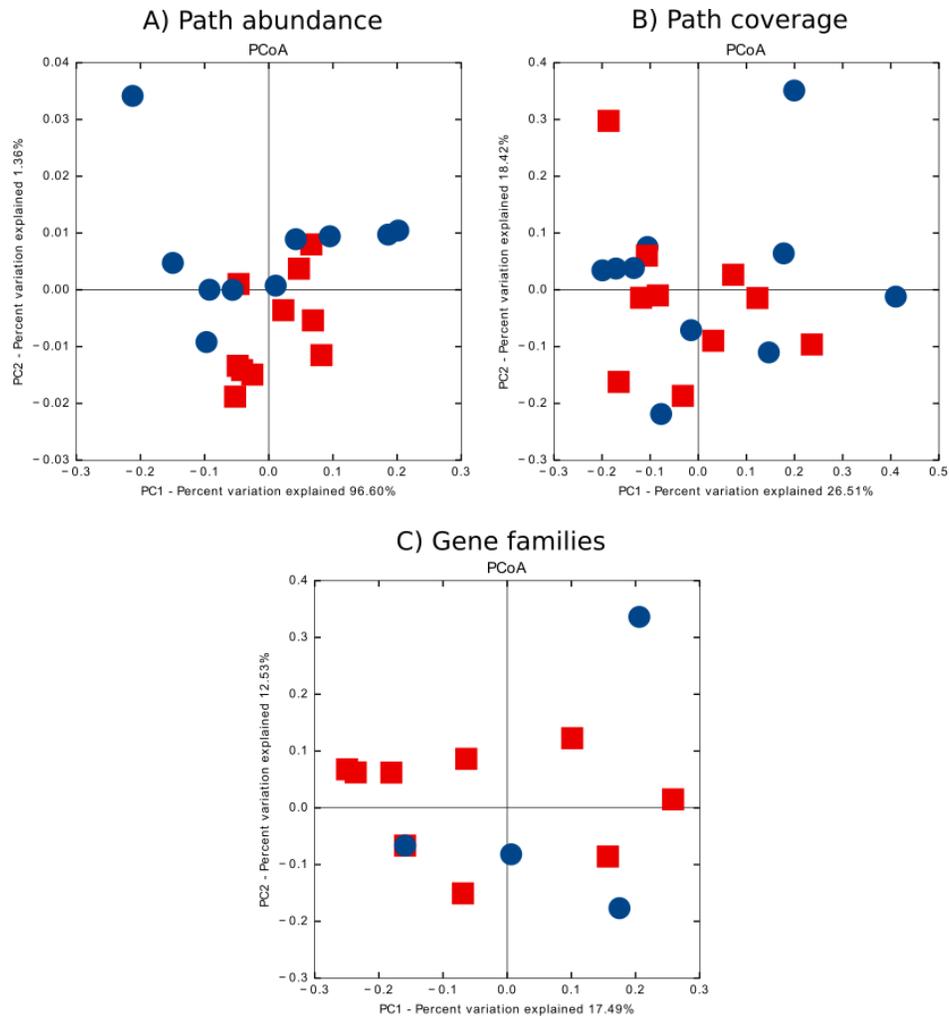


Figura 18. Beta diversidad funcional. Análisis de coordenados principales (PCoA derivados de distancia Unifrac ponderada y distancia Bray-Curtis entre muestras.

Por otra parte, se encontró asociación cuando se comparó los metadatos con la abundancia relativa de las especies identificadas, donde los niveles altos de colesterol sérico están relacionados con la baja abundancia de la Familia *Oscillospiraceae* en niños obesos, **Figura 19.**

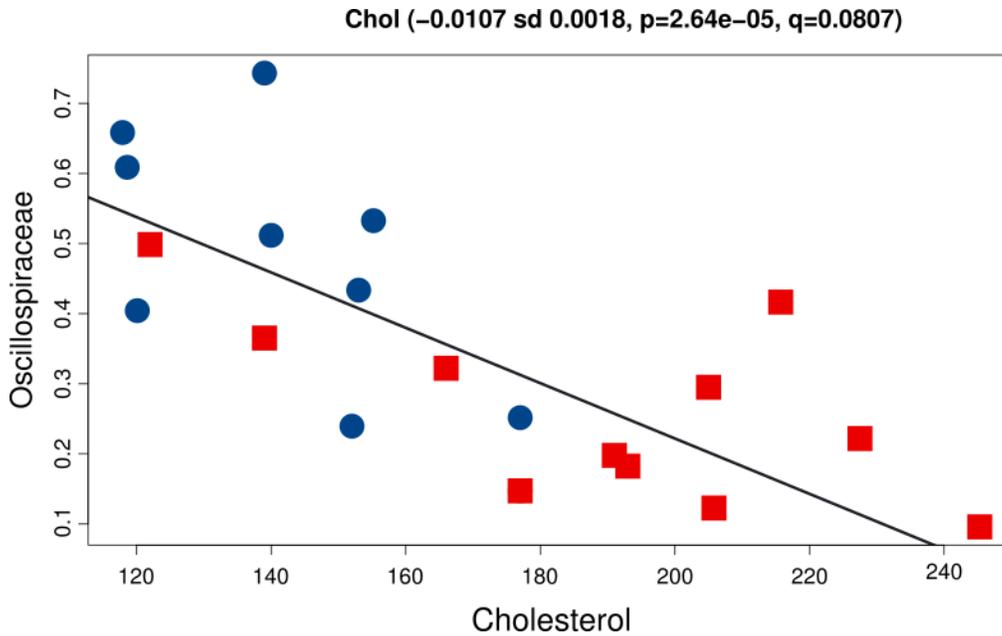


Figura 19. Asociación multivariada con modelo lineal. El incremento de colesterol sérico está asociado negativamente con la abundancia relativa de la familia Oscillospiraceae.

8.5. Diversidad filogenética y diversidad funcional en microbiomas de niños con normopeso y niños obesos.

Se realizó un análisis de agrupación por clusters de todas las especies identificadas graficando únicamente las 15 especies más abundantes en el microbioma, el set completo de metadatos y los ortólogos identificados con la base de datos EggNOG.

El gráfico de calor de este análisis muestra una clusterización jerárquica de especies de los niños con normopeso y obesidad para el filo Bacteroidetes, *Alistipes putrenidis*, *A. shahii*, *Prevotella copri*, *Parabacteroides merdae*, y otros siete diferentes Bacteroides: *Bacteroides ovatus*, *B. vulgatus*, *B. uniformis*, *B. stercoris*, *B. dorei*, *B. cacae*, y *B. coprocola*. Lo mismo ocurre con miembros del filo Firmicutes, tales como *Subdoligranulum* spp., *Eubacterium rectale*, *Faecalibacterium prausnitzii*, y *Ruminococcus bromii*, **Figura 20A**.

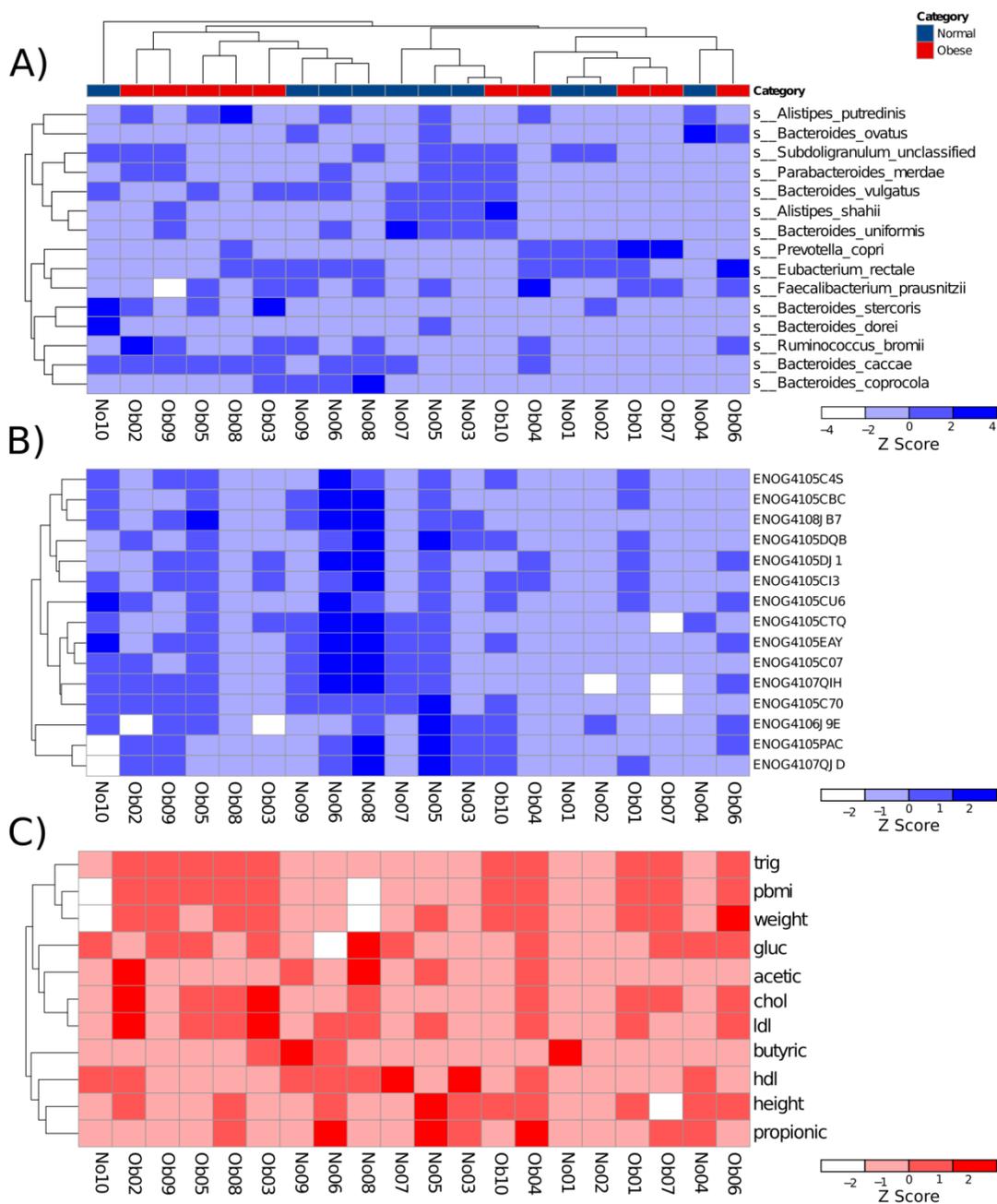


Figura 20. Mapa de calor de perfil taxonómico, funcional y de variables de estudio. A) Especies más abundantes. B) Ortólogos significativos presentes en las especies más abundantes, agrupados respecto a especies. C) Clusterización de metadatos respecto a los ortólogos de las especies más abundantes.

El análisis con los genes ortólogos derivados del análisis metagenómico funcional utilizando la base de datos EggNOG, **Figura 20B** (Apéndice A, Tabla

Suplementaria 7) muestra cuatro principales clústers de módulos metabólicos, en términos de ortología incluyen categorías ligadas a funciones de pared celular, membrana, y desarrollo de envoltura, así como transporte y metabolismo de lípidos y aminoácidos. Un segundo clúster incluye producción y conversión, mecanismos de transducción de señales, mientras que un tercer clúster agrupa metabolismo de nucleótidos y de transporte de carbohidratos, transcripción de ADN, estructura ribosomal y biogénesis y producción y conversión de energía. Un cuarto cluster incluye ortólogos de replicación, replicación, recombinación y reparación, estructura ribosomal y biogénesis, además de la enzima piruvato fosfato diquinasa, y ortólogos del grupo de transporte y metabolismo de carbohidratos, **Figura 20B**. Finalmente, el análisis estadístico utilizando los metadatos clínicos, muestran tres clusters, el primero agrupando triglicéridos, el percentil del IMC y el peso; el segundo grupo a la glucosa, acetato, colesterol y lipoproteína de baja densidad; mientras que un tercer cluster al butirato, lipoproteína de alta densidad, altura y propionato, **Figura 20C**.

9. DISCUSIÓN

El sobrepeso y la obesidad son enfermedades de escala global de acuerdo la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE), y al menos uno de cada tres adultos y uno de cada cinco niños la padecen entre los 35 países miembros de dicha organización [66]. En países como México, el sobrepeso y la obesidad han incrementado a un ritmo alarmante en los últimos años, donde son afectados al menos uno de cada tres niños y adolescentes entre 5 y 11 años [67]. En un trabajo reciente previo a este proyecto, analizando bacterias del colon distal entre niños con sobre peso y obesidad, se encontró una asociación entre las condiciones y los niveles de producción de SCFs en niños mexicanos [31]. El sobrepeso y la obesidad se comienzan a desarrollar en la infancia o adolescencia e implica factores genéticos en el genoma humano, así como en el microbioma humano. Estudios de tipo MGWAS ha probado el papel importante del microbioma en el desarrollo de enfermedades tales como diabetes

tipo 2 [45], cáncer colorectal [46], y artritis reumatoide en adultos [47], lo ha demostrado genes microbianos particulares en cada estudio. En este trabajo, realicé un estudio comparativo del microbioma entre niños con normopeo y niños obesos mexicanos de un estudio de cohorte en obesidad.

Los resultados muestran que los niños obesos tienen incrementado el peso y el percentil de IMC, además de un incremento en los niveles de triglicéridos y colesterol (dislipidemia), **Figura 7**. La caracterización microbiana basada en el análisis de los datos de metagenómica tipo *shot-gun* muestra que en general la abundancia de bacterias, arqueas y comunidades virales son comparables entre niños con normopeso y sobrepeso. Sin embargo, en lo que respecta a los virus, hay un incremento significativo de 19-fold en Human herpesvirus 4 (HHV-4) en heces en niños obesos. Hay un reporte de que existe una asociación de diferentes Human herpesvirus 1 con la obesidad en una población de EE. UU. entre 20 y 49 años [68], lo que indicaría que éste es el primer reporte de asociación de HHV-4 con obesidad infantil. También se observó un incremento en el número de lecturas para el fago CrAssphage en niños obesos; este virus infecta bacterias del filo Bacteroides y recientemente se probó que infecta a *Bacteroides intestinalis*, una bacteria asociada con obesidad [69].

Respecto a las arqueas, hubo una disminución en la abundancia de la arquea metanogénica *Methanobrevibacter smithii* en niños obesos en este estudio, este resultado concuerda con un reporte en adultos franceses [70]. Sin embargo, hubo un incremento en la abundancia relativa de una diferente especie no clasificada *Methanobrevibacter* spp. en los mismos niños. Miembros de este género tienen una productiva actividad sacarolítica permitiendo la digestión de polisacáridos en el colón [71] y se ha reportado que son responsables del incremento de peso corporal relacionado con dieta en un modelo murino [72]. La obesidad también involucra un estado crónico de inflamación de baja intensidad [73], y una cepa de *Methanobrevibacter smithii* está reportada de ser capaz de inducir una respuesta inflamatoria por citosinas por activación y liberación de citosinas proinflamatorias en células dendríticas en células dendríticas humanas, derivadas de monocitos, que contribuyen a la obesidad [74]. En reporte de un

estudio hecho en Estados Unidos con una población adulta de 18-40 años, hubo una asociación positiva de *Methanobrevibacter* spp. con una dieta alta en carbohidratos [75], con un índice de masa corporal y grasa corporal mayor [76]. Además, la misma colonización de *M. smithii* está asociada positivamente con un incremento en el riesgo de sobrepeso en niños de 6 – 10 años en los Países Bajos [77].

Cuando se realizó el análisis de la comunidad bacteriana, los niños con normopeso y con obesidad fueron estratificados basados en tres diferentes enterotipos bacterianos [64,78]. Se observó que la mayoría de los niños con normopeso tenían una comunidad bacteriana dominada por *Ruminococcus* spp. (Enterotype 3), mientras que la mayoría de los niños con obesidad tenían una comunidad dominada por *Prevotella* spp. (Enterotype 2) (**Figura 13**, Tabla Suplementaria 5). Estos dos enterotipos representan el 75% de los niños estudiados. La estratificación de comunidades bacterianas en enterotipos ha sido reportada para microbiota asociada a tumor y no-asociada a tumor de cáncer colorectal [79], y como factor de riesgo cardio-metabólico asociado a dieta [80]. En este estudio, se observó que la abundancia relativa de *Prevotella copri* incrementó en niños con obesidad, de esta forma, consideramos que una dominante *Prevotella* spp. en particular asociada con la obesidad en niños Mexicanos en una edad entre 9 y 11 años.

Por otra parte, en un análisis LEfSe, observamos que niños con normopeso varios miembros del filo Firmicutes, Bacteroidetes y Proteobacteria están al menos 2-fold más abundantes comparándolo con niños con obesidad, **Figura 14**, siendo el ratio Firmicutes/Bacteroidetes correspondiente con reportes previos de estudios de obesidad [81].

Respecto al filo Proteobacteria, en este estudio, un análisis con Metaphlan2 mostró que los miembros de la Familia Desulfobivriaceae, por ejemplo, *Bilophila wadsworthia* estaban 2-fold más abundantes en niños con normopeso que en niños con obesidad, **Figura 14**. Miembros de esta familia son anaerobios estrictos reductores de sulfato, y el incremento de su abundancia está reportado en estudios asociados a obesidad, Tabla 1.

Entre el filo Bacteroidetes, este estudio muestra que miembros de la familia Bacteroidaceae, tales como *Bacteroides faecis*, *B. ovatus*, *B. xylanisolvens*, and *B. salyersiae* estaban 2- a 4-fold más abundantes en niños con normopeso que en niños con obesidad, **Figura 4A**. La relación funcional entre el hospedero y los miembros del filo Bacteroidetes es complejo, debido principalmente a su diversidad genómica, sumado su versatilidad metabólica funcional, lo que le permite a los miembros de este filo adaptarse rápidamente a los cambios de entorno en el colón [82]. Se ha reportado una alta abundancia relativa de *Bacteroides* spp. asociada con normopeso, con el importante papel de mantener el balance ecológico de la concurrencia de la microbiota en el colón, debido a su actividad sacarolítica productora de acetato, propionato y succinato (Tabla 3). Se indentificó varios Firmicutes, los cuales son más abundantes entre niños con normopeso que niños con obesidad. *Streptococcus thermophilus*, *Dorea formicigenerans*, *Anaerostipes hadrus*, *Veillonella parvula*, *Coprococcus comes*, *Lachnospiraceae bacterium 7_1_58FAA*, *Oscillibacter* spp., *Holdemanina* spp., *Clostridium citroniae*, and *Ruminococcus* sp. 5_1_39BFAA, **Figura 14**. Hay evidencia reportada en la literatura de que estas bacterias juegan un papel importante en la prevención de la obesidad en humanos a través de la producción de metabolitos o modulación inmunológica. La abundancia de *S. thermophilus* incrementa la lipólisis de adipocitos en un modelo de ratón transgénico obeso aP2-agouti, el cual es susceptible a obesidad inducida por dieta, y que exhibe patrones de expresión de humano en genes relacionados con obesidad [83], Tabla 3. En otro reporte, una cepa del género *Anaerostipes* spp. se mostró que incrementaba el contenido de butirato en un modelo murino sanos; el butirato es una fuente de energía para el epitelio intestinal, estimula la producción de células T .

Tabla 3. Bacterias del colon aumentadas o disminuidas significativamente en este estudio.

Phylum Proteobacteria				
bacteria	este trabajo	otros reportes	referencia	
Familia Desulfovibrionaceae, <i>Bilophila wadsworthia</i>	2-fold más abundantes en niños con normopeso que en niños obesos	Una disminución en la abundancia de la familia Desulfovibrionaceae ha sido asociada con sobrepeso y obesidad en un estudio hecho en niños suecos de edad preescolar.	Karlsson <i>et al.</i> , 2012	
		<i>B. wadsworthia</i> es significativamente más abundante en delgados que en obesos en una población japonesa adulta.	Andoh <i>et al.</i> , 2016	
		<i>Bilophila</i> spp. incrementa su abundancia en una dieta alta en azúcar en un modelo murino.	Sen <i>et al.</i> , 2017	
Phylum Bacteroidetes				
bacteria	este trabajo	otros reportes	referencia	
Familia Bacteroidaceae, Género <i>Bacteroides faecis</i> , <i>B. ovatus</i> , <i>B. xylanisolvens</i> , and <i>B. salyersiae</i> .	2 a 4-fold más abundantes en niños con normopesos que en niños obesos.	Un incremento de Bacteroidetes debido a una intervención alimentaria reduce el IMC en adolescentes españoles.	Nadal <i>et al.</i> , 2009	
		<i>B. acidifaciens</i> miembro de la Familia Bacteroidaceae, su incremento previene la obesidad y mejora la sensibilidad a insulina en modelo murino.	Yang <i>et al.</i> , 2017	
		<i>B. faecis</i> está negativamente asociado con marcadores para dislipidemia en mujeres danesas adultas.	Brahe <i>et al.</i> , 2015	
		<i>B. ovatus</i> mantiene la diversidad de la microbiota del colon mediante una hidrólisis eficiente de fibra soluble como el almidón, produciendo oligosacáridos y dextrinas, las cuales para otras bacterias no sacarolíticas.	Degnan <i>et al.</i> , 1997	
		<i>B. xylanisolvens</i> degrada xilanos a acetado, propionato y succinato en colon humano.	Chassard <i>et al.</i> , 2008	
		<i>B. salyersiae</i> ha sido aislado de heces fecales humanas.	Song <i>et al.</i> , 2004	
Phylum Firmicutes				
bacteria	este trabajo	otros reportes	referencia	
<i>Streptococcus thermophilus</i>	2-fold más abundantes en niños con normopeso que en niños obesos.	<i>S. thermophilus</i> un probiótico asociado con la reducción de peso corporal, acumulación de grasa, actividad sintasa en adipocitos.	Yoda <i>et al.</i> , 2015	
<i>Dorea formicigenerans</i>		<i>D. formicigenerans</i> , un productor de serina proteasa, cuya abundancia incrementa después de la limpieza a intestino en adultos ingleses.	Jalanka <i>et al.</i> , 2015	
<i>Anaerostipes hadrus</i>		<i>D. formicigenerans</i> disminuye su abundancia después de tratamiento antibiótico en adultos japoneses que sufren de colitis ulcerativa.	Nomura <i>et al.</i> , 2005	
<i>Veillonella parvula</i>		<i>A. hadrus</i> , una cepa de este género ha mostrado incrementar el contenido de butirato en el colon en modelos murinos sanos.	Zhang <i>et al.</i> , 2016	
<i>Coprococcus comes</i>		<i>V. parvula</i> usualmente considerado parte de la microbiota oral, o un patógeno oportunista de humanos.	Al-Otaibi and Al-Mohizea, 2014	
<i>Lachnospiraceae bacterium 7 1 58 FAA</i>		<i>Veillonella</i> spp. está negativamente correlacionados con triglicéridos de cadena corta en suero y en heces, en un estudio hecho en niños a nivel preescolar de Finlandia y Estonia.	Kostic <i>et al.</i> , 2015	
<i>Oscillibacter</i> sp. unclassified		<i>C. comes</i> , su abundancia disminuye junto con IMC, los triglicéridos séricos, el colesterol y el colesterol LDL en adultos alemanes afectados de diabetes / obesidad tipo 2 después de la cirugía de bypass gástrico.	Graessler <i>et al.</i> , 2013	
<i>Holdemania</i> spp.		Familia Lachnospiraceae, se asocia con un menor aumento de peso a largo plazo en mujeres de ascendencia caucásica.	Menni <i>et al.</i> , 2017	
<i>Clostridium citroniae</i>		<i>O. valerigenes</i> un conocido productor de ácido valérico.	Lino <i>et al.</i> , 2007	
<i>Ruminococcus</i> sp. 5 1 39BFAA		<i>H. filiformis</i> un productor de ácido acético y ácido láctico.	Willems <i>et al.</i> , 1997	
<i>Megamonas</i> sp. unclassified		More than 2-fold more abundant in obese than in normal-weight children.	<i>Holdemania</i> spp. associated to leanness in Japanese men.	Kobayashi <i>et al.</i> , 2015
			<i>C. citroniae</i> más abundante en adultos delgados que en adultos obesos en población japonesa.	Andoh <i>et al.</i> , 2016
			<i>C. citroniae</i> es un patógeno oportunista asociado con colitis en adultos.	Gustafsson <i>et al.</i> , 2012
		<i>Ruminococcus</i> spp. correlacionado positivamente con concentración de triglicéridos de cadena corta en suero y heces en un estudio de niños en edad preescolar en Finlandia y Estonia.	Kostic <i>et al.</i> , 2015	
		<i>Megamonas</i> spp. más abundante en adultos taiwaneses obesos que en normopeso.	Chiu <i>et al.</i> , 2014	
		<i>Megamonas</i> spp. abundancia significativamente reducida en niños mexicanos con diabetes tipo 1 respecto al grupo control sano.	Mejía-León <i>et al.</i> , 2014	
		<i>Megamonas</i> spp. más abundante en sujetos con normopeso y pre-diabetes Chinos que en adultos diagnosticados recientemente con diabetes tipo 2.	Zhang <i>et al.</i> , 2013	

reguladoras, inhibe la inflamación y regula la expresión génica, Tabla 3. Una disminución de bacterias productoras de butirato está asociada con varias enfermedades inflamatorias, como la obesidad [84]. Por esto, en nuestro grupo de estudio se ha reportado previamente una disminución en la producción de butirato por la microbiota de niños con obesidad mexicanos menores de 11 años dentro del mismo estudio cohorte [38]. *Veillonella parvula* es un patógeno oportunista, miembro del género *Veillonella* spp., el cual está correlacionado negativamente con triglicéridos de cadena corta (Tabla 3). En otro reporte, se menciona que *V. parvula* tiene propiedades inmunomoduladoras potenciales que inducen respuestas de citoquinas como la producción de interleuquina-6 (IL-6) en células dendríticas.

Además, en el mismo repore, una combinación de *Veillonella* spp. con *Streptococcus* spp. aumenta la respuesta de IL-8, IL-6, IL-10, y TNF- α [85]. Lo cual es interesante ya que hay reportes de que IL-8, y TNF- α , están elevadas en obesidad de humanos. [86], la citosina IL-6 tiene efecto antiinflamatorio y juega un papel compensatorio en la obesidad incrementando la producción de la proteína de islote pancreático glucagon-like peptide-1 (GLP-1) [87], y la IL-10 participa en la prevención de la inflamación de bajo impacto causada por la obesidad [88]. En este estudio, *S. thermophilus* mostró una abundancia de 2-fold en niños con normopeso, **Figura 4A**, así que consideramos que una abundancia pareada de *V. parvula* y *S. thermophilus* está asociada con normopeso en niños mexicanos, donde sinérgicamente regulan la producción de IL-6 para contribuir a la reducción de la inflamación. La abundancia de *Coprococcus comes*, una bacteria productora de ácidos butírico, acético, fórmico y propiónico [89], es más alta en niños con normopeso, **Figura 14**. La abundancia de esta bacteria disminuye junto con el IMC, triglicéridos séricos, colesterol y LDL después de una de bypass gástrico Roux-N-Y en adultos alemanes, Tabla 3.

En niños con normopeso, las bacterias pertenecientes a la Familia *Oscillibacter* spp. fueron significativamente más abundantes que en los niños con obesidad, **Figura 14**. *Oscillibacter valericigenes* (Oscillaspiraceae) es una bacteria bien conocida en producir ácido valérico, Tabla 3, se encontró una importante asociación negativa (SD = 0.0018, $p = 2.64e-25$, $q = 0.0807$) de esta Familia con

los niveles de colesterol sérico y el IMC entre los niños de nuestro estudio, **Figura 19**. Estos resultados concuerdan con el papel de inhibidor de la síntesis del colesterol hepático producido por derivados del ácido valérico en ratas [90]. Otro Firmicutes, *Holdemania* spp. fue 2-fold más abundante en niños con normopeso; esta bacteria es una productora de ácido acético y láctico, y miembros de su género han sido asociados en previos reportes a un estado magro en hombres japoneses, Tabla 3. *Clostridium citroniae* es un Firmicutes que está 2-fold más abundante en normopeso en nuestro estudio. Una cepa de esta bacteria fue reportada con una abundancia superior en adultos delgados que en obesos en un estudio en población japonesa, sin embargo, parecer ser, además, un patógeno oportunista asociado con colitis en adultos, Tabla 3. En este estudio *Ruminococcus* sp. 5_1_39BFAA, fue dos veces más abundante en normopeso que en obesidad, **Figura 14**. Esta cepa pertenece a un género donde sus miembros son reportados como patógenos o probióticos [91]; sorpresivamente *Ruminococcus* spp. correlaciona positivamente con la concentración de triglicéridos de cadena corta en suero y heces en un estudio hecho en niños de preescolar en Estonia y Finlandia, Tabla 3.

Por otra parte, encontramos gram negativos no clasificados de la familia Firmicutes, *Megamonas* spp. más de 2-fold sobrerrepresentada significativamente en niños obesos que en niños con normopeso, **Figura 14**. Miembros del género *Megamonas* spp. son productores activos de ácido propiónico y acético, al ser bacterias sacarolíticas [92]. Se observaron resultados similares acerca de la abundancia de estas bacterias en adultos obesos de Taiwan, Tabla 3. Sin embargo, la abundancia de *Megamonas* spp. se redujo significativamente en un estudio de niños mexicanos con inicios de diabetes tipo 1 respecto a su grupo control sano [93], mientras que en un estudio de diabetes tipo 2 en adultos chinos, el género *Megamonas* fue más abundante en sujetos con normopeso y pre-diabetes que en los individuos recientemente diagnosticados con diabetes tipo 2 [94], Tabla 3. Todos los niños en este estudio mostraron niveles normales de glucosa, pero los niveles séricos de colesterol estuvieron incrementados en los niños con obesidad, **Figura 7**. Miembros del género *Megamonas*, están

reportados de promover los intermediarios isoprenoides en la biosíntesis de colesterol a través de la vía de piruvato mediada por ácido propiónico y alanina [95, 96], lo que podría explicar su abundancia en niños con obesidad en nuestro estudio. Además, en un reporte diferente, una disminución en la abundancia de *Megamonas* spp. se observó durante un tratamiento oral con berberina, un fármaco anticolesterolémico en adultos africanos y chinos [67], lo que añade importancia a *Megamonas* spp. en la biosíntesis de colesterol.

El análisis con HUMAnN2, mostró que las rutas de MetaCyc Glycolysis_I (de Glucosa 6-Fosfato), y Glycolysis II (de Fructosa 6-Fosfato) fueron 2-fold significativamente sobrerrepresentadas en la microbiota de los niños con normopeso, **Figura 15**. Una mayor actividad glucolítica en el colón podría incrementar la producción de ácidos grasos de cadena corta, los cuales son absorbidos por el hospedero. Un incremento en la producción de ácido valérico, por ejemplo, podría disminuir el acetyl CoA del hospedero, dando la pauta a niveles lipídicos normales [96]. Por otra parte, el incremento en la producción de ácido butírico en el hospedero daría como resultado un incremento en las interleucinas antiinflamatorias [98]. Estos resultados son consistentes con lo observado en el estudio de la depleción de la glucólisis del microbioma de unos gemelos obesos de Estados Unidos [99]. La cobertura de rutas metabólicas del microbioma muestra una sobrerrepresentadas de tres rutas de síntesis de nucleótidos tales como pirimidina y cuanosina en normopeso, y abundancia en cuatro rutas anabólicas para síntesis de aminoácidos o azúcar en niños obesos, **Figura 16** (Apéndice, Tabla Suplementaria 6), sin embargo, no se logró encontrar una explicación a esta observación.

La abundancia de familia de genes del microbioma mostró que la RXN α -amilasa (o α -Amilasa (EC 3.2.1.1)) estaba 2-fold más significativa en niños con obesidad, **Figura 17** (Apéndice A, Tabla Suplementaria 6). Esta enzima lleva a cabo la hidrólisis de enlaces glucosídicos α -1,4 de almidón resistente del colon. Resultados similares fueron observados en niños de estados unidos con la enfermedad de hígado graso no-alcohólico [100]. Además, el microbioma de obesos tiene una capacidad de extraer una mayor capacidad energética en forma

de ácido acético y propiónico; *Megamonas* spp. tiene α -amilasa, lo cual podría guiar a una dislipidemia a través de síntesis de acetil-CoA [95].

El análisis de clúster usando los 15 clústeres de genes más abundantes para nuestros datos a partir de la base de datos EggNOG, **Figura 20A** (Apéndice A, Tabla Suplementaria 7), mostró que el metabolismo y transporte de carbohidratos es el grupo funcional más abundante en el microbioma de la población de niños que estudiamos, lo cual es similar a otros estudios del microbioma humano en adultos chinos y daneses [101]. Adicionalmente, el ortólogo de transporte y metabolismo de carbohidratos fosfohexoquinasa (ENOG4105CTQ) fue significativamente más abundante ($p = 0.044$) en niños con normopeso que en niños obesos, lo cual promueve la utilización de glucosa para regular la energía en glycolysis I y II [102], Figura 20B. De igual manera, el ortólogo de transporte y metabolismo de lípidos metilmalonil-CoA descarboxilasa (ENOG4108JB7), fue más abundante en niños con normopeso que en niños obesos ($p = 0.056$), **Figura 20B** (Apéndice A, Tabla Suplementaria 7). La metilmalonil-CoA descarboxilasa juega un papel importante en la producción de ácido propiónico en *Megamonas* spp., la cual está involucrada en la síntesis de colesterol a través de Acetil-CoA [95].

La actividad enzimática anteriormente descrita permite el metabolismo catabólico eficiente de los policáridos no digeridos por la dieta que van a dar al colon en los niños y que es metabolizado por la microbiota del colón. Los productos de la fermentación son ácidos grasos de cadena corta los cuales tienen propiedades inmunomoduladoras y anti-inflamatorias [98]. El almidón resistente es una fibra dietética que puede contribuir a reducir la acumulación de grasa, aumentar la sensibilidad de insulina, regular los niveles de glucosa en sangre y el metabolismo de lípidos, por lo que es una fibra dietética prometedora para la prevención o el tratamiento de la obesidad y sus enfermedades relacionadas [103]. En otro informe, el almidón resistente y el quitosano mostraron un efecto anti-obesidad en un modelo murino [104]. Así, de esta manera, la microbiota intestinal de los niños con normopeso llevaría entre otras funciones genéticas, la

capacidad de fermentar polisacáridos resistentes de manera eficiente en el intestino.

10. CONCLUSIONES

El microbioma de los niños con normopeso y con obesidad estudiados en este proyecto, fueron similares en la composición de las comunidades bacterianas y composición de genes y en la función de sus proteínas, Figura 20A; Figura 20B. Sin embargo, algunos miembros individuales de las comunidades bacterianas mostraron diferencia significativa entre los niños con normopeso y obesidad, afectando la síntesis de algunos metabolitos de rutas específicas, promoviendo la obesidad en adición a otros factores genéticos y ambientales al que los niños están expuestos. Concluimos que este estudio de MGWAS de niños con normopeso y niños con obesidad agrega información útil para la comprensión de la obesidad entre niños mexicanos, que aunque hay correlación con algunos factores no provee suficiente información de causalidad por lo que son necesarios mas estudios al respecto.

11. PERSPECTIVAS

- Repetir los análisis con un número de muestra mayor que permita caracterizar la población infantil mexicana.
- Es necesario evaluar otras asociaciones más allá de la taxonómica y funcional, un estudio GWAS, por ejemplo, buscaría SNPs en los sujetos que se pudieron correlacionar junto con la composición del microbioma.
- Realizar un estudio que permita coleccionar muestras antes de que el individuo desarrolle obesidad.
- Caracterizar la microbiota a través de RNASeq, metatranscriptómica para ver en qué tiempos ocurre la expresión de genes relacionados a obesidad.

12. REFERENCIAS

- [1] WHO | Population-based Approaches to Childhood Obesity Prevention, WHO, 2016. <http://www.who.int/dietphysicalactivity/childhood/approaches/en/>. (Accessed 11 May 2018).
- [2] A.V. Hartstra, K.E.C. Bouter, F. Backhed, M. Nieuwdorp, Insights into the role of the microbiome in obesity and type 2 diabetes, *Diabetes Care* 38 (2015) 159-165, <https://doi.org/10.2337/dc14-0769>.
- [3] World Health Organization . Obesity: preventing and managing the global epidemic: report of a WHO consultation. World Health Organization; World Health Organ Tech Rep Ser. 2000;894. p. 6 -12.
- [4] P. Agrawal, K. Gupta, V. Mishra, S. Agrawal. The Psychosocial Factors Related to Obesity: A Study Among Overweight, Obese, and Morbidly Obese Women in India. *Women & health* (2015), 55(6), 623–645.
- [5] Q. Xia, S. F. Grant. The genetics of human obesity. *Ann. NY Acad. Sci.* 1281 (2013), 178–190.
- [6] NHLBI Obesity Education Initiative Expert Panel on the Identification, Evaluation, and Treatment of Obesity in Adults (US). Clinical Guidelines on the Identification, Evaluation, and Treatment of Overweight and Obesity in Adults: The Evidence Report. Bethesda (MD): National Heart, Lung, and Blood Institute; 1998 Sep. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2003/>. Chapter 2:C.
- [7] P. M. Anderson, K. E. Butcher. Childhood obesity: trends and potential causes. *Future Child.* Spring (2006);16(1):19-45.
- [8] T. J. Cole, M. C. Bellizzi, K. M. Flegal W. H. Dietz. Establishing a standard definition for child overweight and obesity worldwide: international survey. *British Medical Journal* (2000);320:1240-3.
- [9] R.M. Viner, T.Y. Segal, E. Lichtarowicz-Krynska, P. Hindmarsh. Prevalence of the insulin resistance syndrome in obesity. *Arch Dis Child* (2005). Jan 1;90(1):10-4.
- [10] C. K. Holub, J. P. Elder, E. M. Arredondo, S. Barquera, C. M. Eisenberg, L. M. Sánchez Romero, E.J. Simoes. Obesity control in Latin American and U.S. Latinos: a systematic review. *American Journal of Preventive Medicine*, (2013) 44(5), 529–37.
- [11] L. Latnovic, L. Rodriguez Cabrera. Public health strategy against overweight and obesity in Mexico's National Agreement for Nutritional Health. *International Journal of Obesity Supplements* (2013), 3(S1), S12–S14.
- [12] Instituto Nacional de Salud Pública. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino 2016 – ENSANUT-MC-2016. Disponible en: <https://ensanut.insp.mx/ensanut2016>
- [13] Guo SS, Wu W, Chumlea WC, Roche AF. 2002. Predicting overweight and obesity in adulthood from body mass index values in childhood and adolescence. *Am J Clin Nutr.* Sep 1;76(3):653-8.

- [14] Suez J, Korem T, Zeevi D, Zilberman-Schapira G, Thaiss CA, Maza O, Israeli D, Zmora N, Gilad S, Weinberger A, Kuperman Y, Harmelin A, Kolodkin-Gal I, Shapiro H, Halpern Z, Segal E, Elinav E. Artificial sweeteners induce glucose intolerance by altering the gut microbiota. *Nature*. 2014 Oct 9;514(7521):181-6. doi: 10.1038/nature13793. Epub 2014 Sep 17.
- [15] Jacobs DR Jr. 2006. *Fast food and sedentary lifestyle: a combination that leads to obesity*. 83(2):189-190.
- [16] Stunkard AJ, Harris JR, Pedersen NL, McClearn GE. 1990. The body mass index of twins who have been reared apart. *N Engl J Med*. 322:1483–1487.
- [17] A. Mejía-Benítez, M. Klünder-Klünder, L. Yengo, D. Meyre, C. Aradillas, E. Cruz, Pérez-Luque, J.M. Malacara, M.E. Garay, J. Peralta-Romero, S. Flores-Huerta, J. García-Mena, P. Froguel, M. Cruz, A. Bonnefond, Analysis of the contribution of FTO, NPC1, ENPP1, NEGR1, GNPDA2 and MC4R genes to obesity in Mexican children, *BMC Med. Genet*. 14 (2013) 21, <https://doi.org/10.1186/1471-2350-14-21>.
- [18] M. Ulloa-Martínez, A.I. Burguete-García, S. Murugesan, C. Hoyo-Vadillo, M. Cruz-Lopez, J. García-Mena, Expression of candidate genes associated with obesity in peripheral white blood cells of Mexican children, *Arch. Med. Sci*. 12 (2016) 968-976, <https://doi.org/10.5114/aoms.2016.58126>.
- [19] Bäckhed F., Ding H., Wang T., Hooper L.V., Koh G.Y., Nagy A. 2004. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci USA*.;101(44):15718–15723.
- [20] Ley RE, Backhed F, Turnbaugh P, Lozupone CA, Knight RD, Gordon JI. 2005. Obesity alters gut microbial ecology. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102(31):11070–11075.
- [21] Turnbaugh PJ, Ley RE, Hamady M, Fraser-Liggett CM, Knight R, Gordon JI. 2007. The human microbiome project. *Nature*. 449(7164):804–810.
- [22] Berrington de Gonzalez A, Hartge P, Cerhan JR *et al*. 2010. Body-mass index and mortality among 1.46 million white adults. *N Engl J Med*;363:2211–19
- [23] Whitlock G, Lewington S, Sherliker P, Clarke R, Emberson J, *et al*. 2009. Body-mass index and cause-specific mortality in 900 000 adults: collaborative analyses of 57 prospective studies. *Lancet* 373(9669): 1083–1096
- [24] Lederberg J, McCray AT. 'Ome sweet 'omics - a genealogical treasury of words. *Scientist*. 2001;15(7):8–8.
- [25] Sender R, Fuchs S, Milo R (2016) Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLOS Biology* 14(8): e1002533. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002533>
- [26] Cani PD, Osto M, Geurts L, Everard A. .Involvement of gut microbiota in the development of low-grade inflammation and type 2 diabetes associated with obesity. *Gut Microbes*. 2012 Jul-Aug; 3(4):279-88.

- [27] Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS. *et al.* 2010. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*. 464(7285):59–65.
- [28] Lee YK, Mazmanian SK. 2010. Has the microbiota played a critical role in the evolution of the adaptive immune system? *Science*. 330(6012):1768–1773.
- [29] Slack E, Hapfelmeier S, Stecher B, Velykoredko Y, Stoel M, *et al.* 2009. Innate and adaptive immunity cooperate flexibly to maintain host-microbiota mutualism. *Science*. 325(5940):617–620.
- [30] Villanueva-Millán MJ, Pérez-Matute P, Oteo JA. Gut microbiota: a key player in health and disease. A review focused on obesity. *J Physiol Biochem*. 2015 Sep; 71(3):509-25.
- [31] S. Murugesan, K. Nirmalkar, C. Hoyo-Vadillo, M. García-Espitia, D. Ramírez-Sánchez, J. García-Mena, Gut microbiome production of short-chain fatty acids and obesity in children, *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 37 (2018) 621-625, <https://doi.org/10.1007/s10096-017-3143-0>.
- [32] M.E. Icaza-Chávez, Gut microbiota in health and disease, *Rev. Gastroenterol. México* 78 (2013) 240-248, <https://doi.org/10.1016/j.rgm.2013.04.004>.
- [33] Ley R. E., Turnbaugh P. J., Klein S., Gordon J. I. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature*. 2006;444(7122):1022–1023. doi: 10.1038/4441022a. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
- [34] Karlsson F. H., Tremaroli V., Nookaew I., *et al.* Gut metagenome in European women with normal, impaired and diabetic glucose control. *Nature*. 2013;498(7452):99–103. doi: 10.1038/nature12198.
- [35] Schwiertz A., Taras D., Schäfer K. Microbiota and SCFA in lean and overweight healthy subjects. *Obesity*. 2010;18(1):190–195. doi: 10.1038/oby.2009.167.
- [36] 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(7122):1027–1131. doi: 10.1038/nature05414.
- [37] Ridaura VK, Faith JJ, Rey FE, Cheng J, Duncan AE, Kau AL, Griffin NW, Lombard V, Henrissat B, Bain JR, Muehlbauer MJ, Ilkayeva O, Semenkovich CF, Funai K, Hayashi DK, Lyle BJ, Martini MC, Ursell LK, Clemente JC, Van Treuren W, Walters WA, Knight R, Newgard CB, Heath AC, Gordon JI. Gut microbiota from twins discordant for obesity modulate metabolism in mice. *Science*. 2013 Sep 6;341(6150):1241214. doi: 10.1126/science.1241214.
- [38] S. Murugesan, M. Ulloa-Martínez, H. Martínez-Rojano, F.M. Galván-Rodríguez, C. Miranda-Brito, M.C. Romano, A. Piña-Escobedo, M.L. Pizano-Zárate, C.Hoyo Vadillo, J. García-Mena, 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.* 34 (2015) 1337-1346, <https://doi.org/10.1007/s10096-015-2355-4>.
- [39] Visscher PM, Wray NR, Zhang Q, Sklar P, McCarthy MI, Brown MA, Yang J. 10 Years of GWAS Discovery: Biology, Function, and Translation. *Am J Hum Genet*. 2017 Jul 6;101(1):5-

22. doi: 10.1016/j.ajhg.2017.06.005.
- [40] Benson AK, *et al.* Individuality in gut microbiota composition is a complex polygenic trait shaped by multiple environmental and host genetic factors. *Proc Nat Acad Sci USA.* 2010;107:18933–8.
- [41] Goodrich JK, *et al.* Human genetics shape the gut microbiome. *Cell.* 2014;159:789–99.
- [42] Goodrich JK, *et al.* Genetic determinants of the gut microbiome in UK twins. *Cell Host Microbe.* 2016;19:731–43.
- [43] Bonder MJ, *et al.* The effect of host genetics on the gut microbiome. *Nat Genet.* 2016;48:1407–12.
- [44] J. Wang, H. Jia, Metagenome-wide association studies: fine-mining the microbiome, *Nat. Rev. Microbiol.* 14 (2016) 508e522, <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.83>.
- [45] J. Qin, Y. Li, Z. Cai, S. Li, J. Zhu, F. Zhang, S. Liang, W. Zhang, Y. Guan, D. Shen, Y. Peng, D. Zhang, Z. Jie, W. Wu, Y. Qin, W. Xue, J. Li, L. Han, D. Lu, P. Wu, Y. Dai, X. Sun, Z. Li, A. Tang, S. Zhong, X. Li, W. Chen, R. Xu, M. Wang, Q. Feng, M. Gong, J. Yu, Y. Zhang, M. Zhang, T. Hansen, G. Sanchez, J. Raes, G. Falony, S. Okuda, M. Almeida, E. LeChatelier, P. Renault, N. Pons, J.-M. Batto, Z. Zhang, H. Chen, R. Yang, W. Zheng, S. Li, H. Yang, J. Wang, S.D. Ehrlich, R. Nielsen, O. Pedersen, K. Kristiansen, J. Wang, A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes, *Nature* 490 (2012) 55-60, <https://doi.org/10.1038/nature11450>.
- [46] Q. Feng, S. Liang, H. Jia, A. Stadlmayr, L. Tang, Z. Lan, D. Zhang, H. Xia, X. Xu, Z. Jie, L. Su, X. Li, X. Li, J. Li, L. Xiao, U. Huber-Schonauer, D. Niederseer, X. Xu, J.Y. Al-Aama, H. Yang, J. Wang, K. Kristiansen, M. Arumugam, H. Tilg, C. Datz, J. Wang, Gut microbiome development along the colorectal adenomacarcinoma sequence, *Nat. Commun.* 6 (2015) 6528, <https://doi.org/10.1038/ncomms7528>.
- [47] X. Zhang, D. Zhang, H. Jia, Q. Feng, D. Wang, D. Liang, X. Wu, J. Li, L. Tang, Y. Li, Z. Lan, B. Chen, Y. Li, H. Zhong, H. Xie, Z. Jie, W. Chen, S. Tang, X. Xu, X. Wang, X. Cai, S. Liu, Y. Xia, J. Li, X. Qiao, J.Y. Al-Aama, H. Chen, L. Wang, Q.-J. Wu, F. Zhang, W. Zheng, Y. Li, M. Zhang, G. Luo, W. Xue, L. Xiao, J. Li, W. Chen, X. Xu, Y. Yin, H. Yang, J. Wang, K. Kristiansen, L. Liu, T. Li, Q. Huang, Y. Li, J. Wang, The oral and gut microbiomes are perturbed in rheumatoid arthritis and partly normalized after treatment, *Nat. Med.* 21 (2015) 895-905, <https://doi.org/10.1038/nm.3914>.
- [48] A. Cotillard, S.P. Kennedy, L.C. Kong, E. Prifti, N. Pons, E. Le Chatelier, M. Almeida, B. Quinquis, F. Levenez, N. Galleron, S. Gougis, S. Rizkalla, J.-M. Batto, P. Renault, J. ANR MicroObes consortium, J. Doré, J-D Zucker, K. Clément, S.D. Ehrlich, Dietary intervention impact on gut microbial gene richness, *Nature* 500 (2013) 585-588, <https://doi.org/10.1038/nature12480>.
- [49] E. Le Chatelier, T. Nielsen, J. Qin, E. Prifti, F. Hildebrand, G. Falony, M. Almeida, M. Arumugam, J.-M. Batto, S. Kennedy, P. Leonard, J. Li, K. Burgdorf, N. Grarup, T. Jørgensen,

- I. Brandslund, H.B. Nielsen, A.S. Juncker, M. Bertalan, F. Levenez, N. Pons, S. Rasmussen, S. Sunagawa, J. Tap, S. Tims, E.G. Zoetendal, S. Brunak, K. Clément, J. Doré, M. Kleerebezem, K. Kristiansen, P. Renault, T. Sicheritz-Ponten, W.M. de Vos, J.-D. Zucker, J. Raes, T. Hansen, P. MetaHIT consortium, P. Bork, J. Wang, S.D. Ehrlich, O. Pedersen, Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers, *Nature* 500 (2013) 541-546, <https://doi.org/10.1038/nature12506>.
- [49] A.M. Bolger, M. Lohse, B. Usadel, Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data, *Bioinformatics* 30 (2014) 2114-2120, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>.
- [50] W.J. Kent, C.W. Sugnet, T.S. Furey, K.M. Roskin, T.H. Pringle, A.M. Zahler, D. Haussler, The human genome browser at UCSC, *Genome Res.* 12 (2002) 996-1006, <https://doi.org/10.1101/gr.229102>.
- [51] B. Langmead, S.L. Salzberg, Fast gapped-read alignment with Bowtie 2, *Nat. Methods* 9 (2012) 357e359, <https://doi.org/10.1038/nmeth.1923>.
- [52] 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 Aug 15;25(16):2078-9. doi: 10.1093/bioinformatics/btp352.
- [53] J.R. Kultima, L.P. Coelho, K. Forslund, J. Huerta-Cepas, S.S. Li, M. Driessen, [54] A.Y. Voigt, G. Zeller, S. Sunagawa, P. Bork, MOCAT2: a metagenomic assembly, annotation and profiling framework, *Bioinformatics* 32 (2016) 2520e2523, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw183>.
- [55] Luo R, *et al.* SOAPdenovo2: an empirically improved memory-efficient short-read de novo assembler. *Giga Sci.* 2012;1:1–6.
- [56] Zhu W, Lomsadze A, Borodovsky M. Ab initio gene identification in metagenomic sequences. *Nucleic Acids Res.* 2010;38:–e132.
- [57] Powell S, Forslund K, Szklarczyk D, Trachana K, Roth A, Huerta-Cepas J, Gabaldón T, Rattei T, Creevey C, Kuhn M, Jensen LJ, von Mering C, Bork P. eggNOG v4.0: nested orthology inference across 3686 organisms. *Nucleic Acids Res.* 2014 Jan;42(Database issue):D231-9. doi: 10.1093/nar/gkt1253.
- [58] Fu L, Niu B, Zhu Z, Wu S, Li W. CD-hit: accelerated for clustering the next-generation sequencing data. *Bioinformatics*. 2012;28:3150–2.
- [59] D.T. Truong, E.A. Franzosa, T.L. Tickle, M. Scholz, G. Weingart, E. Pasolli, A. Tett, C. Huttenhower, N. Segata, MetaPhlan2 for enhanced metagenomic taxonomic profiling, *Nat. Methods* 12 (2015) 902-903, <https://doi.org/10.1038/nmeth.3589>.
- [60] S. Abubucker, N. Segata, J. Goll, A.M. Schubert, J. IZard, B.L. Cantarel, B. Rodriguez-Mueller, J. Zucker, M. Thiagarajan, B. Henrissat, O. White, S.T. Kelley, B. Methé, P.D. Schloss, D. Gevers, M. Mitreva, C. Huttenhower, Metabolic reconstruction for metagenomic data and its application to the human microbiome, *PLoS Comput. Biol.* 8 (2012), <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002358> e1002358.

- [61] Caspi R, Billington R, Fulcher CA, Keseler IM, Kothari A, Krummenacker M, Latendresse M, Midford PE, Ong Q, Ong WK, Paley S, Subhraveti P, Karp PD. The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes. *Nucleic Acids Res.* 2018 Jan 4;46(D1):D633-D639. doi: 10.1093/nar/gkx935
- [62] S. Rampelli, M. Soverini, S. Turrone, S. Quercia, E. Biagi, P. Brigidi, M. Candela, ViromeScan: a new tool for metagenomic viral community profiling, *BMC Genomics* 17 (2016) 165, <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2446-3>.
- [63] X.C. Morgan, T.L. Tickle, H. Sokol, D. Gevers, K.L. Devaney, D. V Ward, J.A. Reyes, S.A. Shah, N. LeLeiko, S.B. Snapper, A. Bousvaros, J. Korzenik, B.E. Sands, R.J. Xavier, C. Huttenhower, Dysfunction of the intestinal microbiome in inflammatory bowel disease and treatment, *Genome Biol.* 13 (2012) R79, <https://doi.org/10.1186/gb-2012-13-9-r79>.
- [64] M. Arumugam, J. Raes, E. Pelletier, D. Le Paslier, T. Yamada, D.R. Mende, G.R. Fernandes, J. Tap, T. Bruls, J.-M. Batto, M. Bertalan, N. Borruel, F. Casellas, L. Fernandez, L. Gautier, T. Hansen, M. Hattori, T. Hayashi, M. Kleerebezem, K. Kurokawa, M. Leclerc, F. Levenez, C. Manichanh, H.B. Nielsen, T. Nielsen, N. Pons, J. Poulain, J. Qin, T. Sicheritz-Ponten, S. Tims, D. Torrents, E. Ugarte, E.G. Zoetendal, J. Wang, F. Guarner, O. Pedersen, W.M. de Vos, S. Brunak, J. Doré, M. Antolín, F. Artiguenave, H.M. Blottiere, M. Almeida, C. Brechot, C. Cara, C. Chervaux, A. Cultrone, C. Delorme, G. Denariáz, R. Dervyn, K.U. Foerstner, C. Friss, M. van de Guchte, E. Guedon, F. Haimet, W. Huber, J. van Hylckama-Vlieg, A. Jamet, C. Juste, G. Kaci, J. Knol, O. Lakhdari, S. Layec, K. Le Roux, E. Maguin, A. Mérieux, R. Melo Minardi, C. M'rini, J. Muller, R. Oozeer, J. Parkhill, P. Renault, M. Rescigno, N. Sanchez, S. Sunagawa, A. Torrejon, K. Turner, G. Vandemeulebrouck, E. Varela, Y. Winogradsky, G. Zeller, J. Weissenbach, S.D. Ehrlich, P. Bork, Enterotypes of the human gut microbiome, *Nature* 473 (2011) 174-180, <https://doi.org/10.1038/nature09944>.
- [65] Kaufman, L. & Rousseeuw, P. J. *Finding Groups in Data: An Introduction to Cluster Analysis.* (Wiley, 1990).
- [66] OBESITY Update, 2014. <http://www.oecd.org/els/health-systems/Obesity-Update-2014.pdf>. (Accessed 16 May 2018).
- [67] S. Murugesan, K. Nirmalkar, M. Garcia Espitia, M.L. Pizano- Zarate, C. Hoyo-Vadillo, J. Garcia-Mena, Current insight into the role of gut microbiota in Mexican childhood obesity, *SOJ Pharm. Pharm. Sci.* 4 (2017) 1e5, <https://doi.org/10.15226/2374-6866/4/1/00153>.
- [68] Z. Karjala, D. Neal, J. Rohrer, Association between HSV1 seropositivity and obesity: data from the National health and nutritional examination survey, 2007-2008, *PLoS One* 6 (2011), e19092, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019092>.
- [69] B.E. Dutilh, N. Cassman, K. McNair, S.E. Sanchez, G.G.Z. Silva, L. Boling, J.J. Barr, D.R. Speth, V. Seguritan, R.K. Aziz, B. Felts, E.A. Dinsdale, J.L. Mokili, R.A. Edwards, A highly abundant bacteriophage discovered in the unknown sequences of human faecal metagenomes, *Nat. Commun.* 5 (2014) 4498, <https://doi.org/10.1038/ncomms5498>.

- [70] M. Million, M. Maraninchi, M. Henry, F. Armougom, H. Richet, P. Carrieri, R. Valero, D. Raccach, B. Vialettes, D. Raoult, Obesity-associated gut microbiota is enriched in *Lactobacillus reuteri* and depleted in *Bifidobacterium animalis* and *Methanobrevibacter smithii*, *Int. J. Obes.* 36 (2012) 817-825, <https://doi.org/10.1038/ijo.2011.153>.
- [71] B.S. Samuel, E.E. Hansen, J.K. Manchester, P.M. Coutinho, B. Henrissat, R. Fulton, P. Latreille, K. Kim, R.K. Wilson, J.I. Gordon, Genomic and metabolic adaptations of *Methanobrevibacter smithii* to the human gut, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 104 (2007) 10643-10648, <https://doi.org/10.1073/pnas.0704189104>.
- [72] R. Mathur, G. Kim, W. Morales, J. Sung, E. Rooks, V. Pokkunuri, S. Weitsman, G.M. Barlow, C. Chang, M. Pimentel, Intestinal *Methanobrevibacter smithii* but not total bacteria is related to diet-induced weight gain in rats, *Obesity* 21 (2013) 748-754, <https://doi.org/10.1002/oby.20277>.
- [73] A.M. Castro, L.E. Macedo-de la Concha, C.A. Pantoja-Meléndez, Low-grade inflammation and its relation to obesity and chronic degenerative diseases, *Rev. Médica Del Hosp. Gen. México.* 80 (2017) 101-105, <https://doi.org/10.1016/J.HGMX.2016.06.011>.
- [74] C. Bang, K. Weidenbach, T. Gutschmann, H. Heine, R.A. Schmitz, The intestinal archaea *Methanosphaera stadtmanae* and *Methanobrevibacter smithii* activate human dendritic cells, *PLoS One* 9 (2014), e99411, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099411>.
- [75] C. Hoffmann, S. Dollive, S. Grunberg, J. Chen, H. Li, G.D. Wu, J.D. Lewis, F.D. Bushman, Archaea and fungi of the human gut microbiome: correlations with diet and bacterial residents, *PLoS One* 8 (2013), <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066019> e66019.
- [76] R. Mathur, M. Amichai, K.S. Chua, J. Mirocha, G.M. Barlow, M. Pimentel, Methane and hydrogen positivity on breath test is associated with greater body mass index and body fat, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 98 (2013) E698-E702, <https://doi.org/10.1210/jc.2012-3144>.
- [77] C.A. Mbakwa, J. Penders, P.H. Savelkoul, C. Thijs, P.C. Dagnelie, M. Mommers, I.C.W. Arts, Gut colonization with *methanobrevibacter smithii* is associated with childhood weight development, *Obesity* 23 (2015) 2508-2516, <https://doi.org/10.1002/oby.21266>.
- [78] M.Y. Lim, M. Rho, Y.-M. Song, K. Lee, J. Sung, G. Ko, Stability of gut enterotypes in Korean monozygotic twins and their association with biomarkers and diet, *Sci. Rep.* 4 (2014) 7348, <https://doi.org/10.1038/srep07348>.
- [79] B. Flemer, D.B. Lynch, J.M.R. Brown, I.B. Jeffery, F.J. Ryan, M.J. Claesson, M. O'Riordain, F. Shanahan, P.W. O'Toole, Tumour-associated and non-tumour-associated microbiota in colorectal cancer, *Gut* 66 (2017) 633-643, <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-309595>.
- [80] A.C.F. de Moraes, G.R. Fernandes, I.T. da Silva, B. Almeida-Pititto, E.P. Gomes, A. da C. Pereira, S.R.G. Ferreira, Enterotype may drive the dietary-associated cardiometabolic risk factors, *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 7 (2017) 47, <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00047>.
- [81] D. Compare, A. Rocco, M. Sanduzzi Zamparelli, G. Nardone, The gut bacteria-driven obesity development, *Dig. Dis.* 34 (2016) 221-229, <https://doi.org/10.1159/000443356>.

- [82] E.L. Johnson, S.L. Heaver, W.A. Walters, R.E. Ley, Microbiome and metabolic disease: revisiting the bacterial phylum Bacteroidetes, *J. Mol. Med.* 95 (2017) 1-8.
- [83] K. Yoda, X. Sun, M. Kawase, A. Kubota, K. Miyazawa, G. Harata, M. Hosoda, M. Hiramatsu, F. He, M.B. Zemel, A combination of probiotics and whey proteins enhances anti-obesity effects of calcium and dairy products during nutritional energy restriction in aP2-agouti transgenic mice, *Br. J. Nutr.* 113 (2015) 1689-1696, <https://doi.org/10.1017/S0007114515000914>.
- [84] P. Louis, H.J. Flint, Formation of propionate and butyrate by the human colonic microbiota, *Environ. Microbiol.* 19 (2017) 29-41, <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13589>.
- [85] B. van den Bogert, M. Meijerink, E.G. Zoetendal, J.M. Wells, M. Kleerebezem, Immunomodulatory properties of *Streptococcus* and *Veillonella* isolates from the human small intestine microbiota, *PLoS One* 9 (2014), e114277, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114277>.
- [86] C.-S. Kim, H.-S. Park, T. Kawada, J.-H. Kim, D. Lim, N.E. Hubbard, B.-S. Kwon, K.L. Erickson, R. Yu, Circulating levels of MCP-1 and IL-8 are elevated in human obese subjects and associated with obesity-related parameters, *Int. J. Obes.* 30 (2006) 1347-1355, <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0803259>.
- [87] L.J. El-Kadre, A.C.A. Tinoco, Interleukin-6 and obesity: the crosstalk between intestine, pancreas and liver, *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 16 (2013) 564-568, <https://doi.org/10.1097/MCO.0b013e32836410e6>.
- [88] K. Gotoh, K. Fujiwara, M. Anai, M. Okamoto, T. Masaki, T. Kakuma, H. Shibata, Role of spleen-derived IL-10 in prevention of systemic low-grade inflammation by obesity [Review], *Endocr. J.* 64 (2017) 375-378, <https://doi.org/10.1507/endocrj.EJ17-0060>.
- [89] L.V. Holdeman, W.E.C. Moore, New genus, *Coproccoccus*, twelve new species, and emended descriptions of four previously described species of bacteria from human feces, *Int. J. Syst. Bacteriol.* 24 (1974) 260-277, <https://doi.org/10.1099/00207713-24-2-260>.
- [90] D. Kritchevsky, S.A. Tepper, J.A. Story, The effect of two substituted valeric acid derivatives on cholesterol metabolism in rats, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 145 (1974) 12-17. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4812849>. (Accessed 10 May 2018).
- [91] T. de Wouters, J. Doré, P. Lepage, Does our food (environment) change our gut microbiome ('In-Vironment'): a potential role for inflammatory bowel disease? *Dig. Dis.* 30 (2012) 33-39, <https://doi.org/10.1159/000342595>.
- [92] H. Sakon, F. Nagai, M. Morotomi, R. Tanaka, *Sutterella parvirubra* sp. nov. and *Megamonas funiformis* sp. nov., isolated from human faeces, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58 (2008) 970-975, <https://doi.org/10.1099/ijms.0.65456-0>.
- [93] M.E. Mejía-León, J.F. Petrosino, N.J. Ajami, M.G. Domínguez-Bello, A.M.C. de la Barca, Fecal microbiota imbalance in Mexican children with type 1 diabetes, *Sci. Rep.* 4 (2014) 3814, <https://doi.org/10.1038/srep03814>.
- [94] X. Zhang, D. Shen, Z. Fang, Z. Jie, X. Qiu, C. Zhang, Y. Chen, L. Ji, Human gut microbiota

- changes reveal the progression of glucose intolerance, *PLoS One* 8 (2013), e71108, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071108>.
- [95] O. Polansky, Z. Sekelova, M. Faldynova, A. Sebkova, F. Sisak, I. Rychlik, Important metabolic pathways and biological processes expressed by chicken cecal microbiota, *Appl. Environ. Microbiol.* 82 (2015) 1569-1576, <https://doi.org/10.1128/AEM.03473-15>.
- [96] H.M. Miziorko, Enzymes of the mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis, *Arch. Biochem. Biophys.* 505 (2011) 131-143, <https://doi.org/10.1016/j.abb.2010.09.028>.
- [97] R.N. Alolga, Y. Fan, Z. Chen, L.-W. Liu, Y.-J. Zhao, J. Li, Y. Chen, M.-D. Lai, P. Li, L.-W. Qi, Significant pharmacokinetic differences of berberine are attributable to variations in gut microbiota between Africans and Chinese, *Sci. Rep.* 6 (2016) 27671, <https://doi.org/10.1038/srep27671>.
- [98] M.A.R. Vinolo, H.G. Rodrigues, R.T. Nachbar, R. Curi, Regulation of inflammation by short chain fatty acids, *Nutrients* 3 (2011) 858-876, <https://doi.org/10.3390/nu3100858>.
- [99] P.J. Turnbaugh, M. Hamady, T. Yatsunencko, B.L. Cantarel, A. Duncan, R.E. Ley, M.L. Sogin, W.J. Jones, B.A. Roe, J.P. Affourtit, M. Egholm, B. Henrissat, A.C. Heath, R. Knight, J.I. Gordon, A core gut microbiome in obese and lean twins, *Nature* 457 (2009) 480-484, <https://doi.org/10.1038/nature07540>.
- [100] S. Michail, M. Lin, M.R. Frey, R. Fanter, O. Paliy, B. Hilbush, N. V Reo, Altered gut microbial energy and metabolism in children with non-alcoholic fatty liver disease, *FEMS Microbiol. Ecol.* 91 (2015) 1-9, <https://doi.org/10.1093/femsec/fiu002>.
- [101] J. Li, H. Jia, X. Cai, H. Zhong, Q. Feng, S. Sunagawa, M. Arumugam, J.R. Kultima, E. Prifti, T. Nielsen, A.S. Juncker, C. Manichanh, B. Chen, W. Zhang, F. Levenez, J. Wang, X. Xu, L. Xiao, S. Liang, D. Zhang, Z. Zhang, W. Chen, H. Zhao, bJ.Y. Al-Aama, S. Edris, H. Yang, J. Wang, T. Hansen, H.B. Nielsen, S. Brunak, K. Kristiansen, F. Guarner, O. Pedersen, J. Doré, S.D. Ehrlich, P. Bork, J. Wang, J. Wang, MetaHIT Consortium, An integrated catalog of reference genes in the human gut microbiome, *Nat. Biotechnol.* 32 (2014) 834-841, <https://doi.org/10.1038/nbt.2942>.
- [102] M.L. Cárdenas, A. Cornish-Bowden, T. Ureta, Evolution and regulatory role of the hexokinases, *Biochim. Biophys. Acta* 1401 (1998) 242-264. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9540816>. (Accessed 10 May 2018).
- [103] L. Zhang, H.T. Li, L. Shen, Q.C. Fang, L.L. Qian, W.P. Jia, Effect of dietary resistant starch on prevention and treatment of obesity-related diseases and its possible mechanisms, *Biomed. Environ. Sci.* 28 (2015) 291-297, <https://doi.org/10.3967/bes2015.040>.
- [104] X. Si, P. Strappe, C. Blanchard, Z. Zhou, Enhanced anti-obesity effects of complex of resistant starch and chitosan in high fat diet fed rats, *Carbohydr. Polym.* 157 (2017) 834-841, <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.10.042>.

13. APÉNDICE – Tablas Suplementarias

Tabla Suplementaria 1.

Datos antropométricos de los sujetos de este estudio.

Muestra	ID	Cohorte	Peso (kg)	Talla (m)	IMC	pIMC
1	Normopeso01	Normal	30.2	1.33	17.2	65
2	Normopeso02	Normal	34.8	1.37	18.54	79.5
3	Normopeso03	Normal	34.1	1.38	17.91	79.7
4	Normopeso04	Normal	38.4	1.45	18.2	76.3
5	Normopeso05	Normal	42.2	1.52	18.3	74.9
6	Normopeso06	Normal	31.8	1.39	16.5	45.7
7	Normopeso07	Normal	32.8	1.35	18	76.2
8	Normopeso08	Normal	26.2	1.29	15.9	39.8
9	Normopeso09	Normal	34.6	1.33	19.71	73.6
10	Normopeso10	Normal	24.6	1.34	13.8	4.2
11	Obeso01	Obeso	46.3	1.4	23.62	99.3
12	Obeso02	Obeso	41.9	1.41	21.23	96.7
13	Obeso03	Obeso	44	1.34	24.5	99.7
14	Obeso04	Obeso	48.9	1.46	23.1	99.1
15	Obeso05	Obeso	37	1.3	21.9	98
16	Obeso06	Obeso	53	1.42	26.5	99.6
17	Obeso07	Obeso	49	1.27	30.4	99.9
18	Obeso08	Obeso	43.1	1.39	22.3	98.3
19	Obeso09	Obeso	47.5	1.33	26.9	99.8
20	Obeso10	Obeso	48.6	1.39	25.3	99.9

Tabla Suplementaria 2.

Datos Bioquímicos de los individuos del estudio

ID	Score de alimentos	GLUC	COLEST	TRIG	HDL	LDL	LEUCOS	ERITROS	HB	HTO	PLAQUETAS
Normopeso01	0	86.6	117.9	69.6	32	72	4.72	4.39	13.2	37.7	264000
Normopeso02	0	89.5	118.6	52.5	41.1	67	5.51	4.90	15.5	44.5	286000
Normopeso03	0	86.1	129.2	26.6	73.1	50.8	6.6	5.39	13.3	40.4	396000
Normopeso04	3	100	139	49	55	74	4.6	5.2	14.55	42.72	406000
Normopeso05	4	91	139	62	32	95	5.3	4.45	14.77	42.67	272000
Normopeso06	1	80	153	40	52	93	4.8	4.98	14.69	42.66	202000
Normopeso07	4	97	152	62	63	77	7	5.59	16.39	46.61	291000
Normopeso08	1	105	177	59	47	118	9.3	4.96	14.21	41.88	296000
Normopeso09	0	93	155.2	52.9	54.9	89.7	3.24	5.31	15.1	46.4	305000
Normopeso10	0	100.4	120.1	82.3	47.4	56.3	4.98	5.22	15.6	45.7	379000
Obeso01	0	84.5	205.8	222.6	38.6	122.7	6.1	5.3	14.3	44.4	241000
Obeso02	0	92.4	245.3	242.5	44.9	151.9	5.7	4.8	14	43.1	305000
Obeso03	0	100.1	227.5	216.7	36.5	147.7	6.6	5	14.7	43.9	464000
Obeso04	1	99	205	195	51	115	4.7	4.65	13.93	40	341000
Obeso05	3	95	177	183	41	99	7.1	5.47	15.44	44.85	329000
Obeso06	5	98	191	241	43	100	9.1	5.82	14.97	46.26	370000
Obeso07	6	103	166	255	31	84	5.6	5.16	14.13	42.62	297000
Obeso08	3	93	193	218	42	107	4.3	5.11	14.33	42.03	236000
Obeso09	3	98	122	212	29	51	6.4	4.83	14.48	43.36	352000
Obeso10	2	90	140	201	40	60	9.5	5.2	13.88	42.64	312000

Tabla Suplementaria 3.

Concentraciones de ácidos grasos de cadena corta.

ID	Agua(%)	DNA	A260/280	ACÉTICO (mM/100mg)	PROPIÓNICO (mM/100mg)	BUTÍRICO (mM/100mg)
Normopeso01	82.67	31.5	1.77	172.24	44.96	164.82
Normopeso02	64.21	23.7	1.78	26.37	5.97	11.01
Normopeso03	81.53	14.2	1.82	150.67	115.72	17.76
Normopeso04	74.02	31	1.8	128.16	149.18	22.16
Normopeso05	66.41	17.3	1.86	330.27	302.71	31.41
Normopeso06	63.12	12	1.68	106.29	368.24	39.97
Normopeso07	73.54	20.7	1.74	185.15	80.16	18.62
Normopeso08	71.64	18.2	1.68	504.46	85.83	23.21
Normopeso09	70.19	24.7	1.7	372.22	71.71	156.39
Normopeso10	68.05	28.2	1.62	63.31	102.38	18.86
Obeso01	83.23	17.6	1.84	123.14	10.95	28.06
Obeso02	62.63	24.7	1.99	401.27	12.66	6.55
Obeso03	76.71	13.1	1.87	91.85	46.22	54.9
Obeso04	83.75	10.1	1.84	373.89	284.93	26.59
Obeso05	71.23	11.4	1.82	186.72	73.01	30.06
Obeso06	74.5	16.9	1.77	73.44	49.39	16.52
Obeso07	71.42	16.7	1.8	142.96	189.72	31.35
Obeso08	67.85	17.8	1.71	114.79	173.17	3.4
Obeso09	56.6	14.7	1.76	50.78	13.86	2.99
Obeso10	67.34	16.1	1.8	136.75	22.52	24.27

Tabla Suplementaria 4

Resumen de secuenciación metagenómica

Subject	Fenotipo	G [#]	Tamaño Total [§]	Reads [@]	Human reads ^{&}	(%)	NP reads	(%)
Normopeso01	Normal	H	6.772	53745800	20504	0.038	663759	1.235
Normopeso02	Normal	M	5.469	43400866	16441	0.038	581229	1.339
Normopeso03	Normal	H	5.271	41830040	11207	0.027	570629	1.364
Normopeso04	Normal	H	6.364	50504054	16741	0.033	575324	1.139
Normopeso05	Normal	M	5.597	44420344	12978	0.029	577258	1.300
Normopeso06	Normal	M	5.418	42996734	6445	0.015	596414	1.387
Normopeso07	Normal	H	5.214	41382340	16803	0.041	456557	1.103
Normopeso08	Normal	M	5.902	46844822	101415	0.216	549188	1.172
Normopeso09	Normal	H	6.252	49618210	229549	0.463	618309	1.246
Normopeso10	Normal	M	5.822	46204428	59323	0.128	542360	1.174
Obeso01	Obeso	H	8.82	70000220	3714	0.005	1042649	1.489
Obeso02	Obeso	M	5.979	47450562	33221	0.07	546423	1.152
Obeso03	Obeso	H	7.475	59327550	6598	0.011	712134	1.200
Obeso04	Obeso	H	6.92	54923700	17580	0.032	730590	1.330
Obeso05	Obeso	H	5.497	43626418	849385	1.947	564592	1.294
Obeso06	Obeso	M	6.376	50605218	27855	0.055	601754	1.189
Obeso07	Obeso	M	4.557	36167550	9242	0.026	436407	1.207
Obeso08	Obeso	M	5.207	41324418	30851	0.075	505566	1.223
Obeso09	Obeso	M	6.389	50710216	29711	0.059	624721	1.232
Obeso10	Obeso	H	5.825	46233290	55858	0.121	645626	1.396

G: #H, Hombre, M Mujer; §Giga bases de lecturas; @paired-end 2x126, 250 ciclos; &Lecturas correspondiente a humano vs base de datos de hg19; (%), porcentaje de lecturas. NP, lecturas no pareadas.

Tabla Suplementaria 5.

Fenotipo asignado a los enterotipos mediante el método de distancia Jensen–Shannon

Sujetos	Enterotipo1 <i>Bacteroides</i> spp.	Enterotipo2 <i>Prevotella</i> spp.	Enterotipo3 <i>Ruminococcus</i> spp.
Normopeso01	1	-	-
Normopeso02	1	-	-
Normopeso03	-	2	-
Normopeso04	-	2	-
Normopeso05	-	2	-
Normopeso06	-	-	3
Normopeso07	-	-	3
Normopeso08	-	-	3
Normopeso09	-	-	3
Normopeso10	-	-	3
Total Normal=10(100%)	2(20%)	3(30%)	5(50%)
Obeso01	1	-	-
Obeso02	-	2	-
Obeso03	-	-	3
Obeso04	1	-	-
Obeso05	-	2	-
Obeso06	-	-	3
Obeso07	1	-	-
Obeso08	-	2	-
Obeso09	-	2	-
Obeso10	-	2	-
Total Obesos=10(100%)	3(30%)	5(50%)	2(30%)
Total sujetos= 20(100%)	5(25%)	8(40%)	7(35%)

Enterotipo 1, enriquecido en *Bacteroides* spp.; Enterotipo 2, enriquecido en *Prevotella* spp.; Enterotipo 3, enriquecido en *Ruminococcus* spp. (Arumugam *et al.*, 2011).

Tabla Suplementaria 6. Descripción de rutas y genes de las Figuras 14, 15, 16 y 17.

Abundancia de ruta metabólica	Anotación	Fenotipo
Pwy-5484	Glycolysis II (from Fructose 6-Phosphate)	Nw
Glycolysis_I	Glycolysis I (from Glucose 6-Phosphate)	Nw
Cobertura de ruta metabólica		
Pwy-6163	Chorismate Biosynthesis from 3-Dehydroquinone	Ob
Complete-Aro-PWY	Superpathway of Aromatic Amino Acid Biosynthesis	Ob
Aro-PWY	Chorismate Biosynthesis I	Ob
Calvin-PWY	Calvin-Benson-Bassham Cycle	Ob
PWY0-166	Superpathway of Pyrimidine Deoxyribonucleotides <i>de novo</i> Biosynthesis	Nw
PWY-7228	Superpathway of Guanosine Nucleotides <i>de novo</i> Biosynthesis I	Nw
PWY-7221	Guanosine Ribonucleotides <i>de novo</i> Biosynthesis	Nw
Familia de genes		
MethylMalonyl_CoA_Decarboxylase_Rxn	(S)-Methylmalonyl-CoA Decarboxylase (EC 4.1.1.41).	Ob
RXN0_310	(R)-Methylmalonyl-CoA Decarboxylase (EC 4.1.1.M5).	Ob
DNA_Ligase_NAD-RXN	DNA Ligase (NAD+) (EC 6.5.1.2).	Ob
5.99.1.3_RXN	DNA Topoisomerase (ATP-Hydrolyzing) (EC 5.99.1.3)	Ob
5_Formyl_THF_Cyclo_Ligase_RXN	5-Formyltetrahydrofolate Cyclo-ligase (EC 6.3.3.2).	Ob
2.5.1.19_RXN	3-Phosphoshikimate 1-Carboxyvinyltransferase (EC 2.5.1.19).	Ob
Alpha-amyl_RXN	α -Amylase (EC 3.2.1.1)	Ob
RXN0_2601	DNA-(Apurinic or Apyrimidinic Site) Lyase (EC 4.2.99.18)	Ob
Glutamine__tRNA-Ligase_RXN	Glutamine—tRNA Ligase (EC 6.1.1.18).	Ob
2.1.1.63_RXN	Methylated-DNA—[protein]-Cysteine S-Methyltransferase (EC 2.1.1.63).	Ob
AcetoOHButsyn_RXN	AcetoHydroxyButanoate Synthase (EC 2.2.1.6).	Ob
AcetoLactSyn_RXN	Acetolactate Synthase (EC 2.2.1.6).	Ob
UDP_Nacmurala_Glu_Lig_RXN	UDP-N-Acetylmuramoyl-L-alanine: D-glutamate ligase (EC 6.3.2.9).	Ob
3.1.26.3_RXN	Ribonuclease III (EC 2.1.26.3).	Ob
RXN_12588	Cysteine Desulfurase (EC 2.8.1.7).	Ob
Adenylylsulfkin_RXN	Adenylyl-Sulfate kinase (EC 2.7.1.25)	Nw
Dethiobiotin_Syn_RXN	Dethiobiotin Synthase (EC 6.3.3.3).	Nw
2.8.1.6_RXN	Biotin Synthase (EC 2.8.1.6).	Nw
RXN_12977	4-O- β -D-Mannosyl-D-Glucose Phosphorylase (EC 2.4.1.281)	Nw
Chloramphenicol_O_Acetyltransferase_RXN	Chloramphenicol O-Acetyltransferase (EC 2.3.1.28).	Nw
2-Dehydropantoate_Reduct_RXN	2-Dehydropantoate 2-Reductase (EC 1.1.1.169)	Nw
3.1.21.3_RXN	Type I Site-Specific Deoxyribonuclease (EC 3.1.21.3)	Nw

Nota. La columna de la izquierda indica las abreviaciones utilizadas en la la Figure 4B, 4C, y 4D. La columna central muestra el nombre reportado en la base de datos BioCyc Database Collection (<https://biocyc.org/>, Caspi *et al.*, 2016). El número EC en paréntesis es el número de identificación de la reacción. Columna de la derecha: indica la categoría fenotípica, normopeso (Nw), u o obeso (Ob) en donde cada entrada fue más abundante.

Tabla Suplementaria 7.

Descripción del top 15 de los cluster de genes ortólogos anotados con eggNOG de la Figura 20.

eggNOG	Grupo	Función	Cluster*
ENOG4105C4S	M Cell wall/membrane/envelope biogenesis	Requerido para la síntesis precisa y eficiente de proteínas bajo ciertas condiciones de estrés.	I
ENOG4105CBC	E Metabolismo y transporte de aminoácidos	Glutamato sintasa	I
ENOG4108JB7	I Transporte y metabolismo de lípidos	Metilmalonil-CoA descarboxilasa	I
ENOG4105DQB	S Función desconocida	NA	II
ENOG4105DJ1	C-Producción y conversión de energía	Fosfoenolpiruvato. Carboxilasa	II
ENOG4105CI3	T Mecanismo de transducción de señal	Proteína de unión-GTP TypA/BipA	II
ENOG4105CU6	F Transporte y metabolismo de nucleótidos	Carbamoil-fosfato sintasa, cadena amonio	III
ENOG4105CTQ	G Metabolismo y transporte de carbohidratos	Fosfohexokinasa	III
ENOG4105EAY	C Producción y conversión de energía	Bomba que utiliza la energía de la hidrólisis de pirofosfato como la fuerza impulsora para el movimiento de protones a través de la membrana.	III
ENOG4105C70	G Metabolismo y transporte de carbohidratos	Cataliza la conversión reversible de 2- fosfoglicerato a fosfoenolpiruvato	III
ENOG4105C07	J Traducción, estructura ribosomal y biogénesis	Aminoácidos como la valina, para evitar tales errores, tiene dos actividades de edición dependientes de ARNt (Ile) distintas.	III
ENOG4107QIH	K Transcripción	RNA polimerasa DNA-dependiente	III
ENOG4106J9E	L Replicación, recombinación y reparación.	Pfam:Transposasa_11	IV
ENOG4105PAC	J Traducción, estructura ribosomal y biogénesis	Dominio de unión de factor de elongación Tu GTP	IV
ENOG4107QJD	G Metabolismo y transporte de carbohidratos	Piruvato fosfato diquinasa	IV

Nota: Columna izquierda indica las abreviaciones utilizadas en la figura 5B, la segunda columna indica el COG correspondiente en la base de datos eggNOG Database Collection (<http://beta-eggno gdb.embl.de/>, Huerta-Cepas *et al.*, 2016). *, Clústeres descritos en la figura Fig. 5B; y en la sección de Discusión.



Contents lists available at ScienceDirect

Anaerobe

journal homepage: www.elsevier.com/locate/anaerobe

Anaerobes in the microbiome

The gut microbiome of Mexican children affected by obesity

Otoniel Maya-Lucas^{a,2}, Selvasankar Murugesan^{a,1,2}, Khemlal Nirmalkar^{a,b},
Luis David Alcaraz^d, Carlos Hoyo-Vadillo^b, María Luisa Pizano-Zárate^c,
Jaime García-Mena^{a,*}

^a Departamento de Genética y Biología Molecular, Cinvestav Unidad Zacatenco, Av IPN 2508, Ciudad de México 07360, Mexico^b Departamento de Farmacología, Cinvestav Unidad Zacatenco, Av IPN 2508, Ciudad de México 07360, Mexico^c Departamento de Nutrición y Bioprogramación, INPer, Ciudad de México, Mexico^d Departamento de Biología Celular, Facultad de Ciencias, UNAM, Ciudad de México, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 July 2018

Received in revised form

17 October 2018

Accepted 23 October 2018

Available online 24 October 2018

Handling Editor: Emma Allen Vercoe

Keywords:

Gut microbiome

Mexican children

Triglycerides

Cholesterol

High-throughput sequencing

Obesity

ABSTRACT

Obesity is a metabolic disorder and global health issue. In Mexico 34.4% of children between 5 and 11 years-old are overweight or obese. Here we address this issue studying the gut microbiome in a sample of Mexican children affected by obesity. We performed metagenomic shotgun-sequencing of DNA isolated from fecal samples from a cohort of normal weight and obese Mexican children using Illumina platform with HiSeq 2500. We also examined their metabolic factors and fecal short-chain fatty acids concentration. The results show that a remarkable dysbiosis of bacteria, archaea and viruses was not observed in the obese children group compared to the normal weight group; however, the archaeal community exhibited an increase of unclassified *Methanobrevibacter* spp. in obese children. The bacterial communities of all participants were clustered into three different enterotypes. Most normal weight children have a gut bacterial community dominated by *Ruminococcus* spp. (Enterotype 3), while most obese children had a community dominated by *Prevotella* spp. (Enterotype 2). On the other hand, changes in the gut microbiome were correlated with clinical metadata and could be used to stratify individuals based on their phenotype. The species *Megamonas* spp. were over-represented in obese children, whereas members of the family Oscillospiraceae were depleted in the same individuals and negatively correlated with levels of serum cholesterol. A microbiome comparative metabolic pathway analysis showed that two KEGG pathway modules of glycolysis, Glycolysis I (from Glucose 6-Phosphate), and Glycolysis II (from Fructose 6-Phosphate) were significantly overrepresented in normal weight children. Our results establish specific alterations in the gut microbiome of Mexican children affected by obesity, along with clinical alterations, providing information on the microbiome composition that may be useful for prognosis, diagnosis, and treatment.

© 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Abbreviations: EggNOG, Evolutionary genealogy of genes: Non-supervised Orthologous Groups; HUMAnN2, Human Microbiome Project (HMP) Unified Metabolic Analysis Network 2; KEGG, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes; LDA, Linear discrimination analysis; MaAsLin, Multivariate microbial association by the linear model; MetaPhlan, Metagenomic Phylogenetic Analysis; MGWAS, Microbial Genome-Wide Association Studies; SCFAs, Short-chain fatty acids; T2D, Type 2 diabetes.

* Corresponding author.

E-mail addresses: omaya@cinvestav.mx (O. Maya-Lucas), smurugesan@sidra.org (S. Murugesan), nirmalkar@cinvestav.mx (K. Nirmalkar), lalcaraz@iecologia.unam.mx (L.D. Alcaraz), citocromo@cinvestav.mx (C. Hoyo-Vadillo), pizanozarate@yahoo.com (M.L. Pizano-Zárate), jgmena@cinvestav.mx (J. García-Mena).

¹ Present address: Division of Translational Medicine, Research Department, Sidra Medical and Research Institute, Doha, Qatar.

² These two authors contributed equally to this work.

<https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2018.10.009>

1075-9964/© 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Obesity and overweight are global maladies, and currently approximately 2.8 million people in the world die each year due to its complications [1,2]. Obesity and overweight have a prevalence of ≤10% among school-age children in global regions [3], and in countries like Mexico they have epidemic proportions, where at least 34.4% of children between 5 and 11 years-old are overweight or obese [4]. As multifactorial diseases, the development of obesity and overweight involves dietary and physical activity issues, dysfunctional mitochondria [5], genetic factors like polymorphisms in candidate genes such as FTO, NPC1, ENPP1, NEGR1, GNPDA2, and MC4R [6], which affects gene expression of some of them [7], and

the microbiome.

Microbiota in the human gut is composed of trillions of inhabiting microorganisms, with a remarkable portfolio of microbial genes (microbiome). In the gut, the microbiome may modulate human health through diet-energy extraction in form of short-chain fatty acids (SCFAs) through fermentation of undigested carbohydrate fibers, maintenance of immune system, and anti-pathogenic activity [8,9]. Gut microbiota is mainly composed of bacterial phyla such as Firmicutes (60–65%), Bacteroidetes (20–25%), Proteobacteria (5–10%) and Actinobacteria (3%) [10]. One interesting hypothesis is that obese children harbor a gut microbiota with higher capacity of fermentation of resistant starch. So, the existence of a selected microbiota in obese children is plausible, with higher abundance of fermenting metabolic pathways of soluble polysaccharides. In a recent study of microbial diversity between normal-weight, overweight and obese Mexican children of our group, a significant increase in the abundance of *Blautia* spp., *Coprococcus* spp., *Enterobacteriaceae* in overweight, and significant increase in the abundance of *Faecalibacterium* spp., *Roseburia* spp., *Lachnospiraceae* in obese children was revealed [11].

Microbiome richness is illustrated by the compilation of approximately 6 million complete reference genes in the catalog of the human gut microbiome [12], in addition, genomics approaches to characterize the gut microbial biome using the 16S rDNA gene as phylogenetic marker, and whole genome shotgun sequencing, have provided useful taxonomic and functional profiles. In recent years, understanding of the functional association between the gut microbiota and host physiology has progressed enormously. Recent studies proved the important influence of the gut microbiome in metabolic disorders such as obesity, type 2 diabetes (T2D), and metabolic syndrome [13–16].

Microbial Genome-Wide Association Studies (MGWAS) revealed association of gut microbiome with many complex diseases, not only by taxa abundance but also by their functional metabolic profile [17]. Limited MGWAS have explored diseases such as T2D, colorectal cancer and rheumatoid arthritis [18–20]. There are reports of MGWAS in obese Danish and French adults, exploring the metabolic markers and dietary links with obesity [21,22]. However, to our knowledge, there are not enough published reports of systematic MGWAS about children with obesity.

In this study, we performed a metagenome-wide association study of the gut microbiota to identify disease associated metagenomic markers, highlighting how gut microbiota composition, and their metabolic routes differ between normal weight and obese Mexican children.

2. Methods

2.1. Study participants and specimen collection

Our general work pipeline was as described in Fig. 1. We selected twenty unrelated children between 9 and 11 years-old (ten normal, and ten obese) from an obesity database [11]. Children attended a public primary school located in Greater Mexico City area. Informed consent was signed-out by parents and children in accordance with the Helsinki Declaration revised in 2013. The research protocol was approved by the Local Ethical Committee Board of Health from the Instituto Mexicano del Seguro Social R-2011–1402 1402–10, Mexico City. Fecal samples were taken in conjunction with a health examination and stored immediately at -80°C . Blood samples were drawn by vein puncture after an overnight fast and sent to a central laboratory to measure biochemical factors. Individuals also completed a questionnaire recording their dietary intake for analysis. Anthropometrical measurements, biochemical tests, and fecal short chain fatty acids (SCFA) were measured as described

previously [11].

2.2. Nucleic acid extraction and metagenomic shotgun sequencing

Total DNA was extracted from 250.0 mg of homogenized wet fecal sample (71.5% water content ± 7.26 SD) using the MoBio Power Soil DNA Isolation kit (MoBio, Solana Beach, CA, USA) according to the manufacturer's instructions and stored at -80°C until sequencing. All samples were sequenced using the Illumina platform with HiSeq 2500 instrument, which produced paired-end 2×126 read length (OtoGenetics Corporation, USA), with ≥ 40 M reads, and ≥ 5.2 Gb data per sample (Appendix A, Supplementary Table S6).

2.3. Data processing

FastQC was used to assess the 126-bp paired-end reads for the average quality score per base position [23]. The low-quality regions were trimmed out with Trimmomatic [24]. After trimming, sequence reads were aligned against human genome assembly hg19 obtained from UCSC Genome Browser [25] using Bowtie 2 [26] with default parameters to remove potential human reads. Possible human DNA sequences were identified and discarded.

2.4. Metagenomic shotgun sequences analysis

The gut microbial composition of each sample was profiled using MetaPhlAn2 [27]. The relative abundances of the gut microbial functional pathways from metagenomically-sequenced communities were determined using HUMAnN2 [28] using genes, extracted from the KEGG database [29].

2.5. Bacterial, archaeal, and viral abundance analysis

Differences in the abundance of bacterial and archaeal taxa (family, genus and species) between normal weight and obese children, was made by linear discriminant analysis (LDA) followed by Wilcoxon Mann-Whitney test, coupled to size effect (LEfSe) using default parameters [30]. Viral profiling analysis was made using ViromeScan [31].

2.6. Enterotyping and functional clustering

We calculated the distance for genus-level relative abundance profiles and KEGG pathway relative abundance profiles. Enterotypes of the gut microbiome were assigned using default parameters available in the tutorials (<http://enterotyping.embl.de/enterotypes.html>) [32]. In brief, primarily relative abundance of all gut microbiome was taken and script `data=read.table("Mexican_child-obese.genus.txt", header=T, row.names=1, dec=".", sep="|t"); data=data[-1,]` used to load and read the file. Subsequently, we used scripts `data.dist = dist.JSD(data); JSD <- function(x,y) sqrt(0.5 * KLD(x,(x+y)/2) + 0.5 * KLD(y,(x+y)/2))`, and `KLD <- function(x,y) sum(x * log(x/y))` to calculate the Jensen–Shannon (JS) distance for relative abundance profiles at genus-level. To cluster the abundance profiles of the microbiome, we used the Partitioning Around Medoids (PAM) clustering algorithm using the script `pam(as.dist(x), k, diss = TRUE)`, where "x" is a distance matrix and "k" the number of clusters. Next, to assess the optimal number of clusters, we used the Calinski–Harabasz (CH) index, as in the script `data.cluster = pam.Clustering(data.dist, k = 3)`. These clusters were validated by silhouette coefficient $S(i)$ as in the script `obs.silhouette = mean(silhouette(data.cluster, data.dist)[,3])`, and noise was removed using `data.denoised = noise.removal(data, percent = 0.01)` script. Finally, clusters were visualized by principal

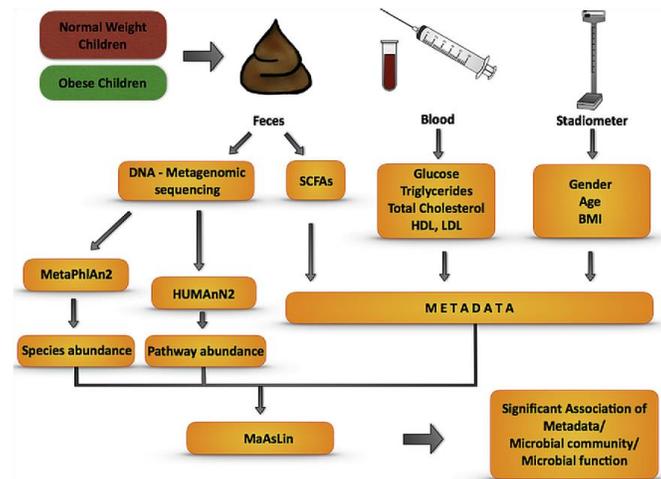


Fig. 1. MGWAS general work pipeline. Fecal and blood samples were collected, and anthropometric data was recorded from all normal weight and obese participant children. Total DNA was extracted from stool and was subjected to metagenomics sequencing; microbial community composition and function were profiled using MetaPhlAn2 [27] and HUMAnN2 [28]. Total Short Chain Fatty acids were also measured from same samples by HPLC [11]. A biochemical profile including glucose, triglycerides, cholesterol and high and low-density lipoproteins was determined in serum. MaASLin [33] was used to find significant associations among species, pathway abundances, and all metadata.

coordinates analysis (PCoA), using the script *obs.pcoa = dudi.pco(-data.dist, scannf = F, nf = 3)*, and the script *s.class(obs.pcoa\$li, fac = as.factor(data.cluster), grid = F)*. Enterotyping was done in “R” environment using biotyper (0.1.2), cluster (v2.07), and ade4 (v1.7) packages.

2.7. Testing for significant associations with the clinical metadata variables

A multivariate association with linear model (MaASLin) specially adapted to microbiome data, was used to identify significant associations between microbial and phenotypic variables [33]. Selected metadata were used in a general linear model with metadata as predictors and arcsin-square root transformed microbial relative abundances as the responses. In this study, model covariates of interest comprised clinical variables shown in [Appendix A, Supplementary Table S1](#). The anthropometric characteristics were statistically analyzed using chi-square, analysis of variance (ANOVA), and Kruskal–Wallis one-way analysis of variance.

2.8. Metagenome assembly and gene prediction

Metagenomic assembly and gene prediction were performed using the MOCAT2 pipeline [34]. Protein-coding genes were predicted using MetaGeneMark [35].

3. Results

3.1. Obese children showed increased levels of fat metabolites and dyslipidemia

Twenty unrelated children (ten normal weight, and ten obese) aged between 9 and 11 years-old, were selected from an obesity database ([Fig. 1; Appendix A, Supplementary Table S1](#)) [11]. The anthropometric assessment indicated no difference in age and height between the two groups ([Fig. 2A and C](#)), but a significant

difference in weight and BMI percentile was observed in agreement to the phenotype ([Fig. 2B and D](#)). In case of biochemical parameters, Mexican obese children showed a significant increase of serum levels of total cholesterol ([Fig. 2F](#)), and triglycerides ([Fig. 2G](#)); the low-density lipoprotein was also increased ([Fig. 2I](#)), however, the difference was not statistically significant. The high-density lipoprotein was significantly decreased in obese, with respect to normal weight children ([Fig. 2H](#)). Also, there was not difference for the fasting serum glucose levels between the two groups ([Fig. 2E](#)). The short chain fatty acids concentration in feces showed no difference between normal weight and obese children ([Fig. 2J–L](#)), although participants for this study were randomly selected from a larger database, where a significant decrease has been reported for propionic and butyric acid in obese children [11].

3.2. Microbiota diversity of normal weight and obese children

A MetaPhlAn analysis of the metagenomic sequencing did not show a global difference in the abundance for the entire bacterial community in obese children compared to the normal weight. For instance, although the relative abundance of *Prevotella copri*, a bacterium belonging to the Bacteroidetes phylum, has been reported to be associated to rheumatoid arthritis in humans, increasing from 3.08% in normal weight to 13.63% in obese children, the difference was not statistically significant ($p = 0.440$). On the other hand, the abundance of *Bacteroides coprocola* another Bacteroidetes associated to T2D decreased from 5.28% in normal weight to 0.54% in obese children, but again the difference was not statistically significant ($p = 0.286$) ([Fig. 3A-Bacteria, color code in Appendix A, Supplementary Fig. S1](#)). The archaea community exhibited an increase of unclassified species of *Methanobrevibacter* in obese children ([Fig. 3A-Archaea; Appendix A, Supplementary Fig. S1](#)). For the viral community, the analysis of the metagenomics data did not show a significant difference in the abundance in obese children compared to normal weight children. However, the relative abundance of some viruses like the Human

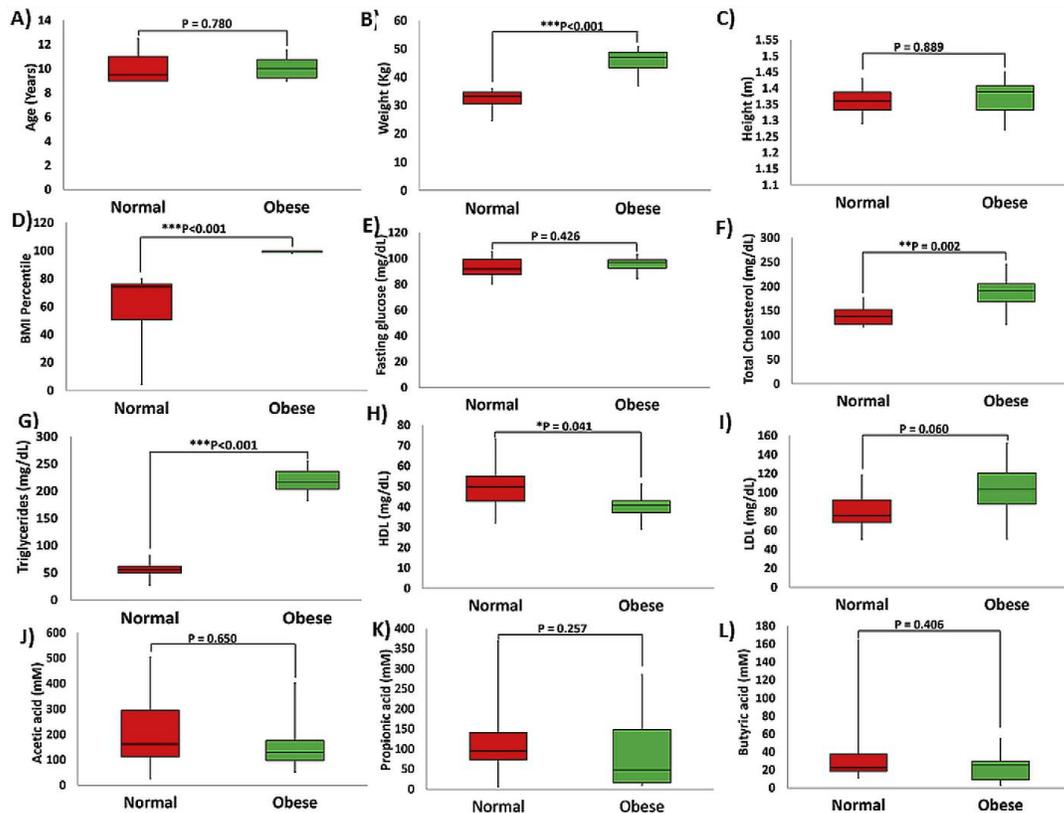


Fig. 2. Metadata statistical significance comparison. A) Age; B) Weight; C) Height; D) body mass index percentile BMI; E) Fasting glucose; F) Total cholesterol; G) Triglycerides; H) High-density lipoprotein (HDL); I) Low-density lipoprotein (LDL); J) Acetic acid; K) Propionic Acid; L) Butyric acid. P-Values were calculated according to Chi-square test, ANOVA test for equal variances, and Kruskal–Wallis test for different variances. (*) $P < 0.05$, (**) $P < 0.01$, (***) $P < 0.0001$ are considered statistically significant; Red color indicates normal weight, and Green color indicates obese children. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

herpesvirus 4 (NC_007605.1) increased from 0.08% in normal weight to 1.53% in obese children ($p = 0.017$), while the relative abundance of Torque teno midi virus 1 (NC_009225.1) decreased from 2.21% in normal weight to 0.72% in obese children ($p = 0.282$) (Fig. 3A–Virus; color code in Appendix A, Supplementary Fig. S2). We also explored the abundance of CrAssphage virus reads, which went from 29,748 in normal weight to 78,111 in obese children; however, this difference was not statistically significant ($p = 0.473$) (Fig. 3B). A clustering analysis of the gut microbiome sequencing data revealed the presence of three previously reported enterotypes in our study subjects: Enterotype 1, enriched in *Bacteroides* spp., Enterotype 2 enriched in *Prevotella* spp. with 50% of obese children, and Enterotype 3, enriched in *Ruminococcus* spp. with 50% of normal weight children (Fig. 3C; Appendix A, Supplementary Table S3).

3.3. Compositional and functional characteristics of normal weight and obese children microbiomes

We performed a MetaPhlan2 and HUMAnN2 analysis on the metagenomics data (Fig. 1). It was observed that *Megamonas* spp., a

Firmicutes bacteria was at least 2-fold more significantly abundant in obese children than in normal weight (Fig. 4A). On the other hand, some members of the phyla Firmicutes, Bacteroidetes and Proteobacteria were at least 2-fold more significantly abundant in normal weight than in obese children. Here, Firmicutes included bacteria such as *Ruminococcus* spp., *Clostridium citroniae*, *Coprococcus comes*, *Streptococcus thermophilus*, *Dorea formicigenerans*, *Oscillibacter* spp., and other members of the Family Oscillospiraceae. The phylum Bacteroidetes included *Bacteroides ovatus*, *B. xylanisolvens*, *B. salyersiae*, and *B. faecis*, while the phylum Proteobacteria included members of the Family Desulfovibrionaceae (Fig. 4A). In addition, to explore the microbiota diversity, we characterized the microbiome of our subjects. Path abundance analysis showed that two KEGG pathway modules of glycolysis, Glycolysis I (from Glucose 6-Phosphate) ($p = 0.013$), and Glycolysis II (from Fructose 6-Phosphate) ($p = 0.016$) were significantly over-represented in normal weight children (Fig. 4B; Appendix A, Supplementary Table S4). The KEGG path coverage analysis of metabolic routes showed almost 4-fold more abundance of three anabolic routes for nucleotide synthesis such as pyrimidine, guanosine in normal weight, and four abundant anabolic routes for

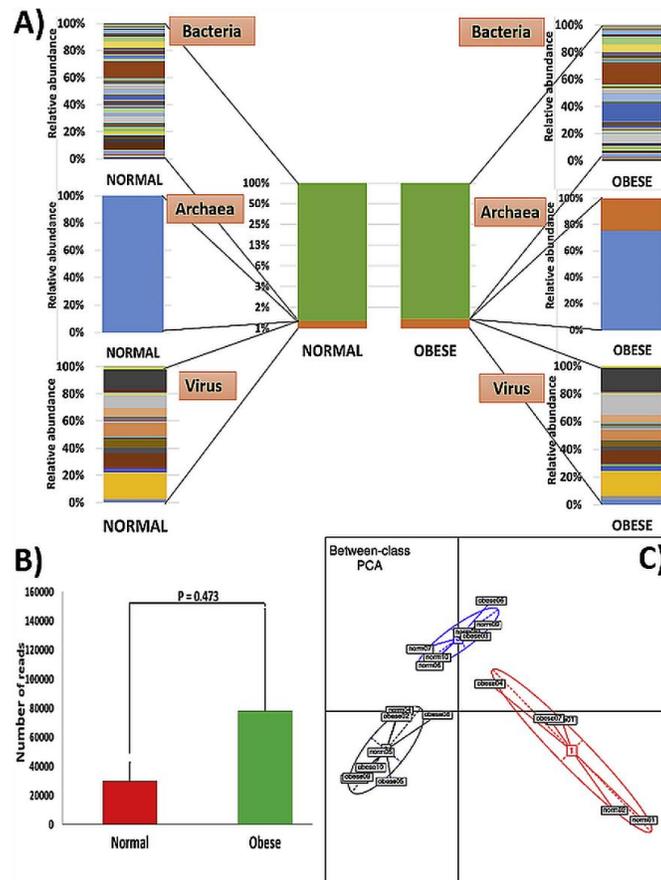


Fig. 3. Characterization of the distal gut microbiome in stool samples from normal weight and obese children. DNA was extracted from each sample and shot-gun metagenomic sequenced as described in the Methods section. A) Relative abundance of bacterial and archaeal (color code for each entry shown in [Appendix A, Supplementary Fig. S1](#)); and viral populations (color code shown in [Appendix A, Supplementary Fig. S2](#)); B) Comparison of total number of CrAssphage reads. Red color indicates normal weight and green color indicates obese children; C) Bacterial enterotypes were defined as describe in 2.6 Enterotyping and functional clustering section of the Methods section. Samples are colored by enterotype as identified by the partitioning around medoids (PAM) clustering algorithm. Red color is Enterotype 1, violet color is Enterotype 2, and blue color indicates Enterotype 3. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

aminoacids or sugar synthesis in obese children ([Fig. 4C](#); [Appendix A, Supplementary Table S4](#)). On regard of KEGG gene families, data analysis showed an increase in the significant abundance of at least 2-fold, of genes such as 4-O- β -D-mannosyl-D-glucose phosphorylase (RXN_12977) in normal weight and catabolic genes such as α -amylase (ALPHA_AMYL_RXN), an enzyme for hydrolysis of (1 \rightarrow 4)- α -D-glucosidic linkages of polysaccharides in obese children ([Fig. 4D](#); [Appendix A, Supplementary Table S4](#)). However, when a Bray-Curtis-Principal coordinate analysis (PCoA) was made for KEGG pathway module abundances, coverage, and gene families using distance matrices, no clustering was observed between the two experimental groups ([Appendix A, Supplementary Fig. S3](#)). On the other hand, when metadata and bacterial were probed together, a significant association was found, where high serum cholesterol levels are related to lower abundance of the Oscillospiraceae family in obese children ([Fig. 4E](#)).

3.4. Phylogenetic and functional diversity in the normal weight and obese children microbiomes

We performed a clustering analysis using the top 15 abundant bacterial species from the microbiome, the full set of metadata, and the 15 orthologous more relevant gene clusters for our data from the EggNOG database. The graphic heatmap of this analysis showed a hierarchical clustering of the normal weight and obese children with gut microbes from the phylum Bacteroidetes such as *Alistipes putrenidis*, *A. shahii*, *Prevotella copri*, *Parabacteroides merdae*, and seven different bacteroides: *Bacteroides ovatus*, *B. vulgatus*, *B. uniformis*, *B. stercoris*, *B. dorei*, *B. cacae*, and *B. coprocola*. The same occurred with members of the phylum Firmicutes, like *Subdoligranulum* spp., *Eubacterium rectale*, *Faecalibacterium prausnitzii*, and *Ruminococcus bromii* ([Fig. 5A](#)). The analysis with orthologous genes derived from metagenomics functional profiling using

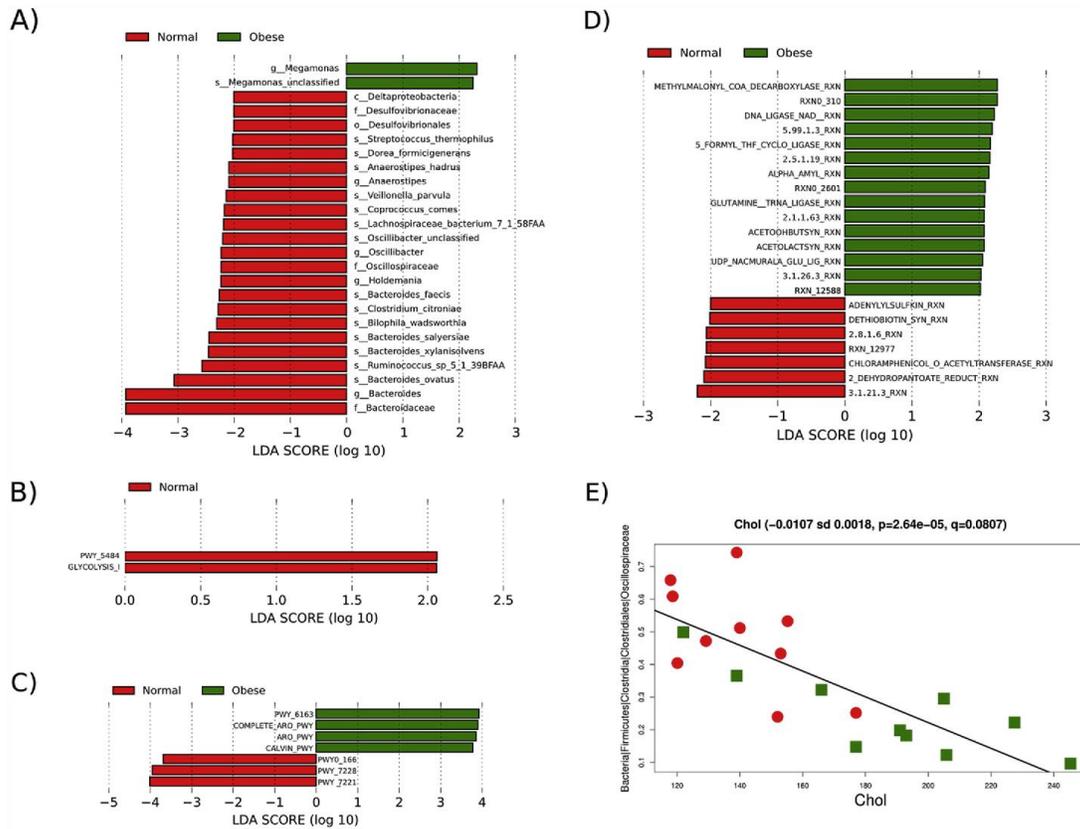


Fig. 4. Significant bacteria, path abundance-coverage, gene families found in the gut microbiome and association with metadata. Figure shows graphs of linear discriminant analysis (LDA) scores for A) Differentially abundant bacterial genera, families or species; B) Differentially abundant KEGG Pathway modules; C) Differentially abundant KEGG pathway coverage; D) Differentially abundant KEGG gene families. Negative and positive LDA scores indicate overrepresented data in normal weight (red) and obese (green) children. Features with LDA scores ≥ 2 are presented. Full description of path abundance, coverage, and gene families is shown in [Appendix A, Supplementary Table S4](#); E) Significant association of cholesterol level with Oscillospiraceae family abundance. Lines represent linear model fit after transform to accommodate compositional, non-normally distributed data and cholesterol level. Red color circles indicate normal weight children; green color squares indicate obese children. Nominal p -values and FDR corrected q -values are assigned by MaAsLin [33]. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

EggNOG database entries (Fig. 5B; [Appendix A, Supplementary Table S5](#)) showed four main clustering of metabolic modules, one including cell wall, membrane, and envelope biogenesis, as well as amino acid and lipid transport and metabolism. A second clustering included energy production and conversion, and signal transduction mechanisms; while a third clustering grouped nucleotide and carbohydrate transport and metabolism, DNA transcription, ribosomal structure and biogenesis, and energy production and conversion orthologous gene clusters. The fourth clustering included replication, recombination, and repair, ribosome structure and biogenesis, and the enzyme pyruvate phosphate dikinase, from the carbohydrate transport and metabolism group (Fig. 5B). Finally, the analysis using the clinical metadata, showed three clustering, the first grouped triglycerides, the percentile of body mass index, and weight; the second grouped glucose, acetate, cholesterol, and low-density lipoprotein; while the third grouped butyrate, high density lipoprotein, height and propionate (Fig. 5C).

4. Discussion

Overweight and obesity are global diseases where according to the Organization for Economic Co-operation and Development, at least one in three adults and one in five children suffer of it among its 35 members [36]. In countries such as Mexico, these two conditions have increased at an alarming rate in the last years, where at least one in three children and adolescents between 5 and 11 years-old are affected [37]. Recent work from our group on gut bacteria in overweight and obesity, has shown its association with the level of SCFAs production in Mexican children [11]. Overweight and obesity usually starts in childhood or adolescence and involves genetic factors in the human genome as well as in the human microbiome.

Microbial Genome Wide Association Studies (MGWAS) has proved the important role of the microbiome in the development of diseases such as type 2 diabetes [18], colorectal cancer [19], and rheumatoid arthritis in adults [20], which has revealed enriched microbial genes, strains and functions in each study group. In this

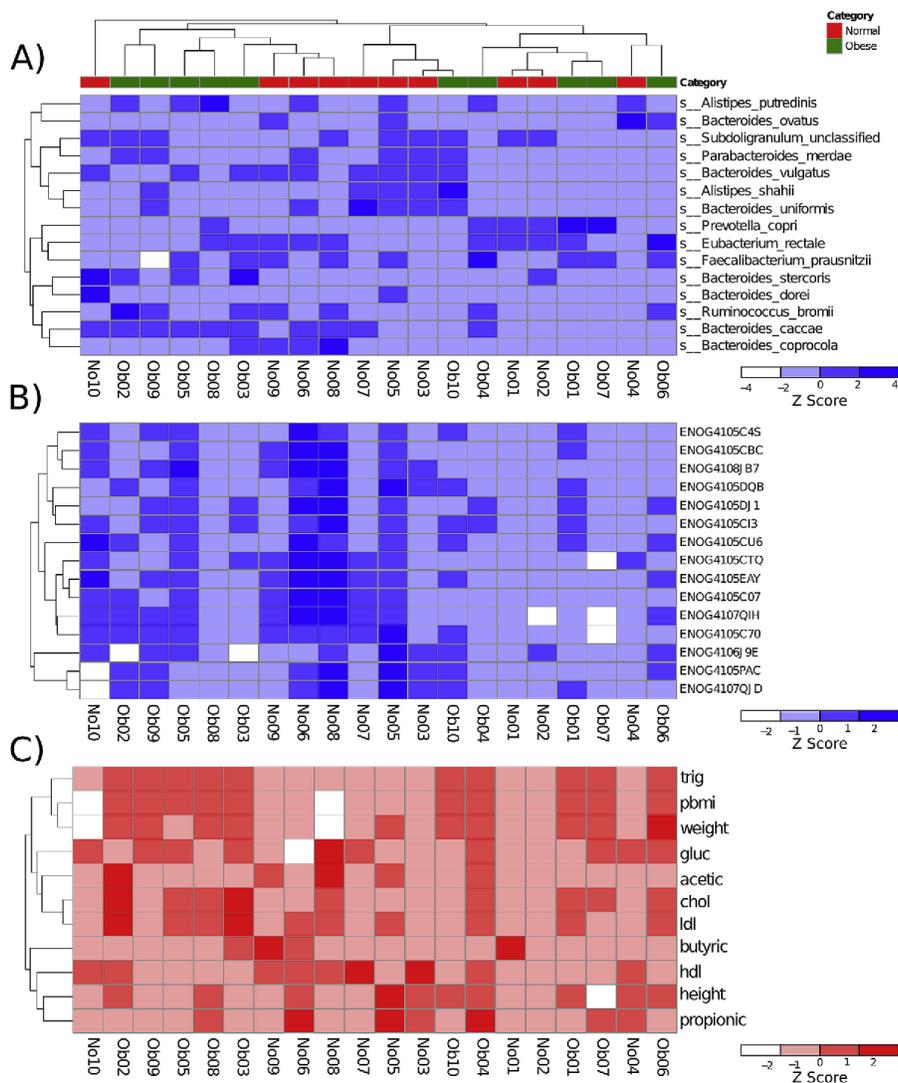


Fig. 5. Heatmap and hierarchical clustering of taxonomic and functional profiles of gut microbiomes. A) Columns, the top 15 bacterial abundance profiles for every individual clustered the two categories (normal-weight, obese children) in groups. Rows, the bacterial abundance in each individual, clustered the members of the top 15 bacteria; B) Columns, the sample clustering retains ordering from A), Rows, clustering of metabolic modules derived from metagenomic functional profiling using EggNOG database. (Appendix A, Supplementary Table S5); C) Columns, the sample clustering retains ordering from A), Rows, clustering of clinical metadata profile. trig, triglycerides; pbmi, percentile of body mass index; gluc, glucose; acetic, acetate; chol, cholesterol; ldl, low density lipoprotein; butyric, butyrate; hdl, high density lipoprotein; propionic, from data shown in Fig. 2, and Appendix A, Supplementary Table S1. Red color indicates normal weight children. Green color indicates obese children. Z Scores in blue or red color indicates how many standard deviations a value is from the mean. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

work, we made a comparative study of the microbiome in normal weight and obese Mexican children from a study cohort on obesity.

Our results show that obese children in the sample have increased weight and BMI percentile, besides to increased triglycerides and cholesterol levels (dyslipidemia) (Fig. 2G and F, Appendix A, Supplementary Table S1). The microbial diversity characterization based on the shotgun metagenomic analysis

showed that in general, the abundance of bacterial, archaeal, and viral communities was comparable between normal weight and obese children. However, on regard of viruses, there is a significant 19-fold increase of the Human herpesvirus 4 (HHV-4) in feces of obese children (Fig. 3A, color code in Appendix A, Supplementary Fig. S2). There is one report of an association of a different Human herpesvirus 1 with obesity in US population between 20 and

49 years-old [38], thus ours is the first report of an association of HHV-4 with obesity in children. We also observed an increase in the number of reads for the CrAssphage virus in obese children; this virus infects bacterial members of the phylum Bacteroidetes (e.g. *Prevotella intermedia*, *Bacteroides* spp.), and it is thought to be associated with obesity [39] (Fig. 3B).

Regarding archaea, there was a decrease in the abundance of the human gut methanogenic archaeon *Methanobrevibacter smithii* in obese children of this study (Fig. 3A-Archaea, color code in Appendix A, Supplementary Fig. S1), this result agrees with a report in French adults [40]. However, there was an increase in the relative abundance of a different unclassified species of *Methanobrevibacter* spp. in the same children (orange color in Fig. 3A-Archaea). Members of this genus have a productive saccharolytic activity allowing digestion of polysaccharides in the gut [41] and are reported to be responsible for diet-related increased body weight in a murine model [42]. Obesity also involves low-grade chronic inflammation [43], and a strain of *Methanobrevibacter smithii* is reported capable of inducing an inflammatory cytokine response by activation and release of pro-inflammatory cytokines in monocyte-derived human dendritic cells contributing to obesity [44]. In a report of a study made in US population adults 18–40 years-old, there was a positive association of *Methanobrevibacter* spp. with a diet high in carbohydrates [45], with greater body mass index, and body fat [46]. Moreover, the same, *M. smithii* colonization was positively associated with an increased risk of overweight in 6–10 years-old children in Netherlands [47].

When the bacterial community was analyzed, the normal-weight and the obese children were stratified based on three different bacterial enterotypes [32,48]. We observed that most normal weight children have a gut bacterial community dominated by *Ruminococcus* spp. (Enterotype 3), while most obese children had a community dominated by *Prevotella* spp. (Enterotype 2) (Fig. 3C, Appendix A, Supplementary Table S3). These two enterotypes accounted for 75% of the studied children. Stratification of microbial communities in enterotypes has been reported for tumor-associated and non-tumor-associated microbiota in colorectal cancer [49], and as a dietary-associated cardiometabolic risk factor [50]. In our study, we observed that the relative abundance of *Prevotella copri* increased in obese children; in this manner, we think that a particular *Prevotella* spp. dominating the gut microbiota (Enterotype 2) is associated with obesity in Mexican children 9 to 11 years-old.

On the other hand, based on LEfSe analysis, we observed that in normal weight, several members of the phyla Firmicutes, Bacteroidetes and Proteobacteria were at least 2-fold more abundant in normal-weight than in obese children (Fig. 4A), being the ratio Firmicutes/Bacteroidetes in agreement with previous reports for obesity [51].

Regarding the phylum Proteobacteria, in our study, the Meta-PhlAn2 analysis showed that members of the Family Desulfobibrionaceae, e.g. *Bilophila wadsworthia* were 2-fold more abundant in normal-weight than in obese children (Fig. 4A). Members of this family are strict anaerobic sulfate-reducing bacteria, and a decrease in its abundance is reported associated to obesity (Table 1).

Among the phylum Bacteroidetes, our study showed that members of the Family Bacteroidaceae, such as *Bacteroides faecis*, *B. ovatus*, *B. xylanisolvens*, and *B. salyersiae* were 2- to 4-fold more abundant in normal-weight than in obese children (Fig. 4A). The functional relationship between the host and members of the phylum Bacteroidetes is complex, due mostly to its genomic diversity, plus a functional metabolic versatility, which allows members of this phylum to adapt quickly to rapid environment changes in the gut [52]. High abundance of *Bacteroides* spp. is reported associated to normal weight, with the important role of

maintaining an ecological balance of the concurrent microbiota in the gut, due to its saccharolytic activity producing acetate, propionate and succinate (Table 1).

We identified several Firmicutes which are more abundant among normal weight than obese children: *Streptococcus thermophilus*, *Dorea formicigenerans*, *Anaerostipes hadrus*, *Veillonella parvula*, *Coprococcus comes*, *Lachnospiraceae* bacterium 7 1 58 FAA, *Oscillibacter* spp., *Holdemanina* spp., *Clostridium citroniae*, and *Ruminococcus* sp. 5 1 39BFAA (Fig. 4A). There is reported evidence that some of these bacteria play a major role in the prevention of obesity in humans through metabolite production or immunological modulation. The abundance of *S. thermophilus* increases adipocyte lipolysis in aP2-agouti transgenic obesity model mice, which is susceptible to diet-induced obesity, and exhibit a human pattern of expression of obesity-related genes [53] (Table 1). In another report, a strain of the genus *Anaerostipes* spp. was shown to increase butyrate content in the gut of healthy mice models; butyrate is an energy source for intestinal epithelium, stimulates the production of regulatory T cells, inhibits inflammation, and regulates gene expression (Table 1). A decrease in butyrate-producing bacteria is associated with several inflammatory diseases like obesity [54]. By this, we have previously reported a decline in butyrate production by the gut microbiota in Mexican obese children under 11 years-old from the same study cohort [11]. *Veillonella parvula* is an opportunistic pathogen, and members of this genus *Veillonella* spp. negatively correlated with short-chain triglycerides (Table 1). In another report, *V. parvula* has potential immunomodulatory properties inducing cytokine responses like interleukine-6 (IL-6) production in dendritic cells. Furthermore, in the same report, a combination of *Veillonella* spp. with *Streptococcus* spp. augmented IL-8, IL-6, IL-10, and TNF- α response [55]. It is of interest that IL-8, and TNF- α , are reported elevated in human obesity [56], cytokine IL-6 has anti-inflammatory effect and a compensatory role in obesity by increasing islet glucagon-like peptide-1 (GLP-1) production [57], and IL-10 participates in the prevention of systemic low-grade inflammation caused by obesity [58]. In our study, *S. thermophilus* exhibited a comparable 2-fold more abundance in normal-weight children (Fig. 4A), so we believe a pairwise abundance of *V. parvula* and *S. thermophilus* is associated to normal-weight in Mexican children where they synergistically regulate the production of IL-6 to contribute to the reduction of inflammation. The abundance of *C. comes*, a bacterium producer of butyric, acetic, formic, and propionic acids [59], is also higher in normal-weight children (Fig. 4A), the abundance of this bacteria decreases along with BMI, serum triglycerides, cholesterol and LDL-cholesterol after Roux-N-Y gastric-bypass surgery in German adults (Table 1).

In normal weight children, bacteria belonging to the family Oscillospiraceae such as unclassified *Oscillibacter* spp. were significantly more abundant than in obese children (Fig. 4A). *Oscillibacter valericigenes* (Oscillospiraceae) is a well-known producer of valeric acid (Table 1); we especially found an important significant negative association (SD = 0.0018, $p = 2.64 \times 10^{-25}$, $q = 0.0807$) of this family with serum cholesterol levels, and BMI among children of our study (Fig. 4E). This result agrees with a role of inhibition of hepatic cholesterol synthesis produced by valeric acid derivatives in rats [60]. Another Firmicutes, *Holdemanina* spp. was 2-fold more abundant in normal weight children; this bacterium is an acetic- and lactic acid producer, and members of this genus are reported associated to leanness in a study made in Japanese men (Table 1). *Clostridium citroniae* is a Firmicutes 2-fold more abundant in normal weight children in our study. A strain of this bacterium was reported as more abundant in lean than obese adults in Japanese population; however, it appears to be an opportunistic pathogen associated to colitis in adults (Table 1). *Ruminococcus* sp. 5 1

Table 1
Gut bacteria with significant increase or decrease among children of this study.

Phylum Proteobacteria			
bacteria	this work	other reports	reference
Family Desulfovibrionaceae, <i>Bilophila wadsworthia</i>	2-fold more abundant in normal weight children than obese children	Family Desulfovibrionaceae, a decrease in its abundance has been associated to overweight and obesity in a study made in Swedish preschool children. <i>B. wadsworthia</i> significantly more abundant in lean than obese Japanese adult population. <i>Bilophila</i> spp. a high sugar diet increases the abundance in rat model.	[74] [75] [76]
Phylum Bacteroidetes			
bacteria	this work	other reports	reference
Family Bacteroidaceae, Genera <i>Bacteroides faecis</i> , <i>B. ovatus</i> , <i>B. xylanisolvens</i> , and <i>B. salyersiae</i> .	2 to 4-fold more abundant in normal-weight than obese children	Increase in Bacteroidetes reported due to alimentary intervention reducing the BMI in Spanish adolescents <i>B. acidifaciens</i> members of the Family Bacteroidaceae, its increase prevented obesity and improved insulin sensitivity in mice model <i>B. faecis</i> negatively associated with markers for dyslipidemia in Danish adult women. <i>B. ovatus</i> maintains diversity of gut microbiota by efficient hydrolysis of soluble fiber like starch producing oligosaccharides and dextrins, which are available to other non-saccharolytic bacteria. <i>B. xylanisolvens</i> in the human gut degrades xylans to acetate, propionate and succinate. <i>B. salyersiae</i> has been isolated from human feces.	[77] [78] [79] [80] [81] [82]
Phylum Firmicutes			
bacteria	this work	other reports	reference
<i>Streptococcus thermophilus</i>	2-fold more abundant in normal-weight than in obese children	<i>S. thermophilus</i> a probiotic associated to reduction of body weight, fat accumulation, fatty acid synthase activity in adipocytes.	[53]
<i>Dorea formicigenerans</i>		<i>D. formicigenerans</i> , a serine protease producer, whose abundance increases after bowel cleansing in English adult people. <i>D. formicigenerans</i> abundance decreases after antibiotic treatment in adult Japanese people suffering of ulcerative colitis.	[83] [84]
<i>Anaerostipes hadrus</i>		<i>A. hadrus</i> , a strain of this genus has shown to increase butyrate content in the gut of healthy mice models.	[85]
<i>Veillonella parvula</i>		<i>V. parvula</i> usually considered part of the oral microbiota, or an opportunistic human pathogen. <i>Veillonella</i> spp. negatively correlated with short-chain triglycerides in serum and stool, in a study made in preschool Finnish and Estonian children.	[86] [87]
<i>Coprococcus comes</i>		<i>C. comes</i> , its abundance decreases along BMI, serum triglycerides, cholesterol and LDL-cholesterol in German adults affected of type 2 diabetes/obesity after Roux-en-Y gastric-bypass surgery.	[88]
Lachnospiraceae bacterium 7 1 58 FAA		Family Lachnospiraceae, associates with lower long-term weight gain in women of Caucasian ancestry.	[89]
<i>Oscillibacter</i> sp. unclassified		<i>O. valericigenes</i> well-known producer of valeric acid.	[90]
<i>Holdemania</i> spp.		<i>H. filiformis</i> acetic and lactic acid producer. <i>Holdemania</i> spp. associated to leanness in Japanese men.	[91] [92]
<i>Clostridium citroniae</i>		<i>C. citroniae</i> more abundant in lean than obese adults in Japanese population. <i>C. citroniae</i> strain is an opportunistic pathogen associated to colitis in adults.	[75] [93]
<i>Ruminococcus</i> sp. 5 1 39BFAA		<i>Ruminococcus</i> spp. positively correlates with short-chain triglycerides concentration in serum and stool in preschool Finnish and Estonian children.	[87]
<i>Megamonas</i> sp. unclassified	More than 2-fold more abundant in obese than in normal-weight children.	<i>Megamonas</i> spp. more abundant in Taiwanese obese adults than in normal weight. <i>Megamonas</i> spp. abundance significantly reduced in Mexican children with Type1 diabetes onset with respect to healthy control. <i>Megamonas</i> spp. more abundant in normal and pre-diabetes Chinese subjects than in recently diagnosed Type 2 diabetes adult individuals.	[94] [63] [64]

39BFAA, this Firmicutes was 2-fold more abundant in normal weight children in our study (Fig. 4A). This strain belongs to a genus where its members are reported as pathogens or probiotics [61]; surprisingly *Ruminococcus* spp. positively correlates with short-chain triglycerides concentration in serum and stool in a study made in preschool Finnish and Estonian children (Table 1).

On the other hand, we found an unclassified gram-negative Firmicutes *Megamonas* spp. more than 2-fold significantly over-represented in obese children than in normal weight children (Fig. 4A). Members of the genus *Megamonas* spp. are active propionic, and acetate producing, saccharolytic bacteria [62]. Similar results about the abundance of this bacterium were observed in Taiwanese obese adults (Table 1). However, *Megamonas* spp.

abundance was significantly reduced in Mexican children with Type 1 Diabetes onset with respect to healthy control [63], while in a Type 2 Diabetes (T2D) study in Chinese adults, the genus *Megamonas* was more abundant in normal and pre-diabetes subjects than in recently diagnosed T2D individuals [64] (Table 1). All children in our study exhibited normal fasting glucose levels (Fig. 2E), but serum cholesterol levels were increased in children affected with obesity (Fig. 2F). Members of the genus *Megamonas* are reported to promote isoprenoid cholesterol biosynthesis through propionic acid mediated pyruvate pathway and alanine [65,66], which may explain its abundance in obesity in our study. Furthermore, in a different report, a decrease in the abundance of *Megamonas* spp. was observed during oral treatment with Berberine, an

anticholesteremic drug in African and Chinese adults [67], which adds to its role in cholesterol biosynthesis.

The HUMAnN2 analyses (Fig. 1), showed that the KEGG pathway modules Glycolysis_I (from Glucose 6-Phosphate), and Glycolysis II (pathway-5484, from Fructose 6-Phosphate) were 2-fold significantly overrepresented in the gut microbiota of normal weight children (Fig. 4B; Appendix A, Supplementary Table S4). More glycolytic activity in the colon would increase short chain fatty acids production, which are absorbed by the host. An increase in valeric acid for instance, would decrease acetyl CoA in the host, leading to normal lipid levels [66]. On the other hand, an increase in butyric acid in the host, leads to an increase in anti-inflammatory interleukins [68] (Fig. 6). This result agrees with the depletion of glycolysis observed in a study of the microbiome of obese American twins [69].

Microbiome path coverage revealed a 4-fold overrepresentation of three anabolic routes for nucleotide synthesis such as pyrimidine and guanosine in normal weight, and four abundant anabolic routes for aminoacids or sugar synthesis in obese children (Fig. 4C, Appendix A, Supplementary Table S4); however, we do not find an explanation for this observation. Microbiome gene family abundance revealed that α -amyl RXN (or α -Amylase (EC 3.2.1.1)) was 2-fold significantly more abundant in obese children (Fig. 4D; Appendix A, Supplementary Table S4). This enzyme carries out the hydrolysis of α -1,4 glycosidic bonds of resistant starches reaching the colon. Similar results were observed in American children with non-alcoholic fatty liver disease [70]. Furthermore, obese microbiome has a higher capacity to extract more energy in the form of acetic and propionic acids; *Megamonas* spp. carries bacterial α -amylase, which might lead to dyslipidemia through acetyl-CoA synthesis [65] (Fig. 6).

Clustering analysis using the more relevant 15 orthologous gene clusters for our data from the EggNOG database (Fig. 5B; Appendix A, Supplementary Table S5), showed that carbohydrate transport

and metabolism is the most abundant functional group among Mexican gut microbiome, which is similar to another human gut microbiome study in Chinese and Danish adults [12]. In addition, phosphohexokinase (ENOG4105CTQ) orthologue of carbohydrate transport and metabolism, was significantly more abundant ($p = 0.044$) in normal weight children than obese children, which promotes utilization of glucose to regulate the energy in both glycolysis I and II [71] (Fig. 4B). Likewise, methylmalonyl-CoA decarboxylase (ENOG4108JB7) orthologue of lipid transport and metabolism, was more abundant in normal weight than obese children ($p = 0.056$) (Fig. 5B; Appendix A, Supplementary Table S5). Methylmalonyl-CoA decarboxylase plays a vital role in propionic acid production in *Megamonas* spp., which is involved in cholesterol synthesis through Acetyl CoA [65].

We think these enzymatic activities allow efficient catabolic metabolism of undigested polysaccharides from the diet that reach the colon in children and are metabolized by the gut microbiota. The fermentation products are short-chain fatty acids which have immunomodulatory and anti-inflammatory properties [68]. Resistant starch is a dietary fiber that may contribute to reduce fat accumulation, enhance insulin sensitivity, regulate blood glucose level and lipid metabolism (Fig. 6), making it a promising dietary fiber for the prevention or treatment of obesity and its related diseases [72]. In another report, dietary resistant starch and chitosan showed anti-obesity effects in a murine model [73]. So, in this manner, the gut microbiota of normal gut children would carry among other gene function, the capacity to ferment resistant polysaccharides efficiently in the gut.

5. Conclusions

The gut microbiome of normal and obese children studied in this work, was quite similar in their microbial communities or their protein assemblies (Fig. 5A; Fig. 5B). However, individual members

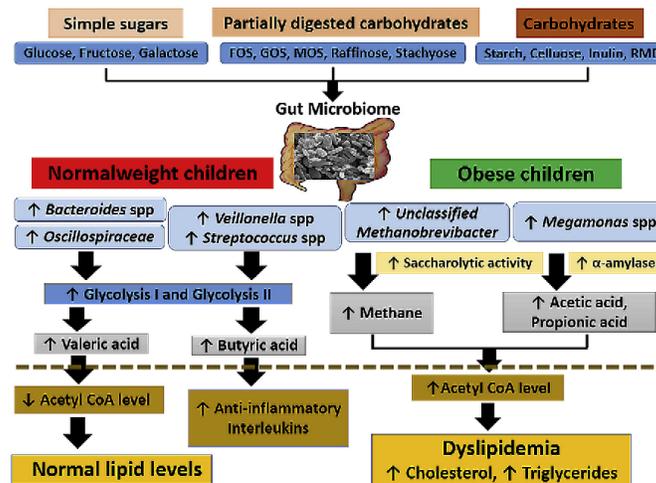


Fig. 6. A model of the gut microbiome role in metabolism of normal-weight and obese Mexican children. In our model, when simple sugars and partially digested carbohydrates reach the colon they have a different fermentation fate. In the case of normal weight children bacteria such as *Bacteroides* spp., *Veillonella* spp., *Streptococcus* spp., and members of the family *Oscillospira* spp. are more abundant (Fig. 4A), exhibiting more activity of Glycolysis I and II path abundances (Fig. 4B, Appendix A, Supplementary Table S4), and more valeric acid and butyric acid synthesis. These metabolites decrease acetyl CoA level leading to normal lipid levels by inhibition of triglyceride, and cholesterol synthesis in the host. In the children suffering of obesity, and increase in unclassified *Methanobrevibacter* (Fig. 3A), and *Megamonas* spp. (Fig. 4A) produces more methane and acetic and propionic acids respectively. This metabolite increases acetyl CoA level leading to dyslipidemia by increasing the levels of triglycerides, and cholesterol in the host. Note. FOS--fructooligosaccharides; GOS--galactooligosaccharides; MOS--mannan-oligosaccharides, RMD, resistant maltodextrin.

of the gut microbial communities, which are significantly different between normal and obese children, affect the synthesis of some metabolites via specific routes, promoting obesity in addition to other genetic and environmental factors to which the children are exposed. We conclude that the study of MGWAS of normal weight and obese children adds useful information to understand obesity among children.

Declarations

Ethics approval and consent to participate

Informed consent was signed-out by parents and children in accordance with the Helsinki Declaration revised in 2013. All participants were informed of the scope of this study and provided their written informed consent. The research protocol was approved by the Local Ethical Committee Board of Health from the Instituto Mexicano del Seguro Social R-2011–1402 1402–10, Mexico City.

Consent for publication

Written informed consent was obtained from all parents and children.

Availability of data and materials

Raw sequence data reported in this study have been submitted to the National Center for Biotechnology Information BioProject Archive under accession no. PRJNA385215 and link is <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/?term=PRJNA385215>, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/?linkname=bioproject_sra_all&from_uid=385215.

Declarations of interest

None.

Funding

This study was supported by Cinvestav; and grants from Fundación Miguel Alemán A. C. 2015; CONACyT 163235 INFR-2011-01; and FONSEC SS/IMSS/ISSSTE-CONACyT-233361 to JGM. The sponsors had no role in design and conduct of the study; collection, management, analysis, and interpretation of the data; or in preparation, review, or approval of the manuscript; or the decision to submit the manuscript for publication.

Author contributions

Author contributions: JGM, SM, KN performed literature search, conceived and designed the study. SM, MLPZ, and OML collected data and conducted the experiments. SM, OML conceived developed and implemented the computational methods. JGM, CHV, LDA, SM, OML, participated in study design and interpretation. JGM, SM, KN wrote the manuscript with critical review input from all the authors.

Acknowledgments

We thank a Postdoctoral Fellowship from FONSEC SS/IMSS/ISSSTE-CONACyT-233361 granted to SM, and CONACyT Doctoral Fellowships granted to OML (346907), and KN (589896). We are grateful to Alberto Piña-Escobedo, and Rodrigo García-Gutiérrez for technical support. M. Sc. Olivia Parra Marín for graphic art. Ms.

Miriam Odet Escobar Matamoros and Linda Zuleyma Quijano for administrative assistance, and Fernando Hernández-Quiroz for technical review of the text. Metagenomics assembly was performed in the HPC Xiuhcoatl (<http://clusterhibrido.cinvestav.mx/>) with the help of Héctor Oliver-Hernández.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2018.10.009>.

References

- [1] WHO | Population-based Approaches to Childhood Obesity Prevention, WHO, 2016. <http://www.who.int/dietphysicalactivity/childhood/approaches/en/>. (Accessed 11 May 2018).
- [2] A.V. Hartstra, K.E.C. Bouter, F. Bäckhed, M. Nieuwdorp, Insights into the role of the microbiome in obesity and type 2 diabetes, *Diabetes Care* 38 (2015) 159–165, <https://doi.org/10.2337/dc14-0769>.
- [3] T. Lobstein, L. Baur, R. Uauy, IASO International Obesity TaskForce, Obesity in children and young people: a crisis in public health, *Obes. Rev.* 5 (Suppl 1) (2004) 4–104, <https://doi.org/10.1111/j.1467-789X.2004.00133.x>.
- [4] M. Aceves-Martins, E. Llauro, L. Tarro, R. Solà, M. Giralt, Obesity-promoting factors in Mexican children and adolescents: challenges and opportunities, *Glob. Health Action* 9 (2016) 29625, <https://doi.org/10.3402/gha.v9.29625>.
- [5] J.C. Boumat, C.W. Brown, Mitochondrial dysfunction in obesity, *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.* 17 (2010) 446–452, <https://doi.org/10.1097/MED.0b013e32833c3026>.
- [6] A. Mejía-Benítez, M. Klünder-Klünder, L. Yengo, D. Meyre, C. Aradillas, E. Cruz, E. Pérez-Luque, J.M. Malacara, M.E. Garay, J. Peralta-Romero, S. Flores-Huerta, J. García-Mena, P. Froguel, M. Cruz, A. Bonnefond, Analysis of the contribution of FTO, NPC1, ENPP1, NEGR1, GNPDA2 and MC4R genes to obesity in Mexican children, *BMC Med. Genet.* 14 (2013) 21, <https://doi.org/10.1186/1471-2350-14-21>.
- [7] M. Ulloa-Martínez, A.I. Burguete-García, S. Murugesan, C. Hoyo-Vadillo, M. Cruz-Lopez, J. García-Mena, Expression of candidate genes associated with obesity in peripheral white blood cells of Mexican children, *Arch. Med. Sci.* 12 (2016) 968–976, <https://doi.org/10.5114/aoms.2016.58126>.
- [8] S. Murugesan, K. Nirmalkar, C. Hoyo-Vadillo, M. García-Espitia, D. Ramírez-Sánchez, J. García-Mena, Gut microbiome production of short-chain fatty acids and obesity in children, *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 37 (2018) 621–625, <https://doi.org/10.1007/s10096-017-3143-0>.
- [9] M.E. Icaza-Chávez, Gut microbiota in health and disease, *Rev. Gastroenterol. México* 78 (2013) 240–248, <https://doi.org/10.1016/j.rgm.2013.04.004>.
- [10] M. Rosenbaum, R. Knight, R.L. Leibel, The gut microbiota in human energy homeostasis and obesity, *Trends Endocrinol. Metabol.* 26 (2015) 493–501, <https://doi.org/10.1016/j.tem.2015.07.002>.
- [11] S. Murugesan, M. Ulloa-Martínez, H. Martínez-Rojano, F.M. Galván-Rodríguez, C. Miranda-Brito, M.C. Romano, A. Piña-Escobedo, M.L. Pizano-Zárate, C. Hoyo-Vadillo, J. García-Mena, 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.* 34 (2015) 1337–1346, <https://doi.org/10.1007/s10096-015-2355-4>.
- [12] J. Li, H. Jia, X. Cai, H. Zhong, Q. Feng, S. Sunagawa, M. Arumugam, J.R. Kultrima, E. Pridi, T. Nielsen, A.S. Juncker, C. Manichanh, B. Chen, W. Zhang, F. Levenez, J. Wang, X. Xu, L. Xiao, S. Liang, D. Zhang, Z. Zhang, W. Chen, H. Zhao, J.Y. Al-Aama, S. Edris, H. Yang, J. Wang, T. Hansen, H.B. Nielsen, S. Brunak, K. Kristiansen, F. Guamer, O. Pedersen, J. Doré, S.D. Ehrlich, P. Bork, J. Wang, J. Wang, MetaHT Consortium, An integrated catalog of reference genes in the human gut microbiome, *Nat. Biotechnol.* 32 (2014) 834–841, <https://doi.org/10.1038/nbt.2942>.
- [13] F.F. Anhe, T.V. Varin, M. Le Barz, Y. Desjardins, E. Levy, D. Roy, A. Marette, Gut microbiota dysbiosis in obesity-linked metabolic diseases and prebiotic potential of polyphenol-rich extracts, *Curr. Obes. Rep.* 4 (2015) 389–400, <https://doi.org/10.1007/s13679-015-0172-9>.
- [14] P.J. Parekh, L.A. Balart, D.A. Johnson, The influence of the gut microbiome on obesity, metabolic syndrome and gastrointestinal disease, *Clin. Transl. Gastroenterol.* 6 (2015) e91, <https://doi.org/10.1038/ctg.2015.16>, e91.
- [15] H. Li, Diet, gut microbiota and obesity, *J. Nutr. Heal. Food Sci.* 3 (2015) 01–06, <https://doi.org/10.15226/jnhfs.2015.00150>.
- [16] C.L. Boulangé, A.L. Neves, J. Chilloux, J.K. Nicholson, M.-E. Dumas, Impact of the gut microbiota on inflammation, obesity, and metabolic disease, *Genome Med.* 8 (2016) 42, <https://doi.org/10.1186/s13073-016-0303-2>.
- [17] J. Wang, H. Jia, Metagenome-wide association studies: fine-mining the microbiome, *Nat. Rev. Microbiol.* 14 (2016) 508–522, <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.83>.
- [18] J. Qin, Y. Li, Z. Cai, S. Li, J. Zhu, F. Zhang, S. Liang, W. Zhang, Y. Guan, D. Shen, Y. Peng, D. Zhang, Z. Jie, W. Wu, Y. Qin, W. Xue, J. Li, L. Han, D. Lu, P. Wu, Y. Dai, X. Sun, Z. Li, A. Tang, S. Zhong, X. Li, W. Chen, R. Xu, M. Wang, Q. Feng, M. Gong, J. Yu, Y. Zhang, M. Zhang, T. Hansen, G. Sanchez, J. Raes, G. Falony, S. Okuda, M. Almeida, E. LeChatelier, P. Renault, N. Pons, J.-M. Batto, Z. Zhang,

- H. Chen, R. Yang, W. Zheng, S. Li, H. Yang, J. Wang, S.D. Ehrlich, R. Nielsen, O. Pedersen, K. Kristiansen, J. Wang, A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes, *Nature* 490 (2012) 55–60, <https://doi.org/10.1038/nature11450>.
- [19] Q. Feng, S. Liang, H. Jia, A. Stadlmayr, L. Tang, Z. Lan, D. Zhang, H. Xia, X. Xu, Z. Jie, L. Su, X. Li, X. Li, J. Li, L. Xiao, U. Huber-Schönauer, D. Niederseer, X. Xu, J.Y. Al-Aama, H. Yang, J. Wang, K. Kristiansen, M. Arumugam, H. Tilg, C. Datz, J. Wang, Gut microbiome development along the colorectal adenoma-carcinoma sequence, *Nat. Commun.* 6 (2015) 6528, <https://doi.org/10.1038/ncomms7528>.
- [20] X. Zhang, D. Zhang, H. Jia, Q. Feng, D. Wang, D. Liang, X. Wu, J. Li, L. Tang, Y. Li, Z. Lan, B. Chen, Y. Li, H. Zhong, H. Xie, Z. Jie, W. Chen, S. Tang, X. Xu, X. Wang, X. Cai, S. Liu, Y. Xia, J. Li, X. Qiao, J.Y. Al-Aama, H. Chen, L. Wang, Q.-J. Wu, F. Zhang, W. Zheng, Y. Li, M. Zhang, G. Luo, W. Xue, L. Xiao, J. Li, W. Chen, X. Xu, Y. Yin, H. Yang, J. Wang, K. Kristiansen, L. Liu, T. Li, Q. Huang, Y. Li, J. Wang, The oral and gut microbiomes are perturbed in rheumatoid arthritis and partly normalized after treatment, *Nat. Med.* 21 (2015) 895–905, <https://doi.org/10.1038/nm.3914>.
- [21] A. Cottillard, S.P. Kennedy, L.C. Kong, E. Prifti, N. Pons, E. Le Chatelier, M. Almeida, B. Quinquis, F. Levenez, N. Galleron, S. Gougis, S. Rizkalla, J.-M. Batto, P. Renault, J. ANR MicroObes consortium, J. Doré, J.-D. Zucker, K. Clément, S.D. Ehrlich, Dietary intervention impact on gut microbial gene richness, *Nature* 500 (2013) 585–588, <https://doi.org/10.1038/nature12480>.
- [22] E. Le Chatelier, T. Nielsen, J. Qin, E. Prifti, F. Hildebrand, G. Falony, M. Almeida, M. Arumugam, J.-M. Batto, S. Kennedy, P. Leonard, J. Li, K. Burgdorf, N. Grarup, T. Jørgensen, I. Brandslund, H.B. Nielsen, A.S. Juncker, M. Bertalan, F. Levenez, N. Pons, S. Rasmussen, S. Sunagawa, J. Tap, S. Tims, E.G. Zoetendal, S. Brunak, K. Clément, J. Doré, M. Kleerebezem, K. Kristiansen, P. Renault, T. Sicheritz-Ponten, W.M. de Vos, J.-D. Zucker, J. Raes, T. Hansen, P. MetaHIT consortium, P. Bork, J. Wang, S.D. Ehrlich, O. Pedersen, Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers, *Nature* 500 (2013) 541–546, <https://doi.org/10.1038/nature12506>.
- [23] R.H. Ramirez-Gonzalez, R.M. Leggett, D. Waite, A. Thanki, N. Drou, M. Caccamo, R. Davey, StatsDB: platform-agnostic storage and understanding of next generation sequencing run metrics, *F1000Research* 2 (2013) 248, <https://doi.org/10.12688/f1000research.2-248.v2>.
- [24] A.M. Bolger, M. Lohse, B. Usadel, Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data, *Bioinformatics* 30 (2014) 2114–2120, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>.
- [25] W.J. Kent, C.W. Sugnet, T.S. Furey, K.M. Roskin, T.H. Pringle, A.M. Zahler, D. Haussler, The human genome browser at UCSC, *Genome Res.* 12 (2002) 996–1006, <https://doi.org/10.1101/gr.229102>.
- [26] B. Langmead, S.L. Salzberg, Fast gapped-read alignment with Bowtie 2, *Nat. Methods* 9 (2012) 357–359, <https://doi.org/10.1038/nmeth.1923>.
- [27] D.T. Truong, E.A. Franzosa, T.L. Tickle, M. Scholz, G. Weingart, E. Pasolli, A. Tett, C. Huttenhower, N. Segata, MetaPhlan2 for enhanced metagenomic taxonomic profiling, *Nat. Methods* 12 (2015) 902–903, <https://doi.org/10.1038/nmeth.3589>.
- [28] S. Abubucker, N. Segata, J. Goll, A.M. Schubert, J. Izard, B.L. Cantarel, B. Rodriguez-Mueller, J. Zucker, M. Thiagarajan, B. Henrissat, O. White, S.T. Kelley, B. Methe, P.D. Schloss, D. Gevers, M. Mitreva, C. Huttenhower, Metabolic reconstruction for metagenomic data and its application to the human microbiome, *PLoS Comput. Biol.* 8 (2012), <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002358> e1002358.
- [29] M. Kanehisa, S. Goto, M. Furumichi, M. Tanabe, M. Hirakawa, KEGG for representation and analysis of molecular networks involving diseases and drugs, *Nucleic Acids Res.* 38 (2010) D355–D360, <https://doi.org/10.1093/nar/gkp896>.
- [30] N. Segata, J. Izard, L. Waldron, D. Gevers, L. Miropolsky, W.S. Garrett, C. Huttenhower, Metagenomic biomarker discovery and explanation, *Genome Biol.* 12 (2011) R60, <https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-6-r60>.
- [31] S. Rappelli, M. Soverini, S. Turroni, S. Quercia, E. Biagi, P. Brigidi, M. Candela, ViromeScan: a new tool for metagenomic viral community profiling, *BMC Genomics* 17 (2016) 165, <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2446-3>.
- [32] M. Arumugam, J. Raes, E. Pelletier, D. Le Paslier, T. Yamada, D.R. Mende, G.R. Fernandes, J. Tap, T. Bruls, J.-M. Batto, M. Bertalan, N. Borruel, F. Casellas, L. Fernandez, L. Gautier, T. Hansen, M. Hattori, T. Hayashi, M. Kleerebezem, K. Kurokawa, M. Leclerc, F. Levenez, C. Manichanh, H.B. Nielsen, T. Nielsen, N. Pons, J. Poulain, J. Qin, T. Sicheritz-Ponten, S. Tims, D. Torrents, E. Ugarte, E.G. Zoetendal, J. Wang, F. Guarner, O. Pedersen, W.M. de Vos, S. Brunak, J. Doré, M. Antolin, F. Artigunave, H.M. Blottiere, M. Almeida, C. Brechot, C. Cara, C. Chervaux, A. Cultrone, C. Delorme, G. Denariatz, R. Dervyn, K.U. Foerster, C. Friss, M. van de Guchte, E. Guedon, F. Haimet, W. Huber, J. van Hylckama-Vlieg, A. Jamet, C. Juste, G. Kaci, J. Knol, O. Lakhdari, S. Layec, K. Le Roux, E. Maguin, A. Mérieux, R. Melo Minardi, C. Mrini, J. Muller, R. Oozeer, J. Parkhill, P. Renault, M. Rescigno, N. Sanchez, S. Sunagawa, A. Torrejon, K. Turner, G. Vandemulebrouck, E. Varela, Y. Winogradsky, G. Zeller, J. Weissenbach, S.D. Ehrlich, P. Bork, Enterotypes of the human gut microbiome, *Nature* 473 (2011) 174–180, <https://doi.org/10.1038/nature09944>.
- [33] X.C. Morgan, T.L. Tickle, H. Sokol, D. Gevers, K.L. Devaney, D. V Ward, J.A. Reyes, S.A. Shah, N. Lelito, S.B. Snapper, A. Bousvaros, J. Korzenik, B.E. Sands, R.J. Xavier, C. Huttenhower, Dysfunction of the intestinal microbiome in inflammatory bowel disease and treatment, *Genome Biol.* 13 (2012) R79, <https://doi.org/10.1186/gb-2012-13-9-r79>.
- [34] J.R. Kultima, L.P. Coelho, K. Forslund, J. Huerta-Cepas, S.S. Li, M. Driessen, A.Y. Voigt, G. Zeller, S. Sunagawa, P. Bork, MOCAT2: a metagenomic assembly, annotation and profiling framework, *Bioinformatics* 32 (2016) 2520–2523, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw183>.
- [35] W. Zhu, A. Lomsadze, M. Borodovsky, Ab initio gene identification in metagenomic sequences, *Nucleic Acids Res.* 38 (2010) e132, <https://doi.org/10.1093/nar/gkq275>.
- [36] OBESITY Update, 2014, <http://www.oecd.org/els/health-systems/Obesity-Update-2014.pdf>. (Accessed 16 May 2018).
- [37] S. Murugesan, K. Nirmalkar, M. Garcia Espitia, M.L. Pizano-Zarate, C. Hoyo-Vadillo, J. Garcia-Mena, Current insight into the role of gut microbiota in Mexican childhood obesity, *SOJ Pharm. Sci.* 4 (2017) 1–5, <https://doi.org/10.15226/2374-6866/4/1/00153>.
- [38] Z. Karjala, D. Neal, J. Rohrer, Association between HSV1 seropositivity and obesity: data from the National health and nutritional examination survey, 2007–2008, *PLoS One* 6 (2011), e19092, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019092>.
- [39] B.E. Dutilh, N. Cassman, K. McNair, S.E. Sanchez, G.G.Z. Silva, L. Boling, J.J. Barr, D.R. Speth, V. Seguritan, R.K. Aziz, B. Felts, E.A. Dinsdale, J.L. Mokili, R.A. Edwards, A highly abundant bacteriophage discovered in the unknown sequences of human faecal metagenomes, *Nat. Commun.* 5 (2014) 4498, <https://doi.org/10.1038/ncomms5498>.
- [40] M. Million, M. Maraninchi, M. Henry, F. Armougom, H. Richey, P. Carrieri, R. Valero, D. Raccach, B. Viallettes, D. Raoult, Obesity-associated gut microbiota is enriched in *Lactobacillus reuteri* and depleted in *Bifidobacterium animalis* and *Methanobrevibacter smithii*, *Int. J. Obes.* 36 (2012) 817–825, <https://doi.org/10.1038/ijo.2011.153>.
- [41] B.S. Samuel, E.E. Hansen, J.K. Manchester, P.M. Coutinho, B. Henrissat, R. Fulton, P. Latreille, K. Kim, R.K. Wilson, J.I. Gordon, Genomic and metabolic adaptations of *Methanobrevibacter smithii* to the human gut, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104 (2007) 10643–10648, <https://doi.org/10.1073/pnas.0704189104>.
- [42] R. Mathur, G. Kim, W. Morales, J. Sung, E. Rooks, V. Pokkunuri, S. Weitsman, G.M. Barlow, C. Chang, M. Pimentel, Intestinal *Methanobrevibacter smithii* but not total bacteria is related to diet-induced weight gain in rats, *Obesity* 21 (2013) 748–754, <https://doi.org/10.1002/oby.20277>.
- [43] A.M. Castro, L.E. Macedo-de la Concha, C.A. Pantoja-Meléndez, Low-grade inflammation and its relation to obesity and chronic degenerative diseases, *Rev. Médica Del Hosp. Gen. México.* 80 (2017) 101–105, <https://doi.org/10.1016/j.hgmx.2016.06.011>.
- [44] C. Bang, K. Weidenbach, T. Gutsmann, H. Heine, R.A. Schmitz, The intestinal archaea *Methanosphaera stadtmanae* and *Methanobrevibacter smithii* activate human dendritic cells, *PLoS One* 9 (2014), e99411, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099411>.
- [45] C. Hoffmann, S. Dollive, S. Grunberg, J. Chen, H. Li, G.D. Wu, J.D. Lewis, F.D. Bushman, Archaea and fungi of the human gut microbiome: correlations with diet and bacterial residents, *PLoS One* 8 (2013), <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066019> e66019.
- [46] R. Mathur, M. Amichai, K.S. Chua, J. Mirocha, G.M. Barlow, M. Pimentel, Methane and hydrogen positivity on breath test is associated with greater body mass index and body fat, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 98 (2013) E698–E702, <https://doi.org/10.1210/jc.2012-3144>.
- [47] C.A. Mbakwa, J. Penders, P.H. Savelkoul, C. Thijs, P.C. Dagnelie, M. Mommers, I.C.W. Arts, Gut colonization with *methanobrevibacter smithii* is associated with childhood weight development, *Obesity* 23 (2015) 2508–2516, <https://doi.org/10.1002/oby.21266>.
- [48] M.Y. Lim, M. Rho, Y.-M. Song, K. Lee, J. Sung, G. Ko, Stability of gut enterotypes in Korean monozygotic twins and their association with biomarkers and diet, *Sci. Rep.* 4 (2014) 7348, <https://doi.org/10.1038/srep07348>.
- [49] B. Flemer, D.B. Lynch, J.M.R. Brown, I.B. Jeffery, F.J. Ryan, M.J. Claesson, M. O'Riordan, F. Shanahan, P.W. O'Toole, Tumour-associated and non-tumour-associated microbiota in colorectal cancer, *Gut* 66 (2017) 633–643, <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-309595>.
- [50] A.C.F. de Moraes, G.R. Fernandes, I.T. da Silva, B. Almeida-Pititto, E.P. Gomes, A. da C. Pereira, S.R.G. Ferreira, Enterotype may drive the dietary-associated cardiometabolic risk factors, *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 7 (2017) 47, <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00047>.
- [51] D. Compare, A. Rocco, M. Sanduzzi Zamparelli, G. Nardone, The gut bacteria-driven obesity development, *Dig. Dis.* 34 (2016) 221–229, <https://doi.org/10.1159/000443356>.
- [52] E.L. Johnson, S.L. Heaver, W.A. Walters, R.E. Ley, Microbiome and metabolic disease: revisiting the bacterial phylum Bacteroidetes, *J. Mol. Med.* 95 (2017) 1–8.
- [53] K. Yoda, X. Sun, M. Kawase, A. Kubota, K. Miyazawa, G. Harata, M. Hosoda, M. Hiramatsu, F. He, M.B. Zemel, A combination of probiotics and whey proteins enhances anti-obesity effects of calcium and dairy products during nutritional energy restriction in aP2-agouti transgenic mice, *Br. J. Nutr.* 113 (2015) 1689–1696, <https://doi.org/10.1017/S0007114515000914>.
- [54] P. Louis, H.J. Flint, Formation of propionate and butyrate by the human colonic microbiota, *Environ. Microbiol.* 19 (2017) 29–41, <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13589>.
- [55] B. van den Bogert, M. Meijerink, E.G. Zoetendal, J.M. Wells, M. Kleerebezem, Immunomodulatory properties of *Streptococcus* and *Veillonella* isolates from the human small intestine microbiota, *PLoS One* 9 (2014), e114277, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114277>.

- [56] C.-S. Kim, H.-S. Park, T. Kawada, J.-H. Kim, D. Lim, N.E. Hubbard, B.-S. Kwon, K.L. Erickson, R. Yu, Circulating levels of MCP-1 and IL-8 are elevated in human obese subjects and associated with obesity-related parameters, *Int. J. Obes.* 30 (2006) 1347–1355, <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0803259>.
- [57] L.J. El-Kadre, A.C.A. Tinoco, Interleukin-6 and obesity: the crosstalk between intestine, pancreas and liver, *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 16 (2013) 564–568, <https://doi.org/10.1097/MCO.0b013e32836410e6>.
- [58] K. Gotoh, K. Fujiwara, M. Anai, M. Okamoto, T. Masaki, T. Kakuma, H. Shibata, Role of spleen-derived IL-10 in prevention of systemic low-grade inflammation by obesity [Review], *Endocr. J.* 64 (2017) 375–378, <https://doi.org/10.1507/endocrj.E17-0060>.
- [59] L.V. Holdeman, W.E.C. Moore, New genus, *Coproccoccus*, twelve new species, and emended descriptions of four previously described species of bacteria from human feces, *Int. J. Syst. Bacteriol.* 24 (1974) 260–277, <https://doi.org/10.1099/00207713-24-2-260>.
- [60] D. Kritchevsky, S.A. Tepper, J.A. Story, The effect of two substituted valeric acid derivatives on cholesterol metabolism in rats, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 145 (1974) 12–17, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4812849>. (Accessed 10 May 2018).
- [61] T. de Wouters, J. Doré, P. Lepage, Does our food (environment) change our gut microbiome ('In-Vironment'): a potential role for inflammatory bowel disease? *Dig. Dis.* 30 (2012) 33–39, <https://doi.org/10.1159/000342595>.
- [62] H. Sakon, F. Nagai, M. Morotomi, R. Tanaka, *Sutterella parvirubra* sp. nov. and *Megamonas funiformis* sp. nov., isolated from human faeces, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58 (2008) 970–975, <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65456-0>.
- [63] M.E. Mejía-León, J.F. Petrosino, N.J. Ajami, M.G. Domínguez-Bello, A.M.C. de la Barca, Fecal microbiota imbalance in Mexican children with type 1 diabetes, *Sci. Rep.* 4 (2014) 3814, <https://doi.org/10.1038/srep03814>.
- [64] X. Zhang, D. Shen, Z. Fang, Z. Jie, X. Qiu, C. Zhang, Y. Chen, L. Ji, Human gut microbiota changes reveal the progression of glucose intolerance, *PLoS One* 8 (2013), e71108, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071108>.
- [65] O. Polansky, Z. Sekelova, M. Faldynova, A. Sebkova, F. Sisak, I. Rychlik, Important metabolic pathways and biological processes expressed by chicken cecal microbiota, *Appl. Environ. Microbiol.* 82 (2015) 1569–1576, <https://doi.org/10.1128/AEM.03473-15>.
- [66] H.M. Mizorko, Enzymes of the mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis, *Arch. Biochem. Biophys.* 505 (2011) 131–143, <https://doi.org/10.1016/j.abb.2010.09.028>.
- [67] R.N. Alogja, Y. Fan, Z. Chen, L.-W. Liu, Y.-J. Zhao, J. Li, Y. Chen, M.-D. Lai, P. Li, L.-W. Qi, Significant pharmacokinetic differences of berberine are attributable to variations in gut microbiota between Africans and Chinese, *Sci. Rep.* 6 (2016) 27671, <https://doi.org/10.1038/srep27671>.
- [68] M.A.R. Vinolo, H.G. Rodrigues, R.T. Nachbar, R. Curi, Regulation of inflammation by short chain fatty acids, *Nutrients* 3 (2011) 858–876, <https://doi.org/10.3390/nu3100858>.
- [69] P.J. Turnbaugh, M. Hamady, T. Yatsunenko, B.L. Cantarel, A. Duncan, R.E. Ley, M.L. Sogin, W.J. Jones, B.A. Roe, J.P. Affourtit, M. Egholm, B. Henrisson, A.C. Heath, R. Knight, J.J. Gordon, A core gut microbiome in obese and lean twins, *Nature* 457 (2009) 480–484, <https://doi.org/10.1038/nature07540>.
- [70] S. Michail, M. Lin, M.R. Frey, R. Fanter, O. Paliy, B. Hilbush, N. V. Reo, Altered gut microbial energy and metabolism in children with non-alcoholic fatty liver disease, *FEMS Microbiol. Ecol.* 91 (2015) 1–9, <https://doi.org/10.1093/femsec/fiu002>.
- [71] M.L. Cárdenas, A. Cornish-Bowden, T. Ureta, Evolution and regulatory role of the hexokinases, *Biochim. Biophys. Acta* 1401 (1998) 242–264, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9540816>. (Accessed 10 May 2018).
- [72] L. Zhang, H.T. Li, L. Shen, Q.C. Fang, L.L. Qian, W.P. Jia, Effect of dietary resistant starch on prevention and treatment of obesity-related diseases and its possible mechanisms, *Biomed. Environ. Sci.* 28 (2015) 291–297, <https://doi.org/10.3967/bes2015.040>.
- [73] X. Si, P. Strappe, C. Blanchard, Z. Zhou, Enhanced anti-obesity effects of complex of resistant starch and chitosan in high fat diet fed rats, *Carbohydr. Polym.* 157 (2017) 834–841, <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.10.042>.
- [74] C.L.J. Karlsson, J. Onnerfält, J. Xu, G. Molin, S. Ahrné, K. Thorngren-Jerneck, The microbiota of the gut in preschool children with normal and excessive body weight, *Obesity* 20 (2012) 2257–2261, <https://doi.org/10.1038/oby.2012.110>.
- [75] A. Andoh, A. Nishida, K. Takahashi, O. Inatomi, H. Imaeda, S. Bamba, K. Kito, M. Sugimoto, T. Kobayashi, Comparison of the gut microbial community between obese and lean peoples using 16S gene sequencing in a Japanese population, *J. Clin. Biochem. Nutr.* 59 (2016) 65–70, <https://doi.org/10.3164/jcbn.15-152>.
- [76] T. Sen, C.R. Cawthon, B.T. Ihde, A. Hajnal, P.M. DiLorenzo, C.B. de La Serre, K. Czaja, Diet-driven microbiota dysbiosis is associated with vagal remodeling and obesity, *Physiol. Behav.* 173 (2017) 305–317, <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.02.027>.
- [77] I. Nadal, A. Santacruz, A. Marcos, J. Warnberg, J.M. Garagorri, M. Garagorri, L.A. Moreno, M. Martín-Matillas, C. Campoy, A. Martí, A. Molerés, M. Delgado, O.L. Veiga, M. García-Fuentes, C.G. Redondo, Y. Sanz, Shifts in clostridia, bacteroides and immunoglobulin-coating fecal bacteria associated with weight loss in obese adolescents, *Int. J. Obes.* 33 (2009) 758–767, <https://doi.org/10.1038/ijo.2008.260>.
- [78] J.-Y. Yang, Y.-S. Lee, Y. Kim, S.-H. Lee, S. Ryu, S. Fukuda, K. Hase, C.-S. Yang, H.S. Lim, M.-S. Kim, H.-M. Kim, S.-H. Ahn, B.-E. Kwon, H.-J. Ko, M.-N. Kweon, Gut commensal *Bacteroides acidifaciens* prevents obesity and improves insulin sensitivity in mice, *Mucosal Immunol.* 10 (2017) 104–116, <https://doi.org/10.1038/mi.2016.42>.
- [79] L.K. Brahe, E. Le Chatelier, E. Prifti, N. Pons, S. Kennedy, T. Hansen, O. Pedersen, A. Astrup, S.D. Ehrlich, L.H. Larsen, Specific gut microbiota features and metabolic markers in postmenopausal women with obesity, *Nutr. Diabetes* 5 (2015) e159, <https://doi.org/10.1038/nutd.2015.9>.
- [80] B.A. Degnan, S. Macfarlane, M.E. Quigley, G.T. Macfarlane, Starch utilization by *Bacteroides ovatus* isolated from the human large intestine, *Curr. Microbiol.* 34 (1997) 290–296, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9099629>. (Accessed 10 May 2018).
- [81] C. Chassard, E. Delmas, P.A. Lawson, A. Bernalier-Donadille, *Bacteroides xylanisolvens* sp. nov., a xylan-degrading bacterium isolated from human faeces, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58 (2008) 1008–1013, <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65504-0>.
- [82] Y.L. Song, C.X. Liu, M. McTeague, S.M. Finegold, "Bacteroides nordii" sp. nov. and "Bacteroides salyersae" sp. nov. isolated from clinical specimens of human intestinal origin, *J. Clin. Microbiol.* 42 (2004) 5565–5570, <https://doi.org/10.1128/JCM.42.12.5565-5570.2004>.
- [83] J. Jalanka, A. Salonen, J. Salojärvi, J. Ritari, O. Immonen, L. Marciani, P. Gowland, C. Hoad, K. Garsed, C. Lam, A. Palva, R.C. Spiller, W.M. de Vos, Effects of bowel cleansing on the intestinal microbiota, *Gut* 64 (2015) 1562–1568, <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2014-307240>.
- [84] T. Nomura, T. Ohkusa, I. Okayasu, T. Yoshida, M. Sakamoto, H. Hayashi, Y. Benno, S. Hirai, M. Hojo, O. Kobayashi, T. Terai, H. Miwa, Y. Takei, T. Ogihara, N. Sato, Mucosa-associated bacteria in ulcerative colitis before and after antibiotic combination therapy, *Aliment. Pharmacol. Ther.* 21 (2005) 1017–1027, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2005.02428.x>.
- [85] Q. Zhang, Y. Wu, J. Wang, G. Wu, W. Long, Z. Xue, L. Wang, X. Zhang, X. Pang, Y. Zhao, L. Zhao, C. Zhang, Accelerated dysbiosis of gut microbiota during aggravation of DSS-induced colitis by a butyrate-producing bacterium, *Sci. Rep.* 6 (2016) 27572, <https://doi.org/10.1038/srep27572>.
- [86] F.E. Al-Otaibi, M.M. Al-Mohizea, Non-vertebral *Veillonella* species septicemia and osteomyelitis in a patient with diabetes: a case report and review of the literature, *J. Med. Case Rep.* 8 (2014) 365, <https://doi.org/10.1186/1752-1947-8-365>.
- [87] A.D. Kotic, D. Gevers, H. Siljander, T. Vatanen, T. Hyötyläinen, A.-M. Hämäläinen, A. Peet, V. Tillmann, P. Pöhö, J. Mattila, H. Lähdesmäki, E.A. Franzosa, O. Vaarala, M. de Goffau, H. Harmsen, J. Ilonen, S.M. Virtanen, C.B. Clish, M. Oresic, C. Huttenhower, M. Knip, R.J. DIABIMMUNE Study Group, R.J. Xavier, The dynamics of the human infant gut microbiome in development and in progression toward type 1 diabetes, *Cell Host Microbe* 17 (2015) 260–273, <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.01.001>.
- [88] J. Graessler, Y. Qin, H. Zhong, J. Zhang, J. Licinio, M.-L. Wong, A. Xu, T. Chavakis, A.B. Bornstein, M. Ehrhart-Bornstein, V. Lamounier-Zepter, T. Lohmann, T. Wolf, S.R. Bornstein, Metagenomic sequencing of the human gut microbiome before and after bariatric surgery in obese patients with type 2 diabetes: correlation with inflammatory and metabolic parameters, *Pharmacogenomics J.* 13 (2013) 514–522, <https://doi.org/10.1038/tpj.2012.43>.
- [89] C. Menni, M.A. Jackson, T. Pallister, C.J. Steves, T.D. Spector, A.M. Valdes, Gut microbiome diversity and high-fibre intake are related to lower long-term weight gain, *Int. J. Obes.* 41 (2017) 1099–1105, <https://doi.org/10.1038/ijo.2017.66>.
- [90] T. Iino, K. Mori, K. Tanaka, K. Suzuki, S. Harayama, *Oscillibacter valericigenes* gen. nov., sp. nov., a valerate-producing anaerobic bacterium isolated from the alimentary canal of a Japanese corbicula clam, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57 (2007) 1840–1845, <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64717-0>.
- [91] A. Willems, W.E. Moore, N. Weiss, M.D. Collins, Phenotypic and phylogenetic characterization of some *Eubacterium*-like isolates containing a novel type B wall murein from human feces: description of *Holdemania filiformis* gen. nov., sp. nov., *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47 (1997) 1201–1204, <https://doi.org/10.1099/00207713-47-4-1201>.
- [92] T. Kobayashi, T. Osaki, S. Oikawa, Use of T-RFLP and seven restriction enzymes to compare the faecal microbiota of obese and lean Japanese healthy men, *Benef. Microbes* 6 (2015) 735–745, <https://doi.org/10.3920/BM2014.0147>.
- [93] R.J. Gustafsson, B. Ohlsson, C. Benoni, B. Jeppsson, C. Olsson, Mucosa-associated bacteria in two middle-aged women diagnosed with collagenous colitis, *World J. Gastroenterol.* 18 (2012) 1628–1634, <https://doi.org/10.3748/wjg.v18.i14.1628>.
- [94] C.-M. Chiu, W.-C. Huang, S.-L. Weng, H.-C. Tseng, C. Liang, W.-C. Wang, T. Yang, T.-L. Yang, C.-T. Weng, T.-H. Chang, H.-D. Huang, Systematic analysis of the association between gut flora and obesity through high-throughput sequencing and bioinformatics approaches, *BioMed Res. Int.* 2014 (2014) 906168, <https://doi.org/10.1155/2014/906168>.