



VNIVERSITAT  
E VALÈNCIA

**FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA**

**DEPARTAMENTO DE PEDIATRÍA, OBSTETRICIA Y  
GINECOLOGÍA**

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN MEDICINA**

**TESIS DOCTORAL**

**¿Pueden los probióticos modificar las  
complicaciones asociadas a la obesidad infantil?**

Presentada por:

**Jesús Sanchis Chordà**

Dirigida por:

**Dra. D<sup>a</sup>. Pilar Codoñer Franch**

**Valencia, mayo 2022**



## TESIS DOCTORAL

### **¿Pueden los probióticos modificar las complicaciones asociadas a la obesidad infantil?**

Tesis presentada para optar al Grado de Doctor por Don Jesús Sanchis Chordà,  
Graduado en Nutrición Humana y Dietética, con DNI: 45795227-L

Firmado: Jesús Sanchis Chordà



Valencia, 9 de mayo de 2022

Directora:

Dra. D<sup>a</sup>. Pilar Codoñer Franch



**Dra. Pilar Codoñer Franch**, Doctora en Medicina y Cirugía y Profesora Titular del Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia.

**Informa que:** Jesús Sanchis Chordà, Graduado en Nutrición Humana y Dietética por la Universidad de Valencia, ha realizado bajo mi dirección, en el Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología de la facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia, el presente trabajo titulado: “¿Pueden los probióticos modificar las complicaciones asociadas a la obesidad infantil?”, y autorizo su presentación como Tesis Doctoral para optar al grado de Doctor.

Y, para que así conste a todos los efectos oportunos, expide y firma el presente informe, en Valencia a 9 de mayo de 2022:

Dra. Pilar Codoñer Franch

A handwritten signature in blue ink, consisting of a series of loops and a horizontal line extending to the left.



A Lucía, por compartir esta tesis conmigo. Gracias por aportar la motivación y el conocimiento imprescindibles para llegar hasta el final.

A Marco, mi hijo, por ser mi fuente de energía y felicidad.

A mis padres, por sacrificarse tanto por sus hijos.



# AGRADECIMIENTOS

Durante este tiempo, he conocido y aprendido de gente maravillosa, que se desvive por su trabajo, personas dispuestas a colaborar y ayudar desinteresadamente por la salud, el bienestar y el logro de otras personas. Gracias a todas y todos los que, de alguna manera, habéis estado conmigo durante la elaboración de esta tesis.

Mi agradecimiento más especial es para las tres mujeres que han hecho posible que esta tesis sea una realidad.

Mi directora, la Dra. Pilar Codoñer. La persona que me escuchó y me tendió la mano (su grupo, su consulta y su casa) en momentos complicados, que me aceptó tal y como soy y que me animó cuando las cosas se torcían. Gracias Pilar, por haberme enseñado el lado humano de la investigación, por apoyarme siempre y por confiar en mí. Gracias a ti también Elías, por tu ayuda con la estadística, por hacer las cosas fáciles y aportar siempre buen humor.

Mi madre, la persona que más ha hecho por mí a lo largo de mi vida. Trabajadora infatigable, siempre dispuesta a todo por sus hijos, siempre dando sin esperar nada a cambio. *Gràcies mare i pare per haver-ho donat tot pels vostres fills, sou un exemple per a mi de com he de criar i cuidar a Marco.*

Lucía, mi compañera de viaje, coautora de esta tesis y la fuerza impulsora para que finalmente esta tesis sea una realidad. Has sido y eres mi motor, quien mejor me conoce, me respeta, me apoya y me motiva. Juntos hemos hecho cosas bonitas y emocionantes, sin duda la mejor de todas, ser la mamá y el papá de nuestro pequeño Marco, que por fin podrá decir que papá también es doctor. Sois el motivo más bonito por el que una

persona puede vivir con alegría, levantarse cada día y sacrificarse para alcanzar nuevas metas.

Gracias a mis hermanos, porque sé, que cuando os necesito, estáis ahí.

Gracias a todo el *Pilar's group* (Ximo, María, Marie, Vanessa, Alan), por abrirme las puertas de vuestro grupo y devolverme las ganas de ser doctor. Especialmente a ti Ximo, por todos tus ánimos y tu ayuda incondicional.

Tula, mil gracias por todo, por lo profesional, pero sobre todo por lo personal. Gracias por cuidar tanto de nosotros. Eternamente agradecidos.

A todos/as los y las trabajadores/as de Pediatría del Hospital Dr. Peset: Belén, Geno, Fina, Miguel... Gracias por vuestra ayuda desinteresada, sin ella no hubiésemos podido llegar hasta aquí.

A los niños y niñas y a sus familias, que han participado en el estudio. Gracias por haberme dedicado vuestro tiempo y confianza. Espero haberos ayudado una parte de lo que, poder conoceros y trataros en consulta, me ha ayudado a mí a crecer profesional y personalmente.

A mi gente querida del “mundo fútbol”, con los que he compartido trabajo y vida las últimas tres temporadas. He descubierto un mundo desconocido para mí, he formado una nueva “familia” en la Academia del Valencia C.F., que me hace disfrutar y mejorar cada día. Gracias por vuestro apoyo e insistencia para que acabase la tesis, especialmente a mi querido amigo y referente Miguel Alonso.

Esta tesis se inició en el IATA-CSIC, gracias a las personas que os portasteis tan bien conmigo e hicisteis todo lo posible para hacer los cambios necesarios y me ayudasteis a recuperar la alegría y las ganas de seguir adelante. Y, a las que pusisteis piedras en mi camino, también os digo, gracias. En esta vida aprendemos de todas las personas, unas nos enseñan qué queremos ser, y otras, qué tipo de profesional y persona no queremos ser.

Por último, agradecer la ayuda económica que recibí a través del Programa de Formación de Profesorado Universitario del actual Ministerio de Universidades, y que me ha permitido elaborar la presente tesis doctoral.

# ÍNDICE GENERAL

<b>RESUMEN.....</b>	<b>15</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>17</b>
<b>LISTA DE TABLAS.....</b>	<b>21</b>
<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>23</b>
<b>01. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>25</b>
1. OBESIDAD INFANTIL Y COMPLICACIONES ASOCIADAS .....	25
1.1. <i>Obesidad infantil: definición y situación actual.....</i>	25
1.2. <i>Factores causales de obesidad .....</i>	28
1.2.1. Patrón de alimentación .....	29
1.2.2. Ritmos circadianos y crononutrición .....	36
1.2.3. Actividad física .....	39
1.2.4. Teoría de los orígenes del desarrollo de la salud y la enfermedad .....	41
1.2.5. Nivel socioeconómico familiar.....	42
1.2.6. Genética.....	43
2. COMPLICACIONES ASOCIADAS A LA OBESIDAD.....	45
2.1. <i>Incremento del tejido adiposo .....</i>	45
2.2. <i>Inflamación crónica .....</i>	46
2.3. <i>Resistencia a la insulina.....</i>	50
2.4. <i>Síndrome metabólico en niños y adolescentes.....</i>	52
3. MICROBIOTA INTESTINAL .....	54
3.1. <i>Definiciones.....</i>	54
3.2. <i>Funciones.....</i>	55
3.3. <i>Factores que modulan la microbiota intestinal a lo largo de la vida.....</i>	56
3.3.1. La ventana de oportunidad .....	56
3.3.2. Gestación y parto .....	57
3.3.3. Lactancia.....	58
3.3.4. Alimentación.....	58

3.3.5. Fármacos .....	59
3.3.6. Entorno e higiene .....	60
3.3.7. Estrés crónico, ritmos circadianos y sedentarismo .....	60
3.4. <i>Disbiosis intestinal</i> .....	61
3.5. <i>Microbiota intestinal, obesidad y complicaciones asociadas: mecanismos principales</i> .....	62
3.5.1. Endotoxemia metabólica e inflamación crónica de bajo grado .....	64
3.5.2. Regulación del metabolismo energético .....	65
3.5.3. Regulación del apetito.....	67
4. PROBIÓTICOS .....	69
4.1. <i>Definición</i> .....	69
4.2. <i>Identificación de microorganismos probióticos: marco legislativo</i> .....	69
4.3. <i>Mecanismos de acción</i> .....	71
4.4. <i>Empleo de probióticos en la obesidad y complicaciones asociadas</i> .....	72
4.5. <i>Bifidobacterium pseudocatenulatum CECT 7765</i> .....	73
<b>02. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN.....</b>	<b>77</b>
1. JUSTIFICACIÓN.....	77
2. HIPÓTESIS.....	78
3. OBJETIVOS.....	78
<b>03. MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>81</b>
1. DISEÑO EXPERIMENTAL .....	81
1.1. <i>Tipo de estudio</i> .....	81
1.2. <i>Tamaño muestral y aleatorización</i> .....	81
1.3. <i>Población de estudio</i> .....	82
1.3.1. Criterios de inclusión.....	83
1.3.2. Criterios de exclusión.....	83
1.4. <i>Diseño del estudio</i> .....	84
2. EVALUACIÓN CLÍNICA Y ANTROPOMÉTRICA.....	87
3. PAUTAS DE ALIMENTACIÓN SALUDABLE.....	91
4. REGISTRO Y EVALUACIÓN DE LA INGESTA DIETÉTICA.....	94
5. PROBIÓTICO: PROPIEDADES, PEPARACIÓN, TRASLADO Y TOMA .....	96
6. DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS Y HORMONALES .....	98
7. ESTUDIO DE LA MICROBIOTA FECAL.....	100
8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	102
8.1. <i>Parámetros dietéticos, antropométricos y bioquímicos</i> .....	102
8.2. <i>Microbiota intestinal</i> .....	102

9. COMITÉ ÉTICO, CONFIDENCIALIDAD Y CONSENTIMIENTO INFORMADO	104
<b>04. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>105</b>
1. FLUJO DE PARTICIPANTES Y RECLUTAMIENTO	105
2. CARACTERÍSTICAS DE LOS PARTICIPANTES	107
3. EFECTO DEL PROBIÓTICO SOBRE PARÁMETROS ANTROPOMÉTRICOS	108
4. EFECTO DEL PROBIÓTICO SOBRE MARCADORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR	113
5. EFECTO DEL PROBIÓTICO SOBRE PARÁMETROS DE INFLAMACIÓN Y ADIPOCINAS	118
6. EFECTO DEL PROBIÓTICO SOBRE OTROS PARÁMETROS BIOQUÍMICOS	123
7. VALORACIÓN DE LA INGESTA DIETÉTICA INICIAL Y LOS CAMBIOS DIETÉTICOS EXPERIMENTADOS TRAS LA INTERVENCIÓN	124
8. CORRELACIONES ENTRE PARÁMETROS DIETÉTICOS Y ANTROPOMÉTRICOS EN EL MOMENTO INICIAL	133
9. EFECTO DE LAS RECOMENDACIONES DIETÉTICAS SOBRE DATOS ANTROPOMÉTRICOS, MARCADORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR Y DE INFLAMACIÓN	135
10. EFECTO DE LA INTERVENCIÓN SOBRE LA COMPOSICIÓN DE LA MICROBIOTA FECAL	138
<b>05. CONCLUSIONES</b>	<b>145</b>
<b>06. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>147</b>
<b>07. ANEXOS</b>	<b>175</b>
ANEXO 1. APROBACIÓN DEL COMITÉ CIENTÍFICO	176
ANEXO 2. DECLARACIÓN DE CONSENTIMIENTO INFORMADO	177
ANEXO 3. HOJA INFORMATIVA PARA LA RECOGIDA DE REGISTROS DIETÉTICOS	179
ANEXO 4. PUBLICACIÓN CIENTÍFICA	181



## INTRODUCCIÓN

En los últimos años, la microbiota intestinal se ha convertido en una novedosa y prometedora diana terapéutica para el tratamiento de la obesidad y enfermedades asociadas. Nuestra cepa de estudio, *Bifidobacterium pseudocatenulatum* CECT 7765, ha demostrado en repetidos estudios con modelos animales de obesidad que mejora alteraciones metabólicas e inmunológicas y restaura el daño vascular.

## HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Según nuestra hipótesis, los resultados obtenidos en modelos murinos, podrían ser reproducibles en humanos con el consumo regular de *B. pseudocatenulatum* CECT 7765, junto con la adopción de hábitos de alimentación saludables. El presente estudio clínico tiene como objetivo evaluar los efectos de la administración oral de este potencial probiótico sobre marcadores de inflamación y salud cardiovascular y, sobre la composición de la microbiota intestinal, en niños con obesidad y resistencia insulínica.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Estudio prospectivo, longitudinal, aleatorizado, doble ciego y controlado con placebo, durante 13 semanas. Una cohorte de 48 niños y adolescentes (7-16 años) con obesidad ( $z\text{-IMC} \geq 2$ ) y resistencia insulínica (índice HOMA-IR  $> 3,16$ ), se distribuyeron entre grupo probiótico (tomaron una dosis diaria de  $1 \times 10^{9-10}$  UFC) y grupo placebo. Todos recibieron idénticas pautas de alimentación basadas en la reducción de ultraprocesados y la promoción de alimentos frescos

y mínimamente procesados, como frutas, hortalizas y tubérculos. Al inicio y al final de la intervención se tomaron medidas antropométricas y bioquímicas a los participantes, y se analizó la ingesta dietética con un recordatorio de ingesta de alimentos de tres días.

## **RESULTADOS**

Se observó una disminución significativa en los niveles de PCR-us ( $P=0,026$ ) y MCP1 ( $P=0,032$ ), así como un aumento de c-HDL ( $P=0,035$ ) y omentina-1 ( $P=0,023$ ) en el grupo probiótico en comparación con el placebo. Ambos grupos experimentaron una disminución significativa del z-IMC después de la intervención, lo que sugiere que los cambios de peso están relacionados con el asesoramiento dietético. No existieron diferencias en la ingesta calórica y nutricional entre grupos. En cuanto a la microbiota intestinal, la administración de probióticos incrementó significativamente la proporción de miembros de la familia *Rikenellaceae*, particularmente del género *Alistipes*.

## **CONCLUSIONES**

Los efectos beneficiosos de la intervención sobre los marcadores inflamatorios y el perfil lipídico sugieren que la ingesta de *B. pseudocatenulatum* CECT 7765 junto con las recomendaciones dietéticas pueden mejorar el estado inflamatorio en niños con obesidad y resistencia insulínica. Estos efectos son paralelos al aumento de los grupos bacterianos asociados a un mayor porcentaje de masa magra. La modulación de la microbiota intestinal mediante la suplementación con probióticos, puede constituir una herramienta terapéutica eficaz para revertir, en parte, las alteraciones metabólicas e inflamatorias secundarias a la obesidad.

# LISTA DE ABREVIATURAS

25(OH)D	25-hidroxivitamina D
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AESAN	Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición
AGCC	Ácidos grasos de cadena corta
AGM	Ácidos grasos monoinsaturados
AGP	Ácidos grasos poliinsaturados
AGS	Ácidos grasos saturados
ALT	Alanina aminotransferasa
Apo A1	Apolipoproteína A1
Apo B	Apolipoproteína B
ARN	Ácido ribonucleico
ARNr	Ácido ribonucleico ribosomal
<i>B.</i>	<i>Bifidobacterium</i>
CCK	Colecistoquinina
CECT	Colección española de cultivos tipo
D-N	Dietista-Nutricionista
DE	Desviación estándar
DHA	Ácido docosahexaenoico
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
EFSA	Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria
ENSE	Encuesta Nacional de Salud España

EPA	Ácido eicosapentaenoico
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
FFAR	Receptores de ácidos grasos ( <i>Free Fatty Acid Receptor</i> )
FXR	Receptor farnesoide X
GABA	Ácido gamma-aminobutírico
GGT	Gamma-glutamil transferasa
GGT	Gamma-glutamil transpeptidasa
GLP-1	Péptido similar al glucagón tipo 1
GOT	Glutamato-oxalacetato transaminasa
GPBAR1	Receptor 1 de ácidos biliares acoplado a proteína G
GPR	Receptores acoplados a proteína G ( <i>G-protein-coupled receptor</i> )
GPT	Glutámico-pirúvica transaminasa
HC	Hidratos de carbono
HDL	Lipoproteína de alta densidad ( <i>High Density Lipoprotein</i> )
HOMA-IR	Modelo homeostático de evaluación de la resistencia a la insulina
HTA	Hipertensión arterial
IATA-CSIC	Instituto de Agroquímica y Tecnología de los Alimentos del Consejo Superior de Investigaciones Científicas
IL-10	Interleucina 10
IL-6	Interleucina 6
IMC	Índice de Masa Corporal
INR	Ingestas Nutricionales de Referencia
LDL	Lipoproteína de baja densidad ( <i>Low Density Lipoprotein</i> )
LPS	Lipopolisacárido bacteriano
MAP	Presión arterial media
MCP1	Proteína quimioatrayente de monocitos 1
NF-κB	Factor nuclear kappa B

OMS	Organización Mundial de la Salud
PA	Presión arterial
PCR	Proteína C Reactiva
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PCR-us	Proteína C reactiva ultrasensible
PRI	Ingestas de referencia de la población en Europa
PYY	Péptido tirosina-tirosina
QPS	Presunción cualificada de seguridad
RBP4	Proteína transportadora de retinol 4
RDA	Cantidad diaria recomendada en Estados Unidos
SM	Síndrome Metabólico
TAB	Tejido Adiposo Blanco
TAM	Tejido Adiposo Marrón
TLR2	Receptor 2 tipo Toll
TLR4	Receptor 4 tipo Toll
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa
UE	Unión Europea
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
VLDL	Lipoproteína de muy baja densidad ( <i>Very Low Density Lipoprotein</i> )
VSL#3	Combinación de ocho cepas diferentes de bacterias ácido-lácticas y bifidobacterias
W3	Omega 3
z-IMC	Puntuación z del IMC



# LISTA DE TABLAS

TABLA 1.1. RECOMENDACIONES DE PROTEÍNAS A LO LARGO DE LA VIDA SEGÚN LO DEFINIDO POR LA CANTIDAD DIARIA RECOMENDADA EN ESTADOS UNIDOS (RDA), LAS INGESTAS DE REFERENCIA DE LA POBLACIÓN EUROPEA (PRI) O LAS RECOMENDACIONES BASADAS EN INGESTAS CENTRADAS EN LOS MÚSCULOS.....	34
TABLA 1.2. PRINCIPALES CITOCINAS CON EFECTOS ANTIINFLAMATORIOS Y PROINFLAMATORIOS RELACIONADAS CON LAS COMPLICACIONES PROPIAS DE LA OBESIDAD .....	47
FIGURA 1.7. POSIBLES MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS PROBIÓTICOS .....	72
TABLA 5.1. CARACTERÍSTICAS DE LOS PARTICIPANTES DE CADA GRUPO .....	107
TABLA 5.2. PARÁMETROS ANTROPOMÉTRICOS ANTES Y DESPUÉS DE LA INTERVENCIÓN .	108
TABLA 5.3. MARCADORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR ANTES Y DESPUÉS DE LA INTERVENCIÓN .....	117
TABLA 5.4. PARÁMETROS DE INFLAMACIÓN ANTES Y DESPUÉS DE LA INTERVENCIÓN .....	122
TABLA 5.5. OTROS PARÁMETROS BIOQUÍMICOS ANTES Y DESPUÉS DE LA INTERVENCIÓN	122
TABLA 5.6. VALORES Y COMPARATIVA DE LA INGESTA DIETÉTICA BASAL Y FINAL DE LOS GRUPOS PLACEBO Y PROBIÓTICO .....	132
TABLA 5.7. CORRELACIONES ENTRE PARÁMETROS DIETÉTICOS Y ANTROPOMÉTRICOS EN EL MOMENTO INICIAL .....	133



# LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1. EVOLUCIÓN ENTRE 1987 Y 2017 DEL PORCENTAJE DE LA POBLACIÓN INFANTIL (2-17 AÑOS) QUE PADECE OBESIDAD Y EL QUE PRESENTA EXCESO DE PESO (OBESIDAD + SOBREPESO) SEGÚN SEXO Y AÑO DE ENCUESTA .....	28
FIGURA 1.2. INFLUENCIA DE LOS ZEITGEBERS (SINCRONIZADORES) SOBRE EL METABOLISMO CIRCADIANO. ADAPTADA DE GOMBERT Y COLABORADORES .....	37
FIGURA 1.3. FACTORES QUE DAN FORMA Y ALTERAN LA MICROBIOTA INTESTINAL A LO LARGO DE LA VIDA .....	61
FIGURA 1.4. DIFERENCIAS TAXONÓMICAS A NIVEL DE FILO, GÉNERO Y ESPECIE QUE CARACTERIZAN UNA “MICROBIOTA OBESOGÉNICA” .....	62
FIGURA 1.5. PRINCIPALES MECANISMOS QUE EXPLICAN LA RELACIÓN ENTRE DISBIOSIS MICROBIANA, OBESIDAD Y COMPLICACIONES ASOCIADAS .....	68
FIGURA 1.6. DIRECTRICES DE LA FAO/OMS PARA LA EVALUACIÓN DE LOS PROBIÓTICOS	70
FIGURA 3.1. CÁLCULO DEL TAMAÑO MUESTRAL PARA LA COMPARACIÓN DE DOS MUESTRAS UTILIZANDO EL EXCEL .....	82
FIGURA 3.2. DISEÑO DEL ESTUDIO .....	86
FIGURA 3.3. BALANZA ELECTRÓNICA TANITA (A) Y EJEMPLO DE LA FORMA DE VALORAR EL PESO EN UN NIÑO (B) .....	87
FIGURA 3.4. TALLÍMETRO HOLTAIN (A) Y EJEMPLO DE LA FORMA DE VALORAR LA TALLA EN UN NIÑO (B) .....	88
FIGURA 3.5. VALORES DE CORTE DEL IMC PARA LA EDAD DE LA OMS PARA DEFINIR LA OBESIDAD, EL SOBREPESO, LA DELGADEZ Y LA DELGADEZ EXTREMA EN NIÑOS EN EDAD ESCOLAR Y ADOLESCENTES; MUJERES Y VARONES .....	89
FIGURA 3.6. “EL PLATO PARA COMER SALUDABLE” ELABORADO POR LA ESCUELA DE SALUD PÚBLICA DE HARVARD .....	92

FIGURA 5.1. DIAGRAMA DE FLUJO DEL ESTUDIO .....	106
FIGURA 5.2. CAMBIOS EN LOS CUATRO ÍNDICES UTILIZADOS PARA VALORAR LA DIVERSIDAD ALFA DURANTE LA INTERVENCIÓN .....	139
FIGURA 5.3. CAMBIOS EN LA FAMILIA <i>RIKENELLACEAE</i> Y EN EL GÉNERO <i>ALISTIPES</i> DURANTE LA INTERVENCIÓN .....	141

# 01. INTRODUCCIÓN |

## 1. OBESIDAD INFANTIL Y COMPLICACIONES ASOCIADAS

---

### 1.1. OBESIDAD INFANTIL: DEFINICIÓN Y SITUACIÓN ACTUAL

**La obesidad** es un problema importante de salud pública a nivel mundial, tanto por su frecuencia como por sus repercusiones en la salud. En las últimas décadas se ha producido un rápido incremento de las tasas de obesidad en la práctica totalidad del mundo, en ambos sexos, en todas las clases sociales y en todas las edades (1–5). Según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (2018), la prevalencia del sobrepeso y la obesidad en niños y adolescentes (de 5 a 19 años) ha aumentado de forma espectacular, del 4% en 1975 a más del 18% en 2016 (4). En 2020, 158 millones de niños y adolescentes sufrían obesidad en el mundo. Pero, no solo eso, se espera que en 2030 esta cifra aumente hasta los 254 millones, según el Atlas mundial sobre obesidad infantil (6). De acuerdo con este informe, En España, el 18,6% de los niños de 5 a 9 años y el 11,6% de los niños de 10 a 19 años serían obesos para 2030.

El exceso de peso durante la niñez y la adolescencia es muy probable que conduzca al sobrepeso o la obesidad de por vida (2,7,8). Además, la obesidad infantil se asocia con un gran número de comorbilidades, como enfermedades cardiovasculares, aterosclerosis, hipertensión arterial (HTA), resistencia a la insulina, diabetes mellitus tipo 2 (DM2), asma, hígado graso no alcohólico o trastornos del sueño (2,3,9). Por último, no podemos pasar por alto los importantes efectos negativos que la obesidad puede provocar en la salud mental de los más jóvenes, como baja autoestima, trastornos de la alimentación,

depresión o reducción del logro educativo (2,3,9). Por todo ello, es muy importante centrar los esfuerzos en prevenir nuevos casos de obesidad infantojuvenil y evitar las complicaciones asociadas.

La OMS define el sobrepeso y la obesidad como una acumulación anormal o excesiva de grasa que puede ser perjudicial para la salud (4). Para su diagnóstico, el índice de masa corporal (IMC) ha sido el método más empleado durante las últimas décadas. Se trata de un indicador simple, aunque imperfecto, para estimar la grasa corporal que tiene una persona, y determinar por tanto si el peso está dentro del rango normal o si, por el contrario, se tiene sobrepeso, obesidad o delgadez.

En adultos, el IMC se calcula dividiendo el peso de una persona en kilos por el cuadrado de su talla en metros ( $\text{kg}/\text{m}^2$ ). Cuando una persona adulta tiene un IMC igual o superior a 25 se considera que padece sobrepeso y, cuando tiene un IMC igual o superior a 30 se considera que padece obesidad (4). En el caso de niños los valores de IMC deben ajustarse según su edad y sexo. De forma que, el sobrepeso y la obesidad se definen del siguiente modo teniendo en cuenta los patrones de crecimiento infantil de la OMS (4):

**En el caso de los niños menores de 5 años:**

- **Sobrepeso** = IMC superior a dos desviaciones típicas por encima de la media establecida para su edad y sexo (z-score) en los patrones de crecimiento infantil de la OMS.
- **Obesidad** = IMC superior a tres desviaciones típicas por encima de la media establecida para su edad y sexo (z-score) en los patrones de crecimiento infantil de la OMS.

**En el caso de los niños de 5 a 19 años:**

- **Sobrepeso** = IMC superior a una desviación típica por encima de la media establecida para su edad y sexo (z-score) en los patrones de crecimiento infantil de la OMS.
- **Obesidad** = IMC superior a dos desviaciones típicas por encima de la media establecida para su edad y sexo (z-score) en los patrones de crecimiento infantil de la OMS.

Sin embargo, tal y como hemos comentado, pese al uso generalizado del IMC para diagnosticar el sobrepeso y la obesidad, las revisiones sistemáticas sobre

el tema (10–12), muestran que el uso del IMC para definir la obesidad tiene una sensibilidad entre baja y moderada. Como resultado, las estimaciones de la prevalencia de obesidad basadas en el IMC son muy conservadoras en todas las edades y en ambos sexos (3,10–12). Tanto es así que, al menos entre el 25 - 50% de niños y adolescentes que tienen un IMC saludable para su edad, en realidad tienen exceso de grasa corporal (11,12). Y, alrededor de la mitad de los adultos con exceso de grasa corporal son clasificados como no obesos de acuerdo con el IMC (10). Además, la fiabilidad de los datos empeora mucho cuando los valores de IMC son auto-declarados, es decir, cuando es la propia persona la que informa sobre su talla y peso (13,14). Así pues, sabiendo que el IMC ha sido y es el indicador más empleado a nivel médico y científico, y que gracias a su simplicidad es posible llevar a cabo estudios epidemiológicos que nos permiten conocer la situación actual de la obesidad en cada país y a nivel mundial (2), también es pertinente tener en cuenta que, el uso del IMC tiene limitaciones y subestima la prevalencia real de sobrepeso y obesidad, especialmente cuando no se realizan las mediciones antropométricas directamente por parte de personal debidamente formado para ello.

**En España**, las cifras sobre la prevalencia de sobrepeso y obesidad varían considerablemente en función de los puntos de corte empleados y de la metodología utilizada. Según los datos del **estudio ALADINO** (Estudio de Alimentación, Actividad Física, Desarrollo Infantil y Obesidad en España, 2019), entre la población infantil española de 6 a 9 años la **prevalencia de sobrepeso fue del 23,3%** (21,9% en niños y 24,7% en niñas), y la **prevalencia de obesidad fue del 17,3%** (19,4% en niños y 15,0% en niñas), utilizando los estándares de crecimiento de la OMS. Dentro de la obesidad, un 4,2 % de los escolares estudiados presentan obesidad severa (9).

De acuerdo con los datos auto-declarados de la **Encuesta Nacional de Salud España (ENSE) de 2017** (15) llevada a cabo con población de **2 a 17 años de edad**; por un lado, la prevalencia de obesidad infantil se mantiene en cifras elevadas con un suave incremento entre 2003 y 2017. El **porcentaje de la población de 2 a 17 años con obesidad es del 10,30%**, ligeramente superior al de 2011 (9,56%). Desde 2003, en cada edición de la ENSE se ha producido un leve incremento (Figura 1.1). Por otro lado, el **18,26% de la población entre**

**2 y 17 años de edad tiene sobrepeso**, cifra idéntica a la encontrada en 2011. Tampoco existen diferencias entre sexos, aunque en el caso de las niñas, la cifra es mayor que la de 2011 mientras que entre los niños es menor. **La sobrecarga ponderal (obesidad + sobrepeso) afecta al 28,56%** (28,7% de los varones y 28,4% de las mujeres) (Figura 1.1).

En general, todos los estudios revelan un **aumento en el exceso de peso** en la población infantil de nuestro país (y del mundo).

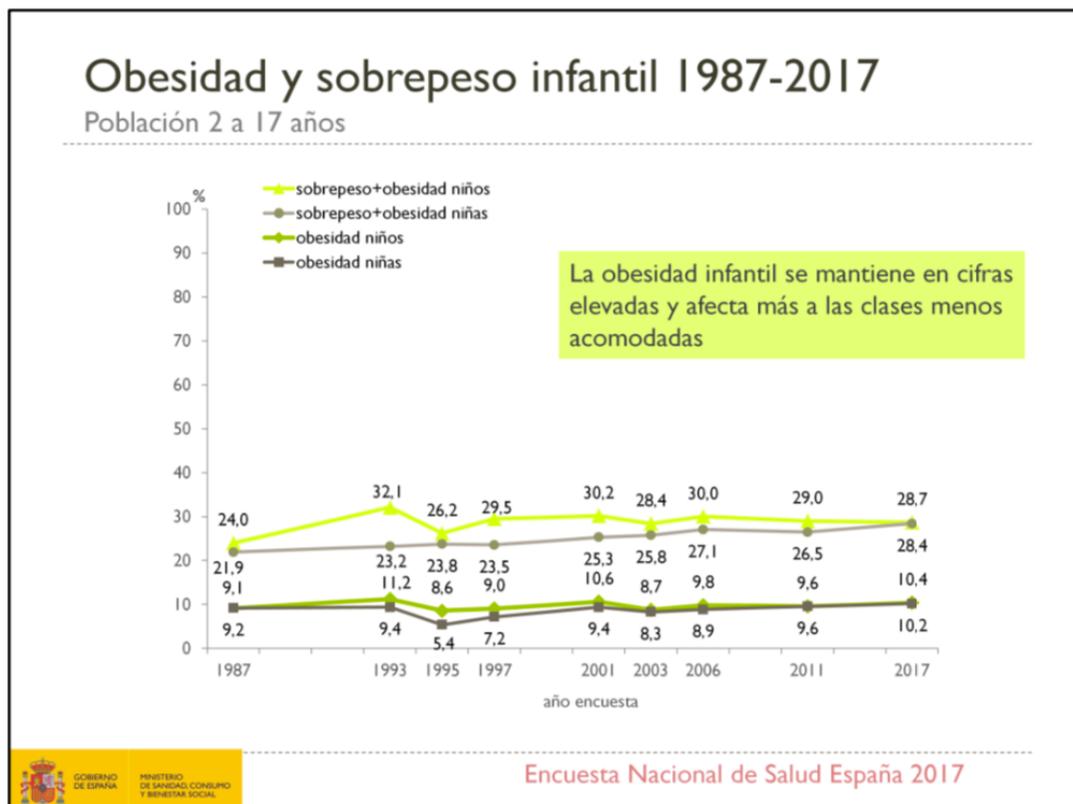


Figura 1.1. Evolución entre 1987 y 2017 del porcentaje de la población infantil (2-17 años) que padece obesidad y el que presenta exceso de peso (obesidad + sobrepeso) según sexo y año de encuesta (15).

## 1.2. FACTORES CAUSALES DE OBESIDAD

Si bien es cierto que existe evidencia científica sólida que respalda que la obesidad tiene un componente genético, no es menos cierto que, en la mayoría de las ocasiones, la interrelación con los factores ambientales: alimentación, actividad física, sueño, programación de la salud, posición socioeconómica,

gestión del estrés, estado mental y emocional, fármacos, etc. (16,17); resulta decisiva.

### **1.2.1. PATRÓN DE ALIMENTACIÓN**

Una alimentación malsana es uno de los principales factores en la génesis de la obesidad. Sin embargo, qué, cómo y cuándo comer se ha convertido en materia de controversia en los últimos años.

#### **LA FIJACIÓN EN LA RESTRICCIÓN CALÓRICA**

El tratamiento tradicional propuesto para la pérdida de peso se ha centrado en la **prescripción de dietas con conteo y restricción calórica**. Este enfoque ha mostrado ser válido para lograr resultados a corto plazo, pero no a largo plazo (18–20). Es más, el 90-95% de individuos que siguen dietas para bajar de peso, recuperan el peso perdido al cabo del tiempo y, a veces, acaban con más peso del que empezaron la dieta (16). Para el mantenimiento de peso a largo plazo, llevar a cabo un patrón de alimentación saludable resulta lo más efectivo (18). Además, el consumo de alimentos *Ad Libitum* no sería un problema cuando se evita la ingesta de “alimentos” ultraprocesados (se definen y abordan más adelante) (21).

En cuanto a la restricción del aporte calórico, Ebbeling y colaboradores (2012), estudiaron los cambios en el consumo energético en reposo y total, al someter a un grupo de personas a tres tipos de dietas diferentes: una dieta muy baja en carbohidratos, una dieta de bajo índice glucémico y una dieta baja en grasas; donde las tres dietas fueron isocalóricas (aportaban exactamente el mismo número de calorías). Lo que mostraron los resultados fue que, aunque las calorías que entran son las mismas en las tres dietas, las que salen o se consumen por el organismo son diferentes, siendo la dieta baja en grasas la que producía un menor consumo energético basal y total (22).

## NÚMERO DE INGESTAS AL DÍA

Tradicionalmente, se ha propuesto que comer con frecuencia, cinco o seis veces al día, y sin saltarse ninguna comida, era una estrategia básica para prevenir o revertir la obesidad. La idea general era que, con ello, se disminuía el hambre y se lograba “acelerar el metabolismo”. Sin embargo, ya en el año 2003, la OMS advertía que “no hay datos suficientes para considerar que una mayor frecuencia de comidas sea efectiva para prevenir la obesidad” (23). Las investigaciones ponen de manifiesto que, el número de ingestas no sería tan relevante y que, incluso realizar un mayor número de ingestas puede traducirse en menor saciedad y mayor sensación de hambre, además de provocar una menor oxidación de grasas (24–26).

Además, practicar **ayuno intermitente a diario, o en días alternos** (restringiendo el periodo de alimentación a 8 horas diarias con dos o tres ingestas al día con un ayuno nocturno prolongado), sería una estrategia válida para mejorar tanto el exceso de peso como las complicaciones asociadas a la obesidad (19,27–37). Siendo una mejor opción adelantar la última ingesta a la tarde, que retrasar la primera al medio día (28,38–41).

En el caso de niños y adolescentes, ante la falta de evidencia científica sólida sobre el número de ingestas y el ayuno intermitente, puesto que apenas se cuenta con unos pocos artículos con limitaciones en su diseño, seguramente, lo más correcto sería planificar 4-5 ingestas diarias (42), respetando las señales de hambre y saciedad (21), y asegurando un consumo suficiente de proteínas (42).

## PORCENTAJES DE MACRONUTRIENTES

Otro de los grandes dogmas que han guiado la alimentación, ha sido establecer unos porcentajes de ingesta de macronutrientes exactos. En las dietas diseñadas para prevenir y tratar la obesidad mediante la manipulación del contenido de calorías dietéticas, la distribución de macronutrientes se ha establecido comúnmente en un 15% de proteínas, <30% de lípidos y 50–55% de carbohidratos, con reducciones en la grasa dietética e incremento de la fibra dietética. Sin embargo, la monitorización de dietas con bajo aporte energético con estas proporciones de macronutrientes revela que dan buenos resultados a

corto plazo, pero no son sostenibles durante largos períodos de tiempo (20). Las dietas que se centran en contabilizar porcentajes específicos de macronutrientes no parecen tener ninguna ventaja en relación con la mejora de los parámetros antropométricos y bioquímicos ni en su mantenimiento a largo plazo (19,43).

## **EL PAPEL DE LA GRASA Y LOS CARBOHIDRATOS EN LA DIETA**

De la mano de la restricción calórica, **la restricción de la ingesta de grasa para hacer frente a la obesidad y las enfermedades cardiovasculares** ha sido el paradigma que ha gobernado las actuaciones dietéticas las últimas décadas (44–46).

Sin embargo, la idoneidad de las dietas bajas en grasa se ha sometido a un intenso análisis ante los datos emergentes que muestran los efectos adversos de los carbohidratos refinados sobre factores de riesgo (por ejemplo, aumento del peso corporal, disminución de la sensibilidad a la insulina, más dislipemia aterogénica, mayor prevalencia de obesidad, síndrome metabólico [SM] y DM2) (44). La evidencia actual indica que las dietas bajas en carbohidratos y altas en fibra y grasa, son más efectivas que las dietas bajas en grasas para promover la pérdida de peso en pacientes con obesidad (44,45), y mejorar las comorbilidades (46–48).

Por ello, las dietas bajas en grasa no parecen ser la opción idónea para promover la pérdida de grasa corporal, al menos no a largo plazo. Además, hay que tener en cuenta que, en la mayoría de los productos ultraprocesados las grasas se reemplazan por carbohidratos refinados, y esto ha tenido y tiene consecuencias negativas en la salud de la población (44). Alimentos que tradicionalmente se han retirado o restringido en dietas bajas en grasa dirigidas a la pérdida de peso o, a la prevención y el tratamiento de enfermedades cardiovasculares; han mostrado en estudios clínicos que su consumo o bien no empeora o bien mejora marcadores antropométricos como peso corporal, IMC, porcentaje de grasa o perímetro de cintura, y también marcadores de inflamación y función endotelial. Estos alimentos son, entre otros: nueces (49) y frutos secos en general (50,51), aguacate (52–54), aceite de oliva (55,56), mejor aún si es virgen extra (57),

pescados azules (20,58), huevos (20,59–62), yogur y queso enteros (46), mantequilla (63), o chocolate amargo (46).

## **LA IMPORTANCIA DE LA INGESTA PROTEICA SUFICIENTE**

Las proteínas son moléculas formadas por aminoácidos que desempeñan funciones enzimáticas, estructurales y reguladoras de vital importancia para el organismo (64). Son imprescindibles para activar las vías de la hipertrofia muscular al estimular la síntesis de proteínas musculares y, para prevenir el catabolismo proteico, especialmente cuando se combinan con el ejercicio físico (64).

El músculo esquelético no solo es crucial para el rendimiento deportivo, también lo es para la salud metabólica, puesto que juega un papel importante en la reducción del riesgo de situaciones patológicas como la obesidad, enfermedades cardiovasculares, resistencia a la insulina, diabetes y osteoporosis. Por lo tanto, las estrategias nutricionales, y de entrenamiento, que se enfocan en preservar o incrementar la masa muscular son de vital importancia (65).

Las recomendaciones actuales de proteínas, según lo definido por la cantidad diaria recomendada (RDA) en Estados Unidos o, las ingestas de referencia de la población (PRI) en Europa, se muestran en la tabla 1.1. (42). Tradicionalmente estas cifras han sido y continúan siendo mal interpretadas. Se trata de recomendaciones que fueron asumidas de forma general como las ingestas óptimas, cuando en realidad, se trata del nivel mínimo de ingesta de proteínas para prevenir la pérdida neta de nitrógeno y reducir el riesgo de enfermedad en casi todas las personas sanas (97-98%) en equilibrio energético (42). Por ejemplo, la evidencia sugiere que, de manera similar a los adultos físicamente activos, los requerimientos diarios de proteínas en niños y adolescentes activos pueden elevarse hasta en un 60% por encima de las estimaciones actuales con una ingesta diaria necesaria de 1,5 - 1,6 g/kg/día (66,67).

Otro aspecto relevante es el de la distribución de la ingesta proteica a lo largo del día con tal de maximizar la estimulación de las tasas de síntesis de proteínas musculares (42,66). Un punto que cada vez genera más controversia, pues por un lado encontramos la visión “más clásica” de la Sociedad Internacional de

Nutrición Deportiva, que considera como la opción idónea una distribución uniforme con ingestas ricas en proteínas cada 3 a 4 h durante todo el día (68). Sin embargo, esta visión más clásica, se ha puesto en entredicho en diversos trabajos y revisiones sistemáticas que, priorizando los beneficios del ayuno intermitente 16/8 (en el que se restringe la ventana de alimentación hasta dejarla en 8 horas de alimentación, por 16 horas de ayuno); logran las mismas ganancias de fuerza y masa muscular, pero con mayor pérdida de grasa, comparada con la opción de realizar ingestas frecuentes (69–74)

Un aspecto a destacar de gran relevancia para las recomendaciones dietéticas, es que los músculos de las personas con obesidad, resistencia a la insulina o inflamación crónica de bajo grado, muestran lo que se llama una “resistencia anabólica”: una alteración en la señalización anabólica ante los estímulos provocados por el ejercicio físico y la ingesta proteica. Ante la falta de datos específicos para niños y adolescentes con sobrepeso u obesidad (66), parece conveniente que en cada una de las ingestas se alcance un mínimo, de 0,3 g/kg/ingesta (42), y se asegure un consumo de proteína diario suficiente.

En **conclusión** y, de acuerdo con la bibliografía disponible, las recomendaciones de los profesionales de la salud deberían focalizarse en garantizar una ingesta diaria total adecuada de proteínas más que en lograr una distribución uniforme en varias ingestas diarias (74). De modo que, finalmente se alcance un consumo de proteínas superior al que marcan las actuales recomendaciones oficiales (RDA y PRI), más aún cuando se trata de jóvenes activos (por sus necesidades incrementadas) (66,67), o de jóvenes con sobrepeso, obesidad y/o comorbilidades asociadas (por la resistencia anabólica que presentan) (42).

Tabla 1.1. Recomendaciones de proteínas a lo largo de la vida según lo definido por la cantidad diaria recomendada en Estados Unidos (RDA), las ingestas de referencia de la población europea (PRI) o las recomendaciones basadas en ingestas centradas en los músculos.

## RECOMENDACIONES PROTEICAS

		Estados Unidos RDA g/kg/d	Europa PRI g/kg/d	Ingestas centradas en los músculos g/kg/ingesta
<b>A lo largo de la vida<sup>a</sup></b>				
Infancia	0 a 12 meses	1,50	1,31	?
Niños pequeños	1-3 años	1,10	1,01	?
Niños	4-13 años	0,95	0,90	0,30
Adolescentes	14-18 años	0,85	0,86	0,30
Adultos	19-70 años	0,80	0,83	0,25
Envejecimiento adulto	>70 años	0,80	0,83	0,40
Embarazo, lactancia.		1,10	1,07	?

*Tenga en cuenta que los valores RDA y PRI se prescriben diariamente y ensombrecen el valor de la distribución de proteínas y la frecuencia de las comidas como factores importantes para la estimulación de las tasas de síntesis de proteínas musculares postprandiales. Las recomendaciones basadas en comidas se deben consumir de 4 a 5 veces al día en función de los horarios de comidas normalmente consumidos.*

<sup>a</sup> rango de edad basado en la definición del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos;

<sup>b</sup> media de los valores de ingesta para edades dentro del rango de edad dado;

<sup>c</sup> calculado con base en la recomendación absoluta de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria y el peso corporal femenino de referencia;

<sup>d</sup> basado en datos de equilibrio de proteínas de todo el cuerpo.? indica valores desconocidos.

(42)

## **ULTRAPROCESADOS COMO RESPONSABLES**

Los “alimentos” ultraprocesados se han convertido en la principal fuente energética en individuos de países desarrollados (75–78). En general, la evidencia sugiere que el consumo de ultraprocesados puede estar asociado con la prevalencia del SM, el aumento en el colesterol total y LDL, y el riesgo de HTA (78).

Los ultraprocesados se definen como formulaciones fabricadas industrialmente, listas para comer o listas para calentar, elaboradas principalmente a base de sustancias que se derivan de alimentos, incluyendo pocos o ningún alimento integral (76). Para su fabricación se emplean una gran diversidad de sustancias sintetizadas artificialmente: colorantes, aromas, emulsionantes, edulcorantes y otros aditivos (76,77). Suelen tener alto contenido en grasas de mala calidad, azúcar y sal, una alta densidad energética y baja en nutrientes, con (prácticamente) nulo contenido en fibra (75–77,79). Se trata de productos económicos, muy accesibles, con elevada digestibilidad, escasa saciedad y extremadamente palatables y adictivos (75,80). Además, resultan muy atractivos y cuentan con sofisticadas estrategias de publicidad especialmente dirigidas a niños y adolescentes (81), la población más susceptible de “caer” en su consumo (2).

Ejemplos de ultraprocesados son cereales de desayuno, galletas, bollería, mermeladas, snacks salados como patatas fritas y similares, postres lácteos o refrescos. Además, varios productos que a menudo se comercializan y se perciben como saludables por parte de la población, no lo son. Por ejemplo: barritas de frutos secos, avena y miel; yogures de sabores bajos en grasa; productos precocinados con bajo aporte energético; la mayoría de los panes producidos industrialmente; o sopas enlatadas (76).

La recomendación de limitar (y evitar en los hogares) el consumo de alimentos ultraprocesados, y potenciar el consumo de “alimentos no procesados” que incluyen, entre otros, hortalizas, frutas, tubérculos, frutos secos, legumbres, granos enteros, carnes frescas, pescados, huevos o mariscos (76), y también alimentos ricos en grasas saturadas como yogur y queso enteros, carnes rojas no procesadas en cantidades moderadas o chocolate amargo (46), es una estrategia necesaria y eficaz para la prevención y el tratamiento de la obesidad

y comorbilidades asociadas (21,46,77–79,82), que debe aplicarse desde el inicio de la alimentación complementaria (81).

### 1.2.2. RITMOS CIRCADIANOS Y CRONONUTRICIÓN

La expresión ritmo circadiano proviene del latín *circā* ("alrededor de") y *diēs* ("día"). Esta expresión se usa para definir cambios en los procesos fisiológicos y comportamentales que se manifiestan con un intervalo de 24 horas. El ritmo circadiano más importante es el ciclo vigilia-sueño, pero también existen un gran número de reacciones vitales que muestran un ritmo circadiano, como la temperatura corporal, la presión arterial, la frecuencia cardíaca, y la expresión de numerosas hormonas y factores inflamatorios (83).

Para estructurar estas variaciones en ciclos de 24h y adaptarlas a nuestros hábitos de vida, el cuerpo tiene dos mecanismos que trabajan en interacción: los relojes periféricos y el reloj central. Por un lado, los **relojes periféricos** están localizados en todas las células de todos los órganos del cuerpo; se trata de "**genes reloj**" que controlan la expresión rítmica de genes involucrados en el metabolismo y la inflamación. Por otro lado, el **reloj biológico central**, localizado en unas estructuras hipotalámicas llamadas núcleos supraquiasmáticos en el sistema nervioso central; sincroniza a los relojes periféricos (es el "director de orquesta"), se guía por la luz que entra a través de la retina y actúa como el principal sincronizador del reloj central. En conjunto, estos relojes internos son sistemas capaces de generar un orden temporal necesario para la fisiología del organismo.

La **luz** actúa como el principal sincronizador (conocido como *zeitgeber*, en alemán) del reloj central. De esta forma, el reloj central regula la síntesis de **melatonina** (hormona de la oscuridad), que al final de la tarde (cuando baja la luz) viaja por todos los fluidos del cuerpo, y señala a cada órgano que vamos a entrar en "modo noche" (83) (Figura 1.2). Sin embargo, la luz no es el único sincronizador: la **temperatura**, la **alimentación**, la **actividad física**, y la duración y calidad del **sueño**, influyen de forma significativa en las variaciones metabólicas y el estado de salud (Figura 1.2). Cuando todos estos

sincronizadores mantienen una regularidad, se permite un mejor funcionamiento de nuestro organismo (83).

La **cronodisrupcion**, o **alteración/desincronización de los ritmos circadianos**, hace referencia a la ausencia de regularidad en los sincronizadores que desemboca en una alteración de los ritmos circadianos. Y esta situación está asociada a, entre otras enfermedades: incremento de peso, trastornos metabólicos e inflamación (84), ya desde una edad muy temprana (83). Uno de los grandes cronodisruptores al que nos enfrentamos actualmente, es el uso de pantallas (móvil, tablet, ordenador, televisión), ya que nos exponen a **luz brillante artificial**, lo cual altera los ritmos circadianos y la secreción de melatonina, especialmente cuando se emplean en las horas próximas al momento de ir a dormir (83).



Figura 1.2. Influencia de los zeitgebers (sincronizadores) sobre el metabolismo circadiano. Adaptada de Gombert y colaboradores, 2018 (83).

## **CRONONUTRICIÓN**

El momento en que se realizan las comidas a lo largo de las 24 horas parece tener un papel tan o más importante que el número de comidas o que el total de calorías ingeridas a lo largo del día (85), sobre la regulación energética en humanos.

Como hemos comentado anteriormente, frente a las clásicas 5 comidas al día repartidas a lo largo de unas 14 horas (85), cada vez más investigaciones proponen reducir el número de ingestas y ajustarlas al período diurno, con el consumo de 2 o 3 comidas principales exclusivamente durante el período de luz, 3 comidas pequeñas en ese mismo período, o la alternancia de comidas con períodos de ayuno intermitente (86). En cualquier caso, las investigaciones llevadas a cabo durante los últimos años, parecen dejar claro que es preferible el consumo de alimentos durante el día que durante la noche (28,39,40). Es mejor desayunar y no cenar, que cenar y no desayunar (87,88).

Además, el orden en el que dentro de una misma comida (el almuerzo, por ejemplo) se ingieren los alimentos ricos en hidratos de carbono, modifica la respuesta metabólica a la comida, presentando un incremento significativamente menor de glucosa e insulina a los 180', cuando se consumen primero los vegetales y alimentos ricos en proteínas, y se dejan para el final los alimentos ricos en hidratos de carbono (89,90).

## **SUEÑO Y OBESIDAD**

La duración corta del sueño parece influir en la ganancia de peso en niños (91,92). En adultos, se ha observado que las alteraciones del ritmo circadiano, como ocurre en los trabajos a turnos, se asocian con un incremento del riesgo de obesidad y SM del 40-60% (84). En el mismo sentido, la gran mayoría de los estudios epidemiológicos, han encontrado que el tiempo de sueño corto se asocia con un IMC más alto y un mayor riesgo de diabetes en niños, adultos y ancianos (93).

Respecto a las razones del impacto negativo de la reducción del sueño en el metabolismo, la mayoría de las hipótesis consideran que la alteración de la concentración de ciertas hormonas y del funcionamiento del circuito de la

recompensa, estarían detrás de un incremento del apetito y del deseo por ingerir “alimentos” ultraprocesados y ricos en hidratos de carbono (94–97).

En **conclusión**, los hábitos de vida influyen en nuestra salud y, uno de los mecanismos que explican esta estrecha relación es el impacto (positivo o negativo) que nuestros hábitos tienen sobre la regulación de los ritmos circadianos. Incidir y educar en la creación de hábitos de vida saludables y regulares, especialmente de buenos hábitos de sueño y del buen uso de las nuevas tecnologías, poniendo límites al uso (sobre todo) nocturno de pantallas; es una estrategia que se antoja como imprescindible para la prevención y el tratamiento eficaz de la obesidad infantil y las complicaciones asociadas.

### 1.2.3. ACTIVIDAD FÍSICA

Hay evidencia concluyente según la cual la actividad física frecuente mejora sustancialmente la forma física y el estado de salud de niños y adolescentes. En comparación con los niños y adolescentes inactivos, los que hacen ejercicio presentan un mejor estado cardiorrespiratorio, mayor resistencia muscular, y una mejora de su salud, y está suficientemente documentado que presentan menor grasa corporal, un perfil de riesgo de enfermedad cardiovascular y metabólica más favorable, y una mejor salud ósea (98); junto a una menor presencia de síntomas de ansiedad y depresión (98,99). Además, un estilo de vida activo se asocia con una masa magra corporal mayor durante todas las fases de crecimiento, que como vimos es importante para apoyar la salud metabólica y esquelética (42).

A los múltiples beneficios anteriores, se suma que la actividad física también puede aumentar la **diversidad de la microbiota intestinal** (que, como veremos, es un buen indicador de salud), a través de diversos mecanismos de acción, entre los que se incluye la promoción de un estado antiinflamatorio (100).

La OMS define la actividad física como “*cualquier movimiento corporal producido por los músculos esqueléticos que exija gasto de energía*”. Y, en sus *Recomendaciones mundiales sobre la actividad física para la salud* (98), para

los niños y adolescentes de entre 5 y 17 años de edad, considera que, la actividad física consiste en juegos, deportes, desplazamientos, actividades recreativas, educación física o ejercicios programados, en el contexto de la familia, la escuela o las actividades comunitarias. Y, con el fin de mejorar las funciones cardiorrespiratorias y musculares, la salud ósea y de reducir el riesgo de enfermedades no transmisibles, recomienda que:

- Los niños y adolescentes de 5 a 17 años deberían acumular **como mínimo 60 minutos diarios** en actividades físicas de **intensidad moderada a vigorosa**.
- La actividad física por un tiempo **superior a 60 minutos diarios reportará un beneficio aún mayor para la salud**.
- La actividad física diaria debería ser, en su mayor parte, aeróbica. **Convendría incorporar, como mínimo tres veces por semana, actividades vigorosas** que fortalezcan, en particular, los músculos y huesos.

En la provincia de Valencia, Ballester-Asensio (2015), reclutó a 106 sujetos (52 niños y 54 niñas) de 4 colegios públicos, con un **rango de edad de 10 a 13 años**. Observó que, de forma global, el 36% de los escolares realizan al menos 60 minutos diarios de actividad física moderada o vigorosa, con una marcada diferencia en el grado de cumplimiento entre niños (57,1%) y niñas (17,0%). Es decir, alrededor de **la mitad de los niños y solo 1 de cada 5 niñas cumplirían con las recomendaciones mínimas de actividad física (101)**. Cabe destacar también que, la evidencia en esta área muestra que los jóvenes de una posición socioeconómica relativamente baja tienden a ser menos activos físicamente (102).

Para terminar, y centrándonos en la parte práctica de qué recomendaciones ofrecer desde el ámbito sanitario para poner remedio a la creciente espiral de déficit de actividad física y obesidad infantil, se propone realizar actividades físicas adaptas a los gustos y necesidades de los niños en las que estos se diviertan y en las que los padres se involucren de forma activa (103). Es decir, **la estrategia más efectiva para que los niños sean más activos es aquella en la que los padres dan ejemplo y se adaptan a sus hijos, y no los hijos a sus padres**.

#### **1.2.4. TEORÍA DE LOS ORÍGENES DEL DESARROLLO DE LA SALUD Y LA ENFERMEDAD**

En la década de 1990, el doctor David Barker, propuso la hipótesis de los “orígenes del desarrollo de la salud y la enfermedad” (*Developmental Origins of Health and Disease theory; DOHaD*), según la cual las diferencias en el crecimiento y desarrollo intrauterino y posnatal temprano, pueden tener importantes consecuencias en la salud de un individuo a largo plazo, predisponiendo al desarrollo de enfermedades cardiovasculares, accidentes cerebrovasculares, DM2 e HTA (104–106). El propio doctor Barker publicó en 2013 un artículo en el que hablaba del concepto «programación» y donde detalla que; la nutrición de la madre durante la preconcepción, la nutrición fetal, y durante la infancia, moldean la función metabólica en el futuro adulto (107). Además, no debemos pasar por alto que, más allá de la alimentación, hay otros factores ambientales que juegan un papel determinante en la programación de la salud: estrés materno, infecciones, teratógenos, fármacos, alcohol, drogas, tabaco o practica de actividad física (108–110).

En la misma dirección que apuntaba el profesor Barker, una serie de tres artículos publicados en mayo de 2018 en *The Lancet*, abordan de manera amplia y detallada la forma en que el peso, los hábitos de vida y, en general los acontecimientos ocurridos a lo largo de la vida de la madre (y también del padre), previos a la concepción, tienen una clara incidencia en la salud futura del niño. De modo que, los hijos concebidos por padres con obesidad y otros problemas de salud, serán niños con mayor predisposición a padecer enfermedades tanto cardiometabólicas como inmunológicas y neurológicas (111–115). Además, las últimas investigaciones sugieren que, la disbiosis del microbioma intestinal (propio de padres con obesidad), puede explicar, al menos en parte, la mayor predisposición a enfermar de sus hijos (115–117).

### 1.2.5. NIVEL SOCIOECONÓMICO FAMILIAR

En España, tanto en el estudio ALADINO (rango de edad de 6 a 9 años) (9); como en la Encuesta Nacional Salud España (ENSE) de 2017, se observa una clara asociación entre el nivel de ingresos familiares y la obesidad. Los datos de la ENSE muestran que, **la prevalencia de obesidad en el rango de edad 2-17 años es del 5,41% en la clase I frente al 15,37% en la clase VI** (la clase social se ha determinado a partir de la ocupación de la persona de referencia del hogar, la clase I es la más alta y la clase VI la más desfavorecida) (15).

Analizando el patrón de alimentación, las personas con menos ingresos son las que consumen mayor cantidad de ultraprocesados (118). Y al contrario ocurre con el consumo de alimentos no procesados, las clases sociales más altas son las que consumen más vegetales, hortalizas y fruta fresca (excluyendo zumos) (15,102). Un buen ejemplo de la enorme diferencia que se observa en el patrón de alimentación en función de la clase social, es el consumo de refrescos azucarados. De tal modo que, el 3,8% de la población de más de un año de clase I bebe refrescos azucarados a diario, proporción que aumenta escalonadamente hasta situarse en el 13,64% en la clase VI (15).

Podemos concluir que, la creciente desigualdad de ingresos en toda la Región Europea de la OMS ha intensificado las diferencias que, por motivos socioeconómicos se observan en materia de seguridad alimentaria, acceso a los alimentos más nutritivos, disponibilidad de instalaciones deportivas y acceso a espacios verdes (102). Con toda probabilidad, esto se ha traducido en que las personas con menos recursos económicos practiquen menos actividad física, se alimenten peor y presenten mayores índices de obesidad. Es necesario poner en marcha acciones y políticas dirigidas a corregir estas desigualdades para prevenir y reducir los elevados índices de sobrepeso y obesidad que afectan a los estratos sociales más desfavorecidos.

### 1.2.6. GENÉTICA

No todos los sujetos expuestos a los mismos factores de riesgo conocidos, como una alimentación rica en ultraprocesados y la escasa actividad física, desarrollan obesidad o, al menos, no lo hacen en el mismo grado. Esto es debido a que estos factores “exógenos” actúan sobre una base “endógena”: la información genética propia de cada individuo, lo cual explicaría, al menos en parte, la gran heredabilidad familiar de la obesidad (119). Este tipo más común de obesidad se suele denominar “obesidad poligénica”, pues es esta base genética la que determina la susceptibilidad del paciente ante los estímulos ambientales.

Se han descrito diferentes genes asociados con la obesidad y que están involucrados en: la regulación de la ingesta de energía, el metabolismo lipídico, la adipogénesis, la termogénesis y la síntesis de adipocinas y factores de transcripción. Genes que codifican para el receptor 4 de melanocortina (*MC4R*), leptina (*LEP*), ghrelina (*GHRL*) y sus receptores, y colecistoquinina (*CCK*) o el gen asociado a la masa grasa y obesidad (*FTO*); son algunos ejemplos relacionados con la regulación de la ingesta de energía. Polimorfismos en dichos genes se asocian con conductas alimentarias inapropiadas, como el aumento del consumo de dulces y picoteos, una ingesta mayor de energía y grasas, el consumo de grandes porciones de comida, el deseo constante de comer y la alimentación asociada a problemas emocionales (120).

Sin embargo, las modificaciones epigenéticas; es decir, las ejercidas por factores “exógenos” sobre el genoma de un individuo, especialmente durante las fases tempranas del desarrollo, parecen desempeñar una función relevante en el riesgo individual para el desarrollo de obesidad (119).

Finalmente, solo un pequeño número de casos de obesidad (5%) resulta de la existencia de mutaciones en genes concretos (“obesidad monogénica”), originando en algunos casos síndromes mendelianos de muy escasa incidencia entre la población (119).

Como **conclusión final**, podemos afirmar que, nuestro patrón de alimentación y estilo de vida han sufrido un cambio drástico con respecto al de nuestros ancestros, dando lugar a lo que en 1997 Egger y Swinburn denominaron por primera vez como un “ambiente obesogénico”, que nos hace muy proclives a la obesidad y a múltiples enfermedades más (121,122). Existen pruebas suficientes para determinar que las estrategias focalizadas únicamente en seguir dietas con restricción de energía son abrumadoramente ineficaces a largo plazo (16) y que, los paradigmas que han guiado la alimentación del ser humano en las últimas décadas no han dado el resultado esperado (44). Las estrategias dietéticas futuras para prevenir el sobrepeso y la obesidad, deberían seguir un abordaje multifactorial (3,16,44,123), enfatizar menos en el aporte calórico y en la distribución de macronutrientes, y mucho más en la **calidad de los alimentos** que configuran el patrón de alimentación (21,46,124), sin olvidar los factores individuales que afectan al equilibrio del peso corporal como la regulación hormonal del metabolismo y el microbioma intestinal (75,125,126).

## 2. COMPLICACIONES ASOCIADAS A LA OBESIDAD

---

### 2.1. INCREMENTO DEL TEJIDO ADIPOSO

El tejido adiposo representa el mayor órgano de nuestro organismo destinado al almacenamiento de energía. El almacenamiento de grasa en el tejido adiposo es un proceso estrictamente regulado, ya que tanto el exceso de tejido adiposo (sobrepeso u obesidad), como la ausencia total o parcial de tejido adiposo (lipodistrofias), se asocian a graves trastornos metabólicos.

Las investigaciones llevadas a cabo durante las últimas décadas han cambiado por completo la forma de ver y entender el tejido adiposo; de tal modo que ha pasado de ser visto como un tejido cuya función era almacenar grasa y proteger los órganos internos frente a impactos, a ser considerado como un auténtico **órgano endocrino e inmunitario**. Los adipocitos, y también otras células presentes en el tejido adiposo como los preadipocitos, pericitos, fibroblastos o las células endoteliales y células inmunitarias (como mastocitos, macrófagos o linfocitos T), secretan una gran variedad de enzimas, factores de crecimiento, lípidos, hormonas y también citocinas o interleucinas, que pueden tener efectos autocrinos, paracrinos y endocrinos (127,128). Pero, ni todo el tejido adiposo es igual ni se comporta de la misma forma:

Por un lado, en el organismo, la grasa se almacena en dos tipos de tejido adiposo, el tejido adiposo blanco (TAB) y el tejido adiposo marrón (TAM). A grandes rasgos, aunque ambos tienen actividad endocrina e inmunitaria: **el TAB** es el principal tejido de almacén de energía del organismo, además de atribuírsele la función de aislamiento y protección mecánica para algunos órganos vitales, mientras que, **el TAM** tiene la función fisiológica de metabolizar los ácidos grasos produciendo calor (129). En las personas con obesidad, el TAB incrementa su volumen, todo lo contrario que el TAM: que se correlaciona inversamente con el IMC, y que disminuye su volumen en jóvenes con sobrepeso u obesidad (129).

Por otro lado, la distribución y la forma de almacenamiento de la grasa corporal es un factor fundamental en la susceptibilidad a padecer complicaciones metabólicas asociadas a su almacenamiento. La situación de mayor susceptibilidad aparece cuando el exceso de grasa se acumula en la **zona abdominal**, en la que se incluye tanto la grasa del tejido adiposo subcutáneo de la zona y en el tejido adiposo visceral, como la grasa acumulada en el interior de órganos (grasa ectópica), especialmente en el corazón (130). Es la acumulación de esta grasa abdominal la que se relaciona con efectos adversos en el organismo, que incluyen **inflamación crónica** y **resistencia a la insulina**, lo cual predispone a las comorbilidades de la obesidad (127,130).

## **2.2. INFLAMACIÓN CRÓNICA**

La inflamación, una respuesta fisiológica de protección del organismo, se presenta para controlar las agresiones físicas, químicas o biológicas. Se caracteriza por la presencia de un elevado número de leucocitos y/o un incremento en los niveles de citocinas proinflamatorias en la circulación o en los tejidos. Este proceso, cuando ocurre de forma aguda, suele tener un carácter protector; en cambio, cuando ocurre de forma crónica la situación es muy diferente, dando lugar a la inflamación crónica de bajo grado que puede ocasionar efectos perjudiciales.

El exceso de grasa en el tejido adiposo, favorece la infiltración de células del sistema inmune (principalmente macrófagos) que tienen el potencial de inducir inflamación, tanto local como sistémica (131). La inflamación crónica es el principal mecanismo a través del cual se desarrolla resistencia a la insulina y disfunción metabólica asociada a la obesidad, incrementando el riesgo de enfermedades cardiovasculares (132).

Se calcula que, aproximadamente el 70-80% de individuos con obesidad, presentan un estado de inflamación crónica de bajo grado, también conocido como lipoinflamación, con importantes repercusiones sistémicas (128).

Las **adipocinas** (citocinas liberadas en el tejido adiposo) son las principales sustancias que controlan el estado inflamatorio sistémico (133,134). Otras citocinas liberadas en otros lugares del organismo, como el hígado o el intestino, también ejercen efectos en el control metabólico e inmunológico del tejido adiposo. Cabe destacar que, la microbiota intestinal parece jugar un papel clave como desencadenante de este proceso de inflamación crónica (133,135,136).

Mientras que algunas citocinas como la proteína C reactiva (PCR) o la proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP1) tienen efectos proinflamatorios y son perjudiciales en el desarrollo de enfermedades asociadas a la obesidad, otras citocinas como la adiponectina o la omentina, tienen efectos protectores en varias enfermedades metabólicas y cardiovasculares. Un desequilibrio en la producción de citocinas contribuye a la patogenia de las complicaciones metabólicas y cardiovasculares relacionadas con la obesidad (137). La lista de citocinas conocidas (en continuo aumento), es muy amplia. A continuación, se detallan solo las más importantes (Tabla 1.2):

<b>Citocinas antiinflamatorias</b>	<b>Citocinas proinflamatorias</b>
Adiponectina	Proteína C reactiva (PCR)
Omentina	Proteína transportadora de retinol 4 (RBP4, por sus siglas en inglés)
Vaspina	Proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1)
Interleucina 10 (IL-10)	Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ )
	Interleucina 6 (IL-6)
	Leptina
	Resistina

Tabla 1.2. Principales citocinas con efectos antiinflamatorios y proinflamatorios relacionadas con las complicaciones propias de la obesidad.

## CITOCINAS ANTIINFLAMATORIAS

- **Adiponectina:** es una adipocina que se produce exclusivamente en adipocitos diferenciados del TAB, en mayor cantidad en el tejido adiposo subcutáneo que en el visceral. Tiene múltiples funciones metabólicas entre las que destacan la reducción del contenido de triglicéridos intracelulares en el hígado y el músculo esquelético (a través de un aumento de la oxidación de ácidos grasos); la reducción de la gluconeogénesis en el hígado; el incremento de la sensibilidad a la insulina y; efectos antiinflamatorios y antiaterogénicos. Los niveles circulantes de adiponectina son menores en sujetos con obesidad y se correlacionan positivamente con la sensibilidad a la insulina (133).
- **Omentina:** es una adipocina que se expresa en la grasa visceral y en el omento (peritoneo visceral). Los niveles circulantes de omentina están reducidos en individuos obesos y en complicaciones asociadas a la obesidad como resistencia a la insulina, intolerancia a la glucosa, dislipemia, HTA y DM2 (133). La medición de los niveles circulantes de omentina podría ser útil para la evaluación de las alteraciones metabólicas y cardiovasculares relacionadas con la obesidad.
- **Vaspina:** es una adipocina de tipo serpina, una superfamilia de proteínas caracterizadas por ser inhibidores de la proteasa serina. La vaspina es capaz de mejorar la resistencia a la insulina y ejerce efectos antiinflamatorios (inhibe TNF- $\alpha$  y activa NF- $\kappa$ B) (133).
- **Interleucina 10 (IL-10):** es una de las citocinas antiinflamatorias más importantes, y la producen los macrófagos activados tipo 2, y los linfocitos B y T.

## CITOCINAS PROINFLAMATORIAS

- **Proteína C Reactiva (PCR):** es sintetizada en el hígado durante la fase aguda de la respuesta inmunológica. Los niveles séricos de la PCR aumentan como respuesta a una gran variedad de agentes infecciosos y no es específica de una enfermedad en particular, pero constituye un indicador muy importante de procesos inflamatorios. La PCR se encuentra en concentraciones elevadas en sujetos con obesidad, además, los niveles séricos de la PCR y de otros marcadores de inflamación sistémica y de disfunción endotelial son predictores de enfermedad cardiovascular (138).
- **Proteína transportadora de retinol 4 (RBP4):** es una adipocina que reduce la sensibilidad periférica y hepática a la insulina e incrementa la gluconeogénesis hepática a través de la activación de la fosfoenol piruvato carboxikinasa. Así, se

ha propuesto como un nuevo nexo de unión entre la obesidad y la resistencia a la insulina, presentando niveles séricos elevados de RBP4 sujetos con obesidad y con insulinoresistencia y DM2 (139).

- **Proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1):** es una adipocina que es capaz de reclutar monocitos, macrófagos, células T y células dendríticas. MCP-1 podría ser la responsable del inicio de la infiltración de macrófagos en el tejido adiposo en individuos con obesidad, además de contribuir al desarrollo de la resistencia a la insulina y el aumento de la adiposidad (133).
- **Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e Interleucina 6 (IL-6):** son citocinas secretadas tanto en el tejido adiposo como en otros tejidos. La producción de ambas citocinas por los adipocitos es mayor en estados de obesidad. El TNF- $\alpha$  actúa fundamentalmente de forma paracrina, circula en muy bajas concentraciones en suero y es de producción ubicua; en contraste con la IL-6, para la que se estima que aproximadamente un tercio de la que circula en suero procede del TAB (fundamentalmente visceral), habiéndose comunicado la existencia de correlación de los niveles de ésta con el IMC y los índices de resistencia a la insulina (140).
- **Leptina:** es una adipocina que interviene principalmente en la regulación de la ingesta de alimentos, el peso corporal y la homeostasis energética a través de las funciones neuroendocrinas. Actualmente se considera que la leptina también influye en la sensibilidad a la insulina y el metabolismo de los lípidos. Las altas concentraciones de leptina están directamente asociadas con la obesidad y el desarrollo posterior de enfermedades metabólicas como la resistencia a la insulina, la DM2 y las enfermedades cardiovasculares (141).
- **Resistina:** adipocina que juega un papel fundamental en el desarrollo de la resistencia a la insulina asociada a obesidad en modelos murinos; en cambio, en humanos solo se han detectado efectos proinflamatorios. En cualquier caso, algunos estudios de caso-control en humanos han mostrado la existencia de un riesgo incrementado de desarrollo de DM2 en pacientes con niveles elevados de resistina (140).

## 2.3. RESISTENCIA A LA INSULINA

Debido a la ausencia de un método estandarizado para medir la sensibilidad a la insulina, no existe una definición unánime de resistencia a la insulina (142). La resistencia a la insulina podría definirse como una condición en la que se necesitan mayores concentraciones de insulina para determinar un efecto fisiológico que fue previamente inducido por una concentración más baja (131). La resistencia a la insulina se considera el mecanismo principal por el cual la obesidad induce DM2 y enfermedades cardiovasculares (3,127,132,143,144). En sujetos no diabéticos con obesidad, la hiperinsulinemia generalmente compensa la resistencia subyacente a la insulina, manteniendo la homeostasis de la glucosa dentro de los niveles normales o casi normales. Cuando falla la hiperinsulinemia compensadora y los niveles de insulina disminuyen debido al desarrollo de un defecto de las células  $\beta$  “fracaso pancreático”, sobreviene una hiperglucemia y el estado típico de DM2 (132).

En cuanto a su diagnóstico, la resistencia a la insulina resulta difícil de detectar desde el punto de vista clínico; pero hay diversas técnicas que son útiles para diagnosticarla. Estas técnicas son: 1) El **clamp hiperinsulinémico-euglucémico**, que se reconoce como el estándar de oro para medir la sensibilidad tisular a la insulina y la secreción de insulina; sin embargo, es costosa y difícil de realizar por lo que no es de utilidad clínica. 2) El **índice Matsuda-DeFronzo** que se calcula a partir de una curva de tolerancia a la glucosa oral de la cual se desprende información adicional sobre el metabolismo de la glucosa en el estado post-estimuladorio. 3) El Índice de control cuantitativo de sensibilidad a la insulina (**QUICKI**), que se define como “ $1/(\log \text{insulina ayunas } [\mu\text{U/ml}] + \log \text{glucosa en ayunas } [\text{mg/dl}])$ ”. 4) El modelo homeostático de evaluación de la resistencia a la insulina (**HOMA-IR**). El QUICKI y el HOMA-IR, son los métodos más sencillos y los más utilizados para el diagnóstico clínico de la RI (142).

El HOMA-IR es un método que permite cuantificar la resistencia a la insulina y la función de las células beta, calculada como el producto de la glucosa plasmática en ayunas (mmol / L) y la insulina sérica en ayunas (mU / L) dividida por 22,5.

Los valores más bajos indican una alta sensibilidad a la insulina; mientras que los valores más altos indican baja sensibilidad a la insulina o resistencia a la insulina (145). Para su diagnóstico entre los púberes, es importante tener en cuenta que, los cambios hormonales de la pubertad inducen una reducción de ~ 33% de la sensibilidad a la insulina en todo el cuerpo que vuelve a los niveles basales con la maduración sexual (144).

Está bien establecido que la distribución de la grasa corporal es más determinante en la sensibilidad a la insulina que el grado de obesidad *per se*. Los depósitos de grasa en la zona abdominal, desencadenan vías moleculares que deterioran la señalización de la insulina (142,144). La **inflamación** generada en el tejido adiposo (especialmente en la grasa abdominal), así como en otros lugares del organismo, como el intestino, pueden ser causantes de resistencia a la insulina a través de diferentes mecanismos: mayor lipólisis y liberación de ácidos grasos libres a la circulación, menor captación de glucosa en los adipocitos, alteración de la liberación de adipocinas (menos adiponectina y más leptina), o un aumento de las citocinas proinflamatorias, como IL-6, MCP-1 o TNF- $\alpha$  (146–148).

Además de la inflamación, otros mecanismos están implicados en el desarrollo de la resistencia a la insulina, como el estrés oxidativo, la disfunción mitocondrial y factores dietéticos que afectan tanto directamente como a través de la **microbiota intestinal** (126,148). El proceso por el cual se desarrolla resistencia a la insulina en individuos con obesidad, es tan complejo que ni siquiera en la actualidad se conoce con exactitud (146).

Finalmente, y como aspectos prácticos para hacer frente a la epidemia de resistencia a la insulina, está demostrado que, el aumento de peso reduce la sensibilidad a la insulina mientras que la pérdida de peso la aumenta. Y que, la actividad física, tanto aeróbica como anaeróbica, aumenta la sensibilidad a la insulina mientras que, la falta de actividad física produce como resultado una marcada reducción de la sensibilidad a la insulina (144).

## 2.4. SÍNDROME METABÓLICO EN NIÑOS Y ADOLESCENTES

El síndrome metabólico (SM) es una de las complicaciones más importantes del exceso de grasa corporal. Se trata de un conjunto de alteraciones que incluyen el metabolismo alterado de la glucosa, triglicéridos elevados, colesterol HDL reducido, presión arterial elevada y adiposidad central (144). Está demostrado que los adultos que cumplen con los criterios para el síndrome tienen un mayor riesgo de desarrollar DM2 y enfermedades cardiovasculares con el tiempo (144). Cuando estas alteraciones se presentan en niños, aumenta el riesgo de padecer estas enfermedades a una edad temprana (131,144).

Actualmente, no hay un consenso internacional sobre sus criterios diagnósticos para la población infantil y/o adolescente. Uno de los más utilizados es el que propuso en el año 2007 la Federación Internacional de Diabetes (IDF) (149,150). Según el cual, existe síndrome metabólico cuando hay obesidad abdominal siempre, más dos cualesquiera de los otros cuatro criterios:

### **Menores de 10 años:**

- No hay criterios definidos

### **De 10 a <16 años:**

- Obesidad abdominal con perímetro de cintura > percentil 90
- Presión arterial > 130/85 mmHg
- Triglicéridos > 150 mg/dL
- Colesterol HDL < 40 mg/dL en ambos sexos
- Glucemia basal > 100 mg/dL, o dos horas tras la sobrecarga > 140 mg/dL

### **>16 años:**

- Obesidad abdominal con perímetro de cintura > 94/80 cm en hombre / mujer caucásicos; 85/90 cm en japoneses; 90/80 cm en resto de asiáticos
- Presión arterial > 130/85 mmHg
- Triglicéridos > 150 mg/dL
- Colesterol HDL < 40 mg/dL en hombres, y < 50 mg/dL en mujeres
- Glucemia basal < 100 mg/dL, o dos horas tras la sobrecarga > 140 mg/dL

Cabe destacar que, aun no cumpliendo los criterios para el diagnóstico de SM, la alteración de cada uno de los componentes por separado aumenta el riesgo cardiovascular (144). Actualmente, se sigue investigando la mejor forma de diagnosticar el SM en la población pediátrica, de hecho, se están estudiando nuevos biomarcadores como las adipocinas, por su gran implicación en el SM (150). Al mismo tiempo que se incrementa el estudio y el reconocimiento del papel que juega la microbiota intestinal en el desarrollo del SM y hasta qué punto, ésta puede convertirse en una diana terapéutica para hacer frente al SM (126,135).

### 3. MICROBIOTA INTESTINAL

---

#### 3.1. DEFINICIONES

El término **microbiota** se refiere a todos los microorganismos presentes en los diversos ecosistemas del cuerpo humano, que encontramos tanto en las superficies como en otras partes del organismo, incluyendo el intestino, las vías respiratorias, las urinarias y los genitales.

La microbiota está compuesta por distintos tipos de microbios: la mayoría son bacterias, pero también incluye arqueas, virus, levaduras y hongos (125). Datos recientes estiman que los humanos estamos colonizados por trillones de microbios, hasta el punto de que la relación entre células humanas y microbianas es 1:1 e incluso 1:2 (151,152).

La **microbiota intestinal** es el conjunto de microorganismos que habitan en el tracto gastrointestinal. La microbiota colónica es la comunidad microbiana más grande y compleja del organismo humano. En total, se han identificado más de 1000 especies bacterianas, y se encuentran aproximadamente 160 especies diferentes en el intestino de cualquier individuo (153).

El **microbioma** es el conjunto de todos los genes que albergan los diferentes microbios que componen una determinada microbiota. Es, en realidad, una manera de referirnos al conjunto de actividades metabólicas que dicha microbiota puede llevar potencialmente a cabo (154). El conjunto de genes de la microbiota intestinal (el **microbioma intestinal**) se estima en alrededor de 3 millones de genes; 150 veces más grande que el del genoma humano (151), y produce miles de metabolitos, que reemplazan o complementan muchas de las funciones del huésped, jugando un papel importantísimo sobre nuestra salud (125,151,153,155,156).

## 3.2. FUNCIONES

La microbiota intestinal está implicada en innumerables funciones biológicas que suceden en nuestro cuerpo, y que podemos resumir en las siguientes (125,153,155–157):

- **Suministro de nutrientes esenciales:** Vitaminas, aminoácidos esenciales y ácidos grasos linoleico y alfa-linolénico.
- **Aprovechamiento de nutrientes no digeribles y síntesis de ácidos grasos de cadena corta (AGCC):** Fibras fermentables como fructanos, almidón resistente, pectinas, beta-glucanos y mucílagos son degradadas por nuestra microbiota, generando gases ( $H_2$ ,  $CO_2$ ) y AGCC. De estos últimos, los más importantes son butirato, propionato y acetato, los cuales cumplen importantes funciones, como inhibir el crecimiento de patógenos, intervenir en el metabolismo celular, o ser fuente de energía fundamental para los enterocitos (en este último caso, el butirato es el más importante).
- **Antagonismo microbiano:** La capacidad de impedir el asentamiento de microbios foráneos potencialmente patógenos sobre nuestras mucosas se articula en torno a tres mecanismos principales: la interferencia con la colonización, la producción de compuestos antimicrobianos y la coagregación con los patógenos (unión a organismos extraños impidiendo su unión a la mucosa).
- **Desarrollo de la defensa orgánica frente a la infección:** La microbiota induce el desarrollo tanto de la inmunidad innata como de la específica.
- **Mantenimiento de la integridad y permeabilidad selectiva del epitelio intestinal.** Los microbios intestinales estimulan la formación de moco protector y también la síntesis de las “tight junctions” (las uniones estrechas entre enterocitos), para asegurar la entrada selectiva de sustancias del lumen al interior del organismo humano (126).
- **La transformación de xenobióticos** –del griego *xeno* («extraño») y *bio* («vida»), una infinidad de compuestos sintéticos elaborados por el ser humano como fármacos o tóxicos ambientales–. La microbiota puede metabolizar estos compuestos, modificando su acción en nuestro organismo, positiva o negativamente (158).

- Además, cada vez está más claro que a través del conocido como eje microbiota-intestino-cerebro, los microbios que albergamos en el intestino tienen una influencia crucial en el **desarrollo neuronal**, en el **aprendizaje**, en el **comportamiento** y hasta se ha postulado que intervienen en la **elección de alimentos** (148,159).

### **3.3. FACTORES QUE MODULAN LA MICROBIOTA INTESTINAL A LO LARGO DE LA VIDA**

#### **3.3.1. LA VENTANA DE OPORTUNIDAD**

El periodo de tiempo que se extiende desde la gestación (incluso antes), hasta aproximadamente los tres años de vida, representa una “ventana de oportunidad para la modulación microbiana” (156,160). Este periodo de tiempo incluye una variedad de eventos y factores con gran potencial modificador de la microbiota intestinal, como son el ambiente físico y psicológico durante la gestación, el modo de parto, la edad gestacional, el tipo de lactancia, la introducción de alimentos sólidos y las intervenciones farmacológicas (Figura 1.3); que dan forma a la composición inicial de la microbiota intestinal (110,156,160–162).

Durante el primer año de vida, la composición de la microbiota intestinal se caracteriza por una diversidad y estabilidad reducidas en comparación con la microbiota adulta. A los 2,5 - 3 años de edad se establece una microbiota similar a la de un adulto (en la que predominan *Bacteroidetes* y *Firmicutes*), aunque no debemos olvidar que cada individuo alberga una composición completamente única. Las funciones de la microbiota intestinal y su maquinaria genética (el microbioma intestinal) experimentan cambios importantes a medida que se introducen los alimentos sólidos, y es que, durante el proceso de destete, los microbios del intestino deben adaptarse poco a poco a una dieta más compleja (156,162).

### 3.3.2. GESTACIÓN Y PARTO

Tradicionalmente se ha defendido que los fetos son estériles y que la exposición del recién nacido a los microorganismos se inicia durante el parto tras la rotura de la bolsa amniótica: es la “hipótesis del útero estéril”. Sin embargo, estudios recientes han desafiado la idea de un ambiente intrauterino estéril al demostrar la presencia de ADN bacteriano en líquido amniótico, sangre de cordón umbilical, meconio, placenta y membranas fetales de embarazos sanos sin ninguna indicación de infecciones o inflamación; lo que sugiere que la génesis del microbioma intestinal se produce en el útero, respaldando la “hipótesis de colonización en el útero” (156,163). Estos avances, añaden más importancia si cabe a la necesidad de adquirir o mantener por parte de la madre y su entorno, unos hábitos de vida saludables durante la gestación (110,164,165).

En cualquier caso, **el parto** supone la primera gran toma de contacto del recién nacido y su microbiota con el mundo exterior. Los estudios indican que, los bebés nacidos por parto vaginal se someten a un “bautismo bacteriano” durante el parto, y su microbiota se asemeja a la microbiota vaginal de la madre, mostrando una microbiota más diversa y un mayor número de *Bacteroides* y *Bifidobacterium* que sus congéneres nacidos por cesárea. Por otro lado, los bebés nacidos por cesárea eluden este “bautismo bacteriano” vaginal, y su microbiota se parece más a la de la microbiota de la piel de su madre (156,160).

Se ha postulado que, los cambios resultantes de la microbiota en los niños nacidos por cesárea, particularmente los números más bajos de *Bacteroides* y *Bifidobacterium*, pueden aumentar el riesgo de padecer enfermedades alérgicas como el asma y la rinitis alérgica (156), así como enfermedad inflamatoria intestinal, y enfermedades atópicas y metabólicas (110,166).

Otro factor determinante a la hora de dar forma a la microbiota intestinal del recién nacido, es la **edad gestacional**. Los recién nacidos prematuros presentan un número reducido de bifidobacterias y su microbiota exhibe menos diversidad en comparación con los recién nacidos a término, lo que propicia ciertas complicaciones frecuentes en los recién nacidos prematuros y que amenazan su vida (156,167).

### 3.3.3. LACTANCIA

La **leche materna** es el mejor alimento que puede recibir el recién nacido (168,169) y, siempre que sea posible, ese debe ser su primer y único alimento hasta alrededor de los 6 meses de edad (170). La leche humana es un fluido dinámico y bioactivo que contiene macronutrientes, micronutrientes y factores inmunológicos y bioactivos. Pero, además, aporta microbios (principalmente bifidobacterias) y oligosacáridos (responsables del llamado factor bifidus, es decir, "alimentan" a las bifidobacterias) (156,160,169,171).

Los lactantes alimentados con leche materna, tienen predominancia de *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* y muestran una microbiota más estable y diversa que los lactantes alimentados con fórmula (156). Todo lo cual, contribuye a una clara maduración del sistema inmunológico, protección contra infecciones y también a la reducción del riesgo de enfermedades, como alergias, obesidad y otros trastornos a lo largo de su vida (168). Por otro lado, un estudio reciente que analizó la microbiota intestinal de 45 lactantes prematuros de muy bajo peso, sugirió que los recién nacidos prematuros hospitalizados que reciben leche materna podrían desarrollar una microbiota similar a la de los recién nacidos a término (172). Estos hallazgos enfatizan la importancia de la leche materna como una oportunidad para que los bebés prematuros desarrollen una microbiota intestinal "normal", similar a la de los nacidos a término.

Por último, dado que la composición de la leche materna está modulada por la alimentación de la madre, durante el periodo de lactancia materna también es crucial para la salud del lactante a corto y largo plazo que la madre adopte una alimentación saludable, (110,156,168) cuyas características se abordan a continuación.

### 3.3.4. ALIMENTACIÓN

Con el inicio de la **alimentación complementaria** a la leche materna o, en su defecto de fórmula, se produce una importante modificación de la microbiota intestinal, y se inicia el cambio hacia una microbiota propia de la edad adulta que

se asienta en el momento en el que el niño ya come todo tipo de alimentos (110). Esta introducción de alimentos sólidos no se basa, o no debería hacerlo, en unas pautas estrictas (170).

La típica dieta occidental, caracterizada por un elevado consumo de productos ultraprocesados, y pobre en alimentos de origen vegetal ricos en fibra (122,157), acaba conformando un patrón de alimentación pernicioso para la microbiota intestinal al que podríamos denominar “**alimentación disbiótica**” (173).-

Un patrón de alimentación centrado en dar forma y mantener una microbiota intestinal sana, estaría caracterizado por priorizar el consumo de hortalizas y frutas, que aportan gran cantidad de fibras fermentables y polifenoles diferentes (126,173,174), que podemos complementar con el consumo de alimentos fermentados (lácteos, pero también vegetales) (175,176), y que acaban conformando lo que podemos denominar como una “**alimentación prebiótica**” (173,177). La cual ha demostrado ampliamente que, entre otros beneficios, mejora trastornos metabólicos asociados con la obesidad, incluida la disminución de la masa grasa, la resistencia a la insulina y la esteatosis hepática, además de reforzar la barrera intestinal (126,174,177).

### **3.3.5. FÁRMACOS**

Los antibióticos ocasionan cambios en el desarrollo y la composición de la microbiota intestinal, especialmente durante los primeros años de vida (168,178,179). Durante la etapa perinatal y la infancia, la administración de antibióticos tanto a la madre como al bebé, se asocia con un riesgo aumentado del niño a padecer posteriormente enfermedades como obesidad (178,180,181), asma, enfermedad inflamatoria intestinal, y otras alteraciones alérgicas e inflamatorias (166,178,182).

Otros fármacos también pueden incidir sobre la microbiota intestinal. Varios estudios clínicos recientes han resaltado los efectos de los inhibidores de la bomba de protones sobre la composición y la función del microbioma intestinal, pero la lista de fármacos que perturban la microbiota es mucho más amplia, e incluye laxantes osmóticos, antidiabéticos, antihipercolesterolemiantes,

antidepresivos, terapias hormonales femeninas, paracetamol, antiinflamatorios no esteroideos, inhaladores anticolinérgicos, inhibidores del TNF-alfa y opioides (183–185).

### 3.3.6. ENTORNO E HIGIENE

Otro punto importante que debe tenerse en cuenta para el bienestar de la microbiota intestinal, muy especialmente durante la gestación y los primeros años de vida del niño, es el lugar de residencia y el nivel de higiene. Crecer y vivir en ambientes rurales (186,187), en contacto constante con árboles, plantas, animales, etc., se ha asociado con una microbiota más saludable. Del mismo modo, la leche materna de mujeres que viven en entornos rurales posee una microbiota más diversa (mejor) que la de aquellas mujeres que viven en entornos urbanos (166). Incluso, el hecho de poseer mascotas con pelo (perros, gatos, etc.) en casa durante y/o después del parto, modifica la microbiota del niño (188) y parece ofrecer protección al recién nacido frente a la atopia y la obesidad infantil (182,189).

### 3.3.7. ESTRÉS CRÓNICO, RITMOS CIRCADIANOS Y SEDENTARISMO

El estrés mantenido en el tiempo, desencadena la liberación de hormonas como la corticotropina y catecolaminas, que alteran la microbiota intestinal (190). Otros factores clave que, en las sociedades occidentalizadas están alterando nuestra microbiota son: el **sedentarismo** (191–193) y la cronodisrupción. La microbiota intestinal es capaz de modular **los ritmos circadianos** del huésped a través de metabolitos microbianos como el butirato, los derivados polifenólicos, las vitaminas y aminos biogénicas (como serotonina); al mismo tiempo, la alteración de los ritmos circadianos influye negativamente sobre el microbioma intestinal (194,195).

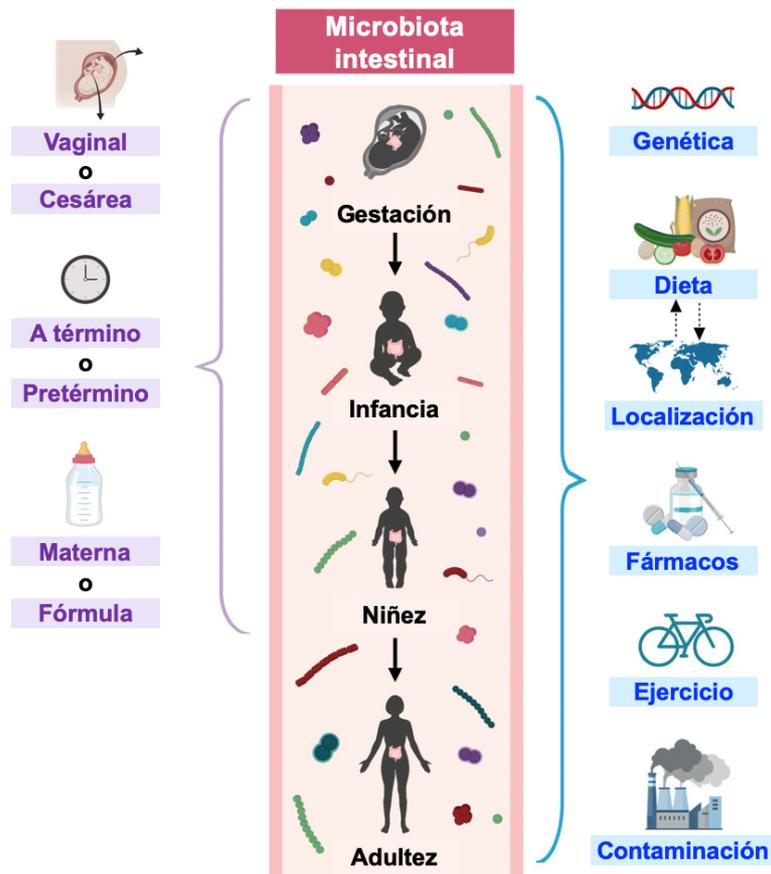


Figura 1.3. Factores que dan forma y alteran la microbiota intestinal a lo largo de la vida. Adaptada de Avelar y colaboradores, 2019 (156).

### 3.4. DISBIOSIS INTESTINAL

Denominamos **disbiosis** a las “alteraciones en la composición, taxonomía, cantidad o función de la microbiota intestinal, resultando en efectos negativos sobre el huésped” (156). La microbiota intestinal desempeña un papel importante en enfermedades gastrointestinales como la enfermedad inflamatoria intestinal, el síndrome del intestino irritable y el cáncer de colon (153). Más recientemente, se ha ido acumulando evidencia sobre que la microbiota también puede estar involucrada en la obesidad y complicaciones asociadas como resistencia a la insulina, DM2 o enfermedad cardiovascular (125,126,152,153); y otras como alergia, eccema, asma, acné o patologías autoinmunitarias (196). Pero no solo eso, durante la última década se han desarrollado estudios (la mayoría preclínicos) que muestran cómo la microbiota intestinal actúa como un regulador

clave en la conexión bidireccional que se establece entre nuestro tracto gastrointestinal y nuestro cerebro, el llamado eje intestino-cerebro. Lo que podría jugar un papel clave en el neurodesarrollo (161), y en afecciones neuropsiquiátricas como depresión o enfermedades neurodegenerativas (196,197).

### 3.5. MICROBIOTA INTESTINAL, OBESIDAD Y COMPLICACIONES ASOCIADAS: MECANISMOS PRINCIPALES

Existen diversos estudios en los que se ha descubierto una estrecha relación entre la composición de la microbiota intestinal, la obesidad y las complicaciones asociadas. Sin embargo, la mayor parte de los mecanismos que pueden explicar esta relación todavía no han sido completamente descifrados (152), y la mayoría de los estudios entorno a la relación microbiota-obesidad se han realizado en ratones, cuya regulación del peso corporal y del almacenamiento de energía difiere mucho de la del ser humano, lo que nos obliga a valorar con mucha cautela los estudios sobre obesidad realizados con modelos animales (198). Ahora bien, existen datos en humanos que nos indican que:

**1º) Las personas que padecen obesidad tienen una composición microbiana diferente.** Poseen lo que podríamos denominar una **microbiota obesogénica**, que presenta una menor diversidad y diferencias taxonómicas a nivel de filo, género y especies, en comparación con las personas con normopeso (157,199,200) (Figura 1.4).

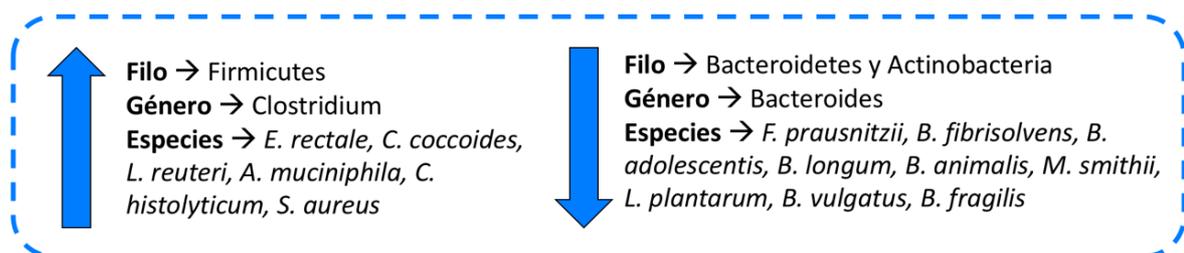


Figura 1.4. Diferencias taxonómicas a nivel de filo, género y especie que caracterizan una "Microbiota obesogénica" (200).

La **diversidad microbiana** (es decir, la riqueza de diferentes especies de la microbiota) se describe constantemente en la literatura científica como un indicador de salud. Una microbiota intestinal humana saludable se caracteriza por poseer una alta diversidad, mientras que una microbiota intestinal disbiótica se caracteriza por albergar una baja diversidad, como sucede en casos de obesidad (199,201), DM2 y arteriosclerosis (155).

**2º)** Además de la diversidad microbiana, otro parámetro importante para evaluar la salud de nuestra microbiota es la **riqueza genética microbiana** (cantidad de genes microbianos), y que, en personas con obesidad, es baja (125,201,202). La evidencia sugiere que podemos clasificar a los sujetos en función de la cantidad de genes bacterianos que albergan en el intestino, dividiéndolos entre los que poseen un alto recuento de genes y los que poseen un bajo recuento (201). Un bajo recuento de genes microbianos se asocia con un aumento de la adiposidad, resistencia a la insulina, dislipemia y un fenotipo inflamatorio más pronunciado (125). Además, la riqueza de genes microbianos podría ser especialmente relevante a la hora de explicar la mayor o menor susceptibilidad para responder a la intervención dietética destinada a mejorar parámetros metabólicos: Dao y colaboradores (2016) observaron que, en términos de mejorar la sensibilidad a la insulina y parámetros de inflamación, y de disminuir las cifras de colesterol, la restricción dietética en pacientes con sobrepeso u obesidad, es menos eficiente entre los pacientes que poseen un bajo recuento de genes comparados con aquellos que poseen un alto recuento (203). En esta misma línea, Zhong y colaboradores (2019), en una cohorte de 281 niños holandeses de entre 6 y 9 años de edad, encontraron que, la correlación inversa entre un alto consumo de fibra dietética y niveles bajos de insulina en plasma, está condicionada por la composición de la microbiota intestinal, con mejores resultados en aquellos niños que cuentan con una microbiota intestinal que muestra una riqueza genética microbiana superior, que les confiere un mayor potencial funcional para la fermentación de carbohidratos complejos y la producción de ácidos grasos de cadena corta (204).

## MECANISMOS PRINCIPALES

Existen tres mecanismos principales que explicarían la relación entre microbiota intestinal, obesidad y las complicaciones asociadas:

### 3.5.1. ENDOTOXEMIA METABÓLICA E INFLAMACIÓN CRÓNICA DE BAJO GRADO

La barrera intestinal consta de una capa de mucus y una capa de células epiteliales que están unidas entre sí a través de las “uniones estrechas entre enterocitos”. La permeabilidad intestinal es una característica funcional del intestino y, su aumento es lo que se conoce con el nombre de “hiperpermeabilidad intestinal”. La microbiota intestinal juega un papel clave en el mantenimiento de la barrera intestinal, tanto en la formación de la capa de mucus como en la síntesis de las “uniones estrechas entre enterocitos”, manteniendo una permeabilidad intestinal óptima (126,205).

El aumento de la permeabilidad intestinal tiene el riesgo de desencadenar una **endotoxemia metabólica**, debido a la translocación de antígenos desde el lumen intestinal hasta el torrente circulatorio. El lipopolisacárido bacteriano (LPS) es el antígeno más estudiado. Se trata de un componente estructural de la membrana de bacterias Gram-negativas que puede unirse al receptor de inmunidad innata, receptor 4 tipo Toll (TLR4), a través de la molécula CD14, promoviendo la producción de citocinas inflamatorias y, por consiguiente, una inflamación crónica de bajo grado. No obstante, el paso del LPS a la circulación sanguínea también se ha descrito por otro mecanismo según el cual, el LPS se incorpora a los quilomicrones y, posteriormente, a otras lipoproteínas (LDL, VLDL) por la acción de translocasas. En cualquier caso, cuando el LPS alcanza la circulación sanguínea puede aumentar la **resistencia a la insulina**, al mismo tiempo que podría incrementar la **hiperplasia de adipocitos** y el **reclutamiento de macrófagos en el tejido adiposo** (126,200).

### 3.5.2. REGULACIÓN DEL METABOLISMO ENERGÉTICO

Una de las primeras teorías que relacionaban microbiota intestinal y obesidad, defendía que, esta asociación se debía a que los microbios intestinales de las personas con obesidad eran capaces de extraer una mayor cantidad de calorías de los alimentos ingeridos. Nuestro aparato digestivo no está dotado con enzimas que permitan digerir ciertos hidratos de carbono complejos (considerados como fibra alimentaria), de tal forma que, estas moléculas llegan al colon sin digerir y allí son fermentadas por acción de los microbios. De acuerdo con esta teoría, una microbiota obesogénica facilita una mayor síntesis de enzimas microbianas capaces de degradar los hidratos de carbono no digeribles (136); de modo que se liberan AGCC que, una vez absorbidos, aportan más calorías a nuestro metabolismo (206). Sin embargo, esta teoría centrada en las calorías recuperadas tiene lagunas importantes; por un lado, las calorías aportadas a través de este mecanismo son muy pocas como para traducirse en un aumento de peso significativo y, por otro lado, las últimas investigaciones al respecto apuntan a que más allá de la mayor cantidad de calorías que pueda recuperar una microbiota obesogénica, los cambios realmente trascendentes que esta microbiota provoca, se deben a las modificaciones del metabolismo a las que puede dar lugar (136,206). Además, se ha demostrado que una mayor producción de AGCC se correlaciona con una menor prevalencia de obesidad inducida por la dieta (207), y una menor resistencia a la insulina (208).

De acuerdo con el conocimiento científico actual, una microbiota intestinal obesogénica tiene la capacidad de estimular procesos que permiten un mayor acúmulo de grasa en el organismo a través de diferentes mecanismos, como son:

#### a) Ácidos grasos de cadena corta (ÁGCC)

Los **AGCC** (butírico, propiónico y acético) son metabolitos característicos de la microbiota intestinal, y juegan un papel importante en el control de la sensibilidad celular a la insulina, la inflamación y la acumulación excesiva de grasa. Lo hacen a través de los receptores acoplados a proteína G (*G-protein-coupled receptor*, GPR), concretamente **GPR43** y **GPR41**, que se expresan en adipocitos, células epiteliales y endocrinas. A estos receptores también se los conoce como receptores de ácidos

grasos 2 y 3 (*Free Fatty Acid Receptor*; FFAR2 y FFAR3), respectivamente (209,210).

La cantidad y el porcentaje relativo de cada AGCC producidos por la microbiota intestinal contribuye a la regulación de la homeostasis energética del huésped, aunque aún parece más importante la **proporción de cada AGCC que entra a la sangre y llega hasta órganos específicos**. En cualquier caso, se necesitan más estudios que den explicación detallada del efecto de la producción de AGCC en el metabolismo (125,200).

## **b) Ácidos biliares**

Los ácidos biliares se sintetizan en el hígado (conocidos como ácidos biliares primarios); que son transportados al duodeno a través de la bilis. Los ácidos biliares primarios son reabsorbidos en su mayoría en el íleon, volviendo al hígado por la vena porta para comenzar nuevamente este proceso, que se conoce como “circulación enterohepática de las sales biliares”. Sin embargo, una pequeña fracción de sales biliares (1–5%; 200–800 mg diarios en humanos) no es absorbida en el intestino delgado y alcanza el intestino grueso y, por tanto, a la microbiota intestinal. Aquí, las sales biliares mantienen una relación bidireccional con la microbiota intestinal: por un lado, los ácidos biliares poseen características antimicrobianas y pueden modular la composición del ecosistema microbiano. Por otro lado, la microbiota colónica es capaz de transformar directamente los ácidos biliares, dando lugar a los conocidos como ácidos biliares secundarios. Además, la microbiota intestinal interviene en la regulación de varias enzimas hepáticas involucradas en la síntesis de ácidos biliares, por lo que se trata de un mecanismo indirecto de transformación de dicho ácidos (153,211).

Los ácidos biliares presentes en la sangre y en el hígado, muestran una gran diversidad (se conocen más de 30 tipos de ácidos biliares) y la microbiota intestinal es el principal responsable de dicha diversidad. O, dicho de otra forma: el perfil de los ácidos biliares será diferente en función del tipo de microbios que se albergan en el intestino (153).

Los ácidos biliares son ligandos del receptor farnesoide X (**FXR**), así como del Receptor 1 de ácidos biliares acoplado a proteína G (**GPBAR1**), que juegan un papel clave en el control de la lipogénesis hepática, de la sensibilidad a la insulina, y de la síntesis y el transporte de lipoproteínas de baja densidad. Las interacciones de los

ácidos biliares con la microbiota intestinal a través de FXR y GPBAR1 son fundamentales para el metabolismo y desarrollo de enfermedades cardiovasculares del huésped (153,209,211,212).

### c) Sistema endocanabinoide

El sistema endocanabinoide, está constituido por receptores canabinoides, sus ligandos (los endocanabinoides) y las enzimas que los producen o inactivan. Los endocanabinoides son compuestos derivados de ácidos grasos endógenos (principalmente del ácido araquidónico), que se unen y activan al mismo receptor que media los efectos de los principios activos del cannabis. Los más estudiados son los derivados del ácido araquidónico: la araquidonil etanolamida (conocido como anandamida) y el 2-araquidonilglicerol (213).

Estos endocanabinoides que están elevados en pacientes con exceso de peso, promueven la resistencia a la insulina, dislipemia y enfermedad cardiovascular (214). Se sabe que, la activación del sistema endocanabinoide aumenta la ingesta energética, mientras que, su bloqueo, reduce la ingesta (213). Y, al parecer, la microbiota intestinal es un elemento clave en el control del sistema endocanabinoide (206,215,216).

### 3.5.3. REGULACIÓN DEL APETITO

El sistema nervioso central recibe constantemente señales neuronales y químicas del intestino y, los microbios y sus metabolitos podrían influir directamente en el cerebro a través de la estimulación del nervio vago (214), o indirectamente a través de los mecanismos que se describen a continuación:

- a) En las células enteroendocrinas, la microbiota intestinal modula la síntesis de **péptidos que controlan la saciedad** como el péptido tirosina-tirosina (también conocido como **PYY**), la colecistoquinina (**CCK**), y el péptido similar al glucagón tipo 1 (**GLP-1**). Tanto el lactato como los AGCC (ambos metabolitos de la microbiota intestinal) son capaces de modular la síntesis de estos péptidos intestinales implicados en la saciedad. En general, la mayor producción de AGCC se asocia a más producción de péptidos saciantes, en cambio, los efectos específicos de cada AGCC aún no se conocen con exactitud (125,136,211).

- b) Las bacterias intestinales también pueden afectar al control central del apetito produciendo **metabolitos neuroactivos**, incluyendo serotonina y ácido gamma-aminobutírico (GABA), neurotransmisores que están implicados en el equilibrio normal de la regulación del apetito (136,214).
- c) Además, la alteración de la microbiota intestinal está asociada con la **inflamación vía LPS**. Existen receptores tipo Toll (que son ligandos de LPS) en neuronas vagales aferentes y en ganglios nodosos, lo que sugiere que, a través de los nervios aferentes viscerales, puede establecerse una relación directa entre la presencia de LPS bacterianos a nivel intestinal y la inflamación del sistema nervioso. La inflamación de la región hipotalámica se asocia con la alteración en el control del apetito (152).
- d) La modulación del sistema endocanabinoide por parte de la microbiota intestinal, además de los efectos anteriormente descritos, también afecta al control homeostático y hedónico del apetito y la ingesta de comida (214).

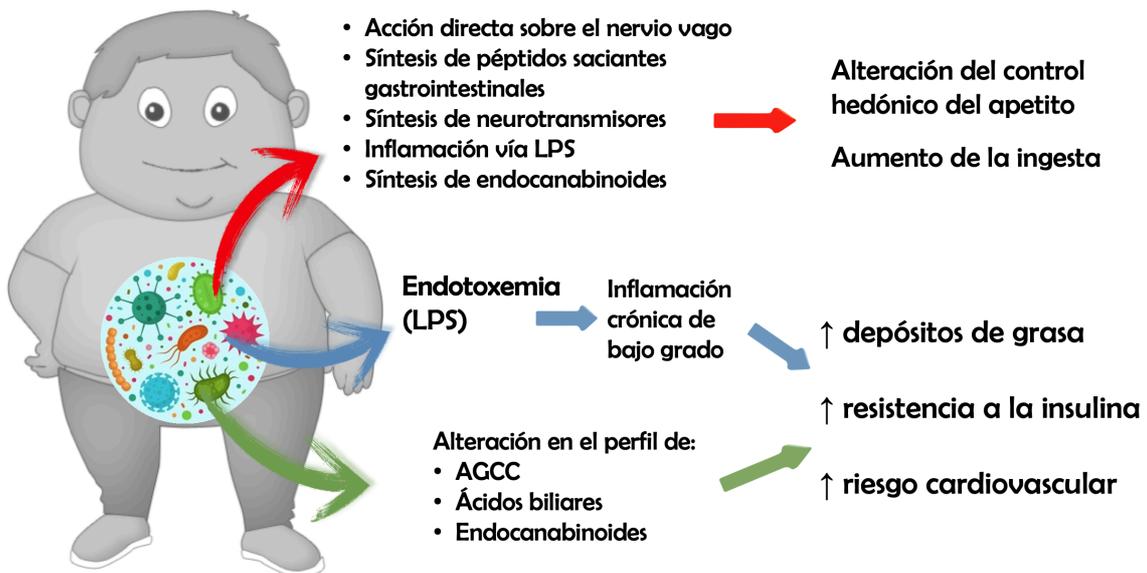


Figura 1.5. Principales mecanismos que explican la relación entre disbiosis microbiana, obesidad y complicaciones asociadas.

Pero no sólo es importante las características de la microbiota que puede tener un individuo, sino que también hay que considerar los cambios que se producen en ésta mediante la alimentación u otros factores exógenos modificables. De ahí la importancia de los llamados **probióticos**.

## **4. PROBIÓTICOS**

---

### **4.1. DEFINICIÓN**

Aunque el concepto probiótico parece ser antiguo, el término "probiótico" no se definió hasta hace relativamente poco y ha ido modificándose con el paso de los años (217). Actualmente, un probiótico se define como "microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un beneficio para la salud del huésped" (218).

### **4.2. IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS PROBIÓTICOS: MARCO LEGISLATIVO**

En las últimas dos décadas, se han comercializado miles de productos con bacterias teóricamente probióticas, al mismo tiempo que la lista de sus "posibles" efectos beneficiosos ha ido creciendo exponencialmente sin reparar en que, en muchas ocasiones, los efectos dependen de diversos factores como: la cepa, dosis, vía de administración o la forma de producción y conservación (219).

En 2001, una comisión de expertos convocados de forma conjunta por la FAO y la OMS, reconoció la necesidad de establecer directrices para la evaluación de la eficacia y seguridad de los probióticos. Y, en 2002, un grupo de trabajo mixto de la FAO y la OMS elaboró unas directrices con los requerimientos mínimos necesarios para que a un producto se le pudiera otorgar el apelativo de probiótico (Figura 1.6) (219).

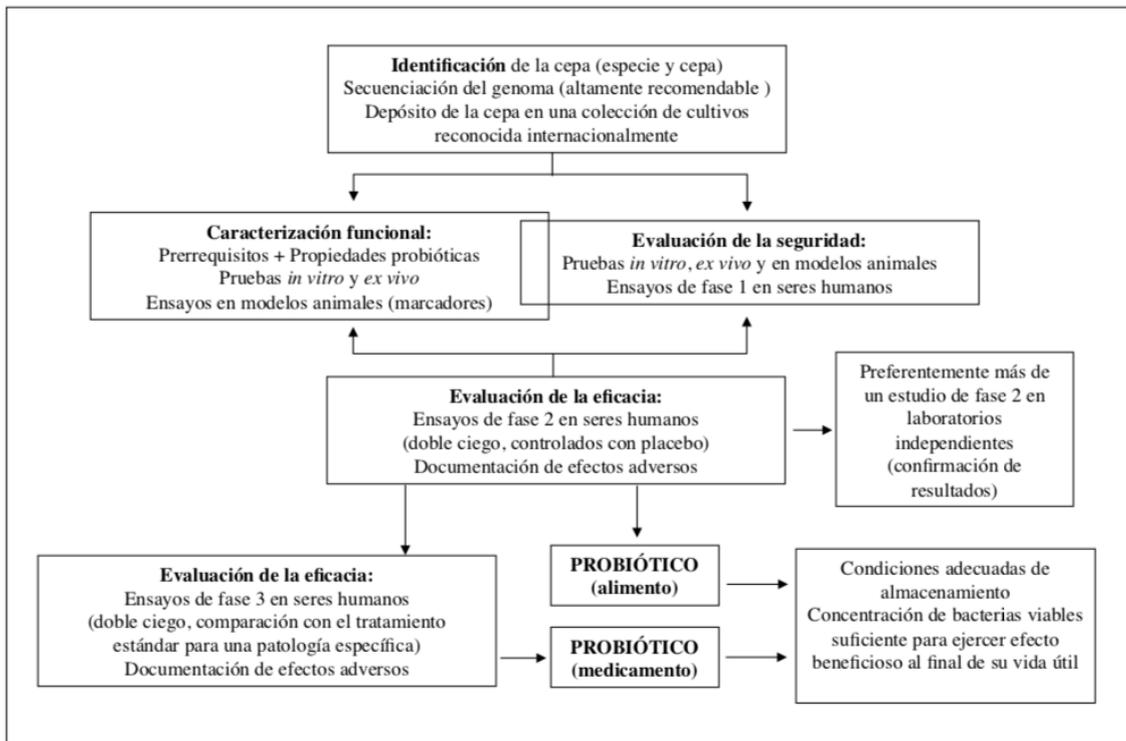


Figura 1.6. Directrices de la FAO/OMS para la evaluación de los probióticos (220).

El marco legislativo por el cual se regula el uso de los probióticos en la alimentación humana, además de muy reciente, tiene gran variabilidad entre diferentes países. Ante esta situación, la Unión Europea (UE), a través de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), ha tratado de dotar a los países miembros de un marco legislativo referente a la seguridad de microorganismos en la alimentación humana, para ello ha creado el estatuto o aval de **presunción cualificada de seguridad** (QPS; del inglés *Qualified Presumption of Safety*) (221). Se trata de un sistema de evaluación de seguridad de un grupo taxonómico definido (por ejemplo, género o especie) que se basa en cuatro pilares: definición de la unidad taxonómica (establecimiento de identidad), historia de uso y evidencia científica disponible, posible patogenicidad y aplicación final.

Actualmente, desde una perspectiva científica, para identificar adecuadamente un producto probiótico éste debe incluir (222):

- Identificación de género y especie, con nomenclatura congruente con los nombres científicos reconocidos actualmente.

- Designación de cepa.
- Recuento de organismos viables de cada cepa al final de la vida útil.
- Condiciones de almacenamiento recomendadas.
- Inocuidad bajo las condiciones de uso recomendadas.
- La dosis recomendada, que debería basarse en la inducción del efecto fisiológico declarado.
- Una descripción exacta del efecto fisiológico, en la medida de lo permitido por la ley.
- Información de contacto para vigilancia luego del lanzamiento comercial.

### **4.3. MECANISMOS DE ACCIÓN**

Durante los últimos años, un gran número de estudios con modelos animales, pero también ensayos clínicos en humanos, han mostrado beneficios de los probióticos en la prevención y tratamiento de diferentes enfermedades. En este sentido, varios estudios han demostrado los efectos terapéuticos potenciales de los probióticos y/o prebióticos sobre el peso corporal, el IMC, la circunferencia de la cintura, los depósitos de grasa, el perfil de lípidos y el estado de inflamación crónica (148,217,223,224).

El estudio de los mecanismos de acción permite conocer el modo por el cual los probióticos ejercen los efectos beneficiosos observados. No obstante, conviene destacar que los mecanismos son especie y cepa específicos (148,218), por lo que cada probiótico posee uno o varios mecanismos de acción que dan lugar a un efecto determinado en la salud humana (Figura 1.7). Desde un punto de vista genérico, podemos decir que algunos mecanismos se observan a nivel de grupos taxonómicos, como la inhibición de potenciales patógenos, o la producción de metabolitos o enzimas. Pero los efectos extraintestinales, como la modulación del sistema inmune, suelen ser específicos de cada cepa. Aunque una determinada cepa suele poseer varios mecanismos de acción, no debemos de esperar que un probiótico lleve a cabo todos los mecanismos de acción propuestos para los probióticos en general (218).



Figura 1.7. Posibles mecanismos de acción de los probióticos. Adaptado de Hill y cols. (2014) (218).

#### 4.4. EMPLEO DE PROBIÓTICOS EN LA OBESIDAD Y COMPLICACIONES ASOCIADAS

El uso de cepas específicas (o combinaciones de ellas), mayoritariamente de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, se ha investigado ampliamente como tratamiento probiótico en modelos animales de obesidad (148,225). Más del 85% de los estudios informan que, tanto ratones como ratas suplementadas con cepas de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* muestran menor ganancia de peso, menor acumulación de grasa y de tejido adiposo blanco en comparación con los animales tratados con placebo (148). Estos resultados positivos también se manifiestan para la mejora de trastornos metabólicos e inmunológicos asociados a la obesidad como permeabilidad intestinal aumentada, resistencia a la insulina, resistencia a la leptina, dislipidemia, endotoxemia metabólica o inflamación crónica (225).

Sin embargo, en los estudios con humanos, los resultados son más escasos e inconsistentes que en modelos murinos (225,226). Entre población pediátrica y adolescente con obesidad se obtienen resultados ambiguos; mientras algunos probióticos logran mejorar parámetros antropométricos y metabólicos, en otros casos no es así (148,226,227). Con resultados muy similares en mujeres embarazadas con sobrepeso u obesidad. Algunas cepas probióticas logran mejorar la sensibilidad a la insulina, reducir la glucosa y la insulina en ayunas, y disminuir del riesgo de diabetes gestacional en mujeres con alto riesgo (227).

#### **4.5. BIFIDOBACTERIUM PSEUDOCATENULATUM CECT 7765**

*Bifidobacterium pseudocatenulatum* CECT 7765 es una cepa segura que fue aislada de heces de lactantes sanos, y que se seleccionó en base a sus propiedades antiinflamatorias *in vitro* en una línea celular de macrófagos (228). La cepa fue identificada por secuenciación del gen 16S ARNr (228).

*B. pseudocatenulatum* CECT 7765 ha sido ampliamente testado en diversos modelos animales (228–232), en los que ha demostrado que su administración es eficaz para la mejora de las alteraciones metabólicas e inmunológicas asociadas a la obesidad tales como:

- Reduce del aumento de peso corporal y de la ingesta de alimento (228,230,232).
- Disminuye los niveles séricos de colesterol, triglicéridos, glucosa e insulina y mejora la tolerancia oral a la glucosa y la sensibilidad a la insulina (228,230).
- Atenúa la inflamación sistémica asociada a la obesidad al restaurar el equilibrio entre las células T reguladoras y los linfocitos B y reduce citocinas proinflamatorias de la inmunidad innata y adaptativa (228,230).
- Mejora la integridad de la pared intestinal y disminuye la translocación bacteriana y la endotoxemia (228,230).

- Reduce de la esteatosis hepática, el tamaño de los adipocitos y la absorción de grasa de los enterocitos (228,231).
- Atenúa los cambios en la composición de la microbiota intestinal tras una alimentación alta en grasa; concretamente, la administración de *B. pseudocatenulatum* CECT 7765 aumenta el número total de *Bifidobacterium spp.* y reduce los de *Enterobacteriaceae*. Estos cambios en la composición de la microbiota podrían contribuir a reducir las señales inflamatorias procedentes del intestino, como se refleja en las menores señales inflamatorias del contenido intestinal, que podrían afectar a otros tejidos periféricos involucrados en la obesidad (228).

Además, este potencial probiótico ha mostrado capacidad para restaurar algunos de los cambios neuroquímicos y de comportamiento encontrados en ratones obesos inducidos por la dieta (229):

- Mejora la señalización de la leptina al incrementar la expresión del receptor de leptina en el intestino y en el hipocampo.
- Atenúa la respuesta exagerada al estrés característica de los ratones obesos. Pese a que no tuvo un efecto significativo sobre la expresión genética relativa de los receptores de glucocorticoides en el hipocampo.
- Restaura las reducciones de adrenalina inducidas por la obesidad en el hipotálamo.
- *B. pseudocatenulatum* también mejora las alteraciones de los niveles de serotonina en el hipocampo, lo que podría estar involucrado en la atenuación del comportamiento depresivo observada en el estudio de Agustí y cols. (2018).
- Con respecto a los parámetros inmunitarios, *B. pseudocatenulatum* CECT 7765 reduce la regulación positiva inducida por la obesidad de la expresión del gen TLR2 en el hipocampo y sus niveles de proteínas en el intestino delgado. La señalización de TLR2 es parte de algunas respuestas inmunes innatas y estos resultados sugieren que la cepa estudiada podría actuar más allá del intestino a través de sus

efectos antiinflamatorios, que teóricamente podrían contribuir a la restauración de los niveles de serotonina en el hipocampo.

La obesidad también se asocia con alteraciones en la remodelación ósea (equilibrio entre la resorción y formación ósea), mineralización ósea subóptima y la consiguiente pérdida de masa ósea. Fernández-Murga y cols. (2020) observaron que, en un modelo murino de obesidad inducida por la dieta, la administración del probiótico redujo la pérdida de masa ósea y mejoró la densidad de masa ósea al disminuir la resorción ósea y aumentar la formación de hueso (233).

Hasta la fecha no hay estudios suficientes realizados en humanos y, con estos antecedentes experimentales y de acuerdo con las directrices de la FAO/OMS para la evaluación de los probióticos (220), es necesario llevar a cabo un estudio clínico con el que poder analizar hasta qué punto los resultados obtenidos en ensayos preclínicos son extrapolables al ser humano.



# 02. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

## 1. JUSTIFICACIÓN

---

La existencia de una estrecha relación de la microbiota intestinal, con la obesidad y trastornos metabólicos como la diabetes tipo 2; ha sido ampliamente estudiada y demostrada (199,234–237). Sin embargo, muchos de los mecanismos que pueden explicar esta relación, o no se conocen o son controvertidos (238).

La evidencia científica actual, sugiere que la manipulación intencionada de la microbiota intestinal a través de prebióticos y probióticos, puede constituir una herramienta útil en la práctica clínica para reducir la prevalencia de obesidad y las complicaciones asociadas (148,223,226,239). La ingesta de algunos probióticos ha mostrado ser una ayuda eficaz para la prevención y el tratamiento de la obesidad, la resistencia a la insulina y las enfermedades cardiovasculares (148,223,227,240).

*B. pseudocatenulatum* CECT 7765 es un potencial probiótico que ha demostrado en repetidos estudios preclínicos una gran capacidad para contrarrestar las principales complicaciones metabólicas asociadas a la obesidad, como son la resistencia insulínica y la inflamación crónica de bajo grado (228,241–243). Sin embargo, hasta la fecha todos estos resultados se han obtenido solo en estudios con modelos animales. Por ello, y de acuerdo con las directrices de la FAO/OMS para la evaluación de los probióticos (220), consideramos pertinente llevar a cabo un estudio de intervención en el que se evalúe si las mejoras observadas en

modelos animales al ser tratados con la cepa *B. pseudocatenulatum* CECT 7765, son reproducibles en humanos. Este avance nos permitirá pautar con mayor seguridad y eficacia nuevas estrategias que tengan como diana terapéutica la microbiota intestinal y que ofrezcan una herramienta eficaz para ayudar a combatir la obesidad y sus complicaciones asociadas.

## 2. HIPÓTESIS

---

El consumo regular de *B. pseudocatenulatum* CECT 7765, junto con la adopción de hábitos dietéticos saludables, puede revertir en parte, las alteraciones metabólicas secundarias a la obesidad a través de cambios en la producción de citocinas y/o en la composición de la microbiota intestinal.

## 3. OBJETIVOS

---

El **objetivo principal** del proyecto de tesis doctoral es evaluar los efectos de la administración oral de una cepa potencialmente probiótica (*B. pseudocatenulatum* CECT 7765) junto con recomendaciones de alimentación saludable, sobre parámetros antropométricos y marcadores de inflamación y salud cardiovascular en niños con obesidad y resistencia insulínica.

Con tal de alcanzar el objetivo principal, se plantean los siguientes **objetivos secundarios**:

1. Estudiar el efecto de la suplementación con *B. pseudocatenulatum* CECT 7765 sobre parámetros antropométricos.
2. Evaluar el efecto de la suplementación con *B. pseudocatenulatum* CECT 7765 sobre parámetros de riesgo cardiovascular como resistencia a la insulina, dislipemia y tensión arterial.
3. Analizar el efecto de la suplementación con *B. pseudocatenulatum* CECT 7765 sobre parámetros de inflamación y adipocinas como leptina, adiponectina, omentina y MCP1.

4. Evaluar el efecto de la suplementación con *B. pseudocatenulatum* CECT 7765 sobre otros parámetros bioquímicos como la GGT, la ALT o la 25(OH)D.
5. Valorar la ingesta dietética inicial y los cambios dietéticos experimentados tras la intervención.
6. Explorar las posibles correlaciones que existen entre la dieta llevada a cabo por los participantes y los parámetros antropométricos en el momento inicial.
7. Analizar el efecto de las recomendaciones dietéticas en niños no suplementados con *B. pseudocatenulatum* CECT 7765 sobre parámetros antropométricos, marcadores de riesgo cardiovascular y de inflamación.
8. Evaluar el efecto de la intervención realizada mediante un patrón de alimentación saludable y suplementación con *B. pseudocatenulatum* CECT 7765 sobre la composición de la microbiota fecal.



# 03. MATERIAL Y MÉTODOS

## 1. DISEÑO EXPERIMENTAL

---

### 1.1. TIPO DE ESTUDIO

Estudio prospectivo, longitudinal, aleatorizado, doble ciego y controlado con placebo; con una cohorte de niños y adolescentes con obesidad y resistencia a la insulina que fueron reclutados en el Hospital Universitario de Pediatría Dr. Peset de Valencia (España). El estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital Universitario Dr. Peset de Valencia (Código: 52/11) (Anexo I). Todos los procedimientos llevados a cabo durante el estudio estaban completamente de acuerdo con los principios éticos para la investigación médica en seres humanos de la declaración de Helsinki, y sus modificaciones posteriores (244).

### 1.2. TAMAÑO MUESTRAL Y ALEATORIZACIÓN

Se requiere un tamaño muestral de 23 niños y niñas por grupo (probiótico y placebo) para detectar una diferencia en la sensibilidad a la insulina en una prueba de dos colas, con un nivel de significación del 5% ( $\alpha=0,05$ ) y con una potencia del 85%, siendo la diferencia entre medias de por lo menos 1,0 unidades del índice HOMA-IR. La varianza utilizada para este cálculo es la que consta en un estudio previo realizado en niños españoles (245). Considerando unas posibles pérdidas del 15% en el seguimiento de los pacientes, se debe de contar con un total de 54 niños (27 por grupo) (Figura 3.1).

<b>COMPARACIÓN DE DOS MEDIAS</b> (Se pretende comparar si las medias son diferentes)	
Indique número del tipo de test	
Tipo de test (unilateral o bilateral)	2 BILATERAL
Nivel de confianza o seguridad (1- $\alpha$ )	95%
Poder estadístico	85%
Precisión (d) (Valor mínimo de la diferencia que se desea detectar, datos cuantitativos)	1,00
Varianza (S <sup>2</sup> ) (De la variable cuantitativa que tiene el grupo control o de referencia)	1,27
<b>TAMAÑO MUESTRAL (n)</b>	<b>23</b>
<b>EL TAMAÑO MUESTRAL AJUSTADO A PÉRDIDAS</b>	
Proporción esperada de pérdidas ( R )	15%
<b>MUESTRA AJUSTADA A LAS PÉRDIDAS</b>	<b>27</b>

Figura 3.1. Cálculo del tamaño muestral para la comparación de dos muestras utilizando el Excel. Disponible en el portal web [www.fisterra.com](http://www.fisterra.com)

Los participantes fueron estratificados inicialmente por sexo. Los bloques permutados (tamaños de bloque de 4) se usaron dentro de cada estrato para lograr el equilibrio mediante una secuencia de aleatorización generada por computadora creada con Microsoft Excel 2013. La asignación fue 1:1 en grupos: **1) el grupo probiótico**, los niños que reciben un suplemento probiótico diariamente junto con recomendaciones dietéticas, y **2) el grupo placebo**, los niños que reciben las mismas recomendaciones dietéticas y un suplemento con idénticas características organolépticas, pero que no contiene la cepa probiótica. Los niños, los padres y los investigadores del estudio no conocieron la asignación del grupo determinado (ciego).

### 1.3. POBLACIÓN DE ESTUDIO

Niños y niñas que cumplieron con todos los criterios de inclusión, y con ninguno de exclusión, de los que se detallan a continuación:

### **1.3.1. CRITERIOS DE INCLUSIÓN**

1. Niños y niñas con obesidad esencial, IMC superior a 2 desviaciones estándar respecto a la media para su edad y género (puntuación z), utilizando las tablas de la Organización Mundial de la Salud como referencia (246).
2. Con resistencia a la insulina de acuerdo con el índice HOMA-IR (calculado dividiendo el producto de la insulina en ayunas en suero en  $\mu\text{UI/mL}$ ) por la glucosa basal (en  $\text{mmol/mL}$ ) por una constante de 22,5. Definimos el nivel de resistencia insulínica a partir de un índice HOMA-IR  $>3.16$  (247).
3. Concentraciones de glucosa plasmática en ayunas inferiores a 110 mg/dL.
4. De edad comprendida entre 7 y 16 años.
5. De raza caucásica y de origen español.
6. Cumplimiento en el seguimiento clínico y analítico en las Consultas Externas de Pediatría del Hospital Universitario Dr. Peset de Valencia.
7. Obtención del consentimiento informado firmado por parte de los padres y/o tutores legales para su inclusión en el estudio.

### **1.3.2. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN**

1. Sujetos que no se ajustan a los criterios de inclusión.
2. Síndromes o enfermedades que pueden influir en la ingesta dietética, composición corporal y distribución de la grasa corporal.
3. Trastornos endocrinos.
4. Uso de medicamentos como antidiabéticos orales, probióticos, antibióticos u otras drogas durante el período de estudio y/o 2 meses antes.
5. Hábitos alimenticios especiales como vegetarianismo.
6. Práctica de ejercicio físico de alta intensidad.

## 1.4. DISEÑO DEL ESTUDIO

Para su inclusión en el estudio, los niños derivados desde sus centros de atención primaria a las Consultas Externas de Pediatría del Hospital Universitario Dr. Peset de Valencia, aceptaron participar tras recibir toda la información del estudio por parte del dietista-nutricionista (D-N) y previa autorización de los padres o tutores de los niños mediante firma del consentimiento informado (Anexo II).

El día de entrada en el estudio y antes de iniciar la intervención, un pediatra encargado del niño en la consulta externa, realizó una historia clínica que incluía antropometría (peso, talla), composición corporal, toma de tensión arterial y exploración clínica completa, y solicitó una analítica de sangre. A continuación, el D-N instruyó a los participantes para que completasen un registro dietético (Anexo III) prospectivo de 3 días (2 días laborales y 1 festivo) que debían completar tanto al inicio como al final de la intervención.

A la semana siguiente de la primera visita, el D-N se citó con el participante y sus familiares para recoger, revisar y completar los registros dietéticos de 3 días (registro inicial o basal). A continuación, llevó a cabo el asesoramiento dietético, ofreciendo las pautas de alimentación y de actividad física que debían llevar a lo largo de la intervención (idénticas para ambos grupos, probiótico y placebo, y descritas más adelante en el apartado 3), realizó una exploración antropométrica y recogió muestras de heces. Finalmente, y en la misma visita, el D-N entregó el tratamiento probiótico o placebo, y ofreció una explicación detallada de las pautas para su ingesta y almacenamiento (detalladas más adelante en el apartado 6), de acuerdo con las indicaciones recibidas por parte del Instituto de Agroquímica y Tecnología de los Alimentos del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IATA-CSIC); donde se elaboraron los suplementos probiótico y placebo.

A los 45 días, los participantes tenían la opción de acudir a una revisión con el D-N, o bien recibir una llamada telefónica con el objetivo de controlar el seguimiento y solventar posibles dudas. A los 91 días y, una vez concluida la intervención, los participantes fueron citados de nuevo en las consultas externas

de pediatría del Hospital Universitario Dr. Peset de Valencia, donde se realizó otra analítica sanguínea, una valoración por parte del pediatra, una exploración antropométrica, la recogida y revisión del registro dietético (registro final) por parte del D-N, y la entrega de los viales vacíos por parte de los pacientes y de las muestras de heces finales (Figura 3.2).

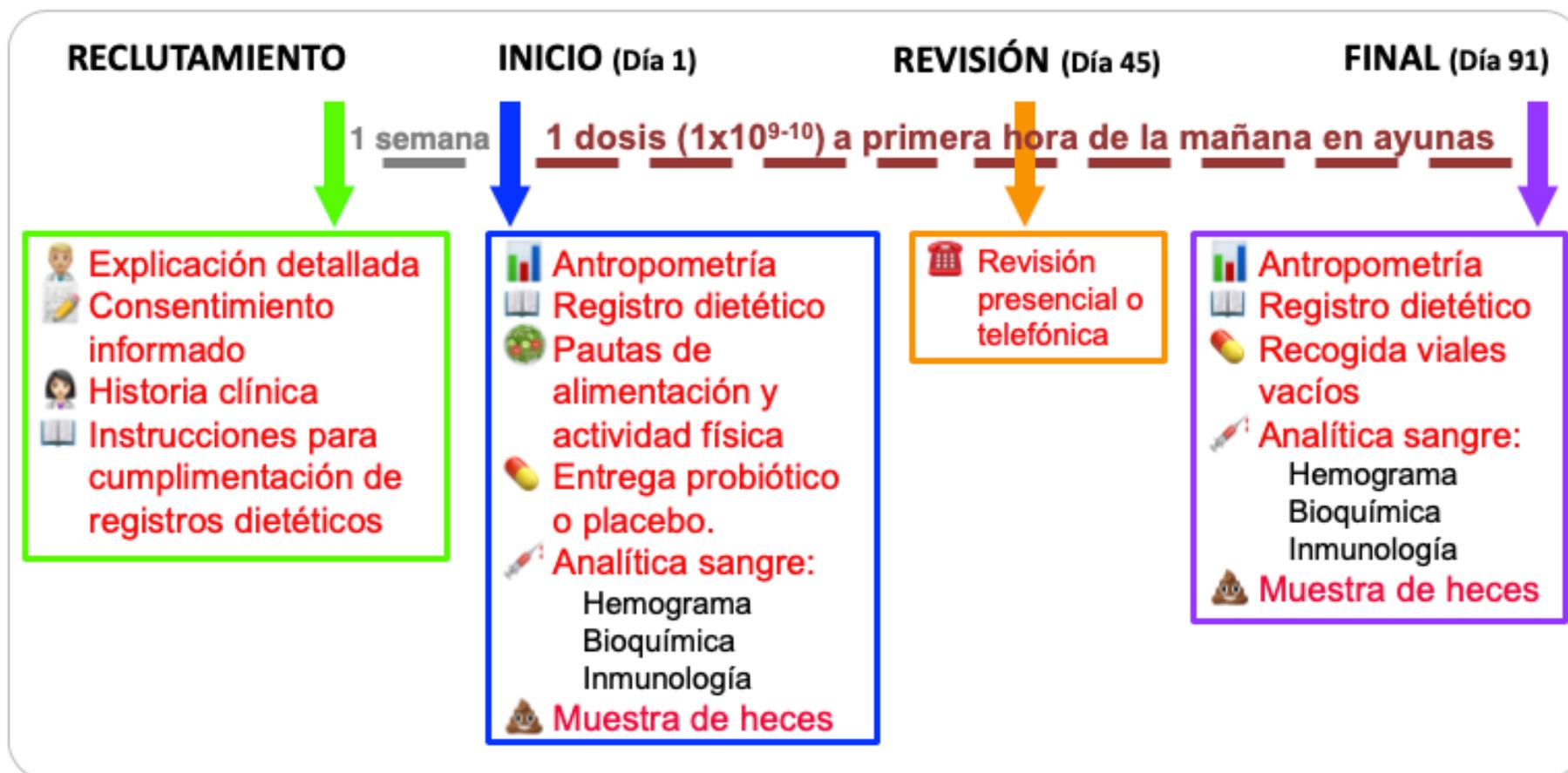


Figura 3.2. Diseño del estudio.

## 2. EVALUACIÓN CLÍNICA Y ANTROPOMÉTRICA

---

Todos los niños fueron pesados y tallados en las mismas condiciones, siguiendo para ello los protocolos estandarizados de la *International Society for the Advancement of Kinanthropometry* (ISAK). Para registrar el peso corporal, se utilizó una balanza electrónica BC-418 MA Tanita Segmental Body Composition analyzer (Tanita Europe BV, Hoofddorp, The Netherlands) (Figura 3.3A). Las mediciones se realizaron con los niños en ropa interior y sin zapatos (Figura 3.3B).

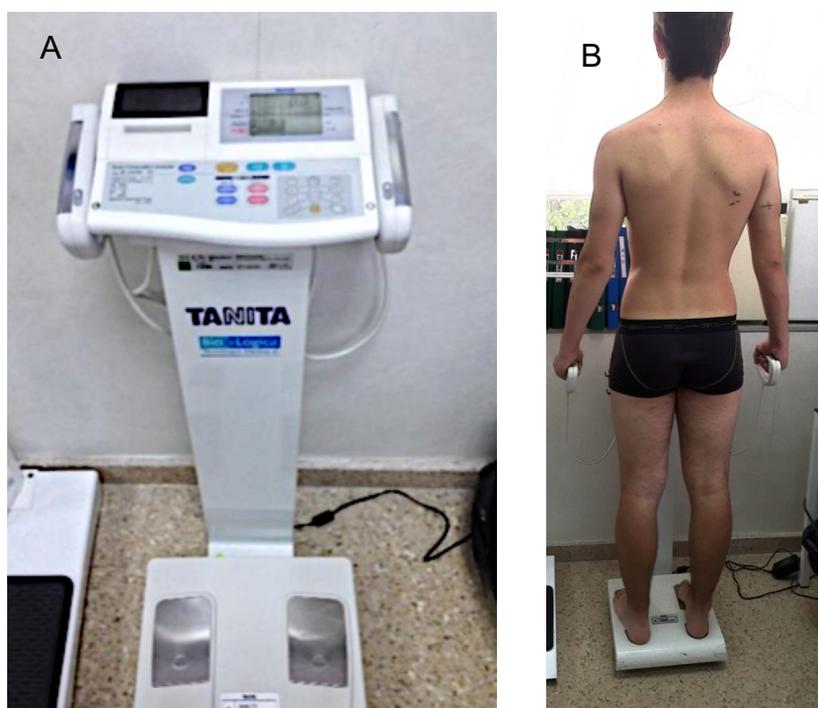


Figura 3.3. Balanza electrónica Tanita (A) y ejemplo de la forma de valorar el peso en un niño (B).

Para medir la talla se utilizó un tallímetro Holtain (Holtain Ltd., Dyfed, UK) con precisión de fracciones de 0,1 cm (Figura 3.4A). Los niños fueron medidos de pie con los pies unidos, descalzos, con los talones, glúteos, espalda y región occipital en contacto con el plano vertical del tallímetro (Figura 3.4B). En el momento de la lectura se pidió al niño que inspirara y mantuviera la cabeza en el plano de Frankfort (línea imaginaria que une el borde inferior de la órbita y el

conducto auditivo externo en posición horizontal). Se utilizó la escala de lectura en centímetros.

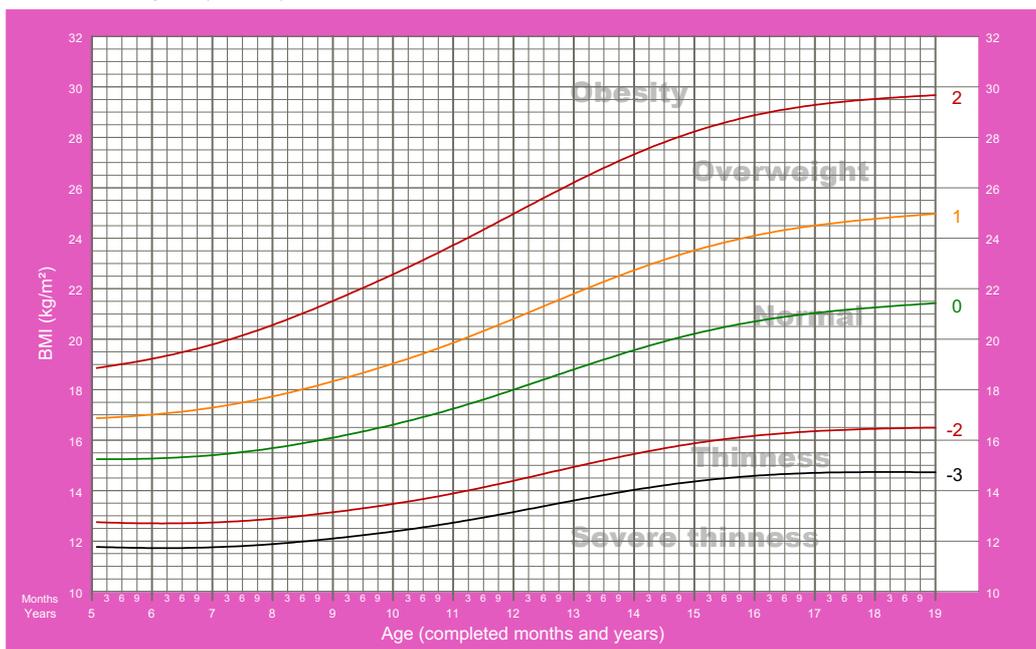


Figura 3.4. Tallímetro Holtain (A) y ejemplo de la forma de valorar la talla en un niño (B).

Se calculó el IMC como el cociente entre el peso (kg) y la altura al cuadrado (m<sup>2</sup>). Se calcularon los valores de la puntuación z del IMC (z-IMC) y los percentiles correspondientes mediante el programa de Aplicación Nutricional de la SEGHN(248) utilizando las tablas de la OMS como referencia (246) (Figura 3.5).

## BMI-for-age GIRLS

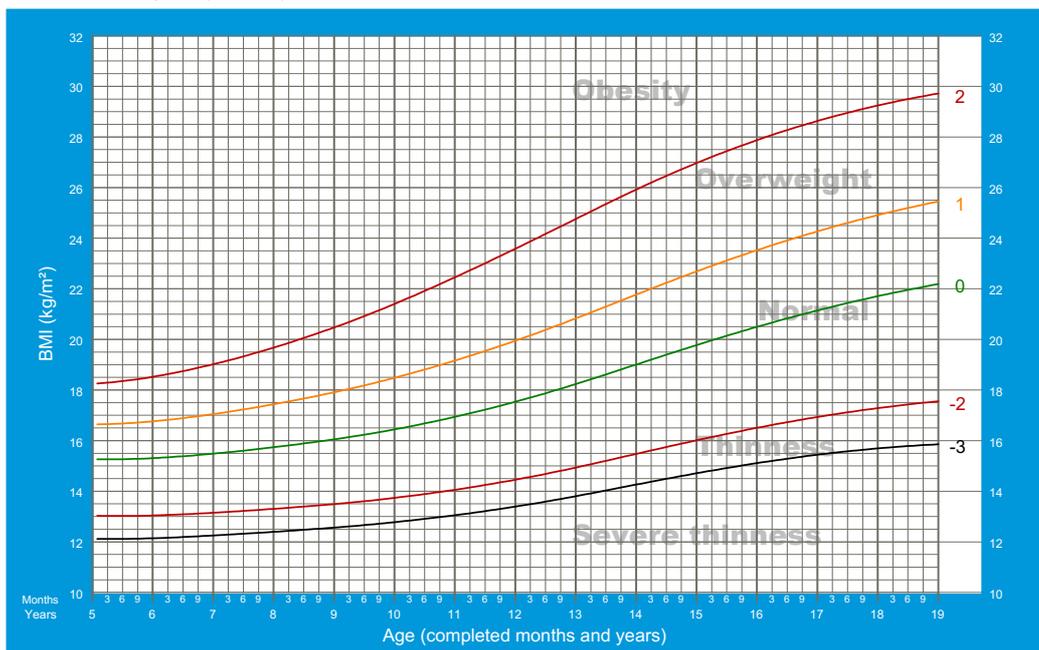
5 to 19 years (z-scores)



2007 WHO Reference

## BMI-for-age BOYS

5 to 19 years (z-scores)



2007 WHO Reference

Figura 3.5. Valores de corte del IMC para la edad de la OMS para definir la obesidad, el sobrepeso, la delgadez y la delgadez extrema en niños en edad escolar y adolescentes; mujeres y varones. Fuente: OMS. Disponible en: [http://www.who.int/growthref/who2007\\_bmi\\_for\\_age/en/](http://www.who.int/growthref/who2007_bmi_for_age/en/)

El **porcentaje de masa grasa** se obtuvo a través de la impedancia bioeléctrica con el analizador de composición corporal BC-418MA Tanita segmental (Tanita Europe BV, Hoofddorp, Países Bajos) (Figura 3.3A). La impedancia bioeléctrica o bioimpedancia, es un método no invasivo para la evaluación de la composición corporal que mide la oposición al flujo de una corriente por el cuerpo entero. Los individuos con grandes cantidades de tejido adiposo tendrán mayor resistencia o impedancia al flujo de corriente debido a que el tejido adiposo es un mal conductor de la electricidad a consecuencia de su bajo contenido de agua. La bioimpedancia es capaz de estimar el agua corporal total y por ello la masa libre de grasa, y por diferencia con la masa corporal se obtiene la masa grasa (92). Para llevar a cabo la determinación en la impedancia bioeléctrica se utilizaron las siguientes condiciones en todas las mediciones: el niño debe estar desnudo, ha tenido que orinar previamente, no debe llevar ningún objeto metálico, debe permanecer erguido y con los brazos estirados.

La presión arterial (PA) se midió en una posición sentada con un esfigmomanómetro automático (Dinamp 200, GE Medical Systems Information Technologies, Inc., Milwaukee, Wisconsin, EE. UU.). Se consideró la media de tres mediciones. La PA media se calculó  $[(2 \times \text{PA diastólica}) + \text{PA sistólica}] / 3$ .

### 3. PAUTAS DE ALIMENTACIÓN SALUDABLE

---

El D-N ofreció un asesoramiento dietético idéntico para los participantes de ambos grupos (probiótico y placebo). El asesoramiento planteado no se centró en la cuantificación y reducción de las calorías ingeridas ni en la valoración y corrección de los porcentajes de macronutrientes a ingerir. El enfoque de la intervención se centró en la educación, corrección y adquisición de hábitos de vida (especialmente de alimentación) saludables; el objetivo principal fue que los participantes y sus familias dejaran de comprar y comer alimentos refinados y ultraprocesados ricos en azúcares refinados, sal, aditivos, grasas perjudiciales, y bajos en fibra alimentaria; un tipo de alimentación que, en su conjunto, dibuja lo que conocemos como un patrón de alimentación occidental y que se traduce en un aumento del riesgo de obesidad y complicaciones asociadas (21,79).

El patrón de alimentación propuesto se basa en ingerir mayores cantidades de frutas y hortalizas (249–251) y alimentos ricos en grasas saludables como aceite de oliva virgen y frutos secos (49–51,55,56,252). Además, incluir huevos a diario (59–61), pescado (58,253) (mejor azul y de pequeño tamaño como sardinas, caballa o boquerones) y carne fresca (evitando embutidos y carne procesada). Se insistió en la necesidad de reducir al máximo la ingesta de alimentos elaborados con cereales refinados (y sus harinas), favoreciendo el consumo de panes integrales no industriales (76), mejor aún elaborados a partir de cereales como centeno o espelta (254), copos de avena integrales (una buena opción para el desayuno) (173,255,256), e incrementar el consumo de legumbres (257,258). Se hizo especial hincapié en que los productos ultraprocesados frecuentemente consumidos por la población infantil como refrescos, yogures no naturales, zumos endulzados, chucherías, galletas, bollería y pastelería en general (21,76,77), se consumiesen solo esporádicamente (máximo una o dos veces a la semana) y siempre mejor fuera del hogar familiar (78).

Para facilitar la comprensión y recibir una guía gráfica que pudiese ayudar a padres e hijos en la adquisición de unos mejores hábitos de alimentación, las familias recibieron una copia del plato para comer saludable (Figura 3.4) creado por la Escuela de Salud Pública de Harvard en 2011 (259).

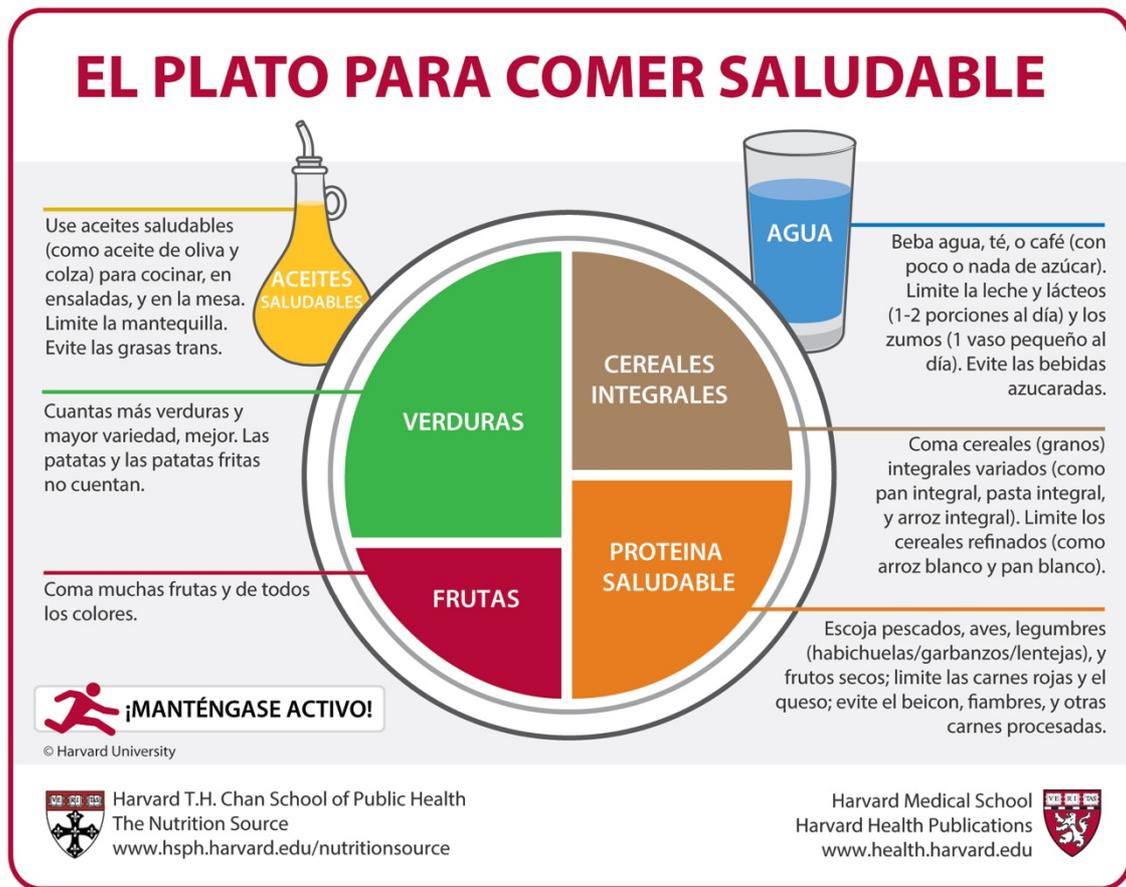


Figura 3.6. “El plato para comer saludable” elaborado por la Escuela de Salud Pública de Harvard (259).

Apoyándonos en la ilustración del plato para comer saludable de la Escuela de Salud Pública de Harvard, las recomendaciones ofrecidas por el D-N fueron las siguientes:

- **Las hortalizas** supondrán no menos de la  $\frac{1}{2}$  del plato de tus comidas principales. Cuantas más, mejor. Intenta incorporar color y variedad, escogiendo preferiblemente las de temporada.
- **Las frutas** serán el postre habitual. Para los tentempiés entre las comidas principales, también son la mejor opción.
- Escoge **granos integrales** (evita el pan y la pasta blanca, así como otros granos refinados). Varía y escoge cereales como la avena, el centeno, la espelta y el arroz; o pseudocereales como el trigo sarraceno y la quinoa. Una fuente excelente para aportar hidratos de carbono son los **tubérculos** como la patata y el boniato. En total, estos alimentos supondrán alrededor de la  $\frac{1}{4}$  del plato de tus comidas principales.

- *Completa tu alimentación optando por fuentes de **proteína saludable**: pescado, aves, legumbres (garbanzos/lentejas/alubias) y frutos secos al natural (ni dulces ni fritos ni salados). Limita los quesos, las carnes rojas y evita las carnes procesadas como tocineta (“bacon”) y embutidos.*
- ***Aceites y grasas**: escoge aceites saludables, en España, la mejor opción es el **aceite de oliva virgen**; tanto para cocinar como para aliñar. Evita todo tipo de aceites o grasas refinadas e hidrogenadas presentes en gran cantidad en los productos altamente procesados como bollería y snacks de todo tipo. Evita salsas procesadas (kétchup, barbacoa...). Y recuerda que “bajo en grasa” no significa saludable.*
- ***Bebe agua**. Evita las bebidas azucaradas o edulcoradas. Limita la leche y los productos lácteos a una o dos porciones al día. Limita el zumo de fruta natural a un vaso pequeño al día, es mejor fruta fresca entera que zumo.*

## 4. REGISTRO Y EVALUACIÓN DE LA INGESTA DIETÉTICA

---

La valoración de la ingesta sigue siendo en la actualidad una herramienta necesaria y de apoyo para conocer el patrón de alimentación y el aporte de macro y micronutrientes tanto a nivel individual como colectivo (260).

El **registro dietético** fue el método utilizado para llevar a cabo la valoración de la ingesta. Para estimar la ingesta habitual de un individuo es necesario anotar los alimentos y bebidas ingeridos en cada una de las comidas/tomas durante un periodo de 3-10 días (260). Puesto que el registro dietético tiene como uno de sus puntos débiles que demanda la participación del sujeto de estudio, con tal de obtener una muestra significativa y minimizar los casos de incumplimiento o abandono, se pidió a los participantes completar un registro dietético de 3 días consecutivos, uno de ellos en fin de semana, y tanto al inicio como al final del estudio (Anexo III).

En la primera visita con el D-N (antes de iniciar el estudio), los participantes fueron instruidos para completar de forma minuciosa los registros dietéticos, debiendo indicar:

- Cada una de las comidas realizadas y la hora, incluyendo tentempiés, snacks o comidas entre horas.
- Todos los sólidos, pero también los líquidos ingeridos. Es habitual pasar por alto las bebidas ingeridas, y cuando estas son refrescos azucarados, por ejemplo, la cantidad de azúcar ingerido puede ser enorme.
- Todos los ingredientes del plato, no solo los alimentos principales (hortalizas, frutas, huevos, etc.), también los aderezos y aditivos: aceite, sal, vinagre, especias, azúcar, sacarina; y las salsas: ketchup, mayonesa, barbacoa, etc.
- El tipo y calidad del alimento, por ejemplo: leche entera, semidesnatada o desnatada, con o sin lactosa; pan blanco, integral, de semillas, de molde, de trigo, de centeno, de espelta, etc.; aceite de oliva, de girasol, de coco, virgen o refinado.
- La cantidad ingerida, pudiendo utilizar medidas caseras (plato o vaso pequeño, mediano, grande; cuchara de café, postre o soperas; un palmo

de pan, ½ barra de cuarto, cuatro dedos, etc.); o medidas exactas (gramos, mililitros).

- Si la cantidad de alimento hace referencia al alimento en crudo o cocinado, y si se consume todo lo que hay en el plato o cuánta cantidad queda en el plato.
- La forma de preparación: horno, hervido, vapor, plancha, frito, crudo.

Para evitar olvidos, se les pidió que anotasen todo lo ingerido inmediatamente después de cada comida principal o picoteo. Y, con tal de asegurar su cumplimentación de la manera más exacta posible durante todo el periodo de estudio, el D-N revisó los registros iniciales y finales junto con los participantes.

La composición de nutrientes en la dieta de los participantes en base a los registros dietéticos recogidos se calculó utilizando el programa DIAL (Alce Ingeniería SA Madrid, España) (261). Las variables utilizadas para la valoración y comparación de las características más relevantes de la dieta de los participantes fueron: kilocalorías consumidas, % de las kilocalorías aportadas a través de proteínas, de hidratos de carbono y de lípidos; cantidad de azúcares, fibra dietética total, soluble e insoluble, así como las cantidades de colesterol, ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados.

## 5. PROBIÓTICO: PROPIEDADES, PEPARACIÓN, TRASLADO Y TOMA

---

La cepa *Bifidobacterium pseudocatenulatum* CECT 7765 se aisló originalmente de heces de lactantes sanos. Esta cepa se seleccionó en base a sus propiedades observadas en estudios *in vivo* (228). Ha demostrado en repetidos estudios en animales gran capacidad para contrarrestar las principales complicaciones metabólicas asociadas a la obesidad, como son la resistencia a la insulina, la inflamación crónica de bajo grado y la disfunción endotelial. Con esta cepa no se han descrito efectos adversos ni a nivel experimental ni clínico (228,241–243). *B. pseudocatenulatum* CECT 7765 está patentada en la Oficina Española de Patentes y Marcas: publicación número 2 389 547.

La cepa de estudio fue facilitada por el IATA-CSIC en viales bebibles de 1 ml mantenidos en congelación. Los participantes tomaban una dosis única por día que contenía desde  $10E^9$  hasta  $10E^{10}$  UFC (Unidades Formadoras de Colonias). El placebo lo proporcionó el mismo Instituto, contenido en viales idénticos: con los mismos excipientes, las mismas características organolépticas e idéntica apariencia que el tratamiento probiótico. Ambos tratamientos fueron identificados con dos nombres en clave para que tanto a los pediatras y D-N, como a los participantes del estudio no conocieran si se les administraba la cepa o el placebo (ciego).

La cepa fue cultivada en el IATA-CSIC en caldo o agar MRS (Scharlau, Barcelona, España) suplementado con 0,05% (w/v) cisteína (MRS-C) (Sigma, St. Louis, MO), e incubada durante 24 h a 37 °C en condiciones de anaerobiosis (AnaeroGen, Oxoid, Basingstoke, Reino Unido). Las bacterias se recogieron por centrifugación (10.000 rpm durante 10 min y a 20 °C), se lavaron dos veces en una solución de fosfato y cloruro sódico (PBS, 130 mM cloruro de sodio, 10 mM fosfato de sodio, pH 7,4), se resuspendieron en leche desnatada al 10% y finalmente se congelaron en alícuotas de 1 mL a -80 °C hasta su administración a los pacientes.

El traslado de las muestras desde el IATA-CSIC hasta la consulta de pediatría en el Hospital Dr. Peset, lo llevó a cabo personalmente el D-N el mismo día que

debían ser entregadas a los participantes, dentro de una bolsa térmica con placas de hielo para asegurar la cadena de frío (manteniéndolas en un congelador del hospital a -20 °C hasta su entrega). Antes de la entrega, el D-N ofreció a los participantes los siguientes consejos para su toma y almacenamiento:

1. El traslado hasta el congelador de casa debía ser inmediato y dentro de la bolsa térmica con placas de hielo. Durante la intervención los viales tenían que permanecer congelados a -20 °C hasta su uso.
2. Los viales debían descongelarse 15 minutos (o más) antes de la toma, agitarse vigorosamente una vez descongelados y disolverse en una pequeña cantidad de agua, leche o zumo.
3. Los viales se tomaban por la mañana tras, al menos, 8 horas de ayuno nocturno (262). Después, deberían esperar un mínimo de 15 minutos para ingerir alimento.
4. Los participantes no podían ingerir medicamentos ni suplementos durante la intervención y, si lo hicieran, debían comunicarlo al médico o D-N. Cualquier enfermedad o situación extraordinaria también debía ser comunicada.

## 6. DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS Y HORMONALES

---

Las determinaciones se llevaron a cabo en el Hospital Universitario Dr. Peset de Valencia y en el laboratorio del Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología de la Facultad de Medicina de la Universitat de Valencia.

Al comienzo y al final del período de intervención, se tomaron muestras de sangre periférica después de 12 horas de ayuno en el Servicio de Análisis Clínicos del Hospital Universitario Dr. Peset de Valencia. Se extrajeron dos tubos; uno para el Hospital Universitario Dr. Peset de Valencia y otro para la Universitat de Valencia. En el laboratorio de análisis del Hospital Dr. Peset, la sangre se procesó inmediatamente después de la recolección y se centrifugó a 3000 g durante 5 minutos a 4 °C, separando plasma, suero y serie celular. Se separaron alícuotas que se mantuvieron congeladas a -80 °C hasta su procesamiento.

Usando métodos automatizados directos (Aeroset System® Abbott Clinical Chemistry, Wiesbaden, Alemania) se midieron **glucosa**, **colesterol total**, colesterol de lipoproteínas de alta densidad (**C-HDL**), colesterol de lipoproteínas de baja densidad (**C-LDL**), **triglicéridos**, **calcio**, **fósforo** y **creatinina**. La **insulina** en ayunas y el **ácido fólico** se determinaron mediante un inmunoensayo de electroquimioluminiscencia automatizado (Architect c8000, Abbott Clinical Chemistry, Wiesbaden, Alemania). La **homocisteína** en plasma se midió en un analizador Roche/Hitachi 917 utilizando el análisis enzimático de la homocisteína de Diazyme (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). La gamma-glutamil transpeptidasa (**GGT**) sérica, la glutamato-oxalacetato transaminasa (**GOT**) y la glutámico-pirúvica transaminasa (**GPT**) se midieron mediante una prueba colorimétrica enzimática a 37 °C en un analizador Roche / Hitachi (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania). Se utilizó la inmunonefelometría con un Behring Nephelometer 2 (Dade Behring, Marburg, Alemania) para analizar la proteína C reactiva ultrasensible (**PCR-us**), proteína transportadora de retinol tipo 4 (**RBP4**), la apolipoproteína A1 (**apo A1**) y la apolipoproteína B (**apo B**). Los niveles de **vitamina D** plasmáticos se midieron

mediante el inmunoensayo de electroquimioluminiscencia usando el módulo e601 de Roche Cobas 6000 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania).

En el laboratorio del Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología de la Facultad de Medicina de la Universitat de Valencia, a partir de alícuotas de plasma preservadas a -80 °C, se determinaron las concentraciones plasmáticas de **resistina**, **adiponectina**, **leptina** y proteína quimioatrayente de monocitos 1 (**MCP1**), empleando para ello la tecnología Luminex utilizando Milliplex Map Human High Sensitivity T Magnetic Bead Panel (Merck Millipore, Darmstadt, Alemania). Los resultados se leyeron en un Labscan 100 (Luminex Technology) y el análisis de datos se realizó con el software Luminex exponente 3.1 (Luminex Corporation, Austin, TX, EEUU). Los niveles plasmáticos de **Omentina-1** se midieron mediante ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (Human Omentin-1 ELISA, Merck-Millipore, Darmstadt, Alemania) y las placas se leyeron en el lector de placas multilabel VICTOR™ X3 2030 (Perkin Elmer, Waltham, MA, EEUU).

## 7. ESTUDIO DE LA MICROBIOTA FECAL

---

El análisis de composición microbiana de las heces de los participantes fue realizado en el IATA-CSIC. Para ello, se realizaron los siguientes pasos: 1) extracción del ADN de las bacterias presentes en las muestras de heces, 2) amplificación de genes por “Reacción en cadena de la polimerasa”, más conocida como **PCR**, concretamente los que codifican para la subunidad 16S del ARNr, 3) secuenciación de genes, y 4) análisis de datos. Los genes que codifican para la subunidad 16S del ARNr son considerados la diana universal para la identificación de bacterias y arqueas, ya que permiten la caracterización taxonómica, pudiendo discernir hasta nivel de género y en algunos casos de especie (263).

**Extracción de ADN fecal:** Se prepararon alícuotas de aproximadamente 200 mg de heces y con el *QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit* (Qiagen, Hilden, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante, se consiguió la extracción de ADN fecal en una concentración de ~20 ng/μL.

**Amplificación de genes por PCR:** se utilizaron aproximadamente 20 ng ADN (1 μL de ADN diluido) para amplificar el gen ARN ribosomal 16S, concretamente las regiones hipervariables V4-V5. Para la amplificación se utilizó un programa de PCR de 25 ciclos que consta de los siguientes pasos: **1)** Desnaturalización: 95°C durante 20 segundos, **2)** Anillamiento: 40°C durante 30 segundos y, **3)** Extensión: 72°C durante 20 segundos. La reacción de PCR se realizó utilizando la enzima polimerasa *Phusion High Fidelity DNA Polymerase* (Thermo Scientific) y los siguientes cebadores para seleccionar la parte del genoma a amplificar (que se dirigen a una amplia gama de genes del ARN ribosomal 16S): SD-Bact-0563-aS-15 (AYTGGGYDTAAAGNG) y SD-Bact-0907-aA-20 (CCGTCAATTYMTTTRAGTTT) (264). La amplificación de genes se realizó por triplicado.

**Secuenciación de genes:** en primer lugar, se hizo una purificación de los productos de la amplificación (amplicones) mediante el *Kit de purificación de banda de gel y ADN para PRC Illustra GFX* (GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido). En segundo lugar, se cuantificó el ADN usando el fluorómetro *Qubit 3.0*

y el kit de ensayo *Qubit dsDNA HS* (LifeTechnologies, Carlsbad, CA, EEUU). Y, en tercer lugar, las muestras se secuenciaron en la plataforma *Illumina MiSeq* (CNAG, Barcelona, España).

**Análisis de datos:** Con la secuenciación se obtuvieron datos brutos en archivos FASTQ. Como herramientas de pre-procesamiento de las lecturas, se utilizó el software Flash (265) para ensamblar extremos del ADN emparejado, el software Mothur v.1.36.1 (266) para la eliminación de los cebadores, y el algoritmo Uchime (267) y el conjunto de referencia SILVA de secuencias 16S (Versión 128) (268) para la detección y eliminación de las secuencias quiméricas (secuencias mezcla de otras, formadas durante el proceso de amplificación por PCR).

La evaluación taxonómica de las muestras, con la finalidad de conocer la composición microbiana fecal, fue determinada por el soporte informático del Proyecto de Base de Datos Ribosómicos (RDP), una de las más importantes fuentes para la identificación de bacterias analizadas por la secuenciación del gen 16S ARN ribosomal (269).

## 8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

---

### 8.1. PARÁMETROS DIETÉTICOS, ANTROPOMÉTRICOS Y BIOQUÍMICOS

El análisis descriptivo de los parámetros y la comparación entre grupos se llevó a cabo con el programa SPSS para Windows (versión 17), Los resultados se expresaron como la media con desviaciones estándar y la significación estadística se estableció en  $P < 0,05$ . La normalidad de cada variable se determinó mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov con la corrección de Lilliefors. Las variables no normales se analizaron después de la transformación logarítmica. Se utilizó una prueba t de Student para muestras pareadas para comparar la situación inicial de cada parámetro con el mismo parámetro al final de la intervención, tanto en el grupo probiótico como en el grupo placebo.

Las correlaciones entre parámetros dietéticos con el z-IMC y el porcentaje de masa grasa fueron determinadas mediante la correlación de Pearson.

### 8.2. MICROBIOTA INTESTINAL

Los análisis estadísticos de los datos obtenidos a partir de la microbiota evaluados por secuenciación del gen 16S RNA ribosomal, se realizaron en el soporte informático de Programación R v3.2.3 (<https://cran.r-project.org/>). Para realizar el análisis comparativo de la microbiota entre o dentro de los grupos, se aplicaron pruebas no paramétricas de *Mann-Whitney Wilcoxon* (para comparar dos categorías) y *Kruskal-Wallis* (para más de dos categorías).

#### MEDIDAS DE LA DIVERSIDAD

Para valorar la diversidad de la microbiota intestinal se utilizaron índices de diversidad alfa y beta, utilizando para ello la plataforma bioinformática QIIME (*Quantitative Insight Into Microbial Ecology*) (270).

**1. Diversidad alfa:** es la riqueza de especies bacterianas de una comunidad a la que consideramos como homogénea. La valoración de la diversidad alfa, se realizó a través de:

- **Riqueza de especies:** se basa únicamente en la determinación del número de especies presentes, sin tener en cuenta el valor de importancia de las mismas.
- **Índice Chao 1:** es un estimador del número de especies en una comunidad basado en el número de especies raras en la muestra.
- **Índice de Shannon:** es un índice que contempla tanto la cantidad de bacterias diferentes presentes en la muestra (riqueza), así como la cantidad relativa de cada una de esas bacterias (abundancia).
- **Índice de Simpson:** manifiesta la probabilidad de que dos individuos tomados al azar de una muestra sean de la misma especie. Está fuertemente influido por la importancia de las especies más dominantes.

La diversidad alfa, se calculó con el soporte informático Mothur v1.36.1, utilizando parámetros predeterminados y métodos promedio en el proceso de agrupamiento (creación de “clústers”). Para ello, los índices descritos (riqueza de especies, índice Chao 1, índice de Shannon e índice de Simpson) se calcularon utilizando un subconjunto normalizado de 10,700 secuencias por muestra, seleccionadas al azar después de mezclar (X10,000) el conjunto de datos original.

**2. Diversidad beta:** mide las diferencias en la composición bacteriana de una o más muestras. En este caso, se compararon muestras al inicio y al final de la intervención (entre grupos y dentro de la cada grupo), y además se compararon muestras en función del sexo de los participantes. Para ello, se utilizó el sistema de distancias de Bray-Curtis y el test de Permanova.

## **9. COMITÉ ÉTICO, CONFIDENCIALIDAD Y CONSENTIMIENTO INFORMADO**

---

El Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitario Doctor Peset, evaluó y aprobó el estudio “¿Pueden los probióticos modificar las complicaciones asociadas a la obesidad infantil?” (Anexo I).

Toda la información recogida de los pacientes incluidos en el estudio ha sido tratada con estricta confidencialidad siguiendo la normativa legal vigente en España (Ley Orgánica 15/1999 de Protección de Datos de Carácter Personal y a la Ley 41/2002 de Información al Paciente). El acceso a los datos de los pacientes se restringió a los componentes del equipo de investigación manteniéndose en todo momento la confidencialidad sobre su identidad.

Todos los pacientes y sus familiares fueron informados del estudio mediante descripción de este, beneficios y posibles riesgos, pasos a seguir en la toma de muestra y el tratamiento que se le iba a dar a los resultados obtenidos (Anexo II). Tras la información a los participantes y sus familias, y la aceptación de los padres o representantes de los menores, se procedió a la firma del consentimiento informado por los padres (Anexo II).

# 04. RESULTADOS Y DISCUSIÓN |

## 1. FLUJO DE PARTICIPANTES Y RECLUTAMIENTO

---

Los participantes del estudio, niños con obesidad y resistencia a la insulina, fueron reclutados en el Hospital Universitario de Pediatría Dr. Peset de Valencia (España) entre septiembre de 2016 y septiembre de 2017.

Un total de sesenta participantes fueron evaluados para su elegibilidad. Se excluyeron cuatro individuos porque no cumplían con los criterios de inclusión o porque se negaron a participar. Por lo tanto, cincuenta y seis niños fueron incluidos en el grupo probiótico o placebo. Ocho fueron retirados durante el estudio por no cumplir con las pautas establecidas. Finalmente, cuarenta y ocho participantes completaron el estudio: 23 (13 niños y 10 niñas) en el grupo probiótico, y 25 (11 niños y 14 niñas) en el grupo control (Figura 5.1). La media (desviación estándar) de la edad del grupo control fue 12,56 (2,76) y 12,52 (2,53) en el grupo probiótico y el rango de edad fue de entre 10 y 15 años para los dos grupos.

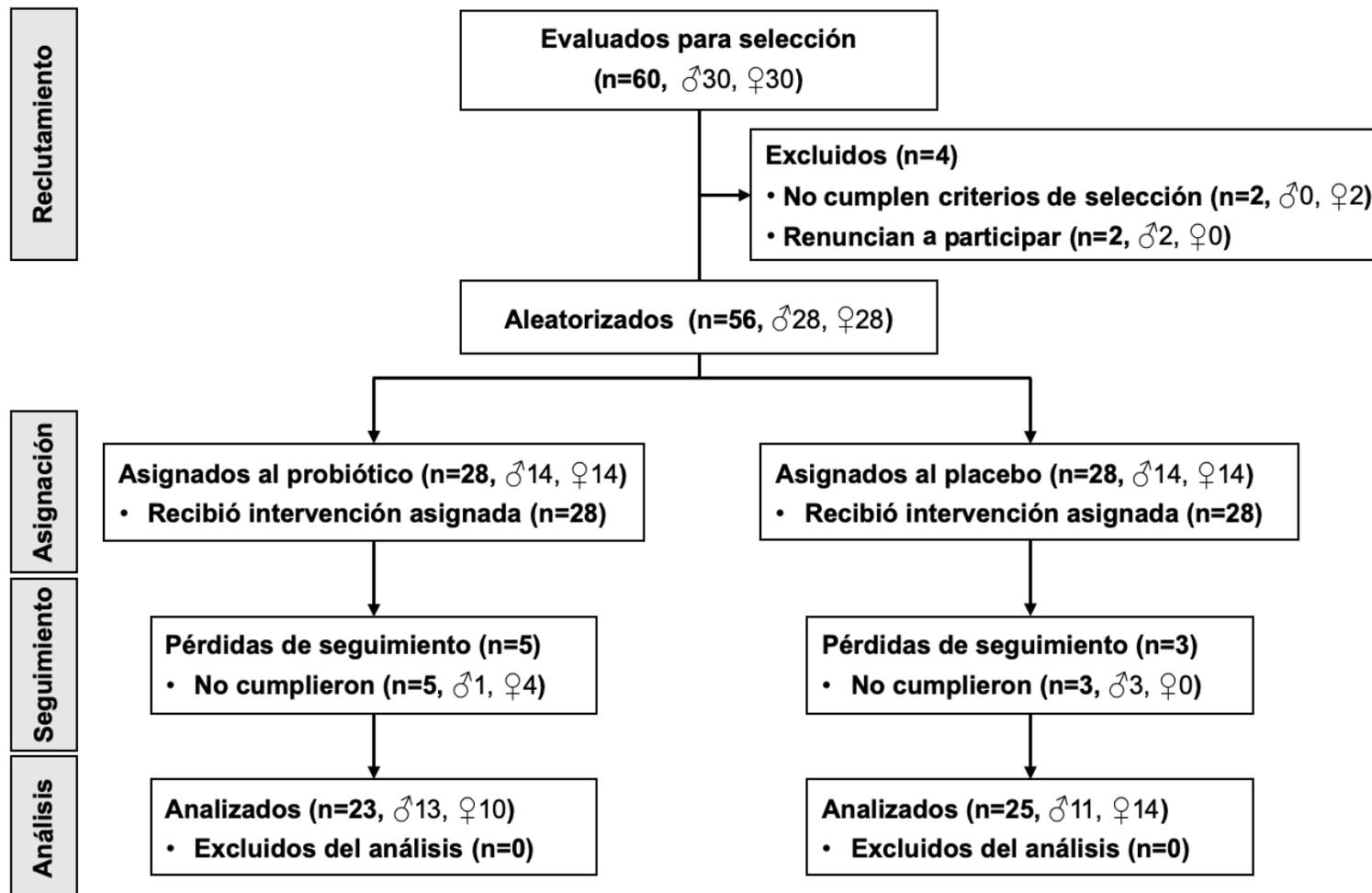


Figura 5.1. Diagrama de flujo del estudio.

## 2. CARACTERÍSTICAS DE LOS PARTICIPANTES

---

En la tabla 5.1, se describen las características generales de los pacientes incluidos en el estudio. Los participantes de ambos grupos presentaban valores de puntuación z-IMC por encima de dos, es decir, padecían obesidad (246). Y estaban afectados de resistencia a la insulina, con un valor de HOMA-IR >3.16 (247) (Tabla 5.1).

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos (grupo que recibió el probiótico frente al grupo que recibió el placebo) en los parámetros descritos, por lo que se trata de una muestra de participantes adecuada para llevar a cabo el estudio.

Tabla 5.1. Características de los participantes de cada grupo.			
	Grupo placebo (n = 25)	Grupo probiótico (n = 23)	P
Sexo (niños/niñas)	11/14	13/10	
Edad	12,56 (1,66)	12,52 (1,59)	0,936
z-IMC	4,17 (1,24)	3,95 (1,25)	0,553
Insulina (µIU/mL)	24,4 (8,21)	22,8 (8,04)	0,503
Glucosa (mg/dL)	94,4 (4,73)	95,2 (5,58)	0,604
HOMA-IR	5,71 (1,97)	5,40 (2,05)	0,600

z-IMC: desviaciones estándar del índice de masa corporal respecto a la media para su edad y género;  
HOMA-IR: modelo homeostático para evaluar la resistencia a la insulina.  
Valores expresados con la media ± desviación estándar.  
P - valor entre valores basales del grupo placebo versus grupo probiótico, calculado con la prueba *T de Student* para muestras no pareadas.

### 3. EFECTO DEL PROBIÓTICO SOBRE PARÁMETROS ANTROPOMÉTRICOS

En la **tabla 5.2**, pueden observarse los parámetros antropométricos, antes y después del período de intervención de 90 días. Con el objetivo de valorar el efecto de la intervención sobre dichos parámetros, por un lado, se examinó el nivel de significancia cuando se compararon los valores iniciales y finales de cada grupo y, por otro lado, se calculó la significancia estadística de los cambios producidos en el grupo probiótico frente a los cambios producidos en el grupo placebo.

Tabla 5.2. Parámetros antropométricos antes y después de la intervención.									
	Grupo placebo (n = 25)				Grupo probiótico (n = 23)				$P^b$
	Basal	Final	$P^a$	Diferencia	Basal	Final	$P^a$	Diferencia	
z-IMC	4,17 (1,24)	3,85 (1,27)	<b>0,001*</b>	-0,32 (0,44)	3,95 (1,25)	3,62 (1,12)	<b>0,000*</b>	-0,34 (0,38)	0,896
Masa grasa (%)	38,2 (6,16)	37,3 (6,09)	0,090	-0,96 (2,60)	36,5 (5,93)	35,3 (6,51)	<b>0,021*</b>	-1,28 (2,47)	0,669
Peso	80,0 (13,8)	80,2 (13,9)	0,771	0,22 (3,73)	76,9 (15,4)	77,9 (15,0)	0,125	0,97 (2,90)	0,447
Perímetro cintura	83,2 (7,8)	83,9 (8,1)	0,075	0,66 (1,27)	87,3 (10,2)	87,0 (9,9)	0,478	-0,30 (2,02)	0,085

z-IMC: desviaciones estándar del índice de masa corporal respecto a la media para su edad y género. Los valores se expresan con la media (DE). \*Indica diferencias significativas con  $P < 0,05$ .

$P^a$  - valor entre el valor basal y el final de la intervención, calculado con la prueba T de Student para muestras pareadas.

$P^b$  - valor entre los cambios, expresado como diferencia en el grupo probiótico frente al grupo placebo, calculado con la prueba T de Student para muestras no pareadas

Los valores de **z-IMC** se redujeron significativamente tanto en el grupo placebo ( $P=0,001^*$ ) como en el probiótico ( $P=0,000^*$ ) tras la intervención (cuando se comparan valores basales versus finales de cada grupo). Cuando se comparan los cambios en el grupo probiótico frente al grupo placebo, éstas no muestran cambios significativos. Por lo tanto, la reducción del z-IMC fue semejante para ambos grupos tras la intervención; lo que nos permite considerar que se trata de

un efecto no a consecuencia de la administración del probiótico, sino más bien, de la intervención dietética.

En el caso del **porcentaje de masa grasa**, tras la intervención se observó una reducción en ambos grupos, pero que solo fue significativa en el grupo probiótico. En cambio, no se observan cambios significativos cuando se hace la comparación entre grupos, por lo que tampoco podemos atribuir la reducción del porcentaje de masa grasa a la ingesta del probiótico. Es probable que, la intervención dietética (y no el probiótico) haya sido la principal responsable de estos cambios. Sin embargo, Zarrati y cols. (2019), sí que observaron que, al suplementar con un yogur probiótico (enriquecido con 3 cepas probióticas) a pacientes adultos con sobrepeso u obesidad que seguían una dieta baja en calorías durante 8 semanas, se lograba una mejora significativa en la reducción del % grasa. Sin embargo, no encontraron diferencias en el resto de medidas antropométricas (271).

Por último, la suplementación con *B. pseudocatenulatum* CECT 7765, tampoco produjo cambios significativos en el **peso** ni en el **perímetro de la cintura**, en ningún grupo. Sin embargo, en las investigaciones que previamente se han llevado a cabo en ratones con obesidad inducida por una dieta alta en grasa, la administración del probiótico sí que logró reducir el peso de forma significativa (228,230,232). Las discrepancias entre estudios en animales y ensayos clínicos en humanos, son evidentes y han sido destacadas (272).

En cuanto a la literatura científica disponible en **niños y adolescentes con obesidad tratados con probióticos**, en la revisión sistemática de Ejtahed y cols. (2019), se analizó los datos de cinco ensayos clínicos con suplementación de probióticos en niños y adolescentes con obesidad, con una duración de 4 a 12 semanas. En tres de los estudios observaron resultados positivos de reducción de peso, perímetro de cintura o IMC. En un estudio no se observaron cambios y, en el otro, los suplementos probióticos condujeron a un aumento de la adiposidad en adolescentes con obesidad (226).

En el estudio llevado a cabo por Famouri y cols. (2017), los autores investigaron el efecto de un probiótico (una mezcla de cuatro cepas de bacterias ácido-lácticas y bifidobacterias) en niños con obesidad e hígado graso no alcohólico durante 12 semanas. En relación a los parámetros antropométricos, el probiótico

fue capaz de reducir el perímetro de cintura, pero no provocó cambios en el z-IMC (273). En cambio, Alisi y cols. (2014), que estudiaron el efecto del probiótico VSL#3 (una combinación de ocho cepas diferentes de bacterias ácido-lácticas y bifidobacterias); administrado durante 4 meses a niños con obesidad e hígado graso no alcohólico, encontraron que, la puntuación z-IMC sí que disminuyó significativamente, en el grupo suplementado con probiótico (274).

En concordancia con nuestros resultados, en un estudio conducido por Gøbel y cols., la suplementación con un probiótico (*Lactobacillus salivarius* Ls-33) durante 12 semanas, no consiguió modificar los parámetros antropométricos z-IMC, porcentaje de masa grasa, peso ni perímetro de cintura (275).

En el caso de **adultos**, la ingesta de probióticos sí que ha mostrado efectos positivos sobre la mejora de algunos parámetros antropométricos. En una revisión sistemática y metaanálisis efectuados por Wang y cols. (2019), analizaron el uso de probióticos para controlar el exceso de peso y los marcadores metabólicos asociados en sujetos adultos ( $\geq 18$  años). Los investigadores seleccionaron 12 ensayos controlados aleatorizados que incluyeron un total de 821 sujetos adultos; a 405 participantes se les había administrado probióticos y a 416 placebo. Los probióticos se administraron en diferentes formas, incluyendo nutracéuticos (bolsitas, cápsulas, polvos), o alimentos (kéfir, yogur y leche fermentada). La duración de la suplementación con probióticos osciló entre 8 y 24 semanas. Con los tratamientos probióticos, los investigadores encontraron una mejora estadísticamente significativa en los parámetros antropométricos de peso corporal, perímetro de cintura, masa grasa, porcentaje de grasa e IMC, en comparación con los grupos control (223).

La revisión sistemática de Ejtahed y cols. (2019), recogió nueve ensayos clínicos en el que participaron **adultos con obesidad**. El rango de duración de la intervención fue de 4 a 12 semanas y se administraron diferentes cepas de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. Ocho estudios mostraron resultados estadísticamente significativos de la eficiencia de los probióticos en la reducción del peso, la masa grasa o el perímetro de la cintura. Solo un estudio no mostró diferencias en estos parámetros antropométricos entre los grupos probiótico y placebo. Además, un ensayo clínico aleatorizado realizado en adultos no obesos con una duración de la intervención de 4 semanas, encontró que, la

suplementación diaria con probióticos previno la obesidad inducida por una dieta hipercalórica alta en grasas (226).

Perna y cols. (2021), en su revisión sistemática y metaanálisis sobre la eficacia de probióticos para mejorar los parámetros antropométricos en adultos con obesidad y enfermedades metabólicas asociadas; encontraron que la suplementación con probióticos provoca una reducción significativa del IMC, y de las circunferencias de cintura y cadera. Pero no del peso corporal (276).

Por último, un hallazgo sumamente interesante es el de Álvarez-Arraño y Martín-Peláez (2021) en su revisión sistemática sobre el efecto de los probióticos y simbióticos en la pérdida de peso en sujetos con sobrepeso u obesidad. Las autoras destacan que, **los estudios que encontraron resultados positivos a nivel antropométrico combinaron parte o toda la intervención con una dieta hipocalórica, restricción calórica y/o aumento de la actividad física**. En consecuencia, la pérdida de peso no se asignó únicamente al efecto del probiótico. Por lo tanto, los resultados reales de las cepas utilizadas en las investigaciones están algo sesgados (277). Hay que destacar que, en el presente trabajo, las recomendaciones dietéticas ofrecidas a nuestros participantes no se basaron en el conteo y restricción calórica ni buscaron generar un déficit energético determinado. Tampoco se propusieron incrementos importantes de actividad física. Quizá estos sean los motivos por los que, con nuestra intervención, no logramos mejorías más significativas en otros parámetros antropométricos diferentes del z-IMC.

**En conclusión, en nuestro estudio el suplemento probiótico no produjo cambios en los parámetros antropométricos**, aunque sí que se observan mejoras en ambos grupos, posiblemente debido a la intervención dietética. En la bibliografía, tanto de niños y adolescentes como de adultos con obesidad y comorbilidades asociadas, encontramos artículos que apoyan nuestros resultados y otros que logran mayores mejoras de los parámetros antropométricos. En cualquier caso, es importante destacar que los efectos de los probióticos dependen de factores como la cepa utilizada y la duración del tratamiento (218). Es posible que la cepa utilizada en el presente estudio no sea eficaz para la mejora de la composición corporal en humanos, o bien, que la duración del estudio (13 semanas) no fuera suficiente para observar cambios en

estos parámetros. Además, según apuntan Cerdó y cols. (2019), el tratamiento de la obesidad basado en la intervención con probióticos debería iniciarse en una etapa temprana de la vida para prevenir la obesidad y las consecuencias metabólicas negativas a posteriori. Al parecer, tratamientos durante las últimas semanas del embarazo y durante los primeros 6 meses de vida, ofrecerían resultados positivos frente a un aumento excesivo de peso (278).

## 4. EFECTO DEL PROBIÓTICO SOBRE MARCADORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR

---

Con tal de evaluar el efecto del probiótico sobre la salud cardiovascular, se analizaron marcadores de riesgo cardiovascular antes y después de la intervención, obteniendo los resultados que se muestran en la tabla 5.3.

En relación a la **presión arterial media** (MAP), en nuestro estudio no encontramos diferencias significativas entre valores basales y finales del grupo placebo ( $P=0,573$ ) ni del grupo probiótico ( $P=0,559$ ). Del mismo modo, tampoco observamos diferencias al comparar los cambios experimentados en cada grupo ( $P=0,415$ ) (Tabla 5.3).

En la misma línea de nuestros resultados, Gøbel y cols. (2012), tras la suplementación con *Lactobacillus salivarius* Ls-33 en **adolescentes con obesidad** durante 12 semanas, no encontraron cambios en la presión arterial (sistólica y diastólica) (275). Otros estudios clínicos disponibles sobre la suplementación con probióticos en niños y adolescentes con obesidad (273), no han informado de las cifras de presión arterial.

En **adultos con sobrepeso**, Ivey y cols. (2015), encontraron que: ni al suplementar con un yogur enriquecido con dos cepas probióticas, ni al aportar estas dos cepas en forma de cápsula, lograban mejorar los niveles de presión arterial tras 6 semanas de tratamiento (279).

En cuanto al **metabolismo de la glucosa**, los valores de **glucosa plasmática en ayunas** no experimentaron cambios significativos durante la intervención, ni en el grupo placebo ( $P=0,124$ ) ni en el probiótico ( $P=0,864$ ). Con respecto a los valores de **insulina** tras la intervención con la cepa de estudio, si bien se observa una reducción en ambos grupos, esta fue significativa en el grupo que ingirió el probiótico ( $P=0,019^*$ ), pero no en el grupo placebo ( $P=0,305$ ). Resultados muy similares se obtienen en el **HOMA-IR**, con una mejora significativa en el grupo probiótico ( $P=0,046^*$ ) pero no en el placebo ( $P=0,216$ ).

Cuando se comparan los cambios producidos en el grupo probiótico frente a los cambios en el grupo placebo, no se aprecia significación estadística, ni en la

glucosa ( $P=0,446$ ) ni en la insulina ( $P=0,583$ ) ni en el HOMA-IR ( $P=0,705$ ), por lo que los cambios observados podrían ser, en gran parte, atribuibles a la intervención dietética y no al probiótico.

Sin embargo, en estudios llevado a cabo en ratones con obesidad inducida por la dieta, la administración de *B. pseudocatenulatum* CECT 7765 sí que mejoró de forma significativa la tolerancia a la glucosa y la sensibilidad a la insulina (228–231).

En concordancia con nuestros resultados, en un estudio clínico llevado a cabo por Alisi y cols. (2014) en niños con obesidad e hígado graso no alcohólico, la suplementación con el probiótico (VSL#3), al igual que en el presente estudio, no produjo cambios en el HOMA-IR (274). Mismos resultados se obtuvieron al suplementar con *Lactobacillus salivarius* Ls-33, a adolescentes con obesidad durante 12 semanas, sin encontrar mejoras significativas de glucosa, insulina en ayunas y HOMA-IR (275).

En la revisión sistemática y metaanálisis que llevaron a cabo Wang y cols. (2019) **en adultos**, sí que encontraron mejoras significativas en los valores de glucosa plasmática en ayunas, insulina y HOMA-IR (223), tras la suplementación con probióticos.

Al analizar las cifras de **colesterol total**, de **C-LDL** y de **triglicéridos**, no se observan diferencias significativas en las reducciones de los valores experimentados en ambos grupos entre sus valores basales y finales. Tampoco encontramos diferencias significativas en la comparativa de los cambios acontecidos en ambos grupos (Tabla 5.3).

Sin embargo, el grupo de participantes que tomó el suplemento probiótico tuvo una mejora significativa de los niveles de **C-HDL** ( $P=0,027^*$ ), mejora que no se produjo en el grupo placebo ( $P=0,530$ ). Además, cuando se compararon los cambios producidos en el grupo probiótico frente a los cambios que tuvieron lugar en el grupo placebo, también se observa una diferencia significativa ( $P=0,035^*$ ), por lo que **podríamos atribuir dichos cambios a la administración del probiótico**.

En relación a otros trabajos realizados, Gøbel y cols. (2012), al igual que en nuestro estudio, no encontraron cambios significativos de colesterol total, C-LDL,

triglicéridos y ácidos grasos libres tras suplementar con *Lactobacillus salivarius* Ls-33 a **adolescentes con obesidad** durante 12 semanas. Aunque, en su caso, tampoco encontraron mejoras de los niveles de C-HDL (275).

Mientras que, contrariamente a los resultados obtenidos por nuestro equipo, en el estudio clínico llevado a cabo por Famouri y cols. (2017) **en niños con obesidad e hígado graso no alcohólico**, la suplementación del probiótico (una mezcla de cuatro cepas de bacterias ácido-lácticas y bifidobacterias) produjo mejoras en los niveles de colesterol total, C-LDL y triglicéridos; en cambio no observaron cambios significativos en los niveles de C-HDL (273).

Wang y cols. (2019), en su revisión sistemática y metaanálisis para evaluar el potencial de los probióticos en el control del sobrepeso obesidad y las comorbilidades asociadas **en adultos**; no encontraron cambios significativos en los niveles de C-HDL. Sin embargo, sí que encuentran mejoras significativas en los niveles de colesterol total y C-LDL (223).

Es de nuevo conveniente recordar que, los efectos de los probióticos varían según la cepa utilizada. Esta cepa ha sido ampliamente estudiada con animales de experimentación y se ha encontrado que, en ratones con obesidad y alteraciones metabólicas inducidas por una dieta alta en grasa, cuando se les administra *B. pseudocatenulatum* CECT 7765, se aprecia una reducción de los niveles de colesterol total, triglicéridos, glucosa y una mejora de la resistencia a la insulina (228–232). En el presente estudio no se encuentran cambios significativos en dichos parámetros, por lo que, al menos en las condiciones del presente ensayo, no se pueden extrapolar los resultados encontrados en animales de experimentación a humanos. Sin embargo, en las condiciones que se ha llevado a cabo la investigación y en pacientes con las características de nuestros participantes, *B. pseudocatenulatum* CECT 7765 podría tener efectos específicos sobre el incremento de los niveles de C-HDL.

Aunque se necesitan estudios específicos para conocer el mecanismo de acción exacto por el cual *B. pseudocatenulatum* CECT 7765 mejora los niveles de C-HDL en humanos, los microbios presentes en el intestino influyen en el metabolismo de las lipoproteínas que transportan el colesterol en sangre a través de varios mecanismos. Por ejemplo, podrían hacerlo modulando el metabolismo de los ácidos biliares (estimulando la deconjugación de sales biliares); a través

de la síntesis de ácidos grasos de cadena corta, que influyen en la síntesis del colesterol y su distribución; o, modulando la incorporación del colesterol en las membranas celulares (280).

Otros marcadores tradicionalmente analizados para estudiar la salud cardiovascular son la **Apolipoproteínas A1 y B**, y la **homocisteína**. Tras nuestra intervención, no observamos diferencias significativas en las mejoras de estos tres parámetros, ni en el grupo placebo ni en el probiótico, entre sus datos basales y finales. Así como tampoco encontramos diferencias significativas en la comparativa de los cambios acontecidos en ambos grupos (Tabla 5.3).

Como **conclusión**, el suplemento probiótico utilizado en el presente estudio, produjo mejoras en los niveles de C-HDL, mientras que no mostró cambios en otros parámetros tradicionales para la valoración del riesgo cardiovascular.

Tabla 5.3. Marcadores de riesgo cardiovascular antes y después de la intervención.

	Grupo placebo (n = 25)				Grupo probiótico (n = 23)				<i>P</i> <sup>b</sup>
	Basal	Final	<i>P</i> <sup>a</sup>	Diferencia	Basal	Final	<i>P</i> <sup>a</sup>	Diferencia	
MAP (mm Hg)	81,8 (6,95)	82,8 (8,08)	0,573	0,85 (7,27)	84,5 (8,42)	83,6 (7,42)	0,559	-0,90 (7,27)	0,415
Glucosa (mg/dL)	94,4 (4,73)	92,2 (5,40)	0,124	-2,20 (6,90)	95,2 (5,60)	94,9 (8,44)	0,864	-0,35 (9,66)	0,446
Insulina (μU/mL)	24,4 (8,21)	22,1 (9,94)	0,305	-2,34 (11,2)	22,8 (8,04)	19,0 (7,1)	<b>0,019*</b>	-3,87 (7,30)	0,583
HOMA-IR	5,71 (1,97)	5,04 (2,33)	0,216	-0,67 (2,62)	5,40 (2,05)	4,47 (1,74)	<b>0,046*</b>	-0,93 (2,11)	0,705
Colesterol total (mg/dL)	155,3 (34,0)	153,9 (31,3)	0,710	-1,40 (18,6)	163,1 (28,3)	162,7 (38,1)	0,928	-0,48 (25,1)	0,885
C-HDL (mg/dL)	40,5 (8,28)	39,9 (7,68)	0,530	-0,64 (5,02)	40,4 (7,21)	42,6 (8,34)	<b>0,027*</b>	2,57 (5,20)	<b>0,035*</b>
C-LDL (mg/dL)	94,9 (26,7)	94,4 (25,7)	0,872	-0,48 (14,8)	102,1 (25,5)	101,7 (36,0)	0,924	-0,43 (21,7)	0,993
Triglicéridos (mg/dL)	98,8 (52,6)	97,2 (36,7)	0,838	-1,68 (40,7)	105,2 (59,5)	92,2 (48,7)	0,180	-13,0 (45,2)	0,364
Apolipoproteína A1 (mg/dL)	125,7 (20,4)	126 (18,3)	0,943	0,24 (16,5)	127,8 (20,1)	128 (21,2)	0,961	0,22 (21,3)	0,997
Apolipoproteína B (mg/dL)	82,7 (23,8)	79,8 (20,9)	0,463	-2,96 (19,8)	87,5 (20,5)	85,7 (28,2)	0,668	-1,78 (19,66)	0,837
Homocisteína (μmol/L)	7,46 (2,84)	8,57 (2,91)	0,161	0,77 (3,88)	7,77 (2,53)	8,50 (3,59)	0,108	0,74 (2,12)	0,975

MAP, presión arterial media; HOMA-IR, modelo homeostático para evaluar la resistencia a la insulina; C-HDL, colesterol de lipoproteínas de alta densidad; C-LDL, colesterol de lipoproteínas de baja densidad.

Los valores se expresan como medias (DE). \*Indica diferencias significativas con  $P < 0,05$ .

$P^a$  – valor: entre el valor basal y el final de la intervención, calculado mediante la prueba T de Student para muestras pareadas.

$P^b$  – valor: entre los cambios en el grupo probiótico frente al grupo placebo, calculado con la prueba T de Student para muestras no pareadas.

## 5. EFECTO DEL PROBIÓTICO SOBRE PARÁMETROS DE INFLAMACIÓN Y ADIPOCINAS

---

Las complicaciones asociadas a la obesidad, como es el caso de las enfermedades cardiovasculares, están en gran medida relacionadas con la inflamación crónica de bajo grado. El conocimiento y análisis de citocinas que controlan la inflamación y otras situaciones asociadas al riesgo cardiovascular, se proponen como el nexo de unión entre la inflamación, la obesidad y las complicaciones asociadas. Las citocinas analizadas antes y después de la intervención de 90 días, se muestran en la tabla 5.4.

La **PCR-us** es un marcador genérico de inflamación y se encuentra en concentraciones elevadas en sujetos con obesidad. Además, los niveles séricos de la PCR-us y de otros marcadores de inflamación sistémica y de disfunción endotelial son predictores de enfermedad cardiovascular (138,281).

En nuestro ensayo, los niveles PCR-us sufrieron una reducción significativa entre los participantes del grupo probiótico ( $P=0,045^*$ ), pero no en el grupo placebo ( $P=0,324$ ). Además, al analizar la significancia al comparar los cambios experimentados en el grupo placebo frente a los del probiótico, observamos que hay una diferencia significativa por lo que podríamos concluir que, dichos cambios, se deben a la acción del probiótico.

En la misma línea de nuestros hallazgos, otros autores han encontrado una relación entre la microbiota intestinal y los niveles de PCR-us (281). Por ejemplo, la proporción de *Akkermansia muciniphila* (una bacteria que estimula la formación de moco protector intestinal y está reducida en casos de obesidad), disminuyó en ratones obesos con niveles elevados de PCR en plasma. Sin embargo, esto no explica si la PCR modula la microbiota intestinal o si los microorganismos intestinales contribuyen a su elevación. De manera similar, la abundancia de *Faecalibacterium prausnitzii* (especie asociada fuertemente con funciones antiinflamatorias) está inversamente correlacionada con los niveles de PCR. Además, la abundancia de miembros del género *Phascolarctobacterium* se ha asociado con niveles más bajos de PCR. *Phascolarctobacterium* son productores de propionato, un ácido graso de cadena

corta que inhibe las cascadas proinflamatorias al suprimir la actividad del factor nuclear kappa-B (NFκB), un regulador proinflamatorio. Por lo tanto, la PCR-us parece ser un marcador inflamatorio posterior que puede regularse a la baja a través de los efectos de los productos metabólicos antiinflamatorios de microbios intestinales específicos (281). Rajkumar y cols. (2014), encontraron que, entre sujetos sanos con un IMC superior a 25 aquellos con niveles más altos de PCR tenían una abundancia significativamente menor de bacterias de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, pero una mayor abundancia de *Escherichia* y *Bacteroides* (282).

Sin embargo, contrariamente a nuestros resultados y a los de otros autores, Gøbel y cols. (2012) en su estudio en adolescentes con obesidad tratados con *Lactobacillus salivarius* Ls-33, no encontraron los mismos beneficios que nosotros sobre los valores de PCR-us. Así como tampoco sobre y otros biomarcadores de inflamación: interleucina-6 y factor de necrosis tumoral (275).

En relación a los valores de **RBP4**, se redujeron significativamente tanto en el grupo placebo ( $P=0,010^*$ ) como en el probiótico ( $P=0,003^*$ ). Pero, las diferencias de RBP4 entre grupos no mostraron cambios significativos ( $P=0,412$ ), por lo que dicha mejora no sería atribuible al probiótico y sí a la intervención dietética.

Un hallazgo muy relevante de nuestro estudio fue el aumento significativo en los niveles de **omentina-1** entre los niños suplementados con el probiótico en comparación con el grupo control. Los niveles iniciales del grupo placebo  $155,9 (\pm 103,9)$  en comparación con las finales  $163,1 (\pm 106,4)$ , no suponen un cambio significativo ( $P=0,772$ ). Por el contrario, la comparación de los datos iniciales  $166,3 (\pm 96,3)$ , frente a los finales  $254 (\pm 107,4)$  del grupo probiótico, arrojan una mejora significativa ( $P=0,001^*$ ). Además, al llevar a cabo la comparativa entre los cambios encontrados en el grupo placebo frente al probiótico, observamos una diferencia significativa ( $P=0,023^*$ ), por lo que podemos suponer que la mejora observada se debe a la suplementación con el probiótico.

La ometina-1 es una adipocina antiinflamatoria recientemente descrita que se expresa en la grasa visceral y en el omento (peritoneo visceral). Está implicada en la regulación de la sensibilidad a la insulina y la función endotelial. Los niveles circulantes de omentina están reducidos en individuos obesos, así como en los casos de

complicaciones asociadas a la obesidad como resistencia a la insulina, intolerancia a la glucosa, dislipemia, HTA y DM2 (133), y estudios previos sugieren que la omentina-1 circulante podría ser un biomarcador útil para evaluar la función endotelial en pacientes con tolerancia alterada a la glucosa (283,284). El presente estudio es el primero en mostrar que los niveles de omentina-1 aumentan después de 13 semanas de intervención con un probiótico acompañada con recomendaciones dietéticas (285). Los efectos podrían estar directamente mediados por *B. pseudocatenulatum* CECT 7765 o ser secundarios a los cambios inducidos sobre la microbiota intestinal.

En la misma línea de nuestros resultados, Zarrati y cols. (2019), encontraron que, suplementando con un yogur probiótico (enriquecido con 3 cepas probióticas) a adultos con sobrepeso u obesidad que siguen una dieta baja en calorías durante 8 semanas, se logra mejorar los niveles de omentina-1 (271).

Al analizar los niveles de **adiponectina** no se encuentran diferencias significativas relativas a la ingesta del probiótico ni antes ni después de la intervención, ni al enfrentar los cambios sucedidos en el grupo probiótico frente al placebo. Y lo mismo sucede con los niveles de **leptina** (Tabla 5.4). Sin embargo, en todos los ensayos con ratones, en los que se ha estudiado el efecto de la administración de la cepa de estudio sobre los niveles de leptina, se ha probado que, *B. pseudocatenulatum* CECT 7765 disminuye los niveles de leptina (228–230,232). La leptina es una proteína codificada por el gen *ob* en las células adiposas. La leptina actúa a nivel del hipotálamo e influye en las señales de saciedad. Concentraciones altas de leptina son características de la inflamación crónica de bajo grado, y de una resistencia a la leptina, lo que provoca que, el sujeto, no reciba correctamente las señales de saciedad, entre otras consecuencias negativas para la salud.

La **MCP-1** es una adipocina que es capaz de reclutar monocitos, macrófagos, células T y células dendríticas. MCP-1 podría ser la responsable del inicio de la infiltración de macrófagos en el tejido adiposo en individuos con obesidad, además de contribuir al desarrollo de la resistencia a la insulina y el aumento de la adiposidad (133).

De acuerdo con nuestros hallazgos, el grupo probiótico tuvo valores significativamente más bajos de MCP-1: 190,7 ( $\pm$  71,4) al inicio, y 141,9 ( $\pm$  68,0) al final, suponiendo esto una reducción significativa ( $P=0,001^*$ ). Lo contrario sucedió en el grupo placebo, al

comparar los valores iniciales 195,5 ( $\pm$  134,7) con los finales 219,2 ( $\pm$  110,4), observamos un incremento, aunque sin significancia estadística ( $P=0,434$ ). Además, las diferencias entre ambos grupos al finalizar la intervención mostraron diferencias significativas ( $P=0,032^*$ ), por lo que dichos efectos pueden ser consecuencia de la ingesta del probiótico (Tabla 5.4).

En un estudio en ratones obesos, observaron que la administración de la cepa *B. pseudocatenulatum* CECT 7765 también reduce los niveles de MCP-1 (228).

La relación de la microbiota sobre el control de la inflamación sistémica, está bien descrito (281). El mecanismo por el cual la toma de un probiótico, pueda modular el estado inflamatorio de un individuo, podría ocurrir por varios mecanismos, como una mayor formación de ácidos grasos de cadena corta, con efectos anti-inflamatorios e inmunomoduladores; una reducción de LPS o cambios en el perfil de ácidos biliares (281).

En **conclusión**, la suplementación con *B. pseudocatenulatum* CECT 7765 consigue mejorar el estado inflamatorio (reduce niveles los de PCR-us y MCP-1, y aumenta los de omentina-1) de niños con obesidad y resistencia a la insulina, lo que puede prevenir futuros eventos cardiovasculares

Tabla 5.4. Parámetros de inflamación antes y después de la intervención.									
	Grupo placebo (n = 25)				Grupo probiótico (n = 23)				<i>P</i> <sup>b</sup>
	Basal	Final	<i>P</i> <sup>a</sup>	Diferencia	Basal	Final	<i>P</i> <sup>a</sup>	Diferencia	
PCR-us (mg/L)	2,94 (2,79)	3,56 (3,92)	0,324	0,62 (3,09)	4,05 (6,86)	2,43 (3,46)	<b>0,045*</b>	-1,62 (3,65)	<b>0,026*</b>
RBP4 (mg/dL)	3,17 (0,71)	2,82 (0,51)	<b>0,010*</b>	-0,34 (0,62)	3,52 (1,26)	3,02 (1,01)	<b>0,003*</b>	-0,50 (0,72)	0,412
Omentina-1 (ng/mL)	155,9 (103,9)	163,1 (106,4)	0,772	7,21 (122,9)	166,3 (96,3)	254,0 (107,4)	<b>0,001*</b>	88,0 (114,7)	<b>0,023*</b>
Adiponectina	13,7 (3,6)	13,8 (3,7)	0,676	-0,44 (3,05)	12,6 (4,1)	13,1 (3,9)	0,273	0,22 (1,50)	0,353
Leptina (ng/mL)	34,4 (16,8)	34,3 (16,2)	0,985	-0,06 (15,3)	34,0 (16,7)	30,1 (12,5)	0,217	-3,9 (15,0)	0,590
MCP1 (pg/mL)	195,5 (134,7)	219,2 (110,4)	0,434	233,7 (148,7)	190,7 (71,4)	141,9 (68,0)	<b>0,001*</b>	-48,8 (61,1)	<b>0,032*</b>

*PCR-us*, proteína C reactiva ultrasensible; *RBP4*, proteína transportadora de retinol tipo 4; *MCP1*, proteína quimioatrayente de monocitos 1.  
 Los valores se expresan como medias (DE). \*Indica diferencias significativas con  $P < 0,05$ .  
 $P^a$  - valor entre el valor basal y el final de la intervención, calculado mediante la prueba T de Student para muestras pareadas.  
 $P^b$  - valor entre los cambios en el grupo probiótico frente al grupo placebo, calculado con la prueba T de Student para muestras no pareadas.

Tabla 5.5. Otros parámetros bioquímicos antes y después de la intervención.									
	Grupo placebo (n = 25)				Grupo probiótico (n = 23)				<i>P</i> <sup>b</sup>
	Basal	Final	<i>P</i> <sup>a</sup>	Diferencia	Basal	Final	<i>P</i> <sup>a</sup>	Diferencia	
GGT (U/L)	19,8 (9,82)	20,2 (11,8)	0,645	0,40 (4,28)	17,5 (5,40)	16,2 (6,89)	0,095	-1,26 (3,47)	0,149
ALT (U/L)	28,0 (18,4)	33,2 (29,6)	0,229	5,12 (20,7)	25,5 (15,3)	26,5 (21,7)	0,690	1,00 (11,9)	0,408
25(OH)D (ng/mL)	24,0 (7,45)	24,9 (8,48)	0,579	0,95 (8,23)	25,49 (11,5)	26,1 (9,79)	0,539	0,58 (4,07)	0,862
Fósforo (mg/dL)	4,72 (0,65)	4,70 (0,74)	0,833	-0,02 (0,47)	4,59 (0,53)	4,51 (0,67)	0,451	-0,08 (0,49)	0,676

*GGT*, gamma-glutamyl transpeptidasa; *ALT*, alanina aminotransferasa; *25(OH)D*, 25-hidroxivitamina D.  
 Los valores se expresan como medias (DE). \*Indica diferencias significativas con  $P < 0,05$ .  
 $P^a$  - valor entre el valor basal y el final de la intervención, calculado mediante la prueba T de Student para muestras pareadas.  
 $P^b$  - valor entre los cambios en el grupo probiótico frente al grupo placebo, calculado con la prueba T de Student para muestras no pareadas.

## 6. EFECTO DEL PROBIÓTICO SOBRE OTROS PARÁMETROS BIOQUÍMICOS

---

Otros marcadores bioquímicos fueron analizados con tal de valorar el estado de salud de los participantes durante el estudio y descartar cualquier efecto adverso de la toma del probiótico. Los resultados se muestran en la tabla 5.5. Ninguno de los parámetros analizados: gamma-glutamil transpeptidasa (GGT), alanina aminotransferasa (ALT), 25-hidroxivitamina D [25(OH)D] y fósforo, mostró cambios significativos ( $P < 0,05$ ) tras el tratamiento, ni en el grupo placebo ni en el probiótico.

Estos datos concuerdan con los de Alisi y cols. (2014) que, en su investigación con niños con obesidad e hígado graso no alcohólico tratados con el probiótico (VSL#3); no observaron cambios en los valores de ALT (274). Sin embargo, Famouri y cols. (2017), también en niños con obesidad e hígado graso no alcohólico, encontraron que la suplementación con probiótico (una mezcla de cuatro cepas de bacterias ácido-lácticas y bifidobacterias) sí que produjo mejoras significativas en los valores de ALT (273).

## 7. VALORACIÓN DE LA INGESTA DIETÉTICA INICIAL Y LOS CAMBIOS DIETÉTICOS EXPERIMENTADOS TRAS LA INTERVENCIÓN

---

A continuación, se evalúa la ingesta dietética inicial y final de cada uno de los grupos, y se realiza una comparación estadística entre la ingesta dietética basal y final ( $P^a$ ) de los grupos por separado (diferencias intragrupos), y una comparativa de la ingesta dietética basal ( $P^b$ ), y la final ( $P^c$ ), del grupo placebo frente al probiótico (diferencias intergrupos) (Tabla 5.6).

Para evaluar y discutir la idoneidad de las ingestas de energía y nutrientes, iniciales y finales, y de los cambios acontecidos; se comparan los resultados obtenidos con las recomendaciones de Ingestas Nutricionales de Referencia (INR) recogidas en el “Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) sobre las INR para la población española (2019)” (286).

Cabe recordar que, tal y como se ha descrito en el apartado de material y métodos de la presente Tesis doctoral, la intervención dietética que se llevó a cabo por parte del D-N, fue idéntica para ambos grupos. Y esta, no se centró en la cuantificación y reducción de las calorías ingeridas, tampoco en el establecimiento de unos porcentajes concretos de macronutrientes, si no en la promoción de un patrón de alimentación saludable, para lo cual, se hizo hincapié en la reducción del consumo de productos ultraprocesados; y en la promoción del consumo de alimentos saludables, especialmente hortalizas, frutas y pescado azul.

### INGESTA ENERGÉTICA

Para valorar la idoneidad de la ingesta energética de los participantes, tomamos como referencia “las ingestas recomendadas para niños y niñas de 13 años moderadamente activos: 2341 kcal para niños y 2102 kcal para niñas” (286). Con una media para ambos sexos de 2222 kcal diarias. Al inicio de nuestro estudio, los participantes del **grupo placebo** ingerían una media de 2798 ( $\pm$  486) kcal;

más de un 25% superior a la INR. Al finalizar el estudio, la ingesta media era de 2672 ( $\pm$  521) kcal, lo que supone una reducción significativa ( $P=0,019^*$ ) de la ingesta energética. Aunque seguía suponiendo una ingesta de un 20% por encima de las INR.

Por su parte, entre el **grupo probiótico** el consumo energético inicial era de 2860 ( $\pm$  466) kcal; más de un 28% por encima de las INR. Al finalizar el estudio, el consumo fue de 2758 ( $\pm$  499) kcal, una reducción significativa ( $P=0,021^*$ ), aunque sigue siendo un 24% superior a las INR.

No se encuentran diferencias significativas en la comparativa de las ingestas iniciales y finales, entre los grupos placebo y probiótico (Tabla 5.6). Este dato refuerza el hecho de que las indicaciones sobre el patrón de alimentación y hábitos de vida que recibieron los participantes fueron idénticas para ambos grupos.

## PROTEÍNAS

Al inicio de nuestro estudio, los participantes del **grupo placebo** ingerían una media de 105,7 ( $\pm$  23,7) gramos de proteínas, que representan el 15,1 ( $\pm$  2,0) % de la energía total consumida. Al finalizar el estudio, consumían 101,3 ( $\pm$  20,5) g, un 15,2 ( $\pm$  1,8) %. Con el peso medio de los participantes del grupo placebo, al inicio: 80,0 ( $\pm$  13,8) kg, y al final del estudio: 80,2 ( $\pm$  13,9) kg, (Tabla 5.2); esto supone una ingesta media de 1,34 ( $\pm$  0,29) g/kg/d al inicio y de 1,27 (0,22) g/kg/d al final del estudio.

Con respecto al **grupo probiótico**, la ingesta inicial de proteínas era de 103,9 ( $\pm$  21,1) g, que representan un 14,6 ( $\pm$  2,1) % de la energía, y la final fue de 104,8 ( $\pm$  16,7) g, un 15,4 ( $\pm$  2,0) % del consumo energético total. Teniendo en cuenta el peso medio de los participantes al inicio: 76,9 ( $\pm$  15,4) kg, y al final del estudio: 77,9 ( $\pm$  15,0) kg, (Tabla 5.2); esto supone una ingesta media de 1,40 ( $\pm$  0,38) g/kg/d al inicio y de 1,39 ( $\pm$  0,31) g/kg/d al final del estudio.

Nuestros datos de ingesta proteica no representan cambios significativos intragrupos durante el estudio, ni tampoco cambios significativos intergrupos en las comparativas basales y finales (Tabla 5.6).

Las INR para proteínas se sitúan en 0,9 y 0,88 g/kg peso corporal por día, en niños y niñas de 13 años, respectivamente. En cambio, todos nuestros participantes, tanto al inicio como al final del estudio consumían alrededor de 1,3-1,4 g/kg/d. En comparación con las INR se trata de una alimentación con exceso de proteínas. Sin embargo, tal y como tratamos en el apartado de introducción, las INR recogen el mínimo de ingesta de proteínas para prevenir la pérdida neta de nitrógeno y reducir el riesgo de enfermedad en casi todas las personas sanas (97-98%) en equilibrio energético (42), y los requerimientos proteicos en niños y adolescentes activos pueden elevarse hasta 1,5 - 1,6 g/kg/día (66,67). Además, está descrito que, entre población con obesidad y resistencia a la insulina, como nuestra población de estudio, se manifiesta una resistencia frente a la acción de la ingesta proteica para la estimulación de la síntesis de proteínas musculares (“resistencia anabólica”). Por lo que, sus requerimientos proteicos están incrementados (287). Para niños y adolescentes con sobrepeso u obesidad, ante la falta de datos concluyentes (66), Burd y cols. (2019), recomiendan que cada una de las ingestas alcance un mínimo de 0,3 g/kg/ingesta (42).

Calculando, por ejemplo, 4 ingestas diarias, con 0,3 g/kg/ingesta y un peso medio de 80kg, la necesidad real sería de un mínimo de 1,2 g/kg/d, y no de 0,8 g/kg/d. Por lo que podríamos concluir que, la ingesta proteica de nuestra población de estudio, está bastante ajustada a sus necesidades teniendo en cuenta su edad, estado de salud y nivel de actividad física.

## **HIDRATOS DE CARBONO**

Las INR sitúan el porcentaje de energía que debe ser aportada a través de hidratos de carbono (HC) entre el 45 y 60%. En el **grupo placebo**, el porcentaje inicial fue del 43,1 ( $\pm$  4,6) % y del 41,4 ( $\pm$  4,0) % al final; sin suponer esta variación una diferencia significativa ( $P=0,182$ ). En el **grupo probiótico**, al inicio del estudio consumían un 43,9 ( $\pm$  5,3) % de la energía en forma de HC, y un 41,2 ( $\pm$  3,6) % al final; un cambio que supuso una diferencia significativa ( $P=0,024^*$ ). Al realizar la comparativa de las ingestas basales y finales entre los grupos, no se observan diferencias significativas intergrupos (Tabla 5.6).

Los porcentajes de HC de los dos grupos y tanto antes como al finalizar la intervención, se sitúan por debajo del mínimo recomendado por la AESAN (2019) (286). Sin embargo, tal y como se expuso en la introducción, la evidencia científica actual indica que, al menos en adultos, las dietas bajas en carbohidratos y altas en fibra y grasa, son más efectivas que las dietas bajas en grasas y altas en HC para promover la pérdida de peso en pacientes con obesidad (44,288). Y que, con ellas, se logra mejorar las comorbilidades asociadas a la obesidad como la resistencia a la insulina y la DM2 (47,48,289).

Por todo lo anteriormente comentado, las indicaciones del D-N, se focalizaron en cambiar el tipo de HC consumidos y mejorar la calidad de los alimentos que son fuentes de HC, y no en incrementar el consumo total de HC. Seguramente ese es el motivo por el que el consumo final del consumo de energía total a través de HC se mantiene en un 41,4 ( $\pm$  4,0) % y un 41,2 ( $\pm$  3,6) %, en los grupos placebo y probiótico, respectivamente.

## **AZÚCARES**

Como se ha comentado, mucho más relevante que conocer la cantidad total de HC aportada, es conocer y mejorar el tipo de HC que se consumen y las fuentes alimentarias de donde provienen. Siendo especialmente perjudiciales para la salud, el consumo de azúcares añadidos, puesto que estos incrementan el riesgo de sobrepeso y obesidad, resistencia a la insulina, DM2 y enfermedades cardiovasculares, entre otras patologías (290,291). De acuerdo con las recomendaciones de la AESAN, el consumo de azúcares añadidos debe ser inferior al 10 % de la ingesta calórica total para formar parte de una dieta saludable y, para obtener mayores beneficios, se recomienda reducir su consumo a menos del 5 % de la ingesta calórica total (292).

En nuestro estudio encontramos que, el consumo de azúcares en el **grupo placebo** se elevó hasta el 18,3 ( $\pm$  4,5) % al inicio, y el 16,9 ( $\pm$  3,1) % al final del estudio. Con una reducción apreciable pero no significativa ( $P=0,156$ ). En el **grupo probiótico**, al inicio del estudio consumían un 18,9 ( $\pm$  2,9) % de la energía total en forma de azúcar, y un 16,5 ( $\pm$  2,9) % al final; lo que supuso una reducción significativa ( $P=0,006^*$ ). Al realizar la comparativa de las ingestas basales y

finales entre los grupos, no se observan diferencias significativas intergrupos (Tabla 5.6).

La reducción en el consumo de azúcares observada en el presente estudio, es consistente con las recomendaciones otorgadas por el D-N, que insistió en la recomendación de reducir el consumo de productos ultraprocesados, con énfasis en la necesidad de evitar las bebidas azucaradas, incluyendo refrescos, zumos y yogures azucarados. En cualquier caso, podemos concluir que, con las pautas de alimentación que recibieron los participantes, se logró una reducción importante del consumo de azúcares en ambos grupos, pero que, aun así, al finalizar el estudio el consumo de azúcares continuaba estando muy por encima de las recomendaciones para una alimentación saludable (292).

## **FIBRA**

Al inicio de nuestro estudio, los participantes del **grupo placebo** ingerían una media de 21,5 ( $\pm$  4,83) gramos de fibra total. Al finalizar el estudio, consumían 26,4 ( $\pm$  5,49) g. Con respecto al **grupo probiótico**, la ingesta inicial de fibra total era de 21,7 ( $\pm$  5,14) g, y la final fue de 26 ( $\pm$  4,95) g. Esto supuso un incremento significativo del consumo de fibra en ambos grupos, sin encontrar diferencias significativas al realizar la comparativa de las ingestas basales y finales entre los grupos (Tabla 5.6).

Según las recomendaciones de la AESAN, el consumo de fibra para niños entre 11 y 14 años, debe ser de 19 gramos de fibra al día, por lo que el consumo al inicio era adecuado, y mejoró todavía más término del estudio. (AESAN, 2019). Estos resultados son coherentes con las recomendaciones dietéticas ofrecidas por el D-N, puesto que se insistió a los participantes para que incrementasen el consumo de alimentos saludables y ricos en fibra: hortalizas, frutas, frutos secos y legumbres (292).

Además, al tener en cuenta los diferentes tipo de fibras, observamos un aumento del consumo de fibra tanto soluble como insoluble, en ambos grupos. Aunque, en el caso de la fibra soluble, solo hubo cambios significativos en el grupo placebo (Tabla 5.6). La fibra soluble es aquella que se solubiliza en agua y está presente sobre todo en frutas (como manzana, plátano o cítricos) y hortalizas

(como alcachofas, espárragos o cebolla), también legumbres y cereales como la avena. La fibra insoluble, por su parte, también se encuentra en frutas y hortalizas, sobre todo en las más fibrosas o en la piel de las frutas, y en cereales integrales y legumbres (293).

La fibra es un componente dietético que tiene una gran influencia en la composición y función de la microbiota intestinal (293). Especialmente importante para la modulación de la microbiota intestinal, es la fibra soluble, ya que se trata de una fibra altamente fermentable por parte de los microbios intestinales. De modo que, su consumo, puede estimular el crecimiento de algunos tipos de microbios como lactobacilos y bifidobacterias (293). Aunque, cabe remarcar que, el almidón resistente, pese a ser una fibra insoluble, es una fibra con un alto grado de fermentabilidad (294).

En **conclusión**, puesto que uno de los objetivos de este estudio es valorar los cambios en la microbiota intestinal, resulta fundamental tener un control de la ingesta de fibra de los participantes. Según nuestros resultados, no hubo diferencias significativas en el consumo de fibra total, fibra soluble o fibra insoluble entre los grupos placebo y probiótico (Tabla 5.6). Por lo tanto, podemos suponer que, el impacto que el mayor consumo de fibra haya podido tener sobre la composición de la microbiota intestinal de los participantes, habrá sido muy similar en ambos grupos.

## LÍPIDOS

El consumo inicial entre los participantes del **grupo placebo** fue de una media de 123 ( $\pm$  23,7) gramos de lípidos totales, que representan el 39,6 ( $\pm$  3,8) % de la energía total consumida. Al finalizar el estudio, consumían 123 ( $\pm$  26,4) g, un 41,4 ( $\pm$  4,7) %. Con respecto al **grupo probiótico**, la ingesta inicial era de 127 ( $\pm$  25,3) g, que representan un 40,1 ( $\pm$  5,5) % de la energía, y la final fue de 128 ( $\pm$  26,3) g, un 41,7 ( $\pm$  3,9) % del consumo energético total (Tabla 5.6).

Nuestros datos no muestran cambios significativos intragrupos, ni tampoco cambios significativos intergrupos en las comparativas basales y finales, en referencia al consumo total de lípidos. Tampoco hubo cambios significativos en

la ingesta de ácidos grasos saturados, ácidos grasos monoinsaturados, ácidos grasos poliinsaturados, ni de colesterol dietético (Tabla 5.6).

La ingesta de lípidos totales entre nuestros participantes, difiere con respecto a las ingestas nutricionales de referencia en España para niños de 4 a 17 años, que recomiendan un consumo de grasas totales de entre el 20 y el 35% de la energía total consumida (286). Sin embargo, tal y como se expuso en la introducción y en este apartado al tratar los hidratos de carbono, la evidencia científica actual, al menos en adultos, no respalda que las dietas bajas en grasas y altas en HC sea más efectivas para favorecer la pérdida de peso en pacientes con obesidad y mejorar las comorbilidades asociadas; en comparación con las dietas bajas en carbohidratos y altas en fibra y grasa (47,48,288,289,295).

En población adulta, Tobias y cols. (2015), llevaron a cabo una revisión sistemática y metaanálisis sobre el efecto de las intervenciones con bajo contenido de grasas frente a otras intervenciones dietéticas sobre el cambio de peso a largo plazo, analizando la evidencia de los ensayos controlados aleatorios de duración  $\geq 1$  año. En la que concluyen que, no se ha logrado demostrar de manera consistente que la reducción del porcentaje de energía de la grasa total conduzca a una pérdida de peso a largo plazo en comparación con otras intervenciones dietéticas (288).

En cualquier caso, más allá de las cantidades de cada nutriente, es fundamental tener en cuenta la procedencia y calidad del alimento que contiene el nutriente que se ingiere, es decir, es fundamental valorar el alimento en su conjunto y no nutrientes de forma aislada (289), el reduccionismo en nutrición ha sido uno de los grandes errores cometidos durante las últimas décadas.

Por todo lo anteriormente expuesto y, porque como también se expuso en la introducción el consumo de alimentos que tradicionalmente se han retirado o restringido de la alimentación por ser fuentes de grasa (frutos secos, aguacate, aceite de oliva, pescados azules, huevos, lácteos fermentados enteros o chocolate amargo), en estudios clínicos se ha mostrado que su consumo o bien no empeora o bien mejora marcadores antropométricos, de inflamación y de función endotelial. La intervención del D-N no buscó reducir la ingesta de alimentos ricos en grasa, sino incrementar el consumo de los alimentos mencionados en detrimento de otros alimentos malsanos, especialmente de

ultraprocesados. Es por ello que los resultados obtenidos, con un incremento del consumo total de lípidos, son coherentes con las recomendaciones ofrecidas por el D-N.

### **Ácidos grasos poliinsaturados omega 3 (W3)**

El pescado azul (sardinas, caballa, boquerones, salmón...) es fuente de W3, especialmente de los W3 de cadena larga; ácido eicosapentaenoico (EPA) y docosahexaenoico (DHA) (296). Los ácidos grasos EPA y DHA, consumidos como parte de una dieta mediterránea, se han relacionado con menor riesgo de enfermedad cardiovascular (297). El EPA es capaz de reducir los niveles de partículas de C-LDL pro-aterogénicas pequeñas y densas, de partículas de lipoproteínas remanentes y de PCR. El DHA es más eficaz incrementando los niveles de C-HDL (297). Y, los dos ácidos grasos tienen un papel fundamental en el control de las respuestas del sistema inmune y la inflamación (296).

El consumo de W3 y de pescado azul, también influyen positivamente en la microbiota intestinal (298). Además, los microbios intestinales son capaces de transformar el EPA y el DHA en componentes que intervienen en el control de alergias, inflamación e inmunidad (299).

Según nuestros resultados, dentro de los lípidos, la mayor diferencia entre el consumo basal y final, y tanto en el grupo placebo como en el probiótico, se produjo por el incremento del consumo de **ácidos grasos poliinsaturados omega 3** (Tabla 5.6). La ingesta inicial media de W3 por parte de los participantes del **grupo placebo** fue de 1,75 ( $\pm$  0,63) gramos, mientras que, al finalizar el estudio consumían 2,07 ( $\pm$  0,84) g ( $P=0,067$ ). Con respecto al **grupo probiótico**, la ingesta inicial de W3 era de 1,70 ( $\pm$  0,47) g, y de 1,93 ( $\pm$  0,70) g al final; ( $P=0,062$ ). Sin observar diferencias significativas intergrupos.

Nuestros resultados guardan relación con las pautas aportadas por el D-N, que aconsejó un consumo semanal de pescado azul de 2-3 raciones, por todos los beneficios anteriormente expuestos. Al no encontrar diferencias al comparar las ingestas basales y finales entre ambos grupos, podemos concluir que, los beneficios que pudieran derivarse del incremento en el consumo de W3, habrán sido similares entre todos los participantes.

Tabla 5.6. Valores y comparativa de la ingesta dietética basal y final de los grupos placebo y probiótico.

	Grupo placebo (n=25)			Grupo probiótico (n=23)			basal vs basal	final vs final
	Basal	Final	$P^a$	Basal	Final	$P^a$	$P^b$	$P^c$
Energía (Kcal)	2798 (486)	2672 (521)	<b>0,019*</b>	2860 (466)	2758 (499)	<b>0,021*</b>	0,657	0,562
Proteína (% IET)	15,1 (2,0)	15,2 (1,8)	0,696	14,6 (2,1)	15,4 (2,0)	0,093	0,252	0,350
Lípidos (% IET)	39,6 (3,8)	41,4 (4,7)	0,129	40,1 (5,5)	41,7 (3,9)	0,134	0,758	0,826
HC (% IET)	43,1 (4,6)	41,4 (4,0)	0,182	43,9 (5,3)	41,2 (3,6)	<b>0,024*</b>	0,562	0,840
Azúcares (g)	126 (32,5)	112 (27,4)	<b>0,026*</b>	136 (34,1)	113,9 (28,5)	<b>0,001*</b>	0,312	0,861
Fibra total (g)	21,5 (4,83)	26,4 (5,49)	<b>0,000*</b>	21,7 (5,14)	26 (4,95)	<b>0,000*</b>	0,918	0,805
Fibra soluble (g)	4,57 (1,77)	5,63 (1,43)	<b>0,003*</b>	5,07 (1,71)	5,67 (1,82)	0,109	0,324	0,937
Fibra insoluble (g)	8,20 (3,63)	11,2 (3,27)	<b>0,001*</b>	8,89 (3,60)	11,5 (2,93)	<b>0,006*</b>	0,514	0,684
Lípidos totales (g)	123 (23,7)	123 (26,4)	0,968	127 (25,3)	128 (26,3)	0,756	0,596	0,517
AGS (g)	39,4 (9,24)	38,7 (11,8)	0,717	42 (10,8)	41,2 (12,4)	0,609	0,379	0,479
AGM (g)	57,5 (11,9)	58,2 (11,5)	0,787	58,3 (14,5)	59,4 (12)	0,787	0,831	0,708
AGP (g)	15,9 (4,29)	15,8 (4,58)	0,918	15,1 (3,17)	15,4 (4,39)	0,660	0,480	0,773
AGP W3 (g)	1,75 (0,63)	2,07 (0,84)	0,067	1,70 (0,47)	1,93 (0,70)	0,062	0,739	0,541
AGP W6 (g)	13,3 (4,09)	13,2 (3,73)	0,874	12,4 (3,07)	12,5 (3,84)	0,861	0,418	0,577
Colesterol (mg)	366 (119)	364 (134)	0,956	363 (108)	364 (124)	0,961	0,914	0,998

IET, ingesta energética total; AGS, ácidos grasos saturados; AGM, ácidos grasos monoinsaturados; AGP, ácidos grasos poliinsaturados.

Los valores se expresan con la media (DE). \*Indica diferencias significativas con  $P < 0,05$ .

$P^a$  - valor entre el valor basal y el final de la intervención, calculado con la prueba T para muestras pareadas.

$P^b$  - valor entre valores basales del grupo placebo versus grupo probiótico, calculado con la prueba T de Student para muestras no pareadas.

$P^c$  - valor entre valores finales del grupo placebo versus grupo probiótico, calculado con la prueba T de Student para muestras no pareadas.

## 8. CORRELACIONES ENTRE PARÁMETROS DIETÉTICOS Y ANTROPOMÉTRICOS EN EL MOMENTO INICIAL

Con el objetivo de explorar las posibles relaciones que existen entre la dieta llevada a cabo por los participantes en el momento inicial del estudio y los parámetros antropométricos (también en el momento inicial), se llevó a cabo una correlación de datos que se muestran en la tabla 5.7. Entre los parámetros antropométricos se seleccionaron el z-IMC y el porcentaje de masa grasa, por ser los más representativos de obesidad en población pediátrica.

Tabla 5.7. Correlaciones entre parámetros dietéticos y antropométricos en el momento inicial.			
Parámetros antropométricos	Parámetros dietéticos	R	P
z-IMC	Energía (kcal)	+0,183	0,213
	Proteína	-0,118	0,424
	Lípidos	+0,254	0,081
	Hidratos de carbono	-0,262	0,072
	Azúcares	-0,122	0,408
	Fibra	-0,011	0,939
% Masa grasa	Energía (kcal)	+0,089	0,555
	Proteína	-0,300	<b>0,043*</b>
	Lípidos	+0,207	0,169
	Hidratos de carbono	-0,091	0,546
	Azúcares	-0,009	0,952
	Fibra	-0,144	0,341
z-IMC: desviaciones estándar del índice de masa corporal respecto a la media para su edad y género. *Indica diferencias significativas con $P < 0,05$ . R: Coeficiente de correlación de Pearson.			

Tras analizar los resultados, solo se encontró una correlación significativa: **el porcentaje de masa grasa corporal se correlacionó negativamente con la ingesta de proteínas**. Se trata de una observación que ya ha sido encontrada previamente en grandes estudios. Por ejemplo, en un estudio prospectivo llevado a cabo en los Países Bajos, estudiaron a 3.991 niños cuando tenían 8 años, e hicieron un seguimiento hasta que cumplieron 10 años. Encontraron que una ingesta más elevada de proteínas se asocia con más masa libre de grasa (analizada a través de una absorciometría dual por rayos X; DEXA). Además, en el estudio, encontraron mayor asociación cuando las proteínas dietéticas eran de origen vegetal, sugiriendo que las proteínas vegetales son más beneficiosas para conseguir una mejor composición corporal (300).

En cualquier caso, es importante destacar que, la actividad física que realizaban los participantes del presente estudio también pudo influir en los resultados obtenidos.

## 9. EFECTO DE LAS RECOMENDACIONES DIETÉTICAS SOBRE DATOS ANTROPOMÉTRICOS, MARCADORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR Y DE INFLAMACIÓN

---

El presente estudio tuvo como objetivo principal evaluar el efecto del suplemento probiótico *Bifidobacterium pseudocatenulatum* CECT 7765. No obstante, el análisis de los resultados permite conocer también cuál fue el efecto de las recomendaciones dietéticas aportadas a los participantes.

### Z-IMC Y PORCENTAJE DE MASA GRASA

En la tabla 5.2, se observa que los valores de **z-IMC** se redujeron significativamente en ambos grupos tras la intervención, sin observar cambios significativos entre grupos, lo que permite atribuir los resultados a la intervención dietética. Algo semejante ocurre con los valores del **porcentaje de masa grasa**, aunque la reducción es solo significativa en el grupo probiótico.

La intervención dietética que se llevó a cabo en el estudio se basó en la promoción de un patrón de alimentación saludable, para lo cual, se hizo hincapié en la reducción del consumo de ultraprocesados y en la promoción del consumo de alimentos saludables, especialmente hortalizas y frutas. Uno de los estudios en lo que se basa lo anterior, es un estudio prospectivo llevado a cabo en España (79). En él, observaron que, tras el seguimiento durante alrededor de 9 años de 8.451 adultos, inicialmente sin exceso de peso, el mayor consumo de productos ultraprocesados se asoció con una mayor incidencia de sobrepeso y obesidad, incluso después de ajustar los posibles factores de confusión (79). Además, en un estudio reciente Hall y cols. (2019), analizaron la relación entre consumo de ultraprocesados y exceso de peso mediante un estudio clínico aleatorizado y cruzado y observaron el efecto del consumo de una dieta basada en productos ultraprocesados frente a una dieta baja en este tipo de productos, 2 semanas con cada dieta con ingesta *ad libitum*. La dieta rica en productos ultraprocesados provocó un aumento de peso de los participantes de  $0.9 \pm 0.3$  kg, así como un aumento de la acumulación de grasa corporal; del mismo modo, la dieta baja en productos ultraprocesados, consiguió una reducción del peso

y de la grasa corporal (21). Por otro lado, el consumo de hortalizas y frutas se asocia a menor peso y mejor composición corporal (301). Se trata de alimentos que aportan fibra y polifenoles que benefician a nuestra microbiota intestinal, promueven la saciedad y permiten la menor ingesta de alimentos con efectos negativos en nuestra salud (301,302).

## **INSULINA Y HOMA-IR**

En la tabla 5.3, se muestra que los valores de **insulina** y del **HOMA-IR**, se redujeron tras la intervención en ambos grupos, aunque solo fue significativa en el grupo probiótico. Cuando se comparan los cambios en el grupo probiótico frente al grupo placebo, éstos no mostraron cambios significativos, por lo que los cambios observados podrían ser atribuidos a la intervención dietética (y no al probiótico). La reducción de los niveles de insulina y HOMA-IR muestra que el tratamiento dietético permitió una mejora de la sensibilidad a la insulina en niños con obesidad. Algunos aspectos fundamentales de la intervención dietética propuesta en este estudio, ya se han descrito en estudios científicos que tienen un efecto positivo sobre la sensibilidad a la insulina. Por ejemplo, la reducción de azúcares en la dieta (303), así como la reducción de productos ultraprocesados (21) conllevan una mejora en el control de la glucosa en sangre y/o la sensibilidad a la insulina.

## **RBP4**

En la tabla 5.4, se observa que los niveles de **RBP4** se redujeron significativamente en ambos grupos tras la intervención, sin que las diferencias de RBP4 entre grupos mostraran cambios significativos. Es por lo que, los cambios observados pueden ser atribuidos a la intervención dietética. RBP4 es un portador específico de retinol en la sangre y también es una adipocina implicada en la progresión de la resistencia a la insulina a través de la inmunidad y los mecanismos inflamatorios (304). Los niveles elevados de RBP4 reducen la sensibilidad periférica y hepática a la insulina e incrementan la gluconeogénesis hepática a través de la activación de la enzima fosfoenol piruvato carboxikinasa (139). Estudios previos han descrito que una dieta baja en calorías disminuye las concentraciones de RBP4 (304), lo que está en concordancia con nuestros resultados, puesto que, las recomendaciones dietéticas

aportadas, aunque no se centraron en la reducción de las calorías ingeridas, consiguieron que los participantes redujeran significativamente su ingesta calórica (Tabla 5.6).

En **conclusión**, las recomendaciones dietéticas proporcionadas en el presente estudio permitieron una reducción del z-IMC y la mejora de la composición corporal, así como una mejora de la sensibilidad a la insulina y del estado inflamatorio de los pacientes con obesidad y resistencia a la insulina.

## 10. EFECTO DE LA INTERVENCIÓN SOBRE LA COMPOSICIÓN DE LA MICROBIOTA FECAL

---

### DIVERSIDAD

El análisis de los perfiles taxonómicos de la microbiota en heces a través de la evaluación de la diversidad alfa, se muestran en la Figura 5.2 donde se muestran los cuatro parámetros utilizados para evaluar la dicha diversidad (riqueza de especies, índice Chao 1, índice de Shannon e índice de Simpson). Los resultados de la diversidad beta muestran que no existieron cambios significativos asociados a los tratamientos (probiótico o placebo), ni cuando se comparó entre grupos, ni entre sexos. Por lo tanto, la intervención con *B. pseudocatenulatum* CECT 7765 en niños con obesidad y resistencia insulínica, no produjo cambios importantes en la cantidad de especies microbianas (diversidad) presentes en la microbiota fecal. Nuestros resultados están en concordancia con los de Walsh y cols. (2020), en cuya investigación encontraron que, el probiótico *L. casei* LC-XCAL™ mejora la salud metabólica en un modelo de ratón con obesidad inducida por dieta sin alterar el microbioma (305).

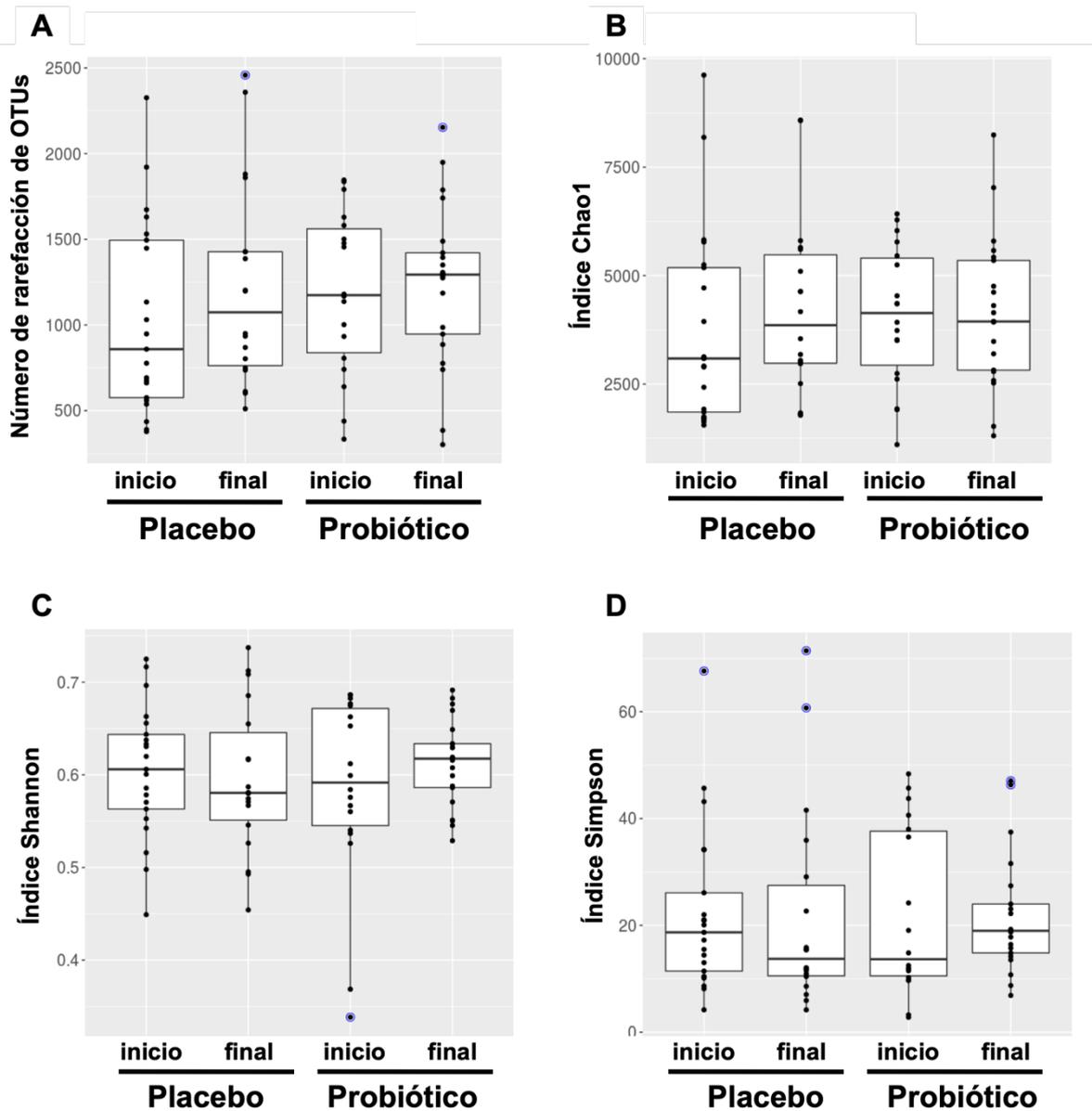


Figura 5.2. Cambios en los cuatro índices utilizados para valorar la diversidad alfa durante la intervención. La riqueza de especies (A), el índice Chao 1 (B), el índice de Shannon (C) y el índice de Simpson (D). Se muestran en forma de diagrama de caja, con cuadros que incluyen la mediana (línea horizontal) y con límites de los cuartiles Q1 y Q3. También se muestra el rango que va desde el percentil 5 al 95. Los puntos con doble borde indican valores atípicos de acuerdo con las distribuciones respectivas.

La misma cepa utilizada en el presente estudio (*B. pseudocatenuatum* CECT 7765), ha sido previamente testada en animales (306). Para ello, se utilizaron modelos murinos a los que a un grupo se les indujo estrés crónico a través de la separación

materna, y a otros no se les aplicó dicho procedimiento. La cepa *B. pseudocatenulatum* CECT 7765 fue administrada a ratones de ambos grupos, mientras que otros recibieron un placebo (por lo tanto, finalmente, se crearon cuatro grupos de ratones diferentes). La administración del probiótico en los ratones suplementados, consiguió una mejora de la diversidad microbiana en heces, e incluso consiguió revertir la disbiosis provocada por el estrés de la separación al nacimiento (306). Como parece evidente, en este caso, los efectos provocados por el probiótico no han resultado similares a los obtenidos a través de los estudios en animales. Cabe destacar la importante diferencia del metabolismo y composición de la microbiota intestinal de ratones y de humanos (307).

Estudios previos en humanos sí que apoyan los resultados obtenidos. Kristensen y cols. (2016), publicaron una revisión sistemática donde se identificaron siete ensayos clínicos aleatorizados que investigaban el efecto de la suplementación con probióticos sobre la microbiota fecal en adultos sanos. Tras su evaluación no se observaron efectos en la composición de la microbiota fecal en términos de diversidad en ninguno de los estudios incluidos en comparación con el placebo. Sólo un estudio encontró que la suplementación con probióticos modificó significativamente la estructura general de la comunidad bacteriana fecal en términos de diversidad beta en comparación con el placebo (308). De hecho, hay poca evidencia de que los probióticos tengan un impacto importante en la estructura general de las comunidades microbianas intestinales más allá del aumento transitorio en la cepa específica que se consume (308). Y, hay que tener en cuenta que los microorganismos utilizados como probióticos, rara vez se identifican en las heces más allá de un par de semanas después de su consumo (308). No obstante, a pesar de la naturaleza transitoria de los probióticos y la ausencia de cambios drásticos en la microbiota fecal durante el consumo de probióticos, los beneficios para la salud están respaldados por evidencia clínica como se ha mencionado en la introducción. Estas observaciones sugieren que los efectos beneficiosos de los probióticos surgen sin la necesidad de colonizar el tracto gastrointestinal y de modificar la composición de la microbiota fecal (309).

## ANÁLISIS DE COMPOSICIÓN

También se realizaron análisis más detallados (con alta precisión a nivel de familia y género) con el fin de revelar posibles diferencias en categorías taxonómicas como consecuencia de la administración de *B. pseudocatenulatum* CECT 7765. Al inicio del estudio, la comparación entre los grupos placebo y probiótico no reveló diferencias en la composición de la microbiota. Sin embargo, después de la intervención, el grupo probiótico mostró un aumento significativo en la abundancia de la familia *Rikenellaceae* ( $P=0.007^*$ ) y del género *Alistipes* ( $P=0.004^*$ ), el más representativo de esta familia (Figura 5.3).

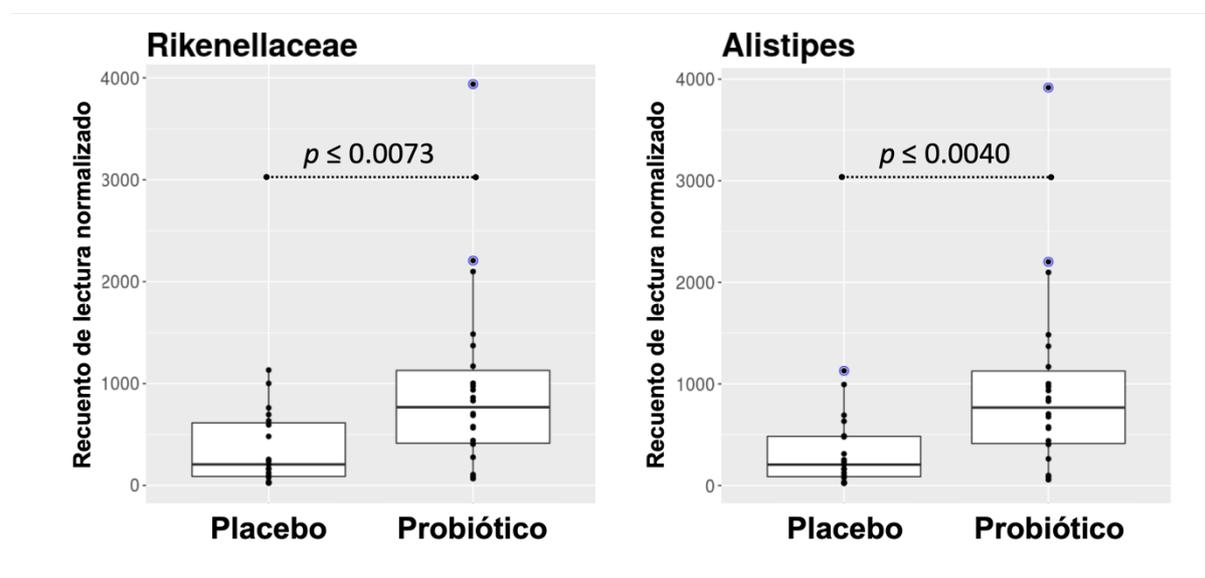


Figura 5.3. Cambios en la familia *Rikenellaceae* y en el género *Alistipes* durante la intervención. Los recuentos de lectura del ADN normalizado se muestran en forma de diagrama de caja, con cuadros que incluyen la mediana (línea horizontal) y con límites de los cuartiles Q1 y Q3. También se muestran los bigotes que van desde los percentiles 5 y 95. Los puntos con doble borde indican valores atípicos de acuerdo con las distribuciones respectivas. Se indican los valores de P obtenidos de las comparaciones llevadas a cabo con la prueba de *Mann-Whitney Wilcoxon*.

La familia ***Rikenellaceae*** (del orden Bacteroidales) incluye dos géneros: *Rikenella* y ***Alistipes***. Peters y cols. (2018), analizaron muestras de heces de 599 adultos (por secuenciación del gen 16S RNA ribosomal), y observaron que, entre otras cosas, los participantes con obesidad tenían niveles reducidos de bacterias de la familia *Rikenellaceae* (310). Por otro lado, el género *Alistipes* se ha visto que también se

encuentra más reducido en personas con obesidad y, según publicaron Aguirre y cols. (2016), seguramente se trata de un género capaz estimular procesos que favorezcan la reducción de peso cuando se aportan fibras prebióticas (311).

### **CEPA *Bifidobacterium pseudocatenulatum* CECT 7765 EN HECES**

Además, la ingesta del suplemento con *B. pseudocatenulatum* CECT 7765 (una bifidobacteria) no aumentó la cantidad total de bifidobacterias en heces, cuando se comparó con el grupo placebo. En cambio, la ingesta del probiótico sí que hizo aumentar la presencia de la especie *B. pseudocatenulatum* en heces. Debido a la técnica empleada para la determinación de la microbiota intestinal (secuenciación del gen 16S RNA ribosomal), se desconoce si las bacterias que se analizan están vivas o muertas. En cualquier caso, es posible que el probiótico ejerza parte de sus efectos (por ejemplo, efectos antiinflamatorios) a través de interacciones entre sus componentes estructurales (pared celular, ADN) y el huésped, incluso si la cepa bacteriana no hubiera sobrevivido completamente tras el paso gastrointestinal.

### **DIETA Y MICROBIOTA**

Tras la intervención de 90 días, no se observaron cambios en la diversidad microbiana, por lo tanto, tampoco hubo cambios de este tipo atribuibles a los cambios dietéticos. En cambio, cuando se hizo el análisis detallado de la microbiota, tras la intervención, se observó una reducción de la abundancia de *Streptococcus* tanto en el grupo placebo ( $P=0,042^*$ ) como en el grupo probiótico ( $P=0,398$ ), aunque la reducción no fue significativa en el último grupo.

Los hábitos de vida, y en especial, la dieta, influyen de manera determinante en la composición de la microbiota intestinal. Por un lado, un tipo de alimentación occidentalizada (rica en productos ultraprocesados, azúcares y cereales refinados, y baja en frutas y hortalizas) conlleva a una pérdida de la diversidad microbiana y cambios específicos de la composición, reduciendo la capacidad para degradar fibra y producir metabolitos beneficiosos (312). Por otro lado, un patrón rico en frutas, hortalizas y tubérculos, se asocia a una microbiota más saludable, con mayor cantidad de bacterias capaces de metabolizar fibras alimentarias (312). La intervención dietética del presente estudio, se centró en la reducción de productos ultraprocesados

y el incremento en el consumo de frutas, hortalizas y tubérculos, por lo que cabría esperar cambios positivos en la microbiota de los participantes. El hecho de que no se hayan encontrado cambios en la diversidad microbiana y muy pocos cambios en relación con la composición específica, puede deberse a un hecho al que cada vez se le está dando más importancia en la literatura científica: los cambios en la microbiota intestinal que puedan ocurrir tras cualquier intervención son individuo-específicas. La microbiota intestinal de cada persona es única, pero la forma en cómo los hospederos responden a una intervención (en este caso, dietética), es muy variable (312). Es por ello por lo que, aun pudiendo existir cambios significativos a nivel de individuo, puede que estos no se observen cuando se analiza el conjunto de la población estudiada. Por otro lado, es posible que el tiempo utilizado de intervención en el estudio no sea suficiente para que se observen cambios importantes en la diversidad y/o composición microbiana. Mientras que una dieta occidentalizada puede alterar muy rápidamente la microbiota intestinal, una dieta alta en fibra (más saludable) necesita un tiempo más prolongado para provocar cambios en la microbiota (313).

En relación con los cambios específicos encontrados en el presente estudio; estudios previos han visto que, altos niveles del género *Streptococcus* se asocian, por un lado, con un índice de masa corporal más alto y, por otro lado, con una baja adherencia a un patrón de alimentación saludable, como es el caso de la dieta mediterránea (314).



## 05. CONCLUSIONES

1. *Bifidobacterium pseudocatenulatum* CECT 7765 mejora los niveles de c-HDL en niños con obesidad y resistencia a la insulina.
2. *Bifidobacterium pseudocatenulatum* CECT 7765 mejora el estado inflamatorio en niños con obesidad y resistencia a la insulina, puesto que reduce los niveles de PCR-us y MCP-1, e incrementa los de omentina-1.
3. *Bifidobacterium pseudocatenulatum* CECT 7765 aumenta significativamente la presencia en heces de la familia *Rikenellaceae* y del género *Alistipes*, el más representativo de esta familia.
4. Una intervención dietética basada en la educación nutricional, y no en el contaje calórico, muestra una reducción de la abundancia de *Streptococcus* tanto en el grupo probiótico como en el placebo, aunque la reducción solo fue significativa en el grupo probiótico.
5. La administración de *Bifidobacterium pseudocatenulatum* CECT 7765 durante 13 semanas, en niños con obesidad y resistencia a la insulina, no logra una mejora significativa de la composición corporal (z-IMC, porcentaje de masa grasa, peso corporal, perímetro de la cintura).
6. *Bifidobacterium pseudocatenulatum* CECT 7765, no logra reducir significativamente los niveles de leptina, al contrario de lo que se ha observado en todos los ensayos llevados a cabo con animales de experimentación. Tampoco se observa una mejora de los niveles de adiponectina y RBP4.
7. La intervención dietética en el presente estudio fue la misma en ambos grupos. Ningún nutriente experimentó diferencias significativas en la comparativa de la ingesta basal frente a la final entre ambos grupos.

8. Una intervención dietética basada en minimizar el consumo de ultraprocesados y promover el consumo de alimentos frescos y mínimamente procesados, sin llevar a cabo una dieta estricta con pesaje de alimentos y recuento calórico ni establecer unos porcentajes específicos de macronutrientes: consigue reducir significativamente la ingesta energética y de azúcares, e incrementar el consumo de fibra. También reduce el z-IMC y el porcentaje de masa grasa, mejora la sensibilidad a la insulina y el estado inflamatorio en niños con obesidad y resistencia a la insulina.
9. La ingesta de proteínas en niños con obesidad y resistencia a la insulina, se asocia con un menor porcentaje de masa grasa.
10. Ni la administración de *Bifidobacterium pseudocatenulatum* CECT 7765 ni la intervención dietética durante 13 semanas, en niños con obesidad y resistencia a la insulina, provocan cambios en la diversidad bacteriana fecal.
11. De acuerdo con las Ingestas Nutricionales de Referencia (INR), en el presente estudio, el porcentaje de energía aportado a través de los HC es insuficiente, y el aportado por las grasas es excesivo.
12. La ingesta proteica de ambos grupos del estudio, excede a las recomendaciones de las INR para la edad y el sexo de los participantes. Sin embargo, las INR para las proteínas deberían revisarse de acuerdo con las últimas evidencias científicas.

## 06. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ng M, Fleming T, Robinson M, Thomson B, Graetz N, Margono C, et al. Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *The Lancet*. 2014 Aug;384(9945):766–81.
2. Abarca-Gómez L, Abdeen ZA, Hamid ZA, Abu-Rmeileh NM, Acosta-Cazares B, Acuin C, et al. Worldwide trends in body-mass index, underweight, overweight, and obesity from 1975 to 2016: a pooled analysis of 2416 population-based measurement studies in 128·9 million children, adolescents, and adults. *The Lancet*. 2017 Dec;390(10113):2627–42.
3. Greydanus DE, Agana M, Kamboj MK, Shebrain S, Soares N, Eke R, et al. Pediatric obesity: Current concepts. *Disease-a-Month*. 2018 Apr;64(4):98–156.
4. World Health Organization. Fact sheet: obesity and overweight. [Internet]. 2018 [cited 2020 Jul 10]. Available from: <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>
5. Cadenas-Sánchez C, Intemann T, Labayen I, Artero EG, Álvarez-Bueno C, Sanchis-Moysi J, et al. Prevalence of severe/morbid obesity and other weight status and anthropometric reference standards in Spanish preschool children: The PREFIT project. *Pediatric Research*. 2020 Feb 18;87(3):501–10.
6. World Obesity Federation. Global Atlas on Childhood Obesity [Internet]. London; 2019 [cited 2021 Jun 23]. Available from: <https://www.worldobesity.org/nlsegmentation/global-atlas-on-childhood-obesity>
7. Steinbeck KS, Lister NB, Gow ML, Baur LA. Treatment of adolescent obesity. *Nature Reviews Endocrinology*. 2018 Jun 13;14(6):331–44.
8. Geserick M, Vogel M, Gausche R, Lipek T, Spielau U, Keller E, et al. Acceleration of BMI in Early Childhood and Risk of Sustained Obesity. *New England Journal of Medicine*. 2018 Oct 4;379(14):1303–12.

9. Estudio ALADINO 2019. Estudio sobre Alimentación, Actividad Física, Desarrollo Infantil y Obesidad en España 2019 [Internet]. Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición. Ministerio de consumo. 2020 [cited 2021 Jun 23]. Available from: [https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/nutricion/observatorio/Informe\\_Aladino\\_2019.pdf](https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/nutricion/observatorio/Informe_Aladino_2019.pdf)
10. Okorodudu DO, Jumean MF, Montori VM, Romero-Corral A, Somers VK, Erwin PJ, et al. Diagnostic performance of body mass index to identify obesity as defined by body adiposity: a systematic review and meta-analysis. *International Journal of Obesity*. 2010 May 2;34(5):791–9.
11. Reilly JJ, Kelly J, Wilson DC. Accuracy of simple clinical and epidemiological definitions of childhood obesity: systematic review and evidence appraisal. *Obesity Reviews*. 2010 Sep;11(9):645–55.
12. Javed A, Jumean M, Murad MH, Okorodudu D, Kumar S, Somers VK, et al. Diagnostic performance of body mass index to identify obesity as defined by body adiposity in children and adolescents: a systematic review and meta-analysis. *Pediatric Obesity*. 2015 Jun;10(3):234–44.
13. Marrodán MD, Martínez-Álvarez JR, Villarino A, Alférez-García I, González-Montero de Espinosa M, López-Ejeda N, et al. Utilidad de los datos antropométricos auto-declarados para la evaluación de la obesidad en la población española; estudio EPINUT-ARKOPHARMA. *Nutrición hospitalaria*. 2013;28(3):676–82.
14. Martínez Álvarez JR, Villarino Marín A, García Alcón RM, Calle Purón ME, Marrodán Serrano MD. Obesidad infantil en España: Hasta qué punto es un problema de salud pública o sobre la fiabilidad de las encuestas. *Nutrición Clínica y Dietética Hospitalaria*. 2013;33(2):80–8.
15. ENSE Encuesta Nacional de Salud España 2017. Madrid; 2018.
16. Dayan PH, Sforzo G, Boisseau N, Pereira-Lancha LO, Lancha AH. A new clinical perspective: Treating obesity with nutritional coaching versus energy-restricted diets. *Nutrition*. 2019 Apr;60:147–51.
17. Martínez García RM. Prevención de la obesidad desde la etapa perinatal. *Nutrición Hospitalaria*. 2017 Oct 15;34(4).
18. Mozaffarian D. Dietary and Policy Priorities for Cardiovascular Disease, Diabetes, and Obesity. *Circulation*. 2016 Jan 12;133(2):187–225.
19. Sofer S, Stark AH, Madar Z. Nutrition Targeting by Food Timing: Time-Related Dietary Approaches to Combat Obesity and Metabolic Syndrome. *Advances in Nutrition*. 2015 Mar 1;6(2):214–23.

20. Abete I, Astrup A, Martínez JA, Thorsdottir I, Zulet MA. Obesity and the metabolic syndrome: role of different dietary macronutrient distribution patterns and specific nutritional components on weight loss and maintenance. *Nutrition Reviews*. 2010 Apr;68(4):214–31.
21. Hall KD, Ayuketah A, Brychta R, Cai H, Cassimatis T, Chen KY, et al. Ultra-Processed Diets Cause Excess Calorie Intake and Weight Gain: An Inpatient Randomized Controlled Trial of Ad Libitum Food Intake. *Cell Metabolism*. 2019 Jul;30(1):67-77.e3.
22. Ebbeling CB, Swain JF, Feldman HA, Wong WW, Hachey DL, Garcia-Lago E, et al. Effects of Dietary Composition on Energy Expenditure During Weight-Loss Maintenance. *JAMA*. 2012 Jun 27;307(24):2627-34.
23. OMS/FAO. Dieta, nutrición y prevención de enfermedades crónicas. OMS, Serie de informes técnicos 916. 2003.
24. Ohkawara K, Cornier MA, Kohrt WM, Melanson EL. Effects of increased meal frequency on fat oxidation and perceived hunger. *Obesity*. 2013 Feb;21(2):336–43.
25. Munsters MJM, Saris WHM. Effects of Meal Frequency on Metabolic Profiles and Substrate Partitioning in Lean Healthy Males. Hennige AM, editor. *PLoS ONE*. 2012 Jun 13;7(6):e38632.
26. Leidy HJ, Campbell WW. The Effect of Eating Frequency on Appetite Control and Food Intake: Brief Synopsis of Controlled Feeding Studies. *The Journal of Nutrition*. 2011 Jan 1;141(1):154–7.
27. Trepanowski JF, Kroeger CM, Barnosky A, Klempel MC, Bhutani S, Hoddy KK, et al. Effect of Alternate-Day Fasting on Weight Loss, Weight Maintenance, and Cardioprotection Among Metabolically Healthy Obese Adults. *JAMA Internal Medicine*. 2017 Jul 1;177(7):930.
28. Kahleova H, Lloren JI, Mashchak A, Hill M, Fraser GE. Meal Frequency and Timing Are Associated with Changes in Body Mass Index in Adventist Health Study 2. *The Journal of Nutrition*. 2017 Sep;147(9):1722–8.
29. Portillo-Sanchez P, Gonzalez-Velazquez C, Mancillas-Adame L. Sample Size Matters When Drawing Conclusions on Alternate-Day Fasting Diet. *JAMA Internal Medicine*. 2017 Nov 1;177(11):1700.
30. Di Francesco A, Di Germanio C, Bernier M, de Cabo R. A time to fast. *Science (1979)*. 2018 Nov 16;362(6416):770–5.
31. Harris L, Hamilton S, Azevedo LB, Olajide J, De Brún C, Waller G, et al. Intermittent fasting interventions for treatment of overweight and obesity in adults. *JBI Database of Systematic Reviews and Implementation Reports*. 2018 Feb;16(2):507–47.

32. de Cabo R, Mattson MP. Effects of Intermittent Fasting on Health, Aging, and Disease. Longo DL, editor. *New England Journal of Medicine*. 2019 Dec 26;381(26):2541–51.
33. Gabel K, Cienfuegos S, Kalam F, Ezpeleta M, Varady KA. Time-Restricted Eating to Improve Cardiovascular Health. *Current Atherosclerosis Reports*. 2021 May 26;23(5):22.
34. Faris MAIE, Jahrami HA, Obaideen AA, Madkour MI. Impact of diurnal intermittent fasting during Ramadan on inflammatory and oxidative stress markers in healthy people: Systematic review and meta-analysis. *Journal of Nutrition & Intermediary Metabolism*. 2019 Mar;15:18–26.
35. Paoli A, Tinsley G, Bianco A, Moro T. The Influence of Meal Frequency and Timing on Health in Humans: The Role of Fasting. *Nutrients*. 2019 Mar 28;11(4):719.
36. Stekovic S, Hofer SJ, Tripolt N, Aon MA, Royer P, Pein L, et al. Alternate Day Fasting Improves Physiological and Molecular Markers of Aging in Healthy, Non-obese Humans. *Cell Metabolism*. 2019 Sep;30(3):462-476.e5.
37. Templeman I, Gonzalez JT, Thompson D, Betts JA. The role of intermittent fasting and meal timing in weight management and metabolic health. *Proceedings of the Nutrition Society*. 2019 Apr 26;1–12.
38. Correia JM, Santos I, Pezarat-Correia P, Silva AM, Mendonca G V. Effects of Ramadan and Non-ramadan Intermittent Fasting on Body Composition: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Frontiers in Nutrition*. 2021 Jan 26;7:625240.
39. Sutton EF, Beyl R, Early KS, Cefalu WT, Ravussin E, Peterson CM. Early Time-Restricted Feeding Improves Insulin Sensitivity, Blood Pressure, and Oxidative Stress Even without Weight Loss in Men with Prediabetes. *Cell Metabolism*. 2018 Jun;27(6):1212-1221.e3.
40. Aparecida Crispim C, Carliana Mota M. New perspectives on chrononutrition. *Biological Rhythm Research*. 2019 Jan 2;50(1):63–77.
41. Haupt S, Eckstein ML, Wolf A, Zimmer RT, Wachsmuth NB, Moser O. Eat, Train, Sleep—Retreat? Hormonal Interactions of Intermittent Fasting, Exercise and Circadian Rhythm. *Biomolecules*. 2021 Mar 30;11(4):516.
42. Burd NA, McKenna CF, Salvador AF, Paulussen KJM, Moore DR. Dietary Protein Quantity, Quality, and Exercise Are Key to Healthy Living: A Muscle-Centric Perspective Across the Lifespan. *Frontiers in Nutrition*. 2019 Jun 6;6(83).
43. Williamson DA. Fifty Years of Behavioral/Lifestyle Interventions for Overweight and Obesity: Where Have We Been and Where Are We Going? *Obesity*. 2017 Nov;25(11):1867–75.
44. Ebbeling CB, Young IS, Lichtenstein AH, Ludwig DS, McKinley M, Perez-Escamilla R, et al. Dietary Fat: Friend or Foe? *Clinical Chemistry*. 2018 Jan;64(1):34–41.

45. Tobias DK, Chen M, Manson JE, Ludwig DS, Willett W, Hu FB. Effect of low-fat diet interventions versus other diet interventions on long-term weight change in adults: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Diabetes & Endocrinology*. 2015 Dec;3(12):968–79.
46. Astrup A, Magkos F, Bier DM, Brenna JT, de Oliveira Otto MC, Hill JO, et al. Saturated Fats and Health: A Reassessment and Proposal for Food-Based Recommendations. *J Am Coll Cardiol*. 2020 Aug;76(7):844–57.
47. Chang CR, Francois ME, Little JP. Restricting carbohydrates at breakfast is sufficient to reduce 24-hour exposure to postprandial hyperglycemia and improve glycemic variability. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2019 May 1;109(5):1302–9.
48. Skytte MJ, Samkani A, Petersen AD, Thomsen MN, Astrup A, Chabanova E, et al. A carbohydrate-reduced high-protein diet improves HbA1c and liver fat content in weight stable participants with type 2 diabetes: a randomised controlled trial. *Diabetologia*. 2019 Nov 23;62(11):2066–78.
49. Li H, Li X, Yuan S, Jin Y, Lu J. Nut consumption and risk of metabolic syndrome and overweight/obesity: a meta-analysis of prospective cohort studies and randomized trials. *Nutrition & Metabolism*. 2018 Dec 22;15(1):46.
50. Flores-Mateo G, Rojas-Rueda D, Basora J, Ros E, Salas-Salvadó J. Nut intake and adiposity: meta-analysis of clinical trials. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2013 Jun 1;97(6):1346–55.
51. Neale EP, Tapsell LC, Guan V, Batterham MJ. The effect of nut consumption on markers of inflammation and endothelial function: a systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *BMJ Open*. 2017 Nov 22;7(11):e016863.
52. Henning SM, Yang J, Woo SL, Lee RP, Huang J, Rasmussen A, et al. Hass Avocado Inclusion in a Weight Loss Diet Supported Weight Loss and Altered Gut Microbiota: A 12 Week Randomized Parallel-Controlled Trial. *Current Developments in Nutrition*. 2019 Jun 12; 3(8):nzz068.
53. Wien M, Haddad E, Oda K, Sabaté J. A randomized 3x3 crossover study to evaluate the effect of Hass avocado intake on post-ingestive satiety, glucose and insulin levels, and subsequent energy intake in overweight adults. *Nutrition Journal*. 2013 Dec 27;12(1):155.
54. Fulgoni VL, Dreher M, Davenport AJ. Avocado consumption is associated with better diet quality and nutrient intake, and lower metabolic syndrome risk in US adults: results from the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 2001–2008. *Nutrition Journal*. 2013 Dec 2;12(1):1.

55. Schwingshackl L, Christoph M, Hoffmann G. Effects of Olive Oil on Markers of Inflammation and Endothelial Function—A Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients*. 2015 Sep 11;7(9):7651–75.
56. Schwingshackl L, Hoffmann G. Monounsaturated fatty acids, olive oil and health status: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Lipids in Health and Disease*. 2014 Dec 1;13(1):154.
57. George ES, Marshall S, Mayr HL, Trakman GL, Tatucu-Babet OA, Lassemillante ACM, et al. The effect of high-polyphenol extra virgin olive oil on cardiovascular risk factors: A systematic review and meta-analysis. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2018 Apr 30;1–24.
58. Elagizi A, Lavie CJ, Marshall K, DiNicolantonio JJ, O’Keefe JH, Milani R V. Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Cardiovascular Health: A Comprehensive Review. *Progress in Cardiovascular Diseases*. 2018 May;61(1):76–85.
59. Richard C, Cristall L, Fleming E, Lewis ED, Ricupero M, Jacobs RL, et al. Impact of Egg Consumption on Cardiovascular Risk Factors in Individuals with Type 2 Diabetes and at Risk for Developing Diabetes: A Systematic Review of Randomized Nutritional Intervention Studies. *Canadian Journal of Diabetes*. 2017 Aug;41(4):453–63.
60. Fuller NR, Sainsbury A, Caterson ID, Denyer G, Fong M, Gerofi J, et al. Effect of a high-egg diet on cardiometabolic risk factors in people with type 2 diabetes: the Diabetes and Egg (DIABEGG) Study—randomized weight-loss and follow-up phase. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2018 Jun 1;107(6):921–31.
61. Geiker NRW, Larsen ML, Dyerberg J, Stender S, Astrup A. Egg consumption, cardiovascular diseases and type 2 diabetes. *European Journal of Clinical Nutrition*. 2018 Jan 27;72(1):44–56.
62. Astrup A. Goodbye to the egg-white omelet—welcome back to the whole-egg omelet. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2018 Jun 1;107(6):853–4.
63. Pimpin L, Wu JHY, Haskelberg H, Del Gobbo L, Mozaffarian D. Is Butter Back? A Systematic Review and Meta-Analysis of Butter Consumption and Risk of Cardiovascular Disease, Diabetes, and Total Mortality. Schooling CM, editor. *PLOS ONE*. 2016 Jun 29;11(6):e0158118.
64. Blasco R, Contreras C, de Teresa C, del Valle M, Franco L, García A, et al. Suplementos nutricionales para el deportista. Ayudas ergogénicas en el deporte - 2019. Documento de consenso de la Sociedad Española de Medicina del Deporte. *Archivos de medicina del deporte*. 2019;36(1):1-114.

65. Witard O, Wardle S, Macnaughton L, Hodgson A, Tipton K. Protein Considerations for Optimising Skeletal Muscle Mass in Healthy Young and Older Adults. *Nutrients*. 2016 Mar 23;8(4):181.
66. Moore DR. Protein Metabolism in Active Youth: Not Just Little Adults. *Exercise and Sport Sciences Reviews*. 2019 Jan;47(1):29–36.
67. Elango R, Humayun MA, Ball RO, Pencharz PB. Protein requirement of healthy school-age children determined by the indicator amino acid oxidation method. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2011 Dec 1;94(6):1545–52.
68. Jäger R, Kerksick CM, Campbell BI, Cribb PJ, Wells SD, Skwiat TM, et al. International Society of Sports Nutrition Position Stand: protein and exercise. *J Int Soc Sports Nutr*. 2017 Dec 20;14(1):20.
69. Stratton MT, Tinsley GM, Alesi MG, Hester GM, Olmos AA, Serafini PR, et al. Four Weeks of Time-Restricted Feeding Combined with Resistance Training Does Not Differentially Influence Measures of Body Composition, Muscle Performance, Resting Energy Expenditure, and Blood Biomarkers. *Nutrients*. 2020 Apr 17;12(4):1126.
70. Tinsley GM, Moore ML, Graybeal AJ, Paoli A, Kim Y, Gonzales JU, et al. Time-restricted feeding plus resistance training in active females: a randomized trial. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2019 Sep 1;110(3):628–40.
71. Tinsley GM, Forsse JS, Butler NK, Paoli A, Bane AA, La Bounty PM, et al. Time-restricted feeding in young men performing resistance training: A randomized controlled trial. *European Journal of Sport Science*. 2017 Feb 7;17(2):200–7.
72. Moro T, Tinsley G, Bianco A, Marcolin G, Pacelli QF, Battaglia G, et al. Effects of eight weeks of time-restricted feeding (16/8) on basal metabolism, maximal strength, body composition, inflammation, and cardiovascular risk factors in resistance-trained males. *Journal of Translational Medicine*. 2016 Dec 13;14(1):290.
73. Hudson JL, Bergia RE, Campbell WW. Effects of protein supplements consumed with meals, versus between meals, on resistance training–induced body composition changes in adults: a systematic review. *Nutrition Reviews*. 2018 Jun 1;76(6):461–8.
74. Hudson JL, Bergia RE, Campbell WW. Protein Distribution and Muscle-Related Outcomes: Does the Evidence Support the Concept? *Nutrients*. 2020 May 16;12(5):1441.
75. Wiss DA, Avena N, Rada P. Sugar Addiction: From Evolution to Revolution. *Frontiers in Psychiatry*. 2018 Nov 7;9:545.
76. Moubarac JC, Parra DC, Cannon G, Monteiro CA. Food Classification Systems Based on Food Processing: Significance and Implications for Policies and Actions: A Systematic Literature Review and Assessment. *Current Obesity Reports*. 2014 Jun 25;3(2):256–72.

77. Juul F, Martinez-Steele E, Parekh N, Monteiro CA, Chang VW. Ultra-processed food consumption and excess weight among US adults. *British Journal of Nutrition*. 2018 Jul 14;120(1):90–100.
78. Poti JM, Braga B, Qin B. Ultra-processed Food Intake and Obesity: What Really Matters for Health—Processing or Nutrient Content? *Current Obesity Reports*. 2017 Dec 25;6(4):420–31.
79. Mendonça R de D, Pimenta AM, Gea A, de la Fuente-Arrillaga C, Martínez-González MA, Lopes ACS, et al. Ultraprocessed food consumption and risk of overweight and obesity: the University of Navarra Follow-Up (SUN) cohort study. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2016 Nov 1;104(5):1433–40.
80. Gordon E, Ariel-Donges A, Bauman V, Merlo L. What Is the Evidence for “Food Addiction?” A Systematic Review. *Nutrients*. 2018 Apr 12;10(4):477.
81. Rauber F, Campagnolo PDB, Hoffman DJ, Vitolo MR. Consumption of ultra-processed food products and its effects on children’s lipid profiles: A longitudinal study. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*. 2015 Jan;25(1):116–22.
82. Fiolet T, Srour B, Sellem L, Kesse-Guyot E, Allès B, Méjean C, et al. Consumption of ultra-processed foods and cancer risk: results from NutriNet-Santé prospective cohort. *BMJ*. 2018 Feb 14;k322.
83. Gombert M, Carrasco-Luna J, Pin-Arboledas G, Codoñer-Franch P. Circadian Rhythm Variations and Nutrition in Children. *Journal of Child Science*. 2018 Jan 26;08(01):e60–6.
84. Kaczmarek JL, Thompson S V., Holscher HD. Complex interactions of circadian rhythms, eating behaviors, and the gastrointestinal microbiota and their potential impact on health. *Nutrition Reviews*. 2017;75(9):673–82.
85. Gill S, Panda S. A Smartphone App Reveals Erratic Diurnal Eating Patterns in Humans that Can Be Modulated for Health Benefits. *Cell Metabolism*. 2015 Nov;22(5):789–98.
86. Mattson MP, Allison DB, Fontana L, Harvie M, Longo VD, Malaisse WJ, et al. Meal frequency and timing in health and disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2014 Nov 25;111(47):16647–53.
87. Kelly KP, McGuinness OP, Buchowski M, Hughey JJ, Chen H, Powers J, et al. Eating breakfast and avoiding late-evening snacking sustains lipid oxidation. Kramer A, editor. *PLOS Biology*. 2020 Feb 27;18(2):e3000622.
88. Richter J, Herzog N, Janka S, Baumann T, Kistenmacher A, Oltmanns KM. Twice as High Diet-Induced Thermogenesis After Breakfast vs Dinner On High-Calorie as Well as Low-Calorie Meals. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2020 Mar 1;105(3):e211–21.

89. Chamorro R, Farias R, Peirano P. Regulación circadiana, patrón horario de alimentación y sueño: Enfoque en el problema de obesidad. *Revista chilena de nutrición*. 2018 Sep;45(3):285–92.
90. Shukla AP, Dickison M, Coughlin N, Karan A, Mauer E, Truong W, et al. The impact of food order on postprandial glycaemic excursions in prediabetes. *Diabetes, Obesity and Metabolism*. 2019 Feb;21(2):377–81.
91. Felső R, Lohner S, Hollódy K, Erhardt É, Molnár D. Relationship between sleep duration and childhood obesity: Systematic review including the potential underlying mechanisms. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2017 Sep;27(9):751–61.
92. Navarro-Solera M. Estudio de la interrelación de factores ambientales, dietéticos y genéticos que afectan a la obesidad infantil. (Tesis doctoral). Universidad de Valencia; 2015.
93. Jiang P, Turek FW. Timing of meals: when is as critical as what and how much. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 2017 May 1;312(5):E369–80.
94. Beebe DW, Simon S, Summer S, Hemmer S, Strotman D, Dolan LM. Dietary intake following experimentally restricted sleep in adolescents. *Sleep*. 2013 Jun 1;36(6):827–34.
95. Cedernaes J, Brandell J, Ros O, Broman J, Hogenkamp PS, Schiöth HB, et al. Increased impulsivity in response to food cues after sleep loss in healthy young men. *Obesity*. 2014 Aug 16;22(8):1786–91.
96. Hanlon EC, Tasali E, Leproult R, Stuhr KL, Doncheck E, de Wit H, et al. Sleep Restriction Enhances the Daily Rhythm of Circulating Levels of Endocannabinoid 2-Arachidonoylglycerol. *Sleep*. 2016;
97. Markwald RR, Melanson EL, Smith MR, Higgins J, Perreault L, Eckel RH, et al. Impact of insufficient sleep on total daily energy expenditure, food intake, and weight gain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2013 Apr 2;110(14):5695–700.
98. World Health Organization. Recomendaciones Mundiales sobre Actividad Física para la Salud. Geneva: WHO Library Cataloguing-in-Publication. 2010.
99. Vancampfort D, Stubbs B, Firth J, Van Damme T, Koyanagi A. Sedentary behavior and depressive symptoms among 67,077 adolescents aged 12–15 years from 30 low- and middle-income countries. *International Journal of Behavioral Nutrition and Physical Activity*. 2018 Dec 8;15(1):73.
100. Codella R, Luzi L, Terruzzi I. Exercise has the guts: How physical activity may positively modulate gut microbiota in chronic and immune-based diseases. *Digestive and Liver Disease*. 2018 Apr;50(4):331–41.

101. Ballester Asensio E. Medición objetiva y percepción subjetiva de los niveles de actividad física en una muestra de niños escolares. (Tesis doctoral). Universidad de Valencia; 2015.
102. WHO. Adolescent obesity and related behaviours: trends and inequalities in the WHO region 2002-2014. Who. 2017.
103. Foster C, Moore J, Singletary C, Skelton J. Physical activity and family-based obesity treatment: a review of expert recommendations on physical activity in youth. *Clin Obes.* 2018;8(1):68–79.
104. Hales CN, Barker DJ, Clark PM, Cox LJ, Fall C, Osmond C, et al. Fetal and infant growth and impaired glucose tolerance at age 64. *BMJ.* 1991 Oct 26;303(6809):1019–22.
105. Barker DJP. The origins of the developmental origins theory. *Journal of Internal Medicine.* 2007 May;261(5):412–7.
106. Barker DJ. Fetal programming of coronary heart disease. *Trends in Endocrinology and Metabolism.* 2002 Nov 1;13(9):364–8.
107. Barker DJP, Thornburg KL. The Obstetric Origins of Health for a Lifetime. *Clinical Obstetrics and Gynecology.* 2013 Sep;56(3):511–9.
108. Mandy M, Nyirenda M. Developmental Origins of Health and Disease: the relevance to developing nations. *International Health.* 2018 Mar 1;10(2):66–70.
109. Dhana K, Haines J, Liu G, Zhang C, Wang X, Field AE, et al. Association between maternal adherence to healthy lifestyle practices and risk of obesity in offspring: results from two prospective cohort studies of mother-child pairs in the United States. *BMJ.* 2018 Jul 4;k2486.
110. Cañellas X, Sanchis J. Niños sanos, adultos sanos. Barcelona: Plataforma editorial; 2016.
111. Stephenson J, Heslehurst N, Hall J, Schoenaker DAJM, Hutchinson J, Cade JE, et al. Before the beginning: nutrition and lifestyle in the preconception period and its importance for future health. *The Lancet.* 2018 May;391(10132):1830–41.
112. Fleming TP, Watkins AJ, Velazquez MA, Mathers JC, Prentice AM, Stephenson J, et al. Origins of lifetime health around the time of conception: causes and consequences. *The Lancet.* 2018 May;391(10132):1842–52.
113. Barker M, Dombrowski SU, Colbourn T, Fall CHD, Kriznik NM, Lawrence WT, et al. Intervention strategies to improve nutrition and health behaviours before conception. *The Lancet.* 2018 May;391(10132):1853–64.
114. Sanchez CE, Barry C, Sabhlok A, Russell K, Majors A, Kollins SH, et al. Maternal pre-pregnancy obesity and child neurodevelopmental outcomes: a meta-analysis. *Obesity Reviews.* 2018 Apr;19(4):464–84.

115. Moreno Villares J, Collado M, Larqué E, Leis Trobazo M, Sáenz de Pipaon M, Moreno Aznar L. Los primeros 1000 días: una oportunidad para reducir la carga de las enfermedades no transmisibles. *Nutrición Hospitalaria*. 2019;36(1):218–32.
116. Hantsoo L, Jašarević E, Criniti S, McGeehan B, Tanes C, Sammel MD, et al. Childhood adversity impact on gut microbiota and inflammatory response to stress during pregnancy. *Brain, Behavior, and Immunity*. 2019 Jan;75:240–50.
117. Zacarías MF, Collado MC, Gómez-Gallego C, Flinck H, Aittoniemi J, Isolauri E, et al. Pregestational overweight and obesity are associated with differences in gut microbiota composition and systemic inflammation in the third trimester. Vinciguerra M, editor. *PLOS ONE*. 2018 Jul 13;13(7):e0200305.
118. Baraldi LG, Martínez Steele E, Canella DS, Monteiro CA. Consumption of ultra-processed foods and associated sociodemographic factors in the USA between 2007 and 2012: evidence from a nationally representative cross-sectional study. *BMJ Open*. 2018 Mar 9;8(3):e020574.
119. Martos-Moreno GÁ, Serra-Juhé C, Pérez-Jurado LA, Argente J. Aspectos genéticos de la obesidad. *Rev Esp Endocrinol Pediatr*. 2017;8.
120. Crovesy L, Rosado EL. Interaction between genes involved in energy intake regulation and diet in obesity. *Nutrition*. 2019 Nov;67–68:110547.
121. Zinöcker M, Lindseth I. The Western Diet–Microbiome–Host Interaction and Its Role in Metabolic Disease. *Nutrients*. 2018 Mar 17;10(3):365.
122. Sonnenburg ED, Sonnenburg JL. The ancestral and industrialized gut microbiota and implications for human health. *Nature Reviews Microbiology*. 2019 Jun 15;17(6):383–90.
123. Bleich SN, Vercammen KA, Zatz LY, Frelier JM, Ebbeling CB, Peeters A. Interventions to prevent global childhood overweight and obesity: a systematic review. *The Lancet Diabetes & Endocrinology*. 2018 Apr;6(4):332–46.
124. Hauner H, Bechthold A, Boeing H, Brönstrup A, Buyken A, Leschik-Bonnet E, et al. Evidence-Based Guideline of the German Nutrition Society: Carbohydrate Intake and Prevention of Nutrition-Related Diseases. *Annals of Nutrition and Metabolism*. 2012;60(s1):1–58.
125. Cani PD, Van Hul M, Lefort C, Depommier C, Rastelli M, Everard A. Microbial regulation of organismal energy homeostasis. *Nature Metabolism*. 2019 Jan 7;1(1):34–46.
126. Régnier M, Van Hul M, Knauf C, Cani PD. Gut microbiome, endocrine control of gut barrier function and metabolic diseases. *Journal of Endocrinology*. 2021 Feb;248(2):R67–82.

127. Aleksandrova K, Mozaffarian D, Pischon T. Addressing the Perfect Storm: Biomarkers in Obesity and Pathophysiology of Cardiometabolic Risk. *Clinical Chemistry*. 2018 Jan;64(1):142–53.
128. Izaola O, de Luis D, Sajoux I, Domingo JC, Vidal M. Inflamación y obesidad (Lipoinflamación). *Nutrición Hospitalaria*. 2015;31(6):2352–8.
129. Esteve Ràfols M. Tejido adiposo: heterogeneidad celular y diversidad funcional. *Endocrinología y Nutrición*. 2014;61:100–12.
130. Piché M, Poirier P, Lemieux I, Després J. Overview of Epidemiology and Contribution of Obesity and Body Fat Distribution to Cardiovascular Disease: An Update. *Progress in Cardiovascular Diseases*. 2018 Jul-Aug;61(2):103-113.
131. Ighbariya A, Weiss R. Insulin Resistance, Prediabetes, Metabolic Syndrome: What Should Every Pediatrician Know? *Journal of Clinical Research in Pediatric Endocrinology*. 2018 Jan 15;49–57.
132. Lee YS, Olefsky J. Chronic tissue inflammation and metabolic disease. *Genes & Development*. 2021 Mar 1;35(5–6):307–28.
133. Torres S, Fabersani E, Marquez A, Gauffin-Cano P. Adipose tissue inflammation and metabolic syndrome. The proactive role of probiotics. *European Journal of Nutrition*. 2019 Feb 24;58(1):27–43.
134. Gutiérrez C, Roura A, Olivares J. Mecanismos Moleculares de la Resistencia a la Insulina: Una Actualización. *Gac Med Mex*. 2017;153:214–28.
135. Santos-Marcos JA, Perez-Jimenez F, Camargo A. The role of diet and intestinal microbiota in the development of metabolic syndrome. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 2019 Aug;70:1–27.
136. Sun L, Ma L, Ma Y, Zhang F, Zhao C, Nie Y. Insights into the role of gut microbiota in obesity: pathogenesis, mechanisms, and therapeutic perspectives. *Protein Cell*. 2018 May 3;9(5):397–403.
137. Shibata R, Ouchi N, Ohashi K, Murohara T. The role of adipokines in cardiovascular disease. *Journal of Cardiology*. 2017 Oct;70(4):329–34.
138. Ramírez Alvarado MM, Sánchez Roitz C. [Relation of serum levels of C-reactive protein to anthropometric measurements; a systematic review of studies in South America]. *Nutrición hospitalaria*. 2012;27(4):971–7.
139. Zulet MA, Puchau B, Navarro C, Martí A, Martínez JA. [Inflammatory biomarkers: the link between obesity and associated pathologies]. *Nutrición hospitalaria*. 2007;22(5):511–27.

140. Martos-Moreno GA, Kopchick JJ, Argente J. Adipoquinas en el niño sano y con obesidad. *Anales de Pediatría*. 2013 Mar;78(3):189.e1-189.e15.
141. Ghadge AA, Khaire AA. Leptin as a predictive marker for metabolic syndrome. *Cytokine*. 2019 May 30;121:154735.
142. Tagi VM, Chiarelli F. Obesity and insulin resistance in children. *Current Opinion in Pediatrics*. 2020 Aug;32(4):582–8.
143. Boulangé CL, Neves AL, Chilloux J, Nicholson JK, Dumas ME. Impact of the gut microbiota on inflammation, obesity, and metabolic disease. *Genome Medicine*. 2016 Dec 20;8(1):42.
144. Gepstein V, Weiss R. Obesity as the Main Risk Factor for Metabolic Syndrome in Children. *Frontiers in Endocrinology*. 2019 Aug 16;10:568.
145. Yeh TL, Chen HH, Tsai SY, Lin CY, Liu SJ, Chien KL. The Relationship between Metabolically Healthy Obesity and the Risk of Cardiovascular Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Journal of Clinical Medicine*. 2019 Aug 15;8(8):1228.
146. Barazzoni R, Gortan Cappellari G, Ragni M, Nisoli E. Insulin resistance in obesity: an overview of fundamental alterations. *Eating and Weight Disorders - Studies on Anorexia, Bulimia and Obesity*. 2018 Apr 3;23(2):149–57.
147. Bluher M. Adipose tissue inflammation: a cause or consequence of obesity-related insulin resistance? *Clinical Science*. 2016;130(18):1603–14.
148. Cerdó T, García-Santos J, G. Bermúdez M, Campoy C. The Role of Probiotics and Prebiotics in the Prevention and Treatment of Obesity. *Nutrients*. 2019 Mar 15;11(3):635.
149. Zimmet P, Alberti KGM, Kaufman F, Tajima N, Silink M, Arslanian S, et al. The metabolic syndrome in children and adolescents - an IDF consensus report. *Pediatric Diabetes*. 2007 Oct;8(5):299–306.
150. Bussler S, Penke M, Flemming G, Elhassan YS, Kratzsch J, Sergeev E, et al. Novel Insights in the Metabolic Syndrome in Childhood and Adolescence. *Hormone Research in Paediatrics*. 2017;88(3–4):181–93.
151. Al Bander Z, Nitert MD, Mousa A, Naderpoor N. The Gut Microbiota and Inflammation: An Overview. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2020 Oct 19;17(20):7618.
152. Rastelli M, Knauf C, Cani PD. Gut Microbes and Health: A Focus on the Mechanisms Linking Microbes, Obesity, and Related Disorders. *Obesity*. 2018 May;26(5):792–800.
153. Rowland I, Gibson G, Heinken A, Scott K, Swann J, Thiele I, et al. Gut microbiota functions: metabolism of nutrients and other food components. *Eur J Nutr*. 2018 Feb;57(1):1–24.

154. Martín Cueto C, Escobedo Martín S, Martín Rosique R, Suárez Fernández JE. Microbiota autóctona. Funciones. Microbioma humano. In: Álvarez Calatayud G, Marcos A, Margolles A, editors. Probióticos, prebióticos y salud: Evidencia científica. 1st ed. Majadahonda (Madrid): Ergon; 2016. p. 1–9.
155. Valdes AM, Walter J, Segal E, Spector TD. Role of the gut microbiota in nutrition and health. *BMJ*. 2018 Jun 13;k2179.
156. Avelar Rodríguez D, Peña Vélez R, Toro Monjaraz EM, Ramírez Mayans J, Ryan PM. The Gut Microbiota: A Clinically Impactful Factor in Patient Health and Disease. *SN Comprehensive Clinical Medicine*. 2019 Mar 18;1(3):188–99.
157. Requena T, Martínez-Cuesta MC, Peláez C. Diet and microbiota linked in health and disease. *Food & Function*. 2018;9(2):688–704.
158. Koppel N, Maini Rekdal V, Balskus EP. Chemical transformation of xenobiotics by the human gut microbiota. *Science*. 2017 Jun 23;356(6344):eaag2770.
159. Liu L, Zhu G. Gut-Brain Axis and Mood Disorder. *Front Psychiatry*. 2018 May 29;9:223.
160. García-Mantrana I, Alcántara C, Selma-Royo M, Boix-Amorós A, Dzidic M, Gimeno-Alcañiz J, et al. MAMI: a birth cohort focused on maternal-infant microbiota during early life. *BMC Pediatrics*. 2019 Dec 3;19(1):140.
161. Diaz Heijtz R. Fetal, neonatal, and infant microbiome: Perturbations and subsequent effects on brain development and behavior. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*. 2016 Dec;21(6):410–7.
162. Robertson RC, Manges AR, Finlay BB, Prendergast AJ. The Human Microbiome and Child Growth – First 1000 Days and Beyond. *Trends in Microbiology*. 2019 Feb;27(2):131–47.
163. Prince AL, Chu DM, Seferovic MD, Antony KM, Ma J, Aagaard KM. The Perinatal Microbiome and Pregnancy: Moving Beyond the Vaginal Microbiome. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2015 Mar 16;5(6):a023051.
164. Selma-Royo M, García-Mantrana I, Calatayud M, Parra-Llorca A, Martínez-Costa C, Collado MC. Maternal diet during pregnancy and intestinal markers are associated with early gut microbiota. *European Journal of Nutrition*. 2021 Apr 29;60(3):1429–42.
165. Maher SE, O'Brien EC, Moore RL, Byrne DF, Geraghty AA, Saldova R, et al. The association between the maternal diet and the maternal and infant gut microbiome: a systematic review. *British Journal of Nutrition*. 2020 Mar 4;1–29.
166. Chong C, Bloomfield F, O'Sullivan J. Factors Affecting Gastrointestinal Microbiome Development in Neonates. *Nutrients*. 2018 Feb 28;10(3):274.

167. Pammi M, Cope J, Tarr PI, Warner BB, Morrow AL, Mai V, et al. Intestinal dysbiosis in preterm infants preceding necrotizing enterocolitis: a systematic review and meta-analysis. *Microbiome*. 2017 Dec 9;5(1):31.
168. Cortes-Macias E, Selma-Royo M, García-Mantrana I, Calatayud M, González S, Martínez-Costa C, et al. Maternal Diet Shapes the Breast Milk Microbiota Composition and Diversity: Impact of Mode of Delivery and Antibiotic Exposure. *The Journal of Nutrition*. 2021 Feb 1;151(2):330–40.
169. Hennet T, Borsig L. Breastfed at Tiffany's. *Trends in Biochemical Sciences*. 2016 Jun;41(6):508–18.
170. Comité de Lactancia Materna y Comité de Nutrición de la Asociación Española de Pediatría. RECOMENDACIONES DE LA ASOCIACIÓN ESPAÑOLA DE PEDIATRÍA SOBRE LA ALIMENTACIÓN COMPLEMENTARIA [Internet]. *Aeped.es*. 2018 [cited 2019 Jun 12]. Available from: <https://www.aeped.es/comite-lactancia-materna/documentos/recomendaciones-aeped-sobre-alimentacion-complementaria>
171. Lemas DJ, Yee S, Cacho N, Miller D, Cardel M, Gurka M, et al. Exploring the contribution of maternal antibiotics and breastfeeding to development of the infant microbiome and pediatric obesity. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*. 2016 Dec;21(6):406–9.
172. Korpela K, Blakstad EW, Moltu SJ, Strømmen K, Nakstad B, Rønnestad AE, et al. Intestinal microbiota development and gestational age in preterm neonates. *Scientific Reports*. 2018 Dec 6;8(1):2453.
173. Cañellas X, Sanchis J, Aguado X, Redondo L. Alimentación prebiótica. Barcelona: Plataforma editorial; 2017.
174. Van Hul M, Cani PD. Targeting Carbohydrates and Polyphenols for a Healthy Microbiome and Healthy Weight. *Curr Nutr Rep*. 2019 Jun 3;
175. Rezac S, Kok CR, Heermann M, Hutkins R. Fermented Foods as a Dietary Source of Live Organisms. *Frontiers in Microbiology*. 2018 Aug 24;9.
176. Albesharat R, Ehrmann MA, Korakli M, Yazaji S, Vogel RF. Phenotypic and genotypic analyses of lactic acid bacteria in local fermented food, breast milk and faeces of mothers and their babies. *Systematic and Applied Microbiology*. 2011 Apr;34(2):148–55.
177. Cani PD. Human gut microbiome: hopes, threats and promises. *Gut*. 2018 Sep;67(9):1716–25.
178. Blaser MJ. Antibiotic use and its consequences for the normal microbiome. *Science* (1979). 2016 Apr 29;352(6285):544–5.

179. Hermansson H, Kumar H, Collado MC, Salminen S, Isolauri E, Rautava S. Breast Milk Microbiota Is Shaped by Mode of Delivery and Intrapartum Antibiotic Exposure. *Frontiers in Nutrition*. 2019 Feb 4;6.
180. Shao X, Ding X, Wang B, Li L, An X, Yao Q, et al. Antibiotic exposure in early life increases risk of childhood obesity: A systematic review and meta-analysis. *Frontiers in Endocrinology*. 2017 Jul 20;8:170.
181. Rasmussen SH, Shrestha S, Bjerregaard LG, Ångquist LH, Baker JL, Jess T, et al. Antibiotic exposure in early life and childhood overweight and obesity: A systematic review and meta-analysis. *Diabetes, Obesity and Metabolism*. 2018 Jun;20(6):1508–14.
182. Gilbert JA, Blaser MJ, Caporaso JG, Jansson JK, Lynch S V, Knight R. Current understanding of the human microbiome. *Nature Medicine*. 2018 Apr 1;24(4):392–400.
183. Jackson MA, Verdi S, Maxan ME, Shin CM, Zierer J, Bowyer RCE, et al. Gut microbiota associations with common diseases and prescription medications in a population-based cohort. *Nature Communications*. 2018 Dec 9;9(1):2655.
184. Falony G, Joossens M, Vieira-Silva S, Wang J, Darzi Y, Faust K, et al. Population-level analysis of gut microbiome variation. *Science (1979)*. 2016 Apr 29;352(6285):560–4.
185. Maier L, Typas A. Systematically investigating the impact of medication on the gut microbiome. *Current Opinion in Microbiology*. 2017 Oct;39:128–35.
186. Zuo T, Kamm M, Colombel J, Ng S. Urbanization and the gut microbiota in health and inflammatory bowel disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2018 Jul;15(7):440-52.
187. Lehtimäki J, Karkman A, Laatikainen T, Paalanen L, von Hertzen L, Haahtela T, et al. Patterns in the skin microbiota differ in children and teenagers between rural and urban environments. *Scientific Reports*. 2017 May 31;7(1):45651.
188. Gómez-Gallego C, Forsgren M, Selma-Royo M, Nermes M, Collado MC, Salminen S, et al. The Composition and Diversity of the Gut Microbiota in Children Is Modifiable by the Household Dogs: Impact of a Canine-Specific Probiotic. *Microorganisms*. 2021 Mar 8;9(3):557.
189. Tun HM, Konya T, Takaro TK, Brook JR, Chari R, Field CJ, et al. Exposure to household furry pets influences the gut microbiota of infants at 3-4 months following various birth scenarios. *Microbiome*. 2017 Apr 6;5(1):40.
190. Foster JA, Rinaman L, Cryan JF. Stress & the gut-brain axis: Regulation by the microbiome. *Neurobiol Stress*. 2017 Mar 19;7:124-136.

191. Cerdá B, Pérez M, Pérez-Santiago JD, Tornero-Aguilera JF, González-Soltero R, Larrosa M. Gut Microbiota Modification: Another Piece in the Puzzle of the Benefits of Physical Exercise in Health? *Frontiers in Physiology*. 2016 Feb 18;7.
192. Allen JM, Mailing LJ, Niemi GM, Moore Rachel, Cook MD, White BA, et al. Exercise Alters Gut Microbiota Composition and Function in Lean and Obese Humans. *Medicine & Science in Sports & Exercise*. 2018 Apr;50(4):747–57.
193. Mitchell CM, Davy BM, Hulver MW, Neilson AP, Bennett BJ, Davy KP. Does Exercise Alter Gut Microbial Composition? A Systematic Review. *Medicine & Science in Sports & Exercise*. 2019 Jan;51(1):160–7.
194. Parkar S, Kalsbeek A, Cheeseman J. Potential Role for the Gut Microbiota in Modulating Host Circadian Rhythms and Metabolic Health. *Microorganisms*. 2019 Jan 31;7(2):41.
195. Gombert M, Carrasco-Luna J, Pin-Arboledas G, Codoñer-Franch P. The connection of circadian rhythm to inflammatory bowel disease. *Translational Research*. 2019 Apr;206:107–18.
196. Cani PD. Gut microbiota-at the intersection of everything? *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2017 Jun;14(6):321-322.
197. Cenit MC, Sanz Y, Codoñer-Franch P. Influence of gut microbiota on neuropsychiatric disorders. *World J Gastroenterol*. 2017 Aug 14;23(30):5486-98.
198. Peláez C, Requena T. *La microbiota intestinal*. 1st ed. CSIC, editor. Fuencarral (Madrid): Catarata; 2017.
199. Turnbaugh PJ, Hamady M, Yatsunenko T, Cantarel BL, Duncan A, Ley RE, et al. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature*. 2009 Jan 30;457(7228):480–4.
200. Gomes A, Hoffmann C, Mota J. The human gut microbiota: Metabolism and perspective in obesity. *Gut Microbes*. 2018;1–18.
201. Le Chatelier E, Nielsen T, Qin J, Prifti E, Hildebrand F, Falony G, et al. Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature*. 2013 Aug 29;500(7464):541–6.
202. Cotillard A, Kennedy SP, Kong LC, Prifti E, Pons N, Le Chatelier E, et al. Dietary intervention impact on gut microbial gene richness. *Nature*. 2013 Aug 28;500(7464):585–8.
203. Dao MC, Everard A, Aron-Wisnewsky J, Sokolovska N, Prifti E, Verger EO, et al. *Akkermansia muciniphila* and improved metabolic health during a dietary intervention in obesity: relationship with gut microbiome richness and ecology. *Gut*. 2016 Mar;65(3):426–36.

204. Zhong H, Penders J, Shi Z, Ren H, Cai K, Fang C, et al. Impact of early events and lifestyle on the gut microbiota and metabolic phenotypes in young school-age children. *Microbiome*. 2019 Dec 4;7(1):2.
205. König J, Wells J, Cani PD, García-Ródenas CL, MacDonald T, Mercenier A, et al. Human intestinal barrier function in health and disease. *Clinical and Translational Gastroenterology*. 2016;7(10):e196.
206. Dahiya DK, Renuka, Puniya M, Shandilya UK, Dhewa T, Kumar N, et al. Gut Microbiota Modulation and Its Relationship with Obesity Using Prebiotic Fibers and Probiotics: A Review. *Front Microbiol*. 2017;8:563.
207. Lin H V., Frassetto A, Kowalik Jr EJ, Nawrocki AR, Lu MM, Kosinski JR, et al. Butyrate and Propionate Protect against Diet-Induced Obesity and Regulate Gut Hormones via Free Fatty Acid Receptor 3-Independent Mechanisms. Brennan L, editor. *PLoS One*. 2012 Apr 10;7(4):e35240.
208. Zhao L, Zhang F, Ding X, Wu G, Lam YY, Wang X, et al. Gut bacteria selectively promoted by dietary fibers alleviate type 2 diabetes. *Science (1979)*. 2018 Mar 9;359(6380):1151–6.
209. Khan MJ, Gerasimidis K, Edwards CA, Shaikh MG. Role of Gut Microbiota in the Aetiology of Obesity: Proposed Mechanisms and Review of the Literature. *Journal of Obesity*. 2016;2016.
210. Barrea L, Muscogiuri G, Annunziata G, Laudisio D, Pugliese G, Salzano C, et al. From gut microbiota dysfunction to obesity: could short-chain fatty acids stop this dangerous course? *Hormones*. 2019 Sep 6;18(3):245–50.
211. Agus A, Clément K, Sokol H. Gut microbiota-derived metabolites as central regulators in metabolic disorders. *Gut*. 2021 Jun;70(6):1174–82.
212. Molinaro A, Wahlström A, Marschall HU. Role of Bile Acids in Metabolic Control. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 2018;29(1):31–41.
213. DiPatrizio N V. Endocannabinoids and the Gut-Brain Control of Food Intake and Obesity. *Nutrients*. 2021 Apr 7;13(4):1214.
214. Torres-Fuentes C, Schellekens H, Dinan TG, Cryan JF. The microbiota–gut–brain axis in obesity. *The Lancet Gastroenterology & Hepatology*. 2017 Oct;2(10):747–56.
215. Mehrpouya-Bahrami P, Chitralla KN, Ganewatta MS, Tang C, Murphy EA, Enos RT, et al. Blockade of CB1 cannabinoid receptor alters gut microbiota and attenuates inflammation and diet-induced obesity. *Scientific Reports*. 2017 Dec 15;7(1):15645.

216. Forte N, Fernández-Rilo AC, Palomba L, Di Marzo V, Cristino L. Obesity Affects the Microbiota–Gut–Brain Axis and the Regulation Thereof by Endocannabinoids and Related Mediators. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020 Feb 25;21(5):1554.
217. Sánchez B, Delgado S, Blanco-Míguez A, Lourenço A, Gueimonde M, Margolles A. Probiotics, gut microbiota, and their influence on host health and disease. *Molecular Nutrition & Food Research*. 2017 Jan;61(1):1600240.
218. Hill C, Guarner F, Reid G, Gibson GR, Merenstein DJ, Pot B, et al. Expert consensus document: The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*. 2014;11(8):506–14.
219. Rodríguez Gómez JM. Probióticos: del laboratorio al consumidor. *Nutrición hospitalaria*. 2015 Feb 7;31 Suppl 1:33–47.
220. Food and Agriculture Organization (FAO). Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food; Report of a Joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. London, Ontario, Canada; 2002.
221. EFSA. Scientific Opinion on the maintenance of the list of QPS biological agents intentionally added to food and feed (2013 update). *EFSA J*. 2013;11:3449.
222. Guarner F, Sanders ME, Eliakim R, Fedorak R, Gangl A, Garisch J, et al. Guías Mundiales de la Organización Mundial de Gastroenterología: Probióticos y prebióticos [Internet]. 2017. Available from: <http://www.worldgastroenterology.org/guidelines/global-guidelines/probiotics-and-prebiotics>
223. Wang ZB, Xin SS, Ding LN, Ding WY, Hou YL, Liu CQ, et al. The Potential Role of Probiotics in Controlling Overweight/Obesity and Associated Metabolic Parameters in Adults: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2019 Apr 15;2019:1–14.
224. Depommier C, Everard A, Druart C, Plovier H, Van Hul M, Vieira-Silva S, et al. Supplementation with *Akkermansia muciniphila* in overweight and obese human volunteers: a proof-of-concept exploratory study. *Nature Medicine*. 2019 Jul 1;25(7):1096–103.
225. Mazloom K, Siddiqi I, Covasa M. Probiotics: How Effective Are They in the Fight against Obesity? *Nutrients*. 2019 Jan 24;11(2):258.
226. Ejtahed HS, Angoorani P, Soroush AR, Atlasi R, Hasani-Ranjbar S, Mortazavian AM, et al. Probiotics supplementation for the obesity management; A systematic review of animal studies and clinical trials. *Journal of Functional Foods*. 2019 Jan;52:228–42.

227. Wiciński M, Gębalski J, Gołębiewski J, Malinowski B. Probiotics for the Treatment of Overweight and Obesity in Humans—A Review of Clinical Trials. *Microorganisms*. 2020 Jul 29;8(8):1148.
228. Cano PG, Santacruz A, Trejo FM, Sanz Y. *Bifidobacterium* CECT 7765 improves metabolic and immunological alterations associated with obesity in high-fat diet-fed mice. *Obesity*. 2013 Nov;21(11):2310–21.
229. Agustí A, Moya-Pérez A, Campillo I, Montserrat-de la Paz S, Cerrudo V, Pérez-Villalba A, et al. *Bifidobacterium pseudocatenulatum* CECT 7765 Ameliorates Neuroendocrine Alterations Associated with an Exaggerated Stress Response and Anhedonia in Obese Mice. *Molecular Neurobiology*. 2018 Jun 18;55(6):5337–52.
230. Moya-Pérez A, Neef A, Sanz Y. *Bifidobacterium pseudocatenulatum* CECT 7765 Reduces Obesity-Associated Inflammation by Restoring the Lymphocyte-Macrophage Balance and Gut Microbiota Structure in High-Fat Diet-Fed Mice. *PLoS One*. 2015 Jul 10;10(7):e0126976.
231. Moya-Pérez A, Romo-Vaquero M, Tomás-Barberán F, Sanz Y, García-Conesa MT. Hepatic molecular responses to *Bifidobacterium pseudocatenulatum* CECT 7765 in a mouse model of diet-induced obesity. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*. 2014 Jan;24(1):57–64.
232. Mauricio MD, Serna E, Fernández-Murga ML, Portero J, Aldasoro M, Valles SL, et al. *Bifidobacterium pseudocatenulatum* CECT 7765 supplementation restores altered vascular function in an experimental model of obese mice. *International Journal of Medical Sciences*. 2017;14(5):444–51.
233. Fernández-Murga ML, Olivares M, Sanz Y. *Bifidobacterium pseudocatenulatum* CECT 7765 reverses the adverse effects of diet-induced obesity through the gut-bone axis. *Bone*. 2020 Dec;141:115580.
234. Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JI. Human gut microbes associated with obesity. *Nature*. 2006 Dec 21;444(7122):1022–3.
235. Qin J, Li Y, Cai Z, Li S, Zhu J, Zhang F, et al. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature*. 2012 Oct 26;490(7418):55–60.
236. Karlsson FH, Tremaroli V, Nookaew I, Bergström G, Behre CJ, Fagerberg B, et al. Gut metagenome in European women with normal, impaired and diabetic glucose control. *Nature*. 2013 Jun 29;498(7452):99–103.
237. Gomes A, Hoffmann C, Mota J. The human gut microbiota: Metabolism and perspective in obesity. *Gut Microbes*. 2018;1–18.

238. Rastelli M, Knauf C, Cani PD. Gut Microbes and Health: A Focus on the Mechanisms Linking Microbes, Obesity, and Related Disorders. *Obesity*. 2018 May;26(5):792–800.
239. Borgeraas H, Johnson LK, Skattebu J, Hertel JK, Hjelmsaeth J. Effects of probiotics on body weight, body mass index, fat mass and fat percentage in subjects with overweight or obesity: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Obesity Reviews*. 2018 Feb;19(2):219–32.
240. Perna S, Ilyas Z, Giacosa A, Gasparri C, Peroni G, Faliva MA, et al. Is Probiotic Supplementation Useful for the Management of Body Weight and Other Anthropometric Measures in Adults Affected by Overweight and Obesity with Metabolic Related Diseases? A Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients*. 2021 Feb 19;13(2):666.
241. Moya-Pérez A, Romo-Vaquero M, Tomás-Barberán F, Sanz Y, García-Conesa MT. Hepatic molecular responses to *Bifidobacterium pseudocatenulatum* CECT 7765 in a mouse model of diet-induced obesity. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*. 2014 Jan;24(1):57–64.
242. Moya-Pérez A, Neef A, Sanz Y. *Bifidobacterium pseudocatenulatum* CECT 7765 Reduces Obesity-Associated Inflammation by Restoring the Lymphocyte-Macrophage Balance and Gut Microbiota Structure in High-Fat Diet-Fed Mice. *PLoS One*. 2015 Jul 10;10(7):e0126976.
243. Mauricio MD, Serna E, Fernández-Murga ML, Portero J, Aldasoro M, Valles SL, et al. *Bifidobacterium pseudocatenulatum* CECT 7765 supplementation restores altered vascular function in an experimental model of obese mice. *International Journal of Medical Sciences*. 2017;14(5):444–51.
244. The Lancet. A fifth amendment for the Declaration of Helsinki. *The Lancet*. 2000 Sep;356(9236):1123.
245. García Cuartero B, García Lacalle C, Jiménez Lobo C, González Vergaz A, Calvo Rey C, Alcázar Villar MJ, et al. Índice HOMA y QUICKI, insulina y péptido C en niños sanos. Puntos de corte de riesgo cardiovascular. *Anales de Pediatría*. 2007 May;66(5):481–90.
246. Say L, Raine R. A systematic review of inequalities in the use of maternal health care in developing countries: examining the scale of the problem and the importance of context. *Bull World Health Organ*. 2007 Oct;85(10):812–9.
247. Keskin M, Kurtoglu S, Kendirci M, Atabek ME, Yazici C. Homeostasis Model Assessment Is More Reliable Than the Fasting Glucose/Insulin Ratio and Quantitative Insulin Sensitivity Check Index for Assessing Insulin Resistance Among Obese Children and Adolescents. *PEDIATRICS*. 2005 Apr 1;115(4):e500–3.

248. Sociedad Española de Gastroenterología Hepatología y Nutrición Pediátrica. Aplicación nutricional SEGHP [Internet]. 2012 [cited 2017 Dec 25]. Available from: <https://www.seghnp.org/nutricional/>
249. Boeing H, Bechthold A, Bub A, Ellinger S, Haller D, Kroke A, et al. Critical review: Vegetables and fruit in the prevention of chronic diseases. *European Journal of Nutrition*. 2012;51(6):637–63.
250. Bertola ML, Mukamal KJ, Cahill LE, Hou T, Ludwig DS, Mozaffarian D, et al. Changes in Intake of Fruits and Vegetables and Weight Change in United States Men and Women Followed for Up to 24 Years: Analysis from Three Prospective Cohort Studies. Razak F, editor. *PLOS Medicine*. 2015 Sep 22;12(9):e1001878.
251. Maskarinec G, Hullar MAJ, Monroe KR, Shepherd JA, Hunt J, Randolph TW, et al. Fecal Microbial Diversity and Structure Are Associated with Diet Quality in the Multiethnic Cohort Adiposity Phenotype Study. *The Journal of Nutrition*. 2019 Sep 1;149(9):1575–84.
252. Estruch R, Martínez-González MA, Corella D, Salas-Salvadó J, Fito M, Chiva-Blanch G, et al. Effect of a high-fat Mediterranean diet on bodyweight and waist circumference: a prespecified secondary outcomes analysis of the PREDIMED randomised controlled trial. *The Lancet Diabetes and Endocrinology*. 2016;4(8):666–76.
253. Abete I, Astrup A, Martínez JA, Thorsdottir I, Zulet MA. Obesity and the metabolic syndrome: role of different dietary macronutrient distribution patterns and specific nutritional components on weight loss and maintenance. *Nutrition Reviews*. 2010 Apr;68(4):214–31.
254. De Lorgeril M, Salen P. Gluten and wheat intolerance today: Are modern wheat strains involved? *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 2014;65(5):577–81.
255. Connolly ML, Tzounis X, Tuohy KM, Lovegrove JA. Hypocholesterolemic and Prebiotic Effects of a Whole-Grain Oat-Based Granola Breakfast Cereal in a Cardio-Metabolic “At Risk” Population. *Frontiers in Microbiology*. 2016 Nov 7;7.
256. Kristek A, Wiese M, Heuer P, Kosik O, Schär MY, Soycan G, et al. Oat bran, but not its isolated bioactive  $\beta$ -glucans or polyphenols, have a bifidogenic effect in an in vitro fermentation model of the gut microbiota. *British Journal of Nutrition*. 2019 Mar 14;121(5):549–59.
257. Marventano S, Izquierdo Pulido M, Sánchez-González C, Godos J, Speciani A, Galvano F, et al. Legume consumption and CVD risk: A systematic review and meta-analysis. *Public Health Nutrition*. 2017;20(2):245–54.
258. Baladía E, Martínez Rodríguez R. Legumbres y salud: resumen de evidencias rápidas. RED-NuBE. 2016. Available from: [www.rednube.net/docs/legumbres\\_2016.pdf](http://www.rednube.net/docs/legumbres_2016.pdf)

259. Harvard Medical School. Healthy Eating Plate. Harvard Health Publications. 2011;(2009):5–23.
260. Porca Fernández C, Tejera Pérez C, Castañeda VB, Manuel J, Almeida G, Bellido Guerrero D. Nuevo enfoque en la valoración de la ingesta dietética. *Nutr Clin Med*. 2016;95(22):95–107.
261. Ortega R, López-Sobaler A, Andrés P, Requejo A, Aparicio A, Molinero L. Programa DIAL para valoración de dietas y cálculos de alimentación (para Windows, versión 3.3.6.0). Departamento de Nutrición (UCM) y Alce Ingeniería, S.A. Madrid, España.; 2016.
262. Tompkins T, Mainville I, Arcand Y. The impact of meals on a probiotic during transit through a model of the human upper gastrointestinal tract. *Beneficial Microbes*. 2011 Dec;2(4):295–303.
263. Suárez Moya A. [Microbiome and next generation sequencing]. *Revista española de quimioterapia: publicación oficial de la Sociedad Española de Quimioterapia*. 2017 Oct;30(5):305–11.
264. Klindworth A, Pruesse E, Schweer T, Peplies J, Quast C, Horn M, et al. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Research*. 2013 Jan 1;41(1):e1–e1.
265. Magoc T, Salzberg SL. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics*. 2011 Nov 1;27(21):2957–63.
266. Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister EB, et al. Introducing mothur: Open-Source, Platform-Independent, Community-Supported Software for Describing and Comparing Microbial Communities. *Applied and Environmental Microbiology*. 2009 Dec 1;75(23):7537–41.
267. Edgar RC, Haas BJ, Clemente JC, Quince C, Knight R. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics*. 2011 Aug 15;27(16):2194–200.
268. Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research*. 2012 Nov 27;41(D1):D590–6.
269. Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, Cole JR. Naive Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy. *Applied and Environmental Microbiology*. 2007 Aug 15;73(16):5261–7.
270. Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods*. 2010 May 11;7(5):335–6.

271. Zarrati M, Raji Lahiji M, Salehi E, Yazdani B, Razmpoosh E, Shokouhi Shoormasti R, et al. Effects of Probiotic Yogurt on Serum Omentin-1, Adropin, and Nesfatin-1 Concentrations in Overweight and Obese Participants Under Low-Calorie Diet. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. 2019 Dec 19;11(4):1202–9.
272. Perel P, Roberts I, Sena E, Wheble P, Briscoe C, Sandercock P, et al. Comparison of treatment effects between animal experiments and clinical trials: systematic review. *BMJ*. 2007 Jan 27;334(7586):197.
273. Famouri F, Shariat Z, Hashemipour M, Keikha M, Kelishadi R. Effects of Probiotics on Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Obese Children and Adolescents. *Journal of Pediatric Gastroenterology & Nutrition*. 2017 Mar;64(3):413–7.
274. Alisi A, Bedogni G, Baviera G, Giorgio V, Porro E, Paris C, et al. Randomised clinical trial: the beneficial effects of VSL#3 in obese children with non-alcoholic steatohepatitis. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. 2014 Jun;39(11):1276–85.
275. Gøbel RJ, Larsen N, Jakobsen M, Mølgaard C, Michaelsen KF. Probiotics to Adolescents With Obesity. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 2012 Dec;55(6):673–8.
276. Perna S, Ilyas Z, Giacosa A, Gasparri C, Peroni G, Faliva MA, et al. Is Probiotic Supplementation Useful for the Management of Body Weight and Other Anthropometric Measures in Adults Affected by Overweight and Obesity with Metabolic Related Diseases? A Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients*. 2021 Feb 19;13(2):666.
277. Álvarez-Arraño V, Martín-Peláez S. Effects of Probiotics and Synbiotics on Weight Loss in Subjects with Overweight or Obesity: A Systematic Review. *Nutrients*. 2021 Oct 17;13(10):3627.
278. Cerdó T, García-Santos J, G. Bermúdez M, Campoy C. The Role of Probiotics and Prebiotics in the Prevention and Treatment of Obesity. *Nutrients*. 2019 Mar 15;11(3):635.
279. Ivey KL, Hodgson JM, Kerr DA, Thompson PL, Stojceski B, Prince RL. The effect of yoghurt and its probiotics on blood pressure and serum lipid profile; a randomised controlled trial. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*. 2015 Jan;25(1):46–51.
280. Hassan A, Din AU, Zhu Y, Zhang K, Li T, Wang Y, et al. Updates in understanding the hypocholesterolemia effect of probiotics on atherosclerosis. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2019 Aug 14;103(15):5993–6006.
281. al Bander Z, Nitert MD, Mousa A, Naderpoor N. The Gut Microbiota and Inflammation: An Overview. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2020 Oct 19;17(20):7618.

282. Rajkumar H, Mahmood N, Kumar M, Varikuti SR, Challa HR, Myakala SP. Effect of Probiotic (VSL#3) and Omega-3 on Lipid Profile, Insulin Sensitivity, Inflammatory Markers, and Gut Colonization in Overweight Adults: A Randomized, Controlled Trial. *Mediators of Inflammation*. 2014;2014:1–8.
283. Hernández-Díaz A, Arana-Martínez JC, Carbó R, Espinosa-Cervantes R, Sánchez-Muñoz F. Omentina: papel en la resistencia a la insulina, inflamación y protección cardiovascular. *Archivos de Cardiología de México*. 2016 Jul;86(3):233–43.
284. Moreno-Navarrete JM, Ortega F, Castro A, Sabater M, Ricart W, Fernández-Real JM. Circulating Omentin as a Novel Biomarker of Endothelial Dysfunction. *Obesity*. 2011 Aug 3;19(8):1552–9.
285. Sanchis-Chordà J, del Pulgar EMG, Carrasco-Luna J, Benítez-Páez A, Sanz Y, Codoñer-Franch P. *Bifidobacterium pseudocatenulatum* CECT 7765 supplementation improves inflammatory status in insulin-resistant obese children. *European Journal of Nutrition*. 2019 Oct;58(7):2789–800.
286. AESAN. Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) sobre Ingestas Nutricionales de Referencia para la población española. *Revista del Comité Científico de la AESAN*. 2019;29:43–68.
287. Beals JW, Burd NA, Moore DR, van Vliet S. Obesity Alters the Muscle Protein Synthetic Response to Nutrition and Exercise. *Frontiers in Nutrition*. 2019 Jun;6.
288. Tobias DK, Chen M, Manson JE, Ludwig DS, Willett W, Hu FB. Effect of low-fat diet interventions versus other diet interventions on long-term weight change in adults: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Diabetes & Endocrinology*. 2015 Dec;3(12):968–79.
289. Astrup A, Magkos F, Bier DM, Brenna JT, de Oliveira Otto MC, Hill JO, et al. Saturated Fats and Health: A Reassessment and Proposal for Food-Based Recommendations. *J Am Coll Cardiol*. 2020 Aug;76(7):844–57.
290. Malik VS, Hu FB. Sugar-Sweetened Beverages and Cardiometabolic Health: An Update of the Evidence. *Nutrients*. 2019 Aug 8;11(8):1840.
291. DiNicolantonio JJ, Lucan SC, O’Keefe JH. The Evidence for Saturated Fat and for Sugar Related to Coronary Heart Disease. *Progress in Cardiovascular Diseases*. 2016 Mar;58(5):464–72.
292. AESAN. Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) de revisión y actualización de las Recomendaciones Dietéticas para la población española. *Revista del Comité Científico de la AESAN*. 2020;32:11–58.

293. Guan ZW, Yu EZ, Feng Q. Soluble Dietary Fiber, One of the Most Important Nutrients for the Gut Microbiota. *Molecules*. 2021 Nov 11;26(22):6802.
294. Guo J, Tan L, Kong L. Impact of dietary intake of resistant starch on obesity and associated metabolic profiles in human: a systematic review of the literature. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2021 Mar 26;61(6):889–905.
295. Ebbeling CB, Young IS, Lichtenstein AH, Ludwig DS, McKinley M, Perez-Escamilla R, et al. Dietary Fat: Friend or Foe? *Clinical Chemistry*. 2018 Jan 1;64(1):34–41.
296. Mendivil CO. Dietary Fish, Fish Nutrients, and Immune Function: A Review. *Frontiers in Nutrition*. 2021 Jan 20;7:617652.
297. Stadler JT, Marsche G. Dietary Strategies to Improve Cardiovascular Health: Focus on Increasing High-Density Lipoprotein Functionality. *Frontiers in Nutrition*. 2021 Nov 22;8.
298. Balfegó M, Canivell S, Hanzu FA, Sala-Vila A, Martínez-Medina M, Murillo S, et al. Effects of sardine-enriched diet on metabolic control, inflammation and gut microbiota in drug-naïve patients with type 2 diabetes: a pilot randomized trial. *Lipids in Health and Disease*. 2016 Dec 18;15(1):78.
299. Saika A, Nagatake T, Kunisawa J. Host- and Microbe-Dependent Dietary Lipid Metabolism in the Control of Allergy, Inflammation, and Immunity. *Frontiers in Nutrition*. 2019 Apr 10;6:36.
300. Jen V, Karagounis LG, Jaddoe VW V., Franco OH, Voortman T. Dietary protein intake in school-age children and detailed measures of body composition: the Generation R Study. *International Journal of Obesity*. 2018 Oct;42(10):1715–23.
301. Krishnaswamy K, Gayathri R. Nature's bountiful gift to humankind: Vegetables & fruits & their role in cardiovascular disease & diabetes. *Indian Journal of Medical Research*. 2018;148(5):569.
302. Singh RK, Chang HW, Yan D, Lee KM, Ucmak D, Wong K, et al. Influence of diet on the gut microbiome and implications for human health. *Journal of Translational Medicine*. 2017 Dec 8;15(1):73.
303. Khalangot MD, Kovtun VA, Gurianov VG, Pysarenko YM, Kravchenko VI. Evaluation of type 2 diabetes prevention through diet modification in people with impaired glucose regulation: A population-based study. *Prim Care Diabetes*. 2019 Dec;13(6):535-541.
304. Zabetian-Targhi F, Mahmoudi MJ, Rezaei N, Mahmoudi M. Retinol Binding Protein 4 in Relation to Diet, Inflammation, Immunity, and Cardiovascular Diseases. *Advances in Nutrition*. 2015 Nov 1;6(6):748–62.

305. Walsh CJ, Healy S, O'Toole PW, Murphy EF, Cotter PD. The probiotic *L. casei* LC-XCAL™ improves metabolic health in a diet-induced obesity mouse model without altering the microbiome. *Gut Microbes*. 2020 Nov 9;12(1):1747330.
306. Moya-Pérez A, Perez-Villalba A, Benítez-Páez A, Campillo I, Sanz Y. *Bifidobacterium* CECT 7765 modulates early stress-induced immune, neuroendocrine and behavioral alterations in mice. *Brain, Behavior, and Immunity*. 2017 Oct;65:43–56.
307. Turner P V. The role of the gut microbiota on animal model reproducibility. *Animal Models and Experimental Medicine*. 2018 Jun;1(2):109–15.
308. Kristensen NB, Bryrup T, Allin KH, Nielsen T, Hansen TH, Pedersen O. Alterations in fecal microbiota composition by probiotic supplementation in healthy adults: a systematic review of randomized controlled trials. *Genome Medicine*. 2016 Dec 10;8(1):52.
309. Sanders ME, Merenstein D, Merrifield CA, Hutkins R. Probiotics for human use. *Nutrition Bulletin*. 2018 Sep;43(3):212–25.
310. Peters BA, Shapiro JA, Church TR, Miller G, Trinh-Shevrin C, Yuen E, et al. A taxonomic signature of obesity in a large study of American adults. *Scientific Reports*. 2018 Dec 27;8(1):9749.
311. Aguirre M, Bussolo de Souza C, Venema K. The Gut Microbiota from Lean and Obese Subjects Contribute Differently to the Fermentation of Arabinogalactan and Inulin. Loh G, editor. *PLoS One*. 2016 Jul 13;11(7):e0159236.
312. de Filippis F, Vitaglione P, Cuomo R, Berni Canani R, Ercolini D. Dietary Interventions to Modulate the Gut Microbiome—How Far Away Are We From Precision Medicine. *Inflammatory Bowel Diseases*. 2018 Sep 15;24(10):2142–54.
313. David LA, Maurice CF, Carmody RN, Gootenberg DB, Button JE, Wolfe BE, et al. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature*. 2014 Jan 11;505(7484):559–63.
314. Garcia-Mantrana I, Selma-Royo M, Alcantara C, Collado MC. Shifts on Gut Microbiota Associated to Mediterranean Diet Adherence and Specific Dietary Intakes on General Adult Population. *Frontiers in Microbiology*. 2018 May 7;9.



## 07. ANEXOS |

# ANEXO 1. APROBACIÓN DEL COMITÉ CIENTÍFICO

 GENERALITAT VALENCIANA  
CONSELLERIA DE SANITAT



AGÈNCIA VALENCIANA DE SALUT  
Departament de Salut València - Doctor Peset

A/A.: Dra. Pilar codoñer Franch  
Servicio de Pediatría  
1º piso C. Externas

Vicent Valentin Segura, Presidente del Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitario Dr. Peset.

## CERTIFICA:

Que este comité en su reunión celebrada el día 25 de Mayo de 2011 ha evaluado y ha aprobado las aclaraciones solicitadas del estudio titulado: ¿Pueden los probióticos modificar la resistencia insulínica en niños obesos?

**Proyecto de investigación**  
**Código Ceic: 52/11**

Valencia 31 de Mayo de 2011

Fdo.: Vicent Valentin Segura  
Presidente CEIC Hospital Universitario Dr. Peset



CS 5/1

## ANEXO 2. DECLARACIÓN DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

---

¿PUEDEN LOS PROBIÓTICOS MODIFICAR LA RESISTENCIA INSULINICA EN NIÑOS OBESOS?

### DECLARACIÓN DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Don/Doña ....., de ....años de edad y con DNI nº ....., en calidad de padre/madre/tutor del menor ..... manifiesta que ha sido informada sobre los beneficios que podría suponer el análisis de la sangre (10 mL) de mi hijo/a, para llevar a cabo la investigación “**¿PUEDEN LOS PROBIÓTICOS MODIFICAR LA RESISTENCIA INSULINICA EN NIÑOS OBESOS?**”

- He sido informado/a de los posibles perjuicios que la extracción de una muestra de 10 mL de sangre puede tener sobre su bienestar y salud (dolor leve de la punción, la extracción de 10 mL no supone ningún riesgo hemodinámico para el niño).
- He leído la hoja informativa que me ha sido entregada.
- He tenido oportunidad de efectuar preguntas sobre el estudio.
- He recibido respuestas satisfactorias.
- He recibido suficiente información en relación con el estudio.
- He hablado con el Dr./Investigador:
- Entiendo que la participación es voluntaria.
- Entiendo que puede abandonar el estudio:
  - Cuando lo desee.
  - Sin que tenga que dar explicaciones.
  - Sin que ello afecte a sus cuidados médicos.

Considero que ha comprendido suficientemente el alcance de su participación en este estudio que no le reporta perjuicio personal alguno y, sin embargo, puede contribuir al avance científico con importantes beneficios para la salud de la población y que se me autorizará a acompañar y estar presente en las actuaciones que se lleven a cabo con motivo del presente estudio.

También he sido informado de forma clara, precisa y suficiente de los siguientes extremos que afectan a los datos personales que se contienen en este consentimiento y en la ficha o expediente que se abra para la investigación:

- Estos datos serán tratados y custodiados con respeto a mi intimidad y a la vigente normativa de protección de datos.
- Sobre esos datos me asisten los derechos de acceso, rectificación, cancelación y oposición que podré ejercitar mediante solicitud ante el investigador responsable en la dirección de contacto que figura en este documento.
- Estos datos no podrán ser cedidos sin mi consentimiento expreso y no lo otorgo en este acto.

He sido también informado/a de que nuestros datos personales serán protegidos e incluidos en un fichero que deberá estar sometido a y con las garantías de la ley 15/1999 de 13 de diciembre.

Tomando ello en consideración, OTORGO mi CONSENTIMIENTO a

- Toma de datos de la Historia Clínica
- Estudio clínico de mi hijo/a
- Extracción de 10 mL de mi sangre de mi hijo/hija
- Análisis de la sangre de mi hijo/a

- Y que todo ello sea utilizado para cubrir los objetivos especificados en el proyecto.

Valencia, a.....de .....de 20.....

Fdo. D/Dña

Dr Dn/Dña

Paciente

Tutor legal

## **ANEXO 3. HOJA INFORMATIVA PARA LA RECOGIDA DE REGISTROS DIETÉTICOS**

---

### **HOJA INFORMATIVA PARA LA RECOGIDA DE REGISTROS DIETÉTICOS**

RELLENA DE FORMA DETALLADA LA INGESTA DE ALIMENTOS SÓLIDOS Y LÍQUIDOS DURANTE 3 DÍAS CONSECUTIVOS (2 DE ELLOS DE LUNES A VIERNES, Y 1 EN FIN DE SEMANA O FESTIVO)

Los registros dietéticos de 24 horas son una herramienta muy útil con la que poder valorar tu alimentación tanto en cantidad como en calidad y analizar las posibles deficiencias energéticas y nutricionales que puedas tener. Para poderlo llevar a cabo de forma correcta, necesitamos que cumplimentes los registros dietéticos de forma sincera y detallada, tal y como se muestra en el ejemplo que se adjunta.

Con tal de obtener datos representativos de tu ingesta, debes registrar durante 3 días consecutivos, 1 de ellos fin de semana o festivo, todo lo que comes y bebes, también la suplementación (si es el caso), las horas de descanso y las de actividad física que realizas a lo largo del día. Por ejemplo, si ingieres leche por la mañana, debes especificar el tipo (desnatada, semidesnatada o entera; con lactosa o sin lactosa) y la cantidad (un vaso entero, medio, grande, un bol, etcétera).

#### **Ejemplo tipo:**

Miércoles 20 de Mayo

#### **DESAYUNO – 7h30´**

- 1 vaso de leche entera (250ml) sin azúcar.
- 1 vaso de zumo natural de naranja con pulpa (250 ml).
- 1 rebanada de pan integral sin azúcares añadidos (marca Hacendado) con 1 cucharada sopera de aceite de oliva virgen extra y 1 bote pequeño de queso fresco 0% (marca Hacendado) (62´5 g).

### **ALMUERZO – 11h (muchísima hambre)**

Bocata integral pan blanco de Mercadona (40g) con una loncha de pechuga de pavo y una loncha de queso semicurado. 1 botella de agua (0´5 L) para beber.

### **COMIDA – 15h (con poca hambre)**

- 1 ración de emperador grande a la plancha con una pizca de sal yodada.
- 1 ensalada abundante que contenía: 1 bote de maíz dulce (marca Hacendado); 1 tomate natural a rodajas; 4 palitos de mar (marca Krissia) y media lechuga iceberg. Aliñada con 1 cucharada sopera de aceite de oliva virgen extra y una pizca de sal yodada.
- 1 vaso de gazpacho suave (115ml), marca Hacendado, con picatostes y 1 rodaja de melón.
- 1 vaso de Coca-cola light.

### **MERIENDA - 18h (tenía poca hambre)**

- Bocata de 5 dedos de pan integral con una loncha de jamón serrano y una loncha de queso semicurado. 1 bote de Coca-cola normal y 1 puñado (mano cerrada) de anacardos fritos y salados.
- 2 galletas Príncipe rellenas de chocolate.

### **CENA 21h (estaba nervioso y comí muy deprisa)**

- 1 plato de puré con verduras cocidas (zanahoria, calabacín, 1 quesito, 1/2 patata). Aliñado con aceite de oliva virgen (2 cucharadas soperas) y una pizca de sal virgen.
- 1 biscote de pan integral, marca Hacendado.
- 2 lonchas de jamón serrano, 1 trozo pequeño (3 dedos) de queso Maasdam.
- 1 yogurt cremoso natural 0% Hacendado (125g).
- 2 vasos de agua.

### **00h30´ me acuesto a dormir**

**DEPORTE DEL DÍA:** Desde las 19h hasta las 20h30´ hemos entrenado a fútbol. Hoy me cansé poco. Juego de portero.

## ANEXO 4. PUBLICACIÓN CIENTÍFICA

---

**Sanchis-Chordà J**, del Pulgar EMG, Carrasco-Luna J, Benítez-Páez A, Sanz Y, Codoñer-Franch P. Bifidobacterium pseudocatenulatum CECT 7765 supplementation improves inflammatory status in insulin-resistant obese children. *European Journal of Nutrition*. 2019 Oct;58(7):2789–800.



# *Bifidobacterium pseudocatenulatum* CECT 7765 supplementation improves inflammatory status in insulin-resistant obese children

Jesús Sanchis-Chordà<sup>1</sup> · Eva M. Gómez del Pulgar<sup>2</sup> · Joaquín Carrasco-Luna<sup>1,3</sup> · Alfonso Benítez-Páez<sup>2</sup> · Yolanda Sanz<sup>2</sup> · Pilar Codoñer-Franch<sup>1,4</sup> 

Received: 14 April 2018 / Accepted: 18 September 2018  
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2018

## Abstract

**Purpose** The relationships between gut microbiota and obesity-related co-morbidities have been increasingly recognized. Low-grade inflammation may be the main factor in the pathogenesis of such disorders. We investigated the effect of the potential probiotic *Bifidobacterium pseudocatenulatum* CECT 7765 on cardiometabolic risk factors, inflammatory cytokines and gut microbiota composition in obese children with insulin resistance.

**Methods** The study included 48 obese children (10–15 years old) with insulin resistance. They received dietary advice and were assigned to take the capsules with or without probiotic ( $10^{9-10}$  CFU) daily for 13 weeks. Clinical, biochemical and gut microbiome measurements were made at baseline and at the end of the intervention.

**Results** There was a significant improvement in body mass index in all children after the intervention, suggesting that weight changes are related to the dietary advice. A significant decrease in circulating high-sensitive C-reactive protein ( $P=0.026$ ) and monocyte chemoattractant protein-1 ( $P=0.032$ ) and an increase in high-density lipoprotein cholesterol ( $P=0.035$ ) and omentin-1 ( $P=0.023$ ) in children receiving probiotic supplementation were observed compared to the control group. Regarding gut microbiota, probiotic administration significantly increased the proportion of the *Rikenellaceae* family members, particularly of the *Alistipes* genus.

**Conclusions** The beneficial effects of the intervention on inflammatory markers and lipid profile suggest that *B. pseudocatenulatum* CECT 7765 intake together with dietary recommendations can improve inflammatory status in children with obesity and insulin resistance. These effects are parallel to increases in bacterial groups associated with a lean phenotype. The modulation of gut microbiota with probiotic supplementation can be considered an effective tool to ameliorate some obesity-related disorders in children.

**Keywords** *Bifidobacterium pseudocatenulatum* · Children obesity · Gut microbiota · Monocyte chemoattractant protein-1 · Omentin-1 · Probiotics

Jesús Sanchis-Chordà and Eva M. Gómez del Pulgar equally contributed to this work.

✉ Pilar Codoñer-Franch  
pilar.codoner@uv.es

<sup>1</sup> Department of Pediatrics, Obstetrics and Gynecology, University of Valencia, Avenida de Blasco Ibañez, no 15, 46010 Valencia, Spain

<sup>2</sup> Microbial Ecology, Nutrition and Health Research Group, Institute of Agrochemistry and Food Technology (IATA), National Research Council (CSIC), C/Médico Agustín Escardino, no 7, Paterna, 46980 Valencia, Spain

<sup>3</sup> Department of Experimental Sciences, Universidad Católica de Valencia, C/Quevedo, no 2, 46001 Valencia, Spain

<sup>4</sup> Department of Pediatrics, Dr. Peset University Hospital, Avenida Gaspar Aguilar, no 90, 46017 Valencia, Spain

## Introduction

The burden of the growing epidemic of obesity and its associated complications has been increasing [1]. However, limited progress has been made to reverse this trend. One of the main co-morbidities found in obese children is insulin resistance, consisting of a reduction in the capacity of insulin to stimulate glucose use. As a result, hyperinsulinemia occurs as a compensatory mechanism, while glucose tolerance remains normal. Besides, hyperinsulinemia is considered an independent risk factor for cardiovascular disease joint to the other traditional risk factors such as abdominal obesity, dyslipidemia and hypertension. Obesity and associated disorders are also characterized by a state of chronic,

low-grade inflammation manifested by an increase in high-sensitive protein-C reactive (hs-CRP) values with abnormal cytokine and adipokine production [2]. Indeed, inflammation is considered one of the mediators of the interplay between obesity, insulin resistance and vascular dysfunction [3, 4].

Currently, the gut microbiota and its collective genome (the microbiome) are considered additional factors that affect energy regulation and fat storage [5]. Alterations in gut microbiota composition and function (intestinal dysbiosis) have been associated with obesity and metabolic co-morbidities [5, 6]. A dysbiotic microbiota is suggested to contribute to the pathophysiology of obesity-associated disorders through different mechanisms, mainly by promoting systemic low-grade inflammation [3].

Probiotics, defined as live microorganisms that, when administered in adequate amounts, confer a health benefit on the host, have been shown to exert immune-regulatory and anti-inflammatory effects [7]. The oral intake of some probiotics has also been considered a possible co-adjuvant for the prevention and treatment of obesity, insulin resistance and cardiovascular diseases [7–9]. *Bifidobacterium pseudocatenulatum* CECT 7765 is a safe strain that has shown pre-clinical efficacy in ameliorating metabolic and immunological alterations associated with obesity in animal models [10–14]. Specifically, *B. pseudocatenulatum* CECT 7765 reduces obesity-associated systemic inflammation in obese mice [13].

Recently, new biomarkers of inflammation have emerged. First identified in intestinal Paneth cells, omentin-1 was thought to be part of the early-defense mechanisms against pathogenic bacteria in the gut [15]. Furthermore, it has been identified as an adipokine mainly expressed in visceral adipose tissue that can act as a protective factor against cardiovascular disease. Thus, circulating omentin-1 concentration could be a useful marker to identify subjects at risk of complications [16]. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) is a chemokine produced by macrophages and endothelial cells via the activation of the nuclear transcription factor- $\kappa$ B pathway [17]. MCP-1 recruits monocytes, leukocytes, and other inflammatory cells in response to an inflammatory challenge and as a consequence of weight gain. MCP-1 released from human adipose tissue is higher in visceral than the subcutaneous deposits, indicating that MCP-1 may have a predominant role in obesity-related health complications [18]. These two adipokines are related to inflammatory processes and endothelial dysfunction. Thus, it could be of interest to evaluate them in the early steps of obesity such as those that occur in children.

The aim of the present study was to investigate the impact of daily consumption of the potential probiotic *B. pseudocatenulatum* CECT 7765 regarding inflammatory and metabolic status of obese children with insulin resistance. We evaluated the effect on clinical and anthropometric

characteristics, cardiometabolic risk factors and molecules reflecting inflammation, such as omentin-1 and MCP-1. The effects on gut microbiota composition were also analyzed.

## Materials and methods

### Study design and subjects

We performed a prospective analytical intervention study in obese children (7–16 years old) with insulin resistance. A sample size of 23 children by group is required to detect difference in insulin resistance in a two-tailed test, with a level of significance of 5%, a power of 85%, being the difference between means of at least 1.0 unit in HOMA-IR index. Considering a possible loss of 15% in the follow-up of patients, we estimated that a sample size of 54 children should be initially included. The standard deviation considered is that included in a previous study conducted in Spanish children [19]. The intervention period lasted for 13 weeks. Participants were recruited for the study within the children attending the Pediatrics Nutrition Outpatient Clinic of the University Hospital Dr. Peset of Valencia (Spain) for diagnosis and treatment of obesity co-morbidities between September 2016 and September 2017. The protocol of the study was approved by the hospital's ethics committee. All procedures in the study were in complete accordance with the Helsinki declaration and its later amendments. The inclusion criteria for participants were as follows: (1) children with body mass index  $z$  score ( $z$ -BMI) greater than 2 standard deviations from the mean age and gender using the World Health Organization tables as a reference; (2) insulin resistance determined by the surrogate marker homeostasis model assessment  $\geq 3.16$  (product of the fasting serum insulin (in  $\mu$ UI/mL) for the fasting glucose (mmol/mL) divided by 22.5) [20]; (3) fasting plasma glucose concentrations below 6.1 mmol/L (110 mg/dL); (4) Spanish Caucasian origin. Exclusion criteria included the presence of known genetic disorders, hormonal disorders or chronic illness, any syndrome or disease that could influence dietary intake, or medication use. They were not vegetarians nor did they engage in intensive physical activity. Children and their parents were informed of the study in a personal interview with the pediatrician and dietitian-nutritionist and signed informed consent forms. All children underwent an anthropometric and dietary review, a blood sample was taken and they provided a stool sample at the beginning and at the end of the study. In the initial interview, participants in both groups received the same dietary recommendations. A potential probiotic strain (*B. pseudocatenulatum* CECT 7765) was provided in single-dose capsules containing between  $1 \times 10^9$  and  $1 \times 10^{10}$  colony forming units (CFU)

per day. The control group received capsules containing the same ingredients without the bacteria.

Participants were initially stratified by sex. Permuted blocks (block sizes of 4) are used within each stratum to achieve balance by a computer-generated randomization sequence created using Microsoft Excel 2013. Allocation was 1:1 to two groups: (1) the probiotic group, children that receive a probiotic supplement daily with dietary recommendations, and (2) the control group, children with the same dietary recommendations who received capsules without probiotic supplement. Children, parents, and the study investigators were blinded to group assignment. During the intervention period, the participants were required to take a single dose capsule in the morning on an empty stomach with a glass of semi-skim milk. On the same day of the initial interview, the patients were provided with 91 vials of capsules required to complete the study and received advice for the conservation and intake of vials. On day 45 of the study (in the middle of the intervention), this was performed via a phone or face-to-face recall to ensure the correct fulfillment of the study protocol.

### Evaluation of clinical parameters

Anthropometric examination was taken with the child in underwear and barefoot according to standardized methods. Weight was obtained by electronic scales with a Tanita BC-418MA segmental body composition analyzer (Tanita Europe BV, Hoofddorp, Netherlands). Height was recorded standing with the feet together, barefoot, and the heels, buttocks, back and occipital region in contact with the vertical plane of the rod (Holtain Ltd., Dyfed, UK). BMI was calculated as  $\text{kg/m}^2$  and a  $z$ -BMI for age and gender was determined using the World Health Organization tables as a reference [21]. The percentage of fat mass was obtained through bioelectrical impedance with the BC-418MA Tanita Segmental body composition analyzer (Tanita Europe BV, Hoofddorp, The Netherlands). Waist circumference was obtained according to standardized protocol with inextensible tape. Blood pressure was measured in a seated position with an automatic sphygmomanometer (Dinamo 200, GE Medical Systems Information Technologies, Inc., Milwaukee, Wisconsin, USA). The mean of three measurements was registered. Mean arterial pressure was calculated  $[(2 \times \text{diastolic blood pressure}) + \text{systolic blood pressure}/3]$  and considered for analysis.

### Biochemical analysis

Blood samples were collected after 12 h of fasting. Blood was processed immediately after collection and centrifuged at 3000g for 5 min at 4 °C. Glucose, total cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), triglycerides,

calcium, phosphorous were measured using automated direct methods (Aeroset System® Abbott Clinical Chemistry, Wiesbaden, Germany). Fasting insulin was determined using commercial kits by an automated electrochemiluminescence Roche Elecsys 2010 immunoassay analyzer. Plasma total homocysteine was measured on a Roche/Hitachi 917 analyzer using a Diazyme homocysteine enzymatic assay (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). Serum gamma-glutamyltranspeptidase and alanine aminotransferase were measured by an enzymatic colorimetric test at 37 °C in a Roche/Hitachi 917 analyzer (Roche Diagnostics, GmbH, Mannheim, Germany). Immunonephelometry was performed in a Behring Nephelometer 2 (Dade Behring, Marburg, Germany) and was used to analyze hs-CRP and retinol binding protein 4 (RBP4). The serum levels of 25(OH)D were quantified by electrochemiluminescence immunoassay in a Modular Analytics E170 (reagents and automatic analyzer were from Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany).

Plasma leptin, adiponectin and MCP1 concentrations were determined by Luminex Technology using a Milliplex Map Human High Sensitivity T Cell Magnetic Bead Panel (Merck Millipore, Darmstadt, Germany). The results were acquired on a LabScan 100 (Luminex), and data analysis was performed with Luminex exponent 3.1 software (Luminex Corporation, Austin, TX, USA.). Plasma levels of omentin-1 were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (Human Omentin-1 ELISA, Merck-Millipore, Darmstadt, Germany) and plates were read in a VICTOR™ X3 2030 multilabel plate reader (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA).

Stool samples were collected before and at the end of the intervention (the same days of the blood test). The patient provided the samples in sterile vials issued the same day or the day before, which were centrally stored at  $-80$  °C until processing.

### Assessment of food intake and dietary recommendations

Dietary intake was assessed by a dietitian-nutritionist using the 24-h dietary recall method. Participants and their parents were also instructed to record their daily dietary intake for 3 days, including a weekend day indicated by the nutritionist at the beginning and at the end of intervention period. Identical dietary advice was prescribed for both groups. The advice was focused on correcting nutritional habits. The aim was for participants and their families to reduce the consumption of ultra-processed food, which are extremely palatable products that have high amounts of harmful fats, refined sugar, salt and synthetic additives, high energy density and low fiber content [22]. It was emphasized that products such as soft drinks, sweets and cakes should be ingested only sporadically. At the same time, consuming higher amounts

of whole fruit, vegetables, legumes, nuts, virgin olive oil, fresh fish and meat and whole grains was reinforced. The evaluation of compliance and a review of dietary records were carried out weekly through telephone interviews with the dietitian-nutritionist. In addition, the remaining capsules and containers were collected at the end of the intervention to ensure proper compliance. Dietary caloric intakes and macronutrient values were analyzed using the DIAL program (Alce Engineering SA Madrid, Spain) both at the beginning and at the end of the intervention period.

## Microbiota analysis

### DNA extraction and PCR amplification

Approximately 200 mg stool aliquots were processed for DNA isolation using the QIAamp Fast DNA Stool MiniKit (Qiagen, Hilden, Germany) following the manufacturer's instructions. A diluted aliquot of the fecal DNA was prepared at ~20 ng/ $\mu$ L to be used in PCRs. Approximately 20 ng DNA (1  $\mu$ L diluted DNA) was used to amplify the V4–V5 hypervariable regions from the bacterial 16S rRNA gene by a 25-cycle PCR program consisting of the following steps: 95 °C for 20 s, 40 °C for 30 s, and 72 °C for 20 s. The PCR was performed using Phusion High-Fidelity Taq Polymerase enzyme (Thermo Scientific) and 6-mer barcoded primers, which target a wide range of bacterial 16S rRNA genes: S-D-Bact-0563-a-S-15 (AYTGGGYDTAAAGNG) and S-D-Bact-0907-a-A-20 (CCGTCAATTYMTTTRAGTTT) [23].

### Sequencing and data analysis

Amplicons consisted of approximately 380-bp fragments purified from triplicate reactions per sample using the Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare, Little Chalfont, UK). Amplicon DNA was quantified using a Qubit 3.0 fluorometer and the Qubit dsDNA HS Assay Kit (LifeTechnologies, Carlsbad, CA, USA). Samples were multiplexed by combining equimolar quantities of amplicon DNA (100 ng per sample) and sequenced in an Illumina MiSeq platform with 2  $\times$  300 PE configuration (CNAG, Barcelona, Spain). The raw data obtained were delivered in FASTQ files and pair ends with quality filtering were assembled using Flash software [24]. Sample de-multiplexing was carried out using sequence information from respective DNA barcodes and a Mothur v.1.36.1 suite of analysis [25]. After assembly and barcode/primer removal, the sequences were processed for chimera removal using the Uchime algorithm [26] and SILVA reference set of 16S sequences (Release 128) [27]. Different alpha diversity descriptors (Chao's richness, Shannon's evenness and Simpson's reciprocal index) were calculated with Mothur v1.36.1

using default parameters and average methods in the clustering step. The Chao's richness informs about the abundance (number) of theoretical species (Operational Taxonomic Units—OTUs) present in samples, Shannon's evenness accounts for the relative abundance of species (similarity of the population size of each of the species present) and the Simpson's reciprocal index measures the global diversity, taking into account the richness and evenness. Taxonomical assessments were performed using the RDP classifier v2.12 [28]. The raw dataset of sequences was submitted to the MG-RAST web server and they can be freely accessed upon accession number mgp86061.

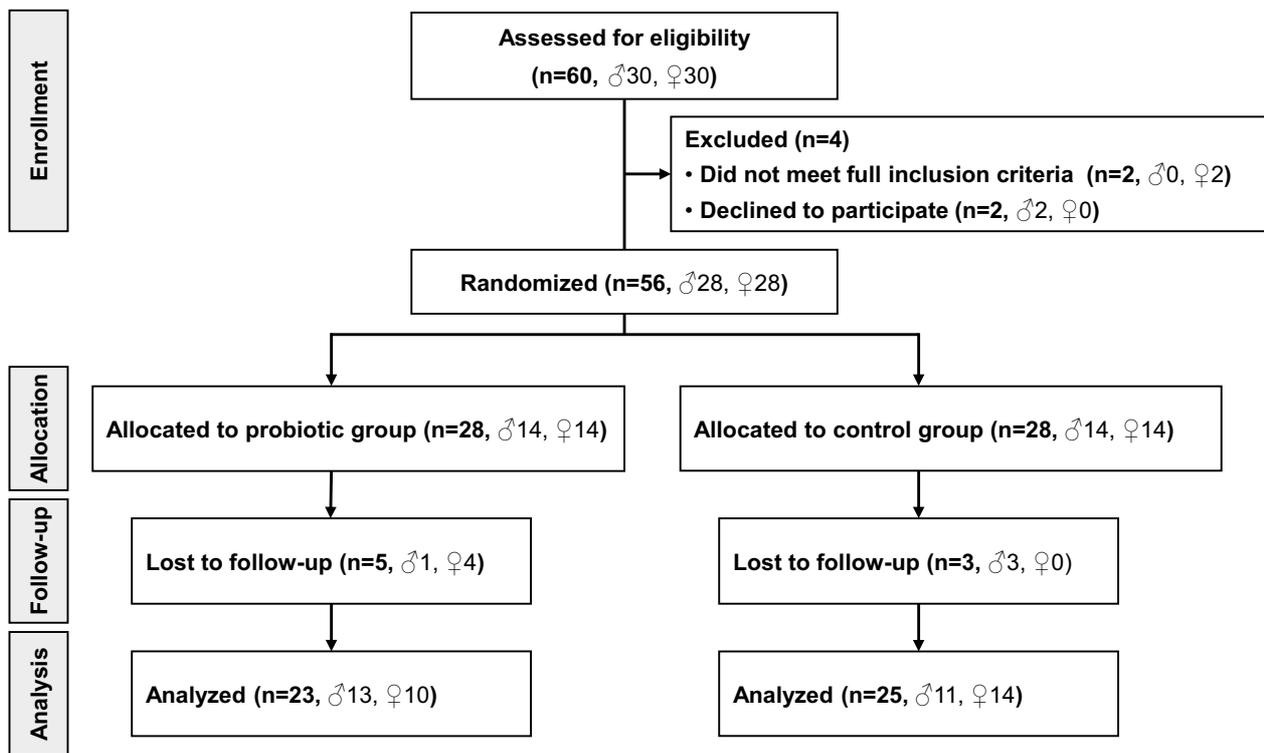
### Statistical analysis

The statistical analysis of clinical and biochemical parameters was conducted with SPSS for Windows (IBM SPSS Statistics for Windows, Version 22.0. Armonk, NY: IBM Corp). The results were expressed as means with standard deviations. The normality of each variable was determined by the Kolmogorov test. Non-normal variables were analyzed after logarithmic transformation. A paired Student's *t* test was used within groups to compare the initial situation of each parameter with the same parameter at the end of the study after 13 weeks of the intervention both in the probiotic and control groups. A general linear model procedure was applied to absolute values of all parameters measured to compare the before–after differences in the intervention group and the before–after differences in the control group (intra-group) and also determine possible time–treatment interactions between both groups (inter-group). The difference between groups in change over time was considered statistically significant at a value of  $P < 0.05$ .

Statistical analyses of microbiota data assessed by 16S rRNA gene sequencing were performed in R v3.2.3 (<http://cran.r-project.org>). For comparative analysis of microbiota between or within groups, non-parametric Kruskal–Wallis and Mann–Whitney Wilcoxon tests were applied. Time and gender were also used as categorical variables in beta diversity analysis based on the Bray–Curtis dissimilarity index and PERMANOVA analysis was performed with the Qiime suite of analysis [29].

## Results

A total of 60 children were assessed for eligibility. Four children were excluded because they do not meet the strict inclusion criteria or declined participation. Eight children were dropped out of the study because they were non-compliant. Forty-eight children completed the study: 23 (10 females) in the probiotic group and 25 (14 females) in the control group (Fig. 1). No adverse effects were noted.



**Fig. 1** Study flowchart

The mean (standard deviation) of age of control group was 12.56 (2.76) and 12.52 (2.53) in probiotic group; age range was between 10 and 15 years for the two groups. There

were no significant differences in the energy and nutrient intake between the control and probiotic groups either at the beginning or the end of the study (Table 1). Similarly,

**Table 1** Daily energy and nutrients intake before and after the intervention

	Control group (n=25)			Probiotic group (n=23)			<i>P</i> <sup>b</sup>	<i>P</i> <sup>c</sup>
	Baseline	Final	<i>P</i> <sup>a</sup>	Baseline	Final	<i>P</i> <sup>a</sup>		
Energy (kcal)	2798 (486)	2672 (520)	<b>0.019</b>	2887 (455)	2750 (519)	<b>0.021</b>	0.520	0.603
Protein (% TEI)	15.1 (2.0)	15.2 (1.8)	0.696	14.4 (2.2)	16.6 (7.0)	0.157	0.252	0.350
Carbohydrate (% TEI)	43.1 (4.6)	41.4 (4.6)	0.182	44.1 (5.3)	39.3 (7.0)	0.151	0.479	0.201
Fat (% TEI)	39.6 (3.8)	41.4 (4.7)	0.129	39.6 (5.4)	41.2 (5.6)	0.235	0.999	0.904
Protein (g)	106 (24)	101 (21)	0.221	103 (21)	111 (34)	0.336	0.728	0.243
Carbohydrate (g)	301 (61)	278 (67)	<b>0.003</b>	319 (66)	274 (78)	<b>0.004</b>	0.332	0.846
Simple sugar (g)	126 (32)	112 (27)	<b>0.026</b>	144 (34)	109 (34)	<b>0.000</b>	0.075	0.690
Total fiber (g)	21.5 (4.8)	27.1 (5.5)	<b>0.000</b>	21.6 (5.3)	25.1 (7.6)	<b>0.049</b>	0.929	0.302
Soluble fiber (g)	4.6 (1.8)	5.6 (1.5)	<b>0.003</b>	4.7 (1.8)	4.9 (1.7)	<b>0.042</b>	0.756	0.117
Insoluble fiber (g)	8.2 (3.6)	11.4 (3.1)	<b>0.000</b>	8.6 (3.9)	18.0 (3.9)	<b>0.011</b>	0.685	0.334
Fat (g)	123 (24)	123 (26)	0.968	127 (26)	127 (31)	0.964	0.593	0.645
SFA (g)	39.4 (9.2)	38.7 (11.8)	0.717	41.1 (10.7)	43.5 (14.6)	0.338	0.565	0.210
MUFA (g)	57.5 (11.9)	58.2 (11.5)	0.787	59.7 (14.4)	59.1 (13.5)	0.861	0.559	0.787
PUFA (g)	16.2 (4.3)	15.8 (4.6)	0.636	15.2 (3.4)	16.9 (4.9)	0.074	0.343	0.407
Cholesterol (mg)	366 (119)	359 (129)	0.851	367 (110)	361 (121)	0.928	0.994	0.962

Values are expressed as the means (SD)

Statistically significant *P*-values are indicated in bold

*TEI* total energy intake, *SFA* saturated fatty acid, *MUFA* monounsaturated fatty acid, *PUFA* polyunsaturated fatty acid

<sup>a</sup>*P* value between baseline versus final intervention

<sup>b</sup>*P* value between control and probiotic group basal data

<sup>c</sup>*P* value between control and probiotic group final data

**Table 2** Clinical and biochemical parameters before and after the intervention

	Control group ( <i>n</i> = 25)				Probiotic group ( <i>n</i> = 23)				<i>P</i> <sup>b</sup>	
	Baseline		Final		Baseline		Final			
		<i>P</i> <sup>a</sup>	Change		<i>P</i> <sup>a</sup>	Change		<i>P</i> <sup>a</sup>		
<i>z</i> -BMI	4.17 (1.24)	<b>0.001</b>	-0.32 (0.44)	3.85 (1.27)	<b>0.001</b>	-0.32 (0.44)	3.62 (1.12)	<b>0.000</b>	-0.34 (0.38)	0.896
Fat mass (%)	38.2 (6.16)	0.091	-0.94 (2.60)	37.3 (6.09)	0.091	-0.94 (2.60)	35.3 (6.51)	<b>0.021</b>	-1.28 (2.47)	0.669
Weight (kg)	80.0 (13.8)	0.771	0.22 (3.73)	80.2 (13.9)	0.771	0.22 (3.73)	77.9 (15.4)	0.125	0.97 (2.90)	0.447
Waist circumference (cm)	83.2 (7.8)	0.075	0.66 (1.27)	83.9 (8.1)	0.075	0.66 (1.27)	87.3 (10.2)	0.478	-0.30 (2.02)	0.085
MAP (mm Hg)	81.8 (6.95)	0.573	0.85 (7.27)	82.8 (8.08)	0.573	0.85 (7.27)	84.5 (8.42)	0.559	-0.90 (7.27)	0.415
Glucose (mg/dL)	94.4 (4.73)	0.124	-2.20 (6.90)	92.2 (5.40)	0.124	-2.20 (6.90)	94.9 (8.44)	0.864	-0.35 (9.66)	0.446
Insulin (μU/mL)	24.4 (8.21)	0.305	-2.34 (11.2)	22.1 (9.94)	0.305	-2.34 (11.2)	22.8 (8.04)	<b>0.019</b>	-3.86 (7.30)	0.583
HOMA-IR	5.71 (1.97)	0.216	-0.67 (2.62)	5.04 (2.33)	0.216	-0.67 (2.62)	5.40 (2.05)	<b>0.046</b>	-0.93 (2.11)	0.705
Total cholesterol (mg/dL)	155.3 (34.0)	0.710	-1.40 (18.6)	153.9 (31.3)	0.710	-1.40 (18.6)	163.1 (28.3)	0.928	-0.48 (25.1)	0.885
HDL-C (mg/dL)	40.5 (8.28)	0.530	-0.64 (5.02)	39.9 (7.68)	0.530	-0.64 (5.02)	40.4 (7.21)	<b>0.027</b>	2.57 (5.20)	<b>0.035</b>
LDL-C (mg/dL)	94.9 (26.7)	0.872	-0.48 (14.8)	94.4 (25.7)	0.872	-0.48 (14.8)	102.1 (25.5)	0.924	-0.43 (21.7)	0.993
Triglycerides (mg/dL)	98.8 (52.6)	0.838	-1.68 (40.7)	97.2 (36.7)	0.838	-1.68 (40.7)	105.2 (59.5)	0.180	-13.0 (45.2)	0.364
GGT (U/L)	19.8 (9.82)	0.645	0.40 (4.28)	20.2 (11.8)	0.645	0.40 (4.28)	17.5 (5.40)	0.095	-1.26 (3.47)	0.149
ALT (U/L)	28.0 (18.4)	0.229	5.12 (20.7)	33.2 (29.6)	0.229	5.12 (20.7)	25.5 (15.3)	0.690	1.00 (11.9)	0.408
25(OH)D (ng/mL)	24.0 (7.45)	0.579	0.95 (8.23)	24.9 (8.48)	0.579	0.95 (8.23)	25.49 (11.5)	0.539	0.58 (4.07)	0.862
Homocysteine (μmol/L)	7.46 (2.84)	0.161	0.77 (3.88)	8.57 (2.91)	0.161	0.77 (3.88)	7.77 (2.53)	0.108	0.74 (2.12)	0.975
hs-CRP (mg/L)	2.94 (2.79)	0.324	0.62 (3.09)	3.56 (3.92)	0.324	0.62 (3.09)	4.05 (6.86)	<b>0.045</b>	-1.62 (3.65)	<b>0.026</b>
RBP4 (mg/dL)	3.17 (0.71)	<b>0.010</b>	-0.34 (0.62)	2.82 (0.51)	<b>0.010</b>	-0.34 (0.62)	3.52 (1.26)	<b>0.003</b>	-0.50 (0.72)	0.412
Omentin-1 (ng/mL)	155.9 (103.9)	0.772	7.21 (122.9)	163.1 (106.4)	0.772	7.21 (122.9)	166.3 (96.3)	<b>0.001</b>	88.0 (114.7)	<b>0.023</b>
Adiponectin (μg/mL)	13.7 (3.6)	0.676	-0.44 (3.05)	13.8 (3.7)	0.676	-0.44 (3.05)	12.6 (4.1)	0.273	0.22 (1.50)	0.353
Leptin (ng/mL)	34.4 (16.8)	0.985	-0.06 (15.3)	34.3 (16.2)	0.985	-0.06 (15.3)	34.0 (16.7)	0.217	-3.9 (15.0)	0.590
MCPI (pg/mL)	195.5 (134.7)	0.434	233.7 (148.7)	219.2 (110.4)	0.434	233.7 (148.7)	190.7 (71.4)	<b>0.001</b>	-48.8 (61.1)	<b>0.032</b>

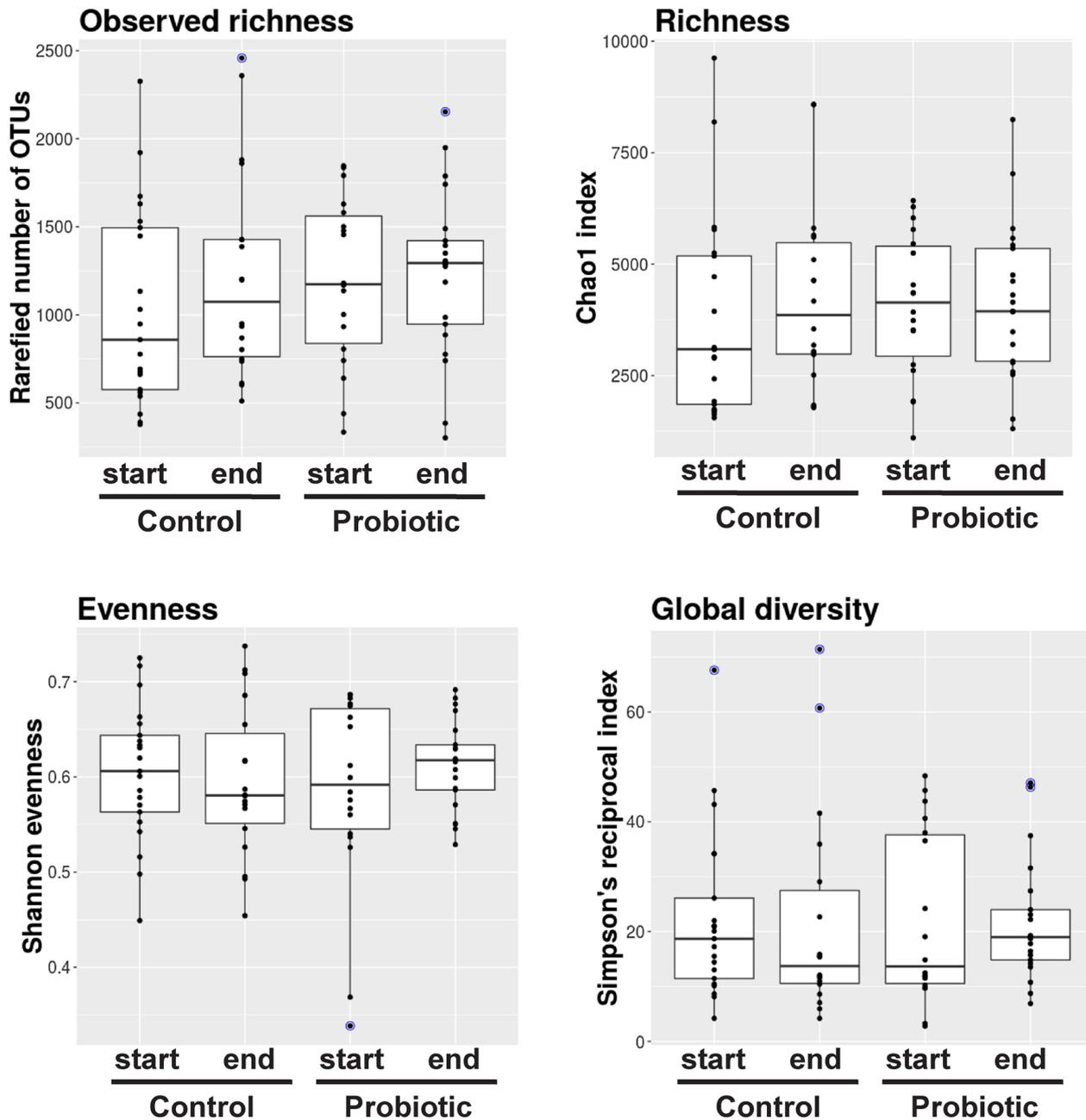
Values are expressed as the means (SD)

Statistically significant *P*-values are indicated in bold

*z*-BMI standard deviation score for body mass index, MAP mean arterial pressure, HOMA-IR homeostasis model assessment of insulin resistance, HDL-C high-density lipoprotein cholesterol, LDL-C low-density lipoprotein cholesterol, GGT gamma-glutamyl transpeptidase, ALT alanine aminotransferase, hs-CRP high-sensitivity C-reactive protein, RBP4 retinol-binding protein 4, MCP-1 monocyte chemoattractant protein-1

<sup>a</sup>*P* value between baseline versus final intervention

<sup>b</sup>*P* value between change in the probiotic group versus change in the control group



**Fig. 2** Changes in the four common ecological descriptors used to assess alpha diversity during the intervention. Distribution of the rarefied number of OTUs (observed richness), Chao's index (richness), Shannon evenness (evenness), and Simpson's reciprocal index (global diversity) are shown in boxplot fashion with boxes disclosing the

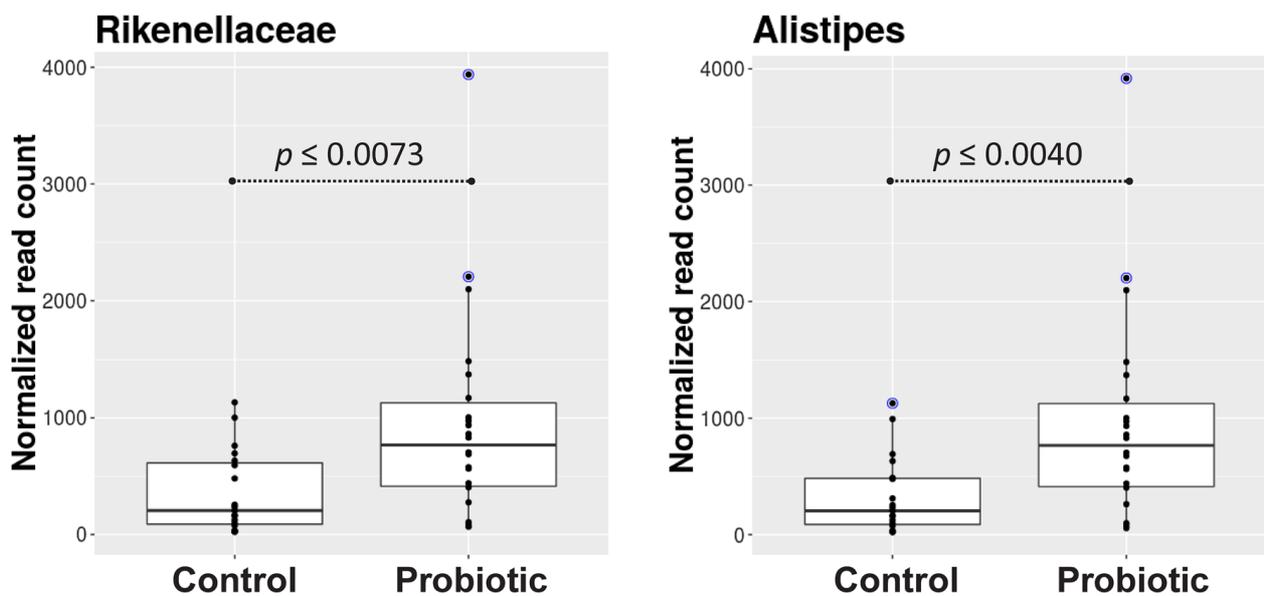
median and boundaries of Q1 and Q3 quartiles, and whiskers ranging from 5th and 95th percentiles. Treatment and time labeling are shown below respective boxplots. Blue data points indicate outliers according to respective distributions

no significant differences were found in baseline clinical and biochemical characteristics when the control and probiotic groups were compared.

### Effect of the intervention on anthropometric and biochemical parameters

Table 2 shows the changes in clinical and biochemical characteristics after the intervention period. In the comparison intragroup, both the control and probiotic groups showed a significant reduction in body weight and RBP4 levels at the

end of the intervention. Fat mass, insulin and homeostasis model assessment of insulin resistance values showed a significant reduction after probiotic treatment. However, these changes did not show a significant difference in the control group. The probiotic group also had significantly lower values of hs-CRP and MCP-1 and higher values of HDL-C and omentin-1 at the end of the intervention period. When we compared the change found in the control group with the change in the probiotic group (between-group comparisons) by a general linear model, statistically significant differences remained between the probiotic and the control groups with



**Fig. 3** Changes in *Rikenellaceae* family and *Alistipes* genus after the intervention with probiotic treatment. Normalized DNA read count distribution at endpoints across all samples grouped into different treatments are shown in a boxplot. Boxes disclose the median and boundaries of Q1 and Q3 quartiles and whiskers range from 5th

and 95th percentiles. Treatments are shown below respective boxplots. Blue data points indicate outliers according to respective distributions. *P* values resulting from comparisons using Mann–Whitney Wilcoxon tests are shown, respectively

respect to the increase of HDL-C and omentin-1 values and the decrease of MCP-1 values found in the probiotic group (Table 2).

### Effect of the intervention on fecal microbiota composition

The intervention with the *B. pseudocatenulatum* CECT 7765 in obese children with insulin resistance did not result in major changes in the number of microbial species of the fecal microbiota. Consequently, differences in the four common ecological descriptors used to assess alpha diversity, including the observed richness, Chao's richness, Shannon's evenness and Simpson's reciprocal index, were not detected when groups and time series were compared (Fig. 2). Global assessment of microbiota profiles through beta diversity analysis did not show significant changes in the microbial community structure associated with the probiotic administration, time or gender. These results indicate that large-scale microbiota changes were not induced by the dietary recommendations alone or the dietary recommendations plus the probiotic supplementation. More detailed analyses were also performed to disclose possible differences in taxonomic categories as a consequence of the administration of *B. pseudocatenulatum* CECT 7765. At baseline, the comparison between the control and probiotic groups did not reveal differences in the microbiota composition. However, after the intervention, the probiotic group showed increases in the abundance of the *Rikenellaceae* family ( $P=0.007$ ) and the *Alistipes* genus ( $P=0.004$ ) (Fig. 3), this being the most

representative genus of this family. The specific dietary recommendations followed by children during the intervention led to a decreased *Streptococcus* spp. abundance ( $P=0.042$ ) as deduced from the comparison of the microbiota composition at baseline and after the intervention in the control group. This effect was not significant in the probiotic group ( $P=0.398$ ). *Bifidobacterium* proportions were not significantly increased as a consequence of the administration of the probiotic when compared to the placebo group and the baseline samples of the probiotic group. This could be due to the sequencing approach used based on short amplicons that only allows an accurate quantification at genus level. We could not disregard that particularly the species *B. pseudocatenulatum* was increased as a result of the probiotic intake. It is also possible that the probiotic exerted part of its effects (for example, anti-inflammatory effects) through interactions between its structural components (cell wall, DNA) and the host, even if the bacterial strain did not survive the gastrointestinal passage completely alive, leading to increased numbers in feces.

### Discussion

This intervention study demonstrates that the intake of *B. pseudocatenulatum* CECT 7765 at a single daily dose of  $1 \times 10^9$ – $10^{10}$  CFU together with dietary counseling for 13 weeks led to a decrease in circulating hs-CRP and MCP-1 and an increase in HDL-C and omentin-1 in obese children with insulin resistance compared to the control group. In

both groups of children, there was a significant decrease in  $z$ -BMI after the intervention, which suggests that body weight changes were related to the dietary advice, while the changes observed between groups in biochemical and inflammatory markers were probably due to the probiotic intake. A link between gut microbiota and obesity and the associated metabolic complications has been suggested, raising interest in developing probiotics whose intake improves the management of co-morbidities associated with obesity. The number of human intervention studies in children and/or adolescents evaluating the effect of probiotics on inflammatory status and cardiovascular biomarkers is, however, very limited. Gøbel et al. conducted a clinical study including 50 adolescents with obesity randomized to *Lactobacillus salivarius* Ls-33 ( $10^{10}$  CFU) or placebo daily for 12 weeks, without detecting any beneficial effect on inflammatory markers or parameters related to metabolic syndrome [30]. Recently, it has been shown that *B. pseudocatenulatum* CECT 7765 improves metabolic and immunological alterations [11, 13, 14], ameliorates neuroendocrine disorders [10], and restores the damaged vascular function in obese mice (animal assays) [12]. To our knowledge, the present study was the first clinical study to evaluate the effects of *B. pseudocatenulatum* CECT 7765 in children.

Diet is a well-recognized factor that modulates gut microbiota; therefore, the same dietary recommendations were done to both groups and dietary intake was assessed at the beginning and at the end of the study to ensure that dietary changes did not differ between groups (Table 1). The dietary intervention significantly reduced  $z$ -BMI and fat mass percentage in all the children. Serum RBP4 levels were also reduced in both groups as a result of the dietary changes. Our results are in accordance with previous studies that described that a low-calorie diet decreases RBP4 concentrations [31]. RBP4 is considered a specific carrier of retinol in the blood and is also an adipokine implicated in the progression of insulin resistance through immunity and inflammatory mechanisms [31]. Elevated levels of RBP4 downregulate the membrane-type glucose transporter 4 in adipocytes and muscle cells, which contributes to the development or worsening of systemic insulin resistance [32], so dietary recommendations given to children can lead to an improvement in the insulin-resistant status mediated in part by the decrease in RBP4.

*Bifidobacterium pseudocatenulatum* CECT 7765 intake increased HDL-C levels, maintaining low-density lipoprotein cholesterol levels stable and thus improving the cardiovascular lipid profile. Recently, it has been shown that some probiotic strains of the genus *Lactobacillus* may exert a lowering effect in low-density lipoprotein cholesterol but no effect was found in HDL-C in adults [33]. In our study, however, we observed a significant increase in HDL-C levels in the probiotic group. Because HDL-C is an effective

biomarker for predicting reduced cardiovascular risk [34], intake of this probiotic may have beneficial effects on cardiovascular risk in obese children. Although the precise mechanism by which our strain (*B. pseudocatenulatum* CECT 7765) increases HDL-C levels in humans remains to be established, a previous mechanistic study in an animal model of diet-induced obesity shows that *B. pseudocatenulatum* CECT 7765 reduced the gene and protein expression of CD36 in the liver. CD36 is a key protein involved in fatty acid uptake and its reduced expression in the liver could explain the lipid-lowering effects of this bacteria in obese mice although specific effects on HDL-C were not investigated in this particular study [14].

Moreover, we observed reduced concentrations of hs-CRP after intervention in the probiotic group compared to the control group. It is well known that hs-CRP is a biomarker of low-grade inflammation and has been proposed as a predictive marker of cardiovascular events [35]. A meta-analysis conducted by Mazidi et al. suggests that probiotic administration may significantly reduce serum hs-CRP [36]. However, only one study included in the meta-analysis was done in obese adolescents (12–15 years old) with *Lactobacillus salivarius* Ls-33. After 12 weeks of supplementation, a reduction in hs-CRP was not detected [30]. In our study, *Bifidobacterium* strain administration led to an improvement in inflammatory status (decrease in hs-CRP and MCP-1, increase in omentin-1 levels) that could prevent future cardiovascular events.

One relevant finding of the study was the significant increase in omentin-1 levels in children supplemented with the probiotic when compared to the control group. Omentin-1 is a recently described anti-inflammatory adipokine that is commonly expressed in the stromal-vascular cells from visceral adipose tissue and is produced in response to inflammatory stimuli. It has been increasingly implicated in the regulation of insulin sensitivity and endothelial function. Omentin-1 levels are lower in obese children with metabolic syndrome compared to non-metabolic syndrome children [37], and previous reports suggest that circulating omentin-1 could be one useful biomarker for evaluating endothelial function in impaired glucose tolerance patients [4, 38]. These results notwithstanding, the present study is the first to show that levels of omentin-1 increased after 13 weeks of dietetic intervention, including the intake of a potential probiotic. The effects could be directly mediated by *B. pseudocatenulatum* CECT 7765 or be secondary to the induced-microbiota changes, although the changes were minor and correlations between modified bacterial groups and omentin-1 were not detected.

Other cardiovascular biomarkers were also modulated by the probiotic administration. Thereafter, serum MCP-1 levels decreased significantly after the intervention period. MCP-1 is a chemokine that plays an important role in the

migration of monocytes into the sub-endothelial space, and it is believed to trigger the early stage of atherosclerotic plaque formation. Since short-chain fatty acids, especially butyrate, produced by gut bacteria have an inhibitory effect on the expression and release of MCP-1 [39], the modulation of the fermentative activity of gut microbiota by *B. pseudocatenulatum* CECT 7765 intake could be a possible mechanism of action that explains the reduction of MCP-1. Regarding the possible mechanism of action of *B. pseudocatenulatum* CECT 7765 on inflammatory markers, in a previous pre-clinical study using a model of diet-induced obesity this strain was demonstrated to restore the gut barrier function (reducing serum endotoxin levels) and reduce the intestinal inflammatory tone, reducing pro-inflammatory cytokine concentrations in the gut (e.g., interleukin-6, MCP-1, TNF- $\alpha$ ) and beyond (serum, adipose tissue and liver) [13]. These could be interrelated mechanisms that theoretically could explain the reduction of some markers of systemic inflammation in the present intervention trial in humans, although markers of intestinal permeability and gut inflammation were not directly assessed to draw more definitive conclusions.

The study also shows that *B. pseudocatenulatum* CECT 7765 administration to obese children significantly increases the proportion of the *Rikenellaceae* family members, particularly of the *Alistipes* genus. *B. pseudocatenulatum* CECT 7765 was also shown to modulate gut microbiota composition in animal studies, although effects on specific bacterial groups are not comparable given the differences in the microbiota between mice and humans [40]. Previous studies indicate that the *Alistipes* genus is associated with a lean phenotype [41], which suggests that *B. pseudocatenulatum* CECT 7765 could favorably modulate the gut ecosystem in obese subjects. In this regard, slight changes in the percentage of fat mass were observed in the probiotic group, accounting for a reduction of ~1.3% during the intervention, whereas in the control group, this was less than 1.0%. Although the difference in fat mass reduction between the two intervention groups was not statistically significant, it cannot be disregarded that the sustained administration of *B. pseudocatenulatum* CECT 7765 in a longer intervention period could have deeper impact on BMI through microbiota-mediated effects.

Our study had the strength of the detailed monitoring of the participants by well-trained nutritionists that ensured the elevated compliance and participation in the follow-up and the rigorous study of fecal microbiota. However, we would like to acknowledge some of the weaknesses of our study, the limited sample size and Caucasian origin of the subjects do not allow us to assert that our results will be extended to the whole population. New similar studies which include a larger sample size and a more heterogeneous population are warranted.

In summary, the beneficial effects of the intervention on immune markers (hs-CRP, omentin-1 and MCP1) and the lipid

profile suggest that *B. pseudocatenulatum* CECT 7765 intake together with dietary counseling can improve the inflammatory status and diminish atherogenic parameters in children with obesity and insulin resistance. These effects were parallel to increases in bacterial groups (*Alistipes* genus) associated with a lean phenotype in previous observational studies. Overall, the findings support the notion that microbiome-based interventions could be adjuvant to dietary recommendations and help improve the management of co-morbidities associated with obesity.

**Acknowledgements** This study was supported by Grant AGL2014-52101-P from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness. The contract of Jesús Sanchis-Jordá was supported by a grant from the Spanish Training University Lecturers Programme (Formación de Profesorado Universitario) from the Spanish Ministry of Education, Culture and Sports (Grant number FPU13/03753). The contracts of Eva M. Gómez del Pulgar and Alfonso Benítez-Páez were supported by the EU Project MyNewGut (no. 613979) from the 7th Framework Program.

**Author contributions** JS-C, PC-F, and JC-L performed the children enrollment, dietary counseling during the study, and statistical analysis of clinical data. EMGP and AB-P accomplished the analysis of gut microbiota. YS and PC-F designed and directed the study.

## Compliance with ethical standards

**Conflict of interest** The authors declare that they have no conflict of interest.

**Ethical approval** The protocol of the study was approved by the Dr. Peset University Hospital ethics committee. All procedures in the study were in complete accordance with the Helsinki declaration and its later amendments.

## References

1. Roth CL, Jain V (2018) Rising obesity in children: a serious public health concern. *Indian J Pediatr* 85:461–462. <https://doi.org/10.1007/s12098-018-2639-7>
2. Aleksandrova K, Mozaffarian D, Pischon T (2018) Addressing the perfect storm: biomarkers in obesity and pathophysiology of cardiometabolic risk. *Clin Chem* 64:142–153. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2017.275172>
3. Reho JJ, Rahmouni K (2017) Oxidative and inflammatory signals in obesity-associated vascular abnormalities. *Clin Sci* 131:1689–1700. <https://doi.org/10.1042/CS20170219>
4. Hernández-Díaz A, Arana-Martínez JC, Carbó R, Espinosa-Cervantes R, Sánchez-Muñoz F (2016) Omentin: role in insulin resistance, inflammation and cardiovascular protection. *Arch Cardiol Mex* 86:233–243. <https://doi.org/10.1016/j.acmx.2015.09.010>
5. Rosenbaum M, Knight R, Leibel RL (2015) The gut microbiota in human energy homeostasis and obesity. *Trends Endocrinol Metab* 26:493–501. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2015.07.002>
6. Garcia-Rios A, Torres-Peña JD, Perez-Jimenez F, Perez-Martinez P (2017) Gut microbiota: a new marker of cardiovascular disease. *Curr Pharm Des* 23:3233–3238. <https://doi.org/10.2174/1381612823666170317144853>

7. Yoo J, Kim S (2016) Probiotics and prebiotics: present status and future perspectives on metabolic disorders. *Nutrients* 8:173. <https://doi.org/10.3390/nu8030173>
8. Tonucci LB, Olbrich dos Santos KM, Licursi de Oliveira L, Rocha Ribeiro SM, Duarte Martino HS (2017) Clinical application of probiotics in type 2 diabetes mellitus: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Clin Nutr* 36:85–92. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2015.11.011>
9. Hendijani F, Akbari V (2018) Probiotic supplementation for management of cardiovascular risk factors in adults with type II diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Clin Nutr* 37:532–541. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2017.02.015>
10. Agustí A, Moya-Pérez A, Campillo I, Montserrat-de la Paz S, Cerrudo V, Perez-Villalba A, Sanz Y (2018) *Bifidobacterium pseudocatenulatum* CECT 7765 ameliorates neuroendocrine alterations associated with an exaggerated stress response and anhedonia in obese mice. *Mol Neurobiol* 55:5337–5352. <https://doi.org/10.1007/s12035-017-0768-z>
11. Cano PG, Santacruz A, Trejo FM, Sanz Y (2013) *Bifidobacterium* CECT 7765 improves metabolic and immunological alterations associated with obesity in high-fat diet-fed mice. *Obesity* 21:2310–2321. <https://doi.org/10.1002/oby.20330>
12. Mauricio MD, Serna E, Fernández-Murga ML, Portero J, Aldasoro M, Valles SL, Sanz Y, Vila JM (2017) *Bifidobacterium pseudocatenulatum* CECT 7765 supplementation restores altered vascular function in an experimental model of obese mice. *Int J Med Sci* 14:444–451. <https://doi.org/10.7150/ijms.18354>
13. Moya-Pérez A, Neef A, Sanz Y (2015) *Bifidobacterium pseudocatenulatum* CECT 7765 reduces obesity-associated inflammation by restoring the lymphocyte-macrophage balance and gut microbiota structure in high-fat diet-fed mice. *PLoS One* 10:e0126976. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126976>
14. Moya-Pérez A, Romo-Vaquero M, Tomás-Barberán F, Sanz Y, García-Conesa M-T (2014) Hepatic molecular responses to *Bifidobacterium pseudocatenulatum* CECT 7765 in a mouse model of diet-induced obesity. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 24:57–64. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2013.04.011>
15. Kazama K, Usui T, Okada M, Hara Y, Yamawaki H (2012) Omentin plays an anti-inflammatory role through inhibition of TNF- $\alpha$ -induced superoxide production in vascular smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol* 686:116–123. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2012.04.033>
16. Shibata R, Ouchi N, Ohashi K, Murohara T (2017) The role of adipokines in cardiovascular disease. *J Cardiol* 70:329–334. <https://doi.org/10.1016/j.jjcc.2017.02.006>
17. Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE (2009) Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *J Interferon Cytokine Res* 29:313–326. <https://doi.org/10.1089/jir.2008.0027>
18. Bruun JM, Lihn AS, Pedersen SB, Richelsen B (2005) Monocyte chemoattractant protein-1 release is higher in visceral than subcutaneous human adipose tissue (AT): implication of macrophages resident in the AT. *J Clin Endocrinol Metab* 90:2282–2289. <https://doi.org/10.1210/jc.2004-1696>
19. García Cuartero B, García Lacalle C, Jiménez Lobo C, González Vergaz A, Calvo Rey C, Alcázar Villar MJ, Díaz Martínez E (2007) The HOMA and QUICKI indexes, and insulin and C-peptide levels in healthy children. Cut off points to identify metabolic syndrome in healthy children. *An Pediatr (Barc)* 66:481–490. <https://doi.org/10.1157/13102513>
20. Keskin M, Kurtoglu S, Kendirci M, Atabek ME, Yazici C (2005) Homeostasis model assessment is more reliable than the fasting glucose/insulin ratio and quantitative insulin sensitivity check index for assessing insulin resistance among obese children and adolescents. *Pediatrics* 115:e500–e503. <https://doi.org/10.1542/peds.2004-1921>
21. de Onis M, Onyango AW, Borghi E, Siyam A, Nishida C, Siekmann J (2007) Development of a WHO growth reference for school-aged children and adolescents. *Bull World Health Organ* 85:660–667. <https://doi.org/10.2471/BLT.07.043497>
22. Mendonça RD, Pimenta AM, Gea A, de la Fuente-Arrillaga C, Martínez-González MA, Lopes AC, Bes-Rastrollo M (2016) Ultraprocessed food consumption and risk of overweight and obesity: the University of Navarra Follow-Up (SUN) cohort study. *Am J Clin Nutr* 104:1433–1440. <https://doi.org/10.3945/ajcn.116.135004>
23. Klindworth A, Pruesse E, Schweer T, Peplies J, Quast C, Horn M, Glöckner FO (2013) Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res* 41:e1. <https://doi.org/10.1093/nar/gks808>
24. Magoc T, Salzberg SL (2011) FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics* 27:2957–2963. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr507>
25. Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister EB, Lesniewski RA, Oakley BB, Parks DH, Robinson CJ, Sahl JW, Stres B, Thallinger GG, Van Horn DJ, Weber CF (2009) Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol* 75:7537–7541. <https://doi.org/10.1128/AEM.01541-09>
26. Edgar RC, Haas BJ, Clemente JC, Quince C, Knight R (2011) UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics* 27:2194–2200. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr381>
27. Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, Peplies J, Glöckner FO (2012) The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res* 41:D590–D596. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1219>
28. Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, Cole JR (2007) Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl Environ Microbiol* 73:5261–5267. <https://doi.org/10.1128/AEM.00062-07>
29. Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, Fierer N, Peña AG, Goodrich JK, Gordon JI, Huttley GA, Kelley ST, Knights D, Koenig JE, Ley RE, Lozupone CA, McDonald D, Muegge BD, Pirrung M, Reeder J, Sevinsky JR, Turnbaugh PJ, Walters WA, Widmann J, Yatsunenko T, Zaneveld J, Knight R (2010) QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods* 7:335–336. <https://doi.org/10.1038/nmeth.f.303>
30. Gøbel RJ, Larsen N, Jakobsen M, Mølgaard C, Michaelsen KF (2012) Probiotics to adolescents with obesity. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 55:673–678. <https://doi.org/10.1097/MPG.0b013e318263066c>
31. Zabetian-Targhi F, Mahmoudi MJ, Rezaei N, Mahmoudi M (2015) Retinol binding protein 4 in relation to diet, inflammation, immunity, and cardiovascular diseases. *Adv Nutr* 6:748–762. <https://doi.org/10.3945/an.115.008292>
32. Yang Q, Graham TE, Mody N, Preitner F, Peroni OD, Zabolotny JM, Kotani K, Quadro L, Kahn BB (2005) Serum retinol binding protein 4 contributes to insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. *Nature* 436:356–362. <https://doi.org/10.1038/nature03711>
33. Thushara RM, Gangadaran S, Solati Z, Moghadasian MH (2016) Cardiovascular benefits of probiotics: a review of experimental and clinical studies. *Food Funct* 7:632–642. <https://doi.org/10.1039/C5FO01190F>
34. Rader DJ, Hovingh GK (2014) HDL and cardiovascular disease. *Lancet* 384:618–625. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)61217-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61217-4)

35. Dali-Youcef N, Mecili M, Ricci R, Andrès E (2013) Metabolic inflammation: connecting obesity and insulin resistance. *Ann Med* 45:242–253. <https://doi.org/10.3109/07853890.2012.705015>
36. Mazidi M, Rezaie P, Ferns GA, Vatanparast H (2017) Impact of probiotic administration on serum C-reactive protein concentrations: systematic review and meta-analysis of randomized control trials. *Nutrients* 9:20. <https://doi.org/10.3390/nu9010020>
37. Buyukinan M, Atar M, Can U, Pirgon O, Guzelant A, Deniz I (2018) The association between serum vaspin and omentin-1 levels in obese children with metabolic syndrome. *Metab Syndr Relat Disord* 16:76–81. <https://doi.org/10.1089/met.2017.0133>
38. Moreno-Navarrete JM, Ortega F, Castro A, Sabater M, Ricart W, Fernández-Real JM (2011) Circulating omentin as a novel biomarker of endothelial dysfunction. *Obesity* 19:1552–1559. <https://doi.org/10.1038/oby.2010.351>
39. Cox MA, Jackson J, Stanton M, Rojas-Triana A, Bober L, Lavery M, Yang X, Zhu F, Liu J, Wang S, Monsma F, Vassileva G, Maguire M, Gustafson E, Bayne M, Chou CC, Lundell D, Jenh CH (2009) Short-chain fatty acids act as antiinflammatory mediators by regulating prostaglandin E(2) and cytokines. *World J Gastroenterol* 15:5549–5557. <https://doi.org/10.3748/wjg.15.5549>
40. Moya-Pérez A, Perez-Villalba A, Benítez-Páez A, Campillo I, Sanz Y (2017) Bifidobacterium CECT 7765 modulates early stress-induced immune, neuroendocrine and behavioral alterations in mice. *Brain Behav Immun* 65:43–56. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2017.05.011>
41. Aguirre M, Bussolo de Souza C, Venema K (2016) The gut microbiota from lean and obese subjects contribute differently to the fermentation of arabinogalactan and inulin. *PLoS One* 11:e0159236. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159236>