

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 954 147**

51 Int. Cl.:

A61K 35/74 (2015.01)

A61P 25/00 (2006.01)

A61P 25/20 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.04.2017** **PCT/US2017/027827**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.10.2017** **WO17181158**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.04.2017** **E 17783343 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.06.2023** **EP 3442547**

54 Título: **Lactobacillus reuteri mm4-1a para usar en el tratamiento o la prevención de trastornos del espectro autista**

30 Prioridad:

15.04.2016 US 201662322946 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.11.2023

73 Titular/es:

BAYLOR COLLEGE OF MEDICINE (100.0%)
One Baylor Plaza
Houston, TX 77030-3411, US

72 Inventor/es:

COSTA-MATTIOLI, MAURO y
BUFFINGTON, SHELLY ALEXANDRA

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 954 147 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Lactobacillus reuteri mm4-1a para usar en el tratamiento o la prevención de trastornos del espectro autista

5 **Campo técnico**

La divulgación se refiere al menos a los campos de biología celular, biología molecular, bioquímica, neurología, conducta, gastroenterología y medicina.

10 **Antecedentes**

Hallazgos recientes indican que la exposición intrauterina a la obesidad materna repercute negativamente en la organización y maduración de los circuitos neuronales necesarios para el desarrollo de la salud mental del niño. De hecho, la obesidad materna y/o las dietas maternas poco saludables aumentan significativamente el riesgo de trastornos del neurodesarrollo, incluyendo el Trastorno del Espectro Autista (TEA) en niños (Bolton y Bilbo, 2014; Connolly *et al.*, 2016; Krakowiak *et al.*, 2012; Sullivan *et al.*, 2014). Dado el aumento concomitante de la prevalencia tanto de la obesidad (Skinner y Skelton, 2014) como del TEA (Zablotsky *et al.*, 2015), resulta útil comprender la relación entre ambos.

La cantidad y el tipo de macronutrientes de la dieta influyen mucho en la microbiota intestinal (Tremaroli y Backhed, 2012), que consiste en una vasta comunidad bacteriana que reside en la parte inferior del intestino y vive en una relación simbiótica con el hospedador. Por lo tanto, la obesidad materna se asocia con alteraciones en el microbioma intestinal de las crías tanto en primates humanos como no humanos (Galley *et al.*, 2014; Ma *et al.*, 2014). Además, los individuos con TEA suelen presentar conjuntamente trastornos de la conducta, problemas gastrointestinales y disbiosis de la microbiota intestinal (Kohane *et al.*, 2012; Mayer *et al.*, 2014; Parracho *et al.*, 2005). Dada la gran cantidad de bibliografía preclínica que apoya la noción de que un sistema de comunicación bidireccional entre el intestino y el cerebro, conocido como eje intestino-cerebro, vincula las actividades intestinales y cerebrales (Cryan y Dinan, 2012; Mayer *et al.*, 2015), se ha especulado que los cambios en el microbioma intestinal pueden dar lugar al TEA y a trastornos neuroconductuales relacionados (Mayer *et al.*, 2014). Sin embargo, aún se desconoce cómo los cambios en las bacterias que habitan en nuestro intestino podrían influir en el desarrollo y la función del cerebro en el TEA.

La presente divulgación satisface una necesidad largamente percibida en la técnica de el tratamiento de trastornos neurológicos y neuroconductuales.

El documento US 2014/363410 se refiere al uso de *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 para fomentar el establecimiento de una función cognitiva sana y normal en mamíferos jóvenes.

Breve resumen

La invención se define mediante las reivindicaciones. En particular, la invención proporciona una formulación que comprende *Lactobacillus reuteri* MM4-1A (ATCC-PTA-6475) y/o un extracto o fracción bioactiva del mismo para usar en un método de tratamiento o prevención de una o más deficiencias en la conducta social en un individuo con trastorno del espectro autista, que comprende las etapas de proporcionar al individuo y/o a la madre durante la gestación del individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de la formulación.

En el presente documento se divulgan métodos y composiciones para el tratamiento y/o la prevención de una afección médica en la que al menos un síntoma es una deficiencia en la conducta social o en donde la afección es un trastorno del neurodesarrollo, psiquiátrico y neurodegenerativo. Aunque cualquier afección médica que presente una deficiencia en la conducta social está englobada por la divulgación, en aspectos específicos, la afección médica es un trastorno del desarrollo, incluyendo un trastorno del neurodesarrollo.

El individuo puede tener una conducta social deteriorada de cualquier tipo. En la invención, el trastorno del neurodesarrollo es el trastorno del espectro autista (TEA), ya sea causado por factores ambientales (dieta, infección por patógenos, exposición a toxinas, pesticidas, etc.) o genéticos (mutaciones en genes asociados al TEA y a otros trastornos neurológicos), la edad paterna/materna y la prematuridad, o cualquier combinación de estos factores. En realizaciones específicas, el individuo es hijo de una madre obesa, con sobrepeso y/o que sigue una dieta rica en grasas, sufre una activación inmunológica durante el embarazo, aunque en algunos casos el individuo nació de una madre que no era obesa, sin sobrepeso y/o que no seguía una dieta rica en grasas. En otros casos, el individuo (madre o progenitor) es portador de mutaciones asociadas a trastornos del neurodesarrollo. En otros casos, la madre o el individuo presentan una microbiota intestinal alterada o muestran una alteración en los niveles de oxitocina.

En aspectos particulares, un individuo que necesita tratamiento y/o prevención de una deficiencia en la conducta social, del neurodesarrollo, trastornos psiquiátricos y neurodegenerativos de cualquier causa recibe una cantidad eficaz de una o más especies de bacterias para tratar y/o prevenir una o más deficiencias de la conducta social. En algunos aspectos, el tratamiento consigue mejorar la deficiencia en la conducta social y, en aspectos específicos, consigue mejorar la deficiencia en la conducta social hasta situarla dentro de un espectro normal.

Ciertos aspectos de la divulgación proporcionan la modificación del microbioma intestinal de un individuo para mejorar una o más deficiencias en la conducta social, el neurodesarrollo y/o trastornos psiquiátricos en el individuo. Otros aspectos de la divulgación proporcionan la modificación del microbioma intestinal de un individuo para mejorar un trastorno del neurodesarrollo en un individuo. En casos específicos, se altera el nivel de al menos un microbio del microbioma intestinal para mejorar una o más deficiencias de la conducta social. En algunos casos, el individuo puede ser hijo o no de una madre obesa, con sobrepeso y/o que seguía una dieta rica en grasas. En aspectos específicos, la bacteria es del género *Lactobacillus*. En otros aspectos, el individuo es portador de una mutación o mutaciones asociadas a trastornos del neurodesarrollo. En aspectos particulares, la especie de *Lactobacillus* es *L. reuteri*, y el *L. reuteri* puede suministrarse como una sola especie o como una de múltiples especies de bacterias no patógenas. En la invención, la especie de *Lactobacillus* es *L. reuteri* MM4-1A (ATCC-PTA-6475). El individuo cuya madre o padre es obeso, con sobrepeso y/o que sigue una dieta rica en grasas, o un individuo portador de mutaciones asociadas a trastornos del neurodesarrollo, puede recibir una cantidad eficaz de *L. reuteri* antes y/o después de nacer. En algunos casos, una hembra embarazada puede recibir una cantidad eficaz de *L. reuteri*, a saber, *L. reuteri* MM4-1A (ATCC-PTA-6475), y en dichos casos, su crías pueden recibir una cantidad eficaz de *L. reuteri* MM4-1A (ATCC-PTA-6475) antes y/o después de nacer. Un feto puede tener una mejora del microbioma intestinal al recibir una o más bacterias de la madre, por ejemplo, a través de la placenta y/o de la circulación sanguínea.

Las realizaciones de la divulgación prevén que la reconstitución específica del microbioma invierte las deficiencias sinápticas inducidas por la dieta materna además o alternativamente a las deficiencias de la conducta social en las crías. Puede tratarse de un parto único o de un parto múltiple. El individuo puede ser de cualquier raza o género, y la madre puede tener cualquier edad, raza o género.

En una realización se proporciona una formulación que comprende *Lactobacillus reuteri* MM4-1A (ATCC-PTA-6475) para usar en un método de tratamiento o prevención de una o más deficiencias en la conducta social en un individuo con trastorno del espectro autista, que comprende las etapas de proporcionar al individuo y/o a la madre durante la gestación del individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de la formulación. En una realización específica, al proporcionar la formulación al individuo, la madre del individuo era obesa, con sobrepeso y/o con una dieta rica en grasas durante el embarazo del individuo. En algunas realizaciones, se proporciona una formulación a la madre durante la gestación del individuo. En realizaciones específicas, la deficiencia en la conducta social comprende una sociabilidad deteriorada, preferencia por la novedad social, dificultad en el uso social de la comunicación verbal y no verbal, o una combinación de las mismas. El individuo tiene un trastorno del espectro autista. En algunas realizaciones de la invención, el método comprende además la etapa de identificar que la madre es o era obesa, con sobrepeso y/o con una dieta rica en grasas durante el embarazo del individuo, y en donde la formulación se administra al individuo o a la madre intencionadamente para tratar o prevenir la deficiencia en la conducta social en el individuo. En casos específicos, el individuo que ha nacido o está siendo gestado por una madre que es o era obesa, con sobrepeso y/o con una dieta rica en grasas puede ser reconocido específicamente como necesitado de tratamiento con *Lactobacillus*, tal como *L. reuteri*. En ciertos aspectos, se administra a la madre y/o al niño *Lactobacillus* para el tratamiento, pero el *Lactobacillus* no es *L. acidophilus* en forma de yogur.

Cualquier formulación para usar en la invención puede comprender una especie bacteriana adicional o una levadura.

También se describe en el presente documento el tratamiento o la prevención de uno o más trastornos en los que el sistema oxitocinérgico es disfuncional. También se describe en el presente documento la prevención o el tratamiento de una o más afecciones en las que el sistema dopaminérgico y de recompensa están suplantados o son disfuncionales.

Breve descripción de los dibujos

FIGS. 1A-1J: Deficiencias sociales y disbiosis de la microbiota intestinal en crías MHFD. **FIG. 1A**, Esquema del régimen alimentario materno y de crianza. **FIG. 1B**, Esquema de la tarea de interacción social recíproca. **FIGS. 1C-1D**, Las crías MHFD mostraron una interacción recíproca reducida (1C, $P < 0,0001$, $t = 7,90$; D, $P < 0,001$, $t = 5,89$). **FIG. 1E**, Esquema de la tarea de interacción social de tres cámaras. **FIGS. 1F-1G**, En el ensayo de sociabilidad, las crías MRD pasaron más tiempo interactuando con un ratón que con una jaula de hilo metálico vacía (**FIG. 1F**, $P < 0,0001$, $t = 8,817$), mientras que las crías MHFD no mostraron ninguna preferencia por el ratón (**FIG. 1F**, $P = 0,48$, $t = 1,19$; Efecto de la dieta materna $F_{1,52} = 6,08$, $P < 0,05$). En la prueba de novedad social, a diferencia de las crías MRD (**FIG. 1G**, $P < 0,0001$, $t = 6,68$), las crías MHFD no tenían preferencia por interactuar con un ratón nuevo frente a uno conocido (**FIG. 1G**, $P = 0,086$, $t = 2,08$; Efecto de la dieta materna $F_{1,52} = 34,96$, $P < 0,0001$). **FIGS. 1H-1I**, Actividad exploratoria representativa de las crías MRD (**FIG. 1H**) y MHFD (**FIG. 1I**) en la prueba de tres cámaras. **FIG. 1J**, Los análisis de coordenadas principales (PCoA) de las distancias UniFrac no ponderadas del conjunto de datos promediado de rarefacciones del gen del ARNr 16S ($n = 1000$ rarefacciones; 7617 lecturas/muestra) mostraron que las muestras MRD se agrupaban por separado de las muestras MHFD ($P < 0,001$, $P_2 = 0,37$). Los gráficos muestran la media $\pm$ EEM. Véanse también las FIGS. 8A-8G - 11A-11B.

FIGS. 2A-2G: El alojamiento conjunto de crías MHFD con MRD recupera tanto la disfunción social como el perfil filogenético de la microbiota de los ratones MHFD. **FIG. 2A**, Esquema del experimento de alojamiento

conjunto. **FIG. 2B**, Las crías MRD y MHFD fueron destetadas en una de las tres composiciones de jaulas. **FIGS. 2C-2G**, Tiempo de interacción social (**FIG. 2C**, MRD frente a MHFD $P < 0,001$, $t = 9,30$; MRD frente a MHFD alojados conjuntamente $P > 0,99$, $t = 0,31$; MHFD frente a MHFD alojados conjuntamente $P < 0,001$, $t = 7,99$; $P < 0,0001$, $F_{3,8} = 30,51$) y la duración del contacto (**FIG. 2D**, MRD frente a MHFD $P < 0,05$, $t = 4,13$; MRD frente a MHFD alojados conjuntamente $P > 0,99$, $t = 0,46$; MHFD frente a MHFD alojados conjuntamente $P < 0,05$, $t = 4,59$; $P < 0,001$, $F_{3,8} = 9,01$) en la prueba de interacción recíproca; tiempos de interacción social en la sociabilidad (**FIG. 2E**, MRD $P < 0,001$, $t = 4,36$; MHFD $P > 0,99$, $t = 0,078$; MRD alojados conjuntamente $P < 0,0001$, $t = 6,33$; MHFD alojados conjuntamente $P < 0,001$, $t = 4,78$; Efecto de dieta materna/alojamiento/interacción $F_{3,32} = 6,13$, $P < 0,01$) y pruebas de novedad social (**FIG. 2F**, MRD $P < 0,0001$, $t = 5,12$; MHFD $P > 0,99$, $t = 0,60$; MRD alojados conjuntamente $P < 0,001$, $t = 4,20$; MHFD alojados conjuntamente $P < 0,001$, $t = 4,76$; Los efectos de dieta materna/alojamiento/interacción $F_{3,32} = 4,37$, $P < 0,01$), así como la agrupación filogenética basada en UniFrac (**FIG. 2G**, $P < 0,001$, $P_2 = 0,552$; $n = 1000$ rarefacciones; 3390 lecturas/muestra), se restablecen, todos, en las crías MHFD alojadas conjuntamente con ratones MRD. Los gráficos muestran la media $\pm$ EEM. Véanse también las FIGS. 12A-12D y las FIGS. 13A-13G.

FIGS. 3A-3L: Microbiota fecal de MRD, pero no de MHFD, las crías mejoran la conducta social del receptor aséptico (GF). **FIGS. 3A-3D**, Los ratones GF muestran una interacción social recíproca reducida (**FIG. 3A**, $P < 0,0001$, $t = 22,73$; **FIG. 3B**, $P < 0,001$, $t = 11,31$) y deficiencias de sociabilidad (**FIG. 3C**, Control $P < 0,0001$, $t = 5,30$, GF $P > 0,99$, $t = 0,39$; Efecto principal del grupo $F_{1,24} = 21,98$, $P < 0,0001$) y preferencia por la novedad social (**FIG. 3D**, Control $P < 0,01$, $t = 3,64$, GF $P = 0,39$, $t = 1,33$; Efecto principal del grupo $F_{1,24} = 5,29$, $P < 0,05$). Esquema del trasplante de microbiota fecal (FMT) a las cuatro (**FIG. 3E**) y ocho semanas de edad (**FIG. 3F**). **FIGS. 3G-3H**, El FMT en las crías MRD, pero no MHFD, en el destete restableció tanto la sociabilidad GF (**FIG. 3G**, GFMRDCol $P < 0,0001$, $t = 6,66$; GFMHFD-Col $P = 0,35$, $t = 1,40$; Efecto donante $F_{1,28} = 32,44$, $P < 0,0001$) y la preferencia por la novedad social (**FIG. 3H**, GFMRDCol $P < 0,01$, $t = 3,60$; GFMHFDCol $P = 0,81$, $t = 0,84$; Efecto donante $F_{1,28} = 9,86$, $P < 0,01$). **FIGS. 3I-3J**, A las ocho semanas, el FMT de donantes MRD o MHFD no consiguió mejorar la sociabilidad (**FIG. 3I**, GFMRDCol $P = 0,51$, $t = 1,20$; GFMHFDCol $P = 0,28$, $t = 1,58$; Efecto donante $F_{1,12} = 0,07$, $P = 0,79$) ni la preferencia por la novedad social en los ratones GF (**FIG. 3J**, GFMRDCol $P = 0,48$, $t = 1,23$; GFMHFDCol $P > 0,99$, $t = 0,043$; Efecto donante $F_{1,12} = 0,71$, $P = 0,42$). **FIGS. 3K-3L**, PCoA de las distancias UniFrac no ponderadas basadas en el conjunto de datos de secuenciación del gen del ARNr 16S de receptores GF de heces de donantes MRD o MHFD en cuatro (3K, $P = 0,001$, $P_2 = 0,83$; $n = 1000$ rarefacciones; 4628 lecturas/muestra) u ocho (3L, $P < 0,001$, $R_2 = 0,77$; $n = 1000$ rarefacciones; 4805 lecturas/muestra) semanas de edad. Los gráficos muestran la media $\pm$ EEM. Véanse también las FIGS. 14A-14H y 15A-15F.

FIGS. 4A-4P: El tratamiento selectivo con *Lactobacillus (L.) reuteri* restablece las deficiencias sociales y los niveles de oxitocina en crías MHFD. **FIG. 4A**, Esquema del tratamiento con *L. reuteri*. **FIGS. 4B, 4C**, A diferencia de los medios de resuspensión (**FIG. 4B**, $P > 0,99$, $t = 1,03$; c, $P > 0,99$, $t = 0,40$) o *L. reuteri* termoinactivada (**FIG. 4B**, $P > 0,99$, $t = 1,35$; c, $P > 0,99$, $t = 0,21$), la administración de *L. reuteri* viva en el agua de bebida recuperó la sociabilidad (**FIG. 4B**, $P < 0,0001$, $t = 5,98$) y la preferencia por la novedad social (**FIG. 4C**, $P < 0,001$, $t = 5,01$) en las crías MHFD (**FIG. 4B**, Efecto del tratamiento $F_{1,86} = 87,53$, $P < 0,0001$; **FIG. 4C**, Efecto del tratamiento $F_{1,86} = 30,24$, $P < 0,0001$). **FIGS. 4D-4E**, Gráficas de seguimiento representativas que muestran la actividad exploratoria. **FIG. 4F**, Imágenes representativas de la inmunorreactividad de la oxitocina de control en diferentes niveles anteroposteriores del PVN. **FIGS. 4G-4J**, Inmunorreactividad de la oxitocina en los PVN de crías MRD (**FIG. 4G**), MHFD (**FIG. 4H**), MHFD tratadas con *L. reuteri* termoinactivada (**FIG. 4I**) y MHFD tratadas con *L. reuteri* viva (**FIG. 4J**). **FIGS. 4K-4N**, El número de células inmunorreactivas a la oxitocina (**FIG. 4K**, $P < 0,01$, $t = 4,76$) y la intensidad de inmunofluorescencia de la oxitocina (**FIG. 4L**, $P < 0,01$, $t = 3,80$) se redujeron en los PVN de los ratones MHFD frente a los MRD. En los PVN de las crías MRD y MHFD, la inmunorreactividad del número de células NeuN (**FIG. 4M**, $P = 0,34$, $t = 1,09$) y la intensidad de la inmunofluorescencia (**FIG. 4N**, $P = 0,79$, $t = 0,28$) fueron similares. **FIGS. 4O-4P**, En relación con el tratamiento con *L. reuteri* termoinactivada, el tratamiento con *L. reuteri* viva aumentó significativamente el número de células positivas en oxitocina (**FIG. 4O**, $P < 0,05$, $t = 2,93$) y la intensidad de inmunofluorescencia de la oxitocina (**FIG. 4P**, $P < 0,05$, $t = 3,09$) en los PVN de las crías MHFD. UA: unidades arbitrarias. Los gráficos muestran la media $\pm$ EEM. Véanse también las FIGS. 16A-16C y las FIGS. 19A-19F.

FIGS. 5A-5L: La interacción social recíproca y la LTP inducida por la interacción social en las neuronas DA del VTA de crías MHFD son restablecidas por *L. reuteri*. **FIG. 5A**, Esquema del diseño experimental. **FIGS. 5B-5E**, Únicamente la interacción con un ratón desconocido indujo una LTP en las neuronas DA del VTA de MRD, tal y como determina el aumento de las relaciones AMPAR/NMDAR (**FIGS. 5B, 5D**, Situación inicial frente a Familiar $P > 0,99$, $t = 0,12$, Situación inicial frente a desconocido $P < 0,01$, $t = 3,79$; Familiar frente a desconocido $P < 0,05$, $t = 3,03$; $5F = 8,03$, $P < 0,01$). En las crías MHFD, ni la interacción recíproca con un desconocido ni con un familiar provocaron una LTP en las neuronas DA del VTA (**FIGS. 5C, 5E**, Situación inicial frente a familiar $P > 0,99$, $t = 0,035$, Situación inicial frente a desconocido $P = 0,64$, $t = 1,30$; Familiar frente a desconocido $P = 0,50$, $t = 1,45$; $F_{2,15} = 1,47$, $P = 0,26$). **FIGS. 5F-5G**, Mientras que los ratones MRD pasaron más tiempo interactuando con un ratón desconocido que con un familiar (familiar frente a desconocido; **FIG. 5F**, $P < 0,001$, $t = 4,88$; **FIG. 5G**, $P < 0,0001$, $t = 5,87$), los ratones MHFD no lo hicieron (familiar frente a desconocido; **FIG. 5F**, $P = 0,47$, $t = 1,87$; **FIG. 5G**, $P = 0,40$, $t = 1,96$) (**FIG. 5F**, $F_{3,19} = 13,8$, $P < 0,0001$; **FIG. 5G**, $F_{3,19} = 18,54$, $P < 0,0001$). **FIGS. 5H-5K**, La *L. reuteri* viva (**FIGS. 5H, 5J**, $P < 0,01$, $t = 4,95$), pero no termoinactivada (**FIGS. 5I, 5K**, $P = 0,84$, $t = 0,20$), restableció la LTP provocada por interacciones extrañas en el VTA de las crías MHFD. **FIG. 5L**, A diferencia de la *L. reuteri* termoinactivada (MHFD frente a MHFD+Hk-LrP $P > 0,99$, $t = 0,099$), la *L. reuteri* viva restableció la interacción social recíproca (MHFD frente a

MHFD+LrP<0,05, $t=3,24$; $F_{2,9}=6,45$, $P<0,05$). Los gráficos muestran la media $\pm$ EEM. Véanse también las FIGS. 20A-20C - FIGS. 22A-22D.

FIGS. 6A-6F: La oxitocina restablece la plasticidad del VTA inducida por la interacción social y las deficiencias en la conducta social en las crías MHFD. **FIGS. 6A-6B**, La administración intranasal de oxitocina recuperó la LTP en el VTA de las crías MHFD (**FIG. 6B**, MHFD+OXT Sola frente a MHFD+OXT Desconocido $P<0,01$, $t=3,66$; MH-FD+Vehículo Desconocido frente a MHFD+OXT Desconocido $P<0,05$, $t=2,86$; $F_{2,15}=7,97$, $P<0,01$). **FIGS. 6C-6F**, La oxitocina también restableció la interacción social recíproca (**FIG. 6C**, MHFD frente a MHFD+Vehículo $P=0,55$, $t=1,46$; MHFD frente a MHFD+OXT $P<0,05$, $t=3,62$; MHFD+Vehículo frente a MHFD+OXT $P<0,01$, $t=4,81$; $F_{2,8}=12,82$, $P<0,01$; **FIG. 6D**, MHFD frente a MHFD+Vehículo $P>0,99$, $t=0,16$; MHFD frente a MHFD+OXT $P<0,05$, $t=4,075$; MHFD+Vehículo frente a MHFD+OXT $P<0,05$, $t=3,94$; $F_{2,8}=10,97$, $P<0,01$), sociabilidad (**FIG. 6E**, MHFD+Vehículo $P>0,99$, $t=0,44$; MHFD+Oxitocina $P=0,24$, $t=1,74$; Efecto del tratamiento $F_{1,8}=2,37$, $P=0,16$) y preferencia por la novedad social en las crías MHFD (**FIG. 6F**, MHFD+Vehículo $P=0,65$, $t=1,05$; MHFD+Oxitocina $P<0,05$, $t=3,54$; Efecto del tratamiento $F_{1,8}=10,54$, $P<0,05$). Los gráficos muestran la media $\pm$ EEM. Véanse también las figuras 22A-22D.

FIG. 7: Especies cuya abundancia está reducida en la microbiota intestinal de las crías MHFD.

FIGS. 8A-8G: Una dieta rica en grasas aumenta el peso de las madres pero no el de las crías, en relación con las FIGS. 1A-1J. **FIGS. 8A-8B**, Los ratones hembra alimentados con una dieta rica en grasas (HFD) mostraron un aumento de peso $>25\%$ en comparación con las hembras alimentadas con una dieta normal (RD) tras 8 semanas de dieta (**FIG. 8A**, $P<0,05$, $t=2,42$; **FIG. 8B**, $P<0,01$, $t=3,90$). **FIG. 8C**, Las hembras alimentadas con HFD mostraron un aumento de la masa grasa en relación con las madres alimentadas con RD (**FIG. 8C**, $P<0,0001$, $t=5,80$). **FIGS. 8D-8E**, En comparación con las hembras alimentadas con RD, el tamaño de camada de las alimentadas con HFD disminuyó (**FIG. 8D**, $P<0,01$, $t=3,18$) y el tiempo hasta la primera camada aumentó (**FIG. 8E**, $P<0,05$, $t=2,26$). **FIGS. 8F-8G**, El peso de las crías no difirió entre las cohortes de la dieta materna ni a las siete-ocho (**FIG. 8F**, $P=0,12$, $t=1,63$) ni a las once-doce semanas de edad (**FIG. 8G**, $P=0,10$, $t=1,80$), el intervalo de edad durante el que se realizaron las pruebas de conducta. Los gráficos muestran la media $\pm$ EEM.

FIGS. 9A-9D: Comportamientos sociales deteriorados en las crías MHFD, en relación con las Figuras 1A-1J. **FIGS. 9A-9B**, Las crías MHFD mostraron un número de contactos reducido (**FIG. 9A**, $P<0,001$, $t=5,10$) y la frecuencia (**FIG. 9B**, $P<0,01$, $t=4,73$) en la prueba de interacción social recíproca. **FIGS. 9C-9D**, En la prueba de tres cámaras, Los ratones MHFD muestran una sociabilidad deteriorada (**FIG. 9C**, MRD $P<0,01$, $t=3,67$, MHFD $P=0,15$, $t=1,81$; Efecto de la dieta materna $F_{1,52}=15,00$, $P<0,001$) y preferencia por la novedad social (**FIG. 9D**, MRD $P<0,001$, $t=4,28$, MHFD $P=0,053$, $t=2,29$; Efecto de la dieta materna $F_{1,52}=21,53$, $P<0,0001$). Los gráficos muestran la media $\pm$ EEM.

FIGS. 10A-10F: El microbioma intestinal de las crías MHFD no muestra cambios taxonómicos de alto nivel, pero se reduce la diversidad bacteriana, en relación con las FIGS. 1A-1J. **FIGS. 10A-10D**, La abundancia relativa de las 10 divisiones más abundantes, identificadas mediante el análisis del gen del ARNr 16S, no difirió significativamente entre las cohortes con dieta materna (**FIGS. 10A,10B**, *Bacteroidetes* $P=0,50$; *Firmicutes* $P=0,94$; *Proteobacterias* $P=0,64$; *Deferribacteres* $P=0,91$; *Actinobacterias* $P=0,20$; *Tenericutes* $P=0,83$; *Candidata division TM7* $P=0,73$; *Cianobacterias* $P=0,97$; *Verrucomicrobia* $P=0,38$; *Fusobacteria* $sP=0,37$) y órdenes (**FIGS. 10C,10D**, *Bacteroidales* $P=0,67$, *Erysipelotrichales* $P=0,32$, *Clostridiales* $P=0,32$; *Deferribacterales* $P=1$; *Campylobacteriales* $P=1$; *Lactobacillales* $P=0,68$; *Bifidobacteriales* $P=0,78$; *Coriobacteriales* $P=0,23$; *Desulfocivibionales* $P=0,49$; *RF9* $P=0,56$). **FIG. 10E**, PCoA de las distancias UniFrac ponderadas del conjunto de datos del gen del ARNr 16S de MRD y MHFD promediadas y redondeadas ($n=1000$ rarefacciones; 7617 lecturas/muestra). La evaluación ponderada de la estructura de la comunidad mostró un solapamiento entre las dos cohortes de dieta materna (**FIG. 10E**, $P=0,18$, $R^2=0,063$). **FIG. 10F**, Se identificaron sustancialmente menos unidades taxonómicas operativas (OTU) entre las muestras de crías MHFD frente a las MRD, lo que indica una diversidad microbiana reducida en las crías MHFD ($P<0,01$, $t=3,41$). El gráfico muestra la media $\pm$ EEM.

FIGS. 11A-11B: La HFD altera el microbioma materno, en relación con las Figuras 1A-1J. **FIG. 11A**, PCoA de las distancias UniFrac no ponderadas generadas a partir del conjunto de datos promediado de rarefacciones del gen del ARNr 16S ($n=1000$ rarefacciones; 2397 lecturas/muestra). La composición microbiana de las muestras fecales maternas se agrupó inmediatamente antes de la administración de la dieta, pero dentro de las cuatro semanas de dieta, las muestras fecales maternas de las alimentadas con HFD se agruparon por separado de los controles. Este cambio en la composición microbiana se mantuvo tras ocho semanas de dieta, cuando comenzó la crianza ($P<0,001$, $R^2=0,79$). **FIG. 11B**, Mientras que la diversidad bacteriana no difería antes del inicio de la dieta ($P=0,61$, $t=1,30$), se redujo significativamente en las hembras alimentadas con HFD después de cuatro ($P<0,05$, $t=2,82$) y ocho semanas de dieta ($P<0,0001$, $t=5,78$). Los gráficos muestran la media $\pm$ EEM.

FIGS. 12A-12D: El alojamiento conjunto de una sola cría MHFD con tres crías MRD revirtió las deficiencias sociales de las crías MHFD, en relación con las Figuras 2A-2G. **FIGS. 12A-12B**, El alojamiento conjunto con crías MRD mejoró el número de contactos de interacción social recíproca de las crías MHFD (**FIG. 12A**, MRD frente a MHFD $P<0,01$, $t=5,92$; MRD frente a MHFD alojados conjuntamente $P=0,32$, $t=2,27$; MHFD frente a MHFD

alojados conjuntamente $P < 0,05$, $t = 3,65$; $F_{3,8} = 12,10$, $P < 0,01$) y la frecuencia de interacción (**FIG. 12B**, MRD frente a MHFD $P < 0,01$, $t = 5,89$; MRD frente a MHFD alojados conjuntamente $P = 0,32$, $t = 2,26$; MHFD frente a MHFD alojados conjuntamente $P < 0,05$, $t = 3,63$; $F_{3,8} = 11,99$, $P < 0,01$). **FIGS. 12C-12D**, El alojamiento conjunto con MRD mejoró la sociabilidad de las crías MHFD (**FIG. 12C**, MRD $P < 0,01$, $t = 3,97$; MRD alojados conjuntamente $P < 0,01$, $t = 3,53$; MHFD $P = 0,79$, $t = 1,31$; MHFD alojados conjuntamente $P = 0,086$, $t = 2,42$; Dieta materna/Efecto del alojamiento $F_{1,32} = 13,42$, $P < 0,001$) y preferencia por la novedad social (**FIG. 12D**, MRD $P < 0,01$, $t = 3,66$; MRD alojados conjuntamente $P < 0,05$, $t = 2,91$; MHFD $P = 0,67$, $t = 1,41$; MHFD alojados conjuntamente $P < 0,01$, $t = 3,83$; Dieta materna/Efecto del alojamiento $F_{1,32} = 47,73$, $P < 0,0001$). Los gráficos muestran la media $\pm$ EEM.

FIGS. 13A-13G: El alojamiento conjunto de tres ratones MHFD con una sola cría MRD recupera las deficiencias sociales y el perfil filogenético de los ratones MHFD, en relación con las Figuras 2A-2G. **FIG. 13A**, Esquema del experimento de alojamiento conjunto. **FIG. 13B**, Las crías MRD y MHFD fueron destetadas en una de las tres composiciones de jaulas, como se muestra. **FIGS. 13C-13G**, Tiempo de interacción social (**FIG. 13C**, MRD frente a MHFD $P < 0,0001$, $t = 10,21$; MRD frente a MHFD alojados conjuntamente $P > 0,99$, $t = 1,41$; MHFD frente a MHFD alojados conjuntamente $P < 0,0001$, $t = 8,53$; $P < 0,0001$, $F_{3,8} = 38,88$) y la duración del contacto (**FIG. 13D**, MRD frente a MHFD $P < 0,0001$, $t = 7,18$; MRD frente a MHFD alojados conjuntamente $P > 0,99$, $t = 0,59$; MHFD frente a MHFD alojados conjuntamente $P < 0,001$, $t = 6,29$; $P = 0,0001$, $F_{3,8} = 19,14$) en la prueba de interacción recíproca; sociabilidad (**FIG. 13E**, MRD $P < 0,0001$, $t = 7,37$; MHFD $P = 0,802$, $t = 1,31$; MRD alojados conjuntamente $P < 0,0001$, $t = 6,02$; MHFD alojados conjuntamente $P < 0,0001$, $t = 9,46$; Efectos de dieta materna/alojamiento/interacción $F_{3,32} = 18,62$, $P < 0,0001$) y preferencia por la novedad social (**FIG. 13F**, MRD $P < 0,05$, $t = 2,82$; MHFD $P = 0,723$, $t = 1,37$; MRD alojados conjuntamente $P < 0,05$, $t = 2,72$; MHFD alojados conjuntamente $P < 0,01$, $t = 3,34$; Los efectos de dieta materna/alojamiento/interacción $F_{3,32} = 4,55$, $P < 0,01$) así como la agrupación filogenética UniFrac (**FIG. 13G**, $P < 0,001$, $P_2 = 0,681$; $n = 1000$ rarefacciones; 12600 lecturas/muestra), se restablecen en las crías MHFD alojadas conjuntamente con ratones MRD en una configuración 3 MHFD:1MRD. Los gráficos muestran la media $\pm$ EEM.

FIGS. 14A-14G: Las deficiencias sociales de los ratones asépticos (GF) se recuperan con el trasplante de microbiota fecal de MRD, pero no de MHFD, donantes a las 4 semanas de edad, en relación con las FIGS. 3A-3L. **FIGS. 14A-14B**, Durante la prueba de interacción social recíproca, el número de contactos (**FIG. 14A**, $P < 0,001$, $t = 10,10$) y la frecuencia de interacción (**FIG. 14B**, $P < 0,001$, $t = 10,19$) se redujeron en las crías GF. **FIGS. 14C-14D**, En la prueba de las tres cámaras, los ratones GF mostraron una sociabilidad deteriorada (**FIG. 14C**, Control $P < 0,01$, $t = 3,87$; GF $P = 0,95$, $t = 0,73$; Efecto de grupo $F_{1,24} = 10,58$, $P < 0,01$) y preferencia por la novedad social (**FIG. 14D**, Control $P < 0,05$, $t = 2,54$; GF $P > 0,99$, $t = 0,30$; Efecto de grupo $F_{1,24} = 2,51$, $P = 0,13$). **FIGS. 14E-14F**, Los resultados de la prueba de las tres cámaras muestran que un trasplante de microbiota fecal de las crías MRD, pero no MHFD, en el destete (cuatro semanas), restableció tanto la sociabilidad de GF (**FIG. 14E**, GF colonizadas con MRD $P < 0,01$, $t = 3,39$; GF colonizadas con MHFD $P > 0,99$, $t = 0,67$; Efecto de la opción donante/interacción $F_{1,28} = 8,25$, $P < 0,01$) y preferencia por la novedad social (**FIG. 14F**, GF colonizados con MRD $P < 0,05$, $t = 2,89$; GF colonizados con MHFD $P = 0,69$, $t = 0,96$; Efecto donante $F_{1,28} = 7,42$, $P < 0,05$). **FIGS. 14G-14H**, A las ocho semanas, ni el trasplante de microbiota fecal MRD ni de MHFD mejoraron las deficiencias sociales de los ratones GF (**FIG. 14G**, GF colonizados con MRD $P = 0,55$, $t = 1,15$; GF colonizados con MHFD $P = 0,41$, $t = 1,35$; Efecto donante $F_{1,12} = 0,020$, $P = 0,89$; **FIG. 14H**, GF colonizados con MRD $P = 0,18$, $t = 1,85$; GF colonizadas con MHFD $P > 0,99$, $t = 0,53$; Efecto donante $F_{1,12} = 2,85$, $P = 0,12$). FMT = trasplante de microbiota fecal. Los gráficos muestran la media $\pm$ EEM.

FIGS. 15A-15F: La diversidad de la comunidad bacteriana difiere entre los ratones GF que reciben microbiota fecal de MRD frente a MHFD, en relación con las Figuras 3A-3L. **FIGS. 15A-15E**, Diversidad bacteriana en receptores GF MRD y MHFD a lo largo del tiempo mostrada como una regresión local con un intervalo de confianza del 95 % (**FIG. 15A**). En comparación con los ratones GF que recibieron materia fecal de MRD, el número de OTU observado en los ratones GF que recibieron materia fecal de MHFD fue similar a las 24 h tras el trasplante (**FIG. 15A**, 15B, $P = 0,57$, $t = 0,61$), pero se redujo en la semana uno (**FIGS. 15A**, 15C, $P < 0,05$, $t = 3,27$), dos (**FIGS. 15A**, 15D, $P < 0,05$, $t = 3,12$), y ocho (**FIGS. 15A**, 15E, $P < 0,05$, $t = 0,298$). **FIG. 15F**, El número de OTU observadas se redujo en los ratones GF que recibieron microbiota fecal de crías MHFD frente a MRD (**FIG. 15F**, $P < 0,05$, $t = 2,98$). Los gráficos muestran la media $\pm$ EEM.

FIG. 16A-16C: El tratamiento con *L. reuteri* invierte las deficiencias sociales en MHFD, en relación con las FIGS. 4A-4P y la Tabla 1. Todos los grupos de crías MRD prefirieron la cámara que contenía un ratón en la prueba de sociabilidad (**FIG. 16A**, MRD+medios $P < 0,05$, $t = 2,84$; MRD+*L. reuteri* termoinactivada, $P < 0,001$, $t = 4,12$; MRD+*L. reuteri* viva $P < 0,0001$, $t = 5,71$) y la cámara que contenía el Ratón 2 en la prueba de novedad social (**FIG. 16B**, MRD+medios $P < 0,01$, $t = 3,90$; MRD+*L. reuteri* termoinactivada, $P < 0,001$, $t = 4,44$; MRD+*L. reuteri* viva $P < 0,01$, $t = 3,57$). A diferencia de los medios solos (**FIG. 16A**, MHFD+medios $P > 0,99$, $t = 0,56$; **FIG. 16B**, MHFD+medios $P > 0,99$, $t = 0,64$) o *L. reuteri* termoinactivada (**FIG. 16A**, MHFD+*L. reuteri* termoinactivada $P = 0,085$, $t = 2,50$; **FIG. 16B**, MHFD+*L. reuteri* termoinactivada $P > 0,99$, $t = 0,053$), la administración de *L. reuteri* viva en el agua de bebida mejoró la sociabilidad de las crías MHFD y la preferencia por la novedad social (**FIG. 16A**, MHFD+*L. reuteri* $P < 0,0001$, $t = 5,06$; Efecto del tratamiento $F_{1,86} = 55,61$, $P < 0,0001$; **FIG. 16B**, MHFD+*L. reuteri* $P < 0,001$, $t = 4,55$; Efecto del tratamiento $F_{1,86} = 37,12$, $P < 0,0001$). **FIG. 16C**, Las placas anteriores y posteriores al tratamiento revelaron que la mayor parte de *L. reuteri* sobrevivió durante el periodo de tratamiento de 24 h, pero ninguna lo

hizo tras el procedimiento de termoinactivación. Los gráficos muestran la media $\pm$ EEM.

FIGS. 17A-17G: El tratamiento con otro *Lactobacillus*, (*L.*) *johnsonii*, no logra revertir las deficiencias sociales en las crías MHFD, en relación con las Figuras 4A-4P y la Figura 7. **FIG. 17A**, Esquema del tratamiento con *L.johnsonii*. **FIGS. 17B,17C**, Ni los medios de resuspensión (**FIG. 17B**, $P=0,38$, $t=1,72$; **FIG. 17C**, $P>0,99$, $t=0,40$) ni la administración de *L.johnsonii* en el agua de bebida (**FIG. 17B**, $P>0,99$, $t=0,78$; **FIG. 17C**, $P>0,99$, $t=0,21$) mejoró la sociabilidad (**FIG.17B**) o la preferencia por la novedad social (**FIG. 17C**) en las crías MHFD (**FIG. 17B**, Efecto del tratamiento $F_{3,32}=23,94$, $P<0,0001$; **FIG. 17C**, Efecto del tratamiento $F_{3,32}=6,13$, $P<0,001$). **FIGS. 17D-17G**, Gráficas de seguimiento representativas de ratones durante cada fase de la tarea de 3 cámaras, las cohortes como se ha señalado. Los gráficos muestran la media $\pm$ EEM.

FIGS. 18A-18B: La conducta repetitiva exagerada en ratones MHFD y asépticos (GF) no está mediada por cambios en el microbioma, en relación con las Figuras 4A-4P. **FIG. 18A**, Esquema de la tarea de enterrar canicas, una medida de la conducta repetitiva en ratones. **FIG. 18B**, La crías MHFD enterraron más canicas que las crías MRD ($P<0,05$, $t=3,64$). Los ratones GF enterraron más canicas que las crías MRD colonizadas convencionalmente ($P<0,0001$, $t=5,20$). El alojamiento conjunto no consiguió revertir el aumento en la conducta de enterramiento de canicas en las crías MHFD (MHFD en alojamiento conjunto frente a MRD, $P<0,01$, $t=4,32$; MHFD alojados conjuntamente frente a MHFD, $P>0,99$, $t=1,51$) y la colonización de ratones GF con microbiota MRD a las 4 semanas de edad no revirtió la conducta repetitiva exagerada (GF colonizados con MRD frente a MRD, $P=0,25$, $t=2,60$; colonizados con MRD frente a GF, $P>0,99$, $t=1,38$). El gráfico muestra la media $\pm$ EEM.

FIGS. 19A-19F: El tratamiento con *L. reuteri* no logró revertir la conducta relacionada con la ansiedad de las crías MHFD, en relación con las Figuras 4A-4P. **FIG. 19A**, Esquema de la prueba en campo abierto. **FIG. 19B**, Comparadas con las MRD, las crías MHFD pasaron menos tiempo explorando el centro de la arena de campo abierto ($P<0,05$, $t=3,61$) y el tratamiento con *L. reuteri* no afectó significativamente a esta conducta (MHFD frente a MHFD+*L.reuteri*, $P>0,99$, $t=0,13$; MRD frente a MHFD+*L. reuteri*, $P<0,05$, $t=2,79$; $F_{2,49}=7,82$, $P<0,01$). **FIG. 19C**, Gráficas representativas de la actividad exploratoria. **FIGS. 19D-19F**, Las mediciones de la actividad locomotora durante la exploración de la arena no difirieron entre los grupos con dieta materna o de tratamiento (**FIG. 19D**, $F_{2,49}=0,26$, $P=0,77$; **19E**, $F_{2,49}=0,25$, $P=0,78$; **19F**, $F_{2,49}=1,30$, $P=0,28$). Los gráficos muestran la media $\pm$ EEM.

FIGS. 20A-20C: Identificación de neuronas DA en el VTA lateral en cortes de mesencéfalo de ratones, en relación con las FIGS. 5A-5L y 6A-6F. **FIG. 20A**, Grabación representativa de una neurona en el VTA lateral que muestra un marcapasos estable disparando a 1-5 Hz en modo de célula adherida. **FIG. 20B**, La amplitud del pico se midió desde el inicio de la desviación hacia dentro hasta el pico hacia fuera a un potencial de mantenimiento de -55 mV. Las neuronas que mostraban anchuras de pico $> 1,0$ ms se tomaron como dopaminérgicas. **FIG. 20C**, Únicamente se estudiaron las neuronas ventrolaterales VTA con una corriente activada por hiperpolarización (Ih) grande (>150 pA) y una corriente de fuga grande (>150 pA).

FIGS. 21A-21D: La transmisión sináptica basal no se altera en los cortes del VTA de ratones MHFD, en relación con las FIGS. 5A-5L y 6A-6F. Las corrientes postsinápticas excitatorias (EPSC) se registraron según lo descrito por Zhu *et al.* (2011). **FIG. 21A**, La amplitud de las EPSC provocadas (eEP-SC) en función de la intensidad de estimulación se representa gráficamente como curvas de entrada/salida (registradas en pinza de voltaje a -70 mV con pipetas que contienen cesio y en presencia de picrotoxina 100 μ M) fue similar en los cortes VTA de crías MRD y MHFD ($t=0,16$, $p=0,88$, $n=5$). **FIG. 21B**, Se registraron EPSC emparejadas a intervalos entre estímulos de 50, 100, 200 y 400 ms y las relaciones entre impulsos emparejados de EPSC2/EPSC1 no muestran diferencias entre las crías MRD y las MHFD ($t=0,2$, $p=0,84$, $n=5$). **FIGS. 21C-21E**, Los trazados de la muestra (arriba) de EPSC espontáneas en miniatura y los datos resumidos (abajo) muestran una frecuencia similar (**FIG. 21D**, $t=0,24$, $p=0,81$, $n=6$) y amplitud (**FIG. 21E**, $t=0,07$, $p=0,94$, $n=6$) en cortes de VTA de crías MRD y MHFD. Los gráficos muestran la media $\pm$ EEM.

FIGS. 22A-22D: La administración de oxitocina mejora la conducta social de las crías MHFD, en relación con las FIGS. 6A-6F. **FIGS. 22A-22B**, En la prueba de interacción social recíproca, la administración intranasal de oxitocina mejoró la duración del contacto de las crías MHFD (**FIG. 22A**, $P=0,052$, $t=2,99$; Efecto del tratamiento $F_{2,8}=5,87$, $P<0,05$) y la frecuencia de interacción (**FIG. 22B**, $P<0,05$, $t=3,43$; Efecto del tratamiento $F_{2,8}=14,58$, $P<0,01$), mientras que la administración intranasal del vehículo solo no tuvo ningún efecto (**FIG. 22A**, $P>0,99$, $Z=0,11$; **22B**, $P=0,20$, $t=2,11$). **FIGS. 22C-22D**, En la tarea de tres cámaras, la oxitocina intranasal mejoró la sociabilidad (**FIG. 22C**, MHFD+Vehículo $P>0,99$, $t=0,29$; MH-FD+Oxitocina $P<0,01$, $t=3,50$; Efecto del tratamiento $F_{1,12}=5,16$, $P<0,05$) y la preferencia por la novedad social (**FIG. 22D**, +Vehículo con MHFD $P=0,50$, $t=1,25$; MH-FD+Oxitocina $P=0,096$, $t=2,34$; Efecto del tratamiento $F_{1,8}=6,41$, $P<0,05$) en las crías MHFD. Los gráficos muestran la media $\pm$ EEM.

FIGS. 23A y 23B: El tratamiento con *L. reuteri* recupera las deficiencias en la conducta social en ratones GF. La adición de *L. reuteri* en el agua de bebida invierte la sociabilidad deficiente (**FIG. 23A**) y la novedad social (**FIG. 23B**) de los ratones GF.

FIGS. 24A-24D: El tratamiento con *L. reuteri* recupera la conducta social de los ratones deficientes en

Cntnap2. (FIGS. 24A-24B) Los ratones que carecen de Cntnap2 mostraron una sociabilidad y una novedad social deterioradas. **(FIGS. 24C-24D)** La adición de *L. reuteri* en el agua de bebida invierte la sociabilidad deficiente **(FIG. 24C)** y la novedad social **(FIG. 24D)** en ratones que carecen de Cntnap2.

5 Descripción detallada

Como se utiliza en el presente documento, en la memoria descriptiva, "un" o "uno/a" puede significar uno/a o más. Como se utiliza en el presente documento en la reivindicación o reivindicaciones, cuando se usa junto con la expresión "que comprende", las palabras "un" o "uno/a" pueden significar uno/a o más de uno/a. Como se usa en el presente documento, "otro/a" puede significar al menos un/a segundo/a o más. En realizaciones específicas, los aspectos de la divulgación pueden "consistir esencialmente en" o "consistir en" uno o más elementos de la invención, por ejemplo. Algunas realizaciones de la invención pueden consistir o consisten esencialmente en uno o más elementos, etapas del método y/o métodos de la invención. Se contempla que cualquier método o composición que se describa en el presente documento puede implementarse con respecto a cualquier otro método o composición que se describa en el presente documento. Las realizaciones analizadas en el contexto de los métodos y/o las composiciones de la invención pueden emplearse con respecto a cualquier otro método o composición descritos en el presente documento. Por lo tanto, una realización que pertenece a un método o una composición puede aplicarse también a otros métodos y composiciones de la invención.

En el presente documento se describen métodos y composiciones para tratar o prevenir deficiencias de la conducta social o afecciones médicas en donde una o más deficiencias de la conducta social son al menos un síntoma. En algunos aspectos, el individuo padece un trastorno del neurodesarrollo. En aspectos particulares, a un individuo que lo necesita se le proporciona una cantidad eficaz de una o varias bacterias particulares con fines terapéuticos o preventivos. En la invención, el individuo padece un trastorno del espectro autista (TEA).

25 I. Probióticos y formulaciones

En el presente documento se describe el tratamiento o la prevención de una afección médica en la que al menos un síntoma es una deficiencia en la conducta social, incluyendo en algunos casos un trastorno del neurodesarrollo. En aspectos particulares, a un individuo que tiene una deficiencia en la conducta social o que corre el riesgo de tener una deficiencia en la conducta social, o a una hembra que está embarazada de un individuo que corre el riesgo de tener una deficiencia en la conducta social, se le proporciona una cantidad eficaz de una formulación que comprende una cantidad eficaz de *Lactobacillus*, tal como *L. reuteri*. Puede utilizarse cualquier cepa de *L. reuteri*. Algunos ejemplos de cepas de *L. reuteri* incluyen al menos ATCC PTA 6475, DSM17938, ATCC PTA4659, ATCC PTA 5289, ATCC 55730, CRL1324, DSM20016, CF4-6G, ATCC55730, CF48-3A1, M27U15, y otras cepas indicadas en Frese *et al.*, 2011; Spinler *et al.*, 2014; Oh *et al.*, 2010, y combinaciones de las mismas. La *L. reuteri* se puede obtener de cualquier fuente adecuada, incluyendo comercialmente, de un laboratorio de investigación, como un regalo o aislarse de la naturaleza. Los métodos de aislamiento de *L. reuteri* son conocidos en la técnica, incluyendo al menos los descritos la patente de EE.UU. n.º 5.439.678 y en la Patente de EE.UU. n.º 5.849.289, por ejemplo. En la invención, la cepa de *L. reuteri* es la cepa la MM4-1A (ATCC-PTA-6475).

En el presente documento se describen composiciones que comprenden las bacterias seleccionadas mediante los métodos descritos anteriormente. Las composiciones pueden incluir un portador, diluyente y/o excipiente farmacéuticamente aceptable, en algunos casos. la composición puede incluir más de una cepa bacteriana. Las composiciones pueden formularse para ser administradas en alimentos, agua, a través de una sonda oral, a través de un aerosol o un producto pulverizable, gotas, polvo liofilizado, extracto, píldora y/o a través de un supositorio, en casos específicos.

Las cepas o las composiciones descritas en el presente documento pueden administrarse de varias formas conocidas o disponibles para los expertos en la materia. Las cepas o las composiciones pueden administrarse en forma de un producto farmacéutico, nutracéutico, añadidas a los alimentos y/o al agua, y/o administradas en forma aerosolizada o pulverizable para su administración por inhalación. Además, las cepas y las composiciones descritas en el presente documento pueden administrarse como suspensiones líquidas, polvos liofilizados o concentrados congelados para su adición a regiones objeto distintas de un sujeto, como ejemplos.

En aspectos específicos, la composición de *L. reuteri* y los métodos relacionados descritos en el presente documento utilizan métodos de formulación particulares. En algunos ejemplos, el portador puede comprender además un disgregante, un deslizante y/o un lubricante, tales como los descritos en la patente de EE. UU n.º 9.084.434, por ejemplo, para facilitar un mayor período de validez y/o semivida de la formulación. El disgregante puede ser cualquier disgregante adecuado tal como, por ejemplo, un disgregante seleccionado del grupo que consiste en croscarmelosa de sodio, crospovidona, goma gellan, hidroxipropilcelulosa, almidón y glicolato sódico de almidón. El deslizante puede ser cualquier deslizante adecuado tal como, por ejemplo, un deslizante seleccionado del grupo que consiste en dióxido de silicio, dióxido de silicio coloidal y talco. El lubricante puede ser cualquier lubricante adecuado tal como, por ejemplo, un lubricante seleccionado del grupo que consiste en estearato cálcico, estearato magnésico, ácido esteárico, estearilfumerato sódico y ácidos grasos de origen vegetal. En la composición y el método, el portador, está presente en la composición en un intervalo que varía de aproximadamente un 30 % p/p a aproximadamente un 98 % p/p; este

porcentaje en peso es un porcentaje en peso acumulativo que tiene en cuenta todos los ingredientes presentes en el portador. La composición para usar en la presente invención ser una puede forma farmacéutica oral, un polvo que se mezcla en un líquido o un chicle. Cuando la composición es una forma farmacéutica oral, la forma farmacéutica oral puede seleccionarse del grupo que consiste en comprimidos, comprimidos oblongos y cápsulas, en donde los comprimidos y los comprimidos oblongos pueden ser sólidos o masticables. Cuando la composición es un polvo, puede mezclarse en un líquido que se selecciona del grupo que consiste en agua, leche, zumo y yogur. Cuando la composición es un chicle, el chicle puede ser un chicle blando o tabletas de chicle duras. Mediante la combinación de especies probióticas con alcoholes de azúcar, tales como manitol, sorbitol, solos o junto con el alcohol de azúcar adicional lactitol y/o un fitonutriente, tal como proantocianidinas oligómeras (OPC), la estabilidad de las formulaciones probióticas aumenta en diversas condiciones de conservación.

En aspectos particulares, las composiciones probióticas para usar en la presente divulgación pueden prepararse como un polvo destinado a ser disuelto en un líquido, tal como agua, leche, zumo y yogur. Se entiende que los líquidos individuales pueden mezclarse entre sí cuando sea apropiado. Por ejemplo, la formulación probiótica puede combinarse con zumo de frutas y yogur, o leche y yogur, para hacer batidos de yogur probiótico. La formulación probiótica también puede combinarse con leche y helado para hacer batidos lácteos probióticos. Los aromatizantes para las formulaciones líquidas probióticas contempladas en la divulgación son conocidos por los expertos en la materia.

En casos particulares, la formulación de *L. reuteri* para usar en la invención (como ejemplo de *Lactobacillus*) comprende uno o más excipientes. Algunos ejemplos de excipientes que pueden utilizarse para formular formas farmacéuticas adecuadas incluyen aglutinantes, disgregantes, lubricantes, recubrimientos, plastificantes, agentes de compresión, agentes de granulación por vía húmeda y edulcorantes, todos los cuales son conocidos por los expertos en la materia a la que pertenece la invención. Todos los ejemplos siguientes se proporcionan como ilustración y no de forma excluyente. Los aglutinantes se utilizan cuando procede para ayudar a que los ingredientes de la forma farmacéutica permanezcan juntos. Algunos ejemplos de aglutinantes incluyen carbopol, polividona y goma xantana. Los lubricantes se utilizan siempre generalmente en la fabricación de formas farmacéuticas por compresión directa para evitar que la masa de polvo compactada se pegue al equipo durante el proceso de compresión o encapsulado. Algunos ejemplos de lubricantes incluyen estearato cálcico, estearato magnésico, ácido esteárico, estearilfumerato sódico y ácidos grasos de origen vegetal. Los disgregantes ayudan a la ruptura de la masa compactada cuando se coloca en un medio líquido. Algunos ejemplos de disgregantes incluyen croscarmelosa sódica, crospovidona, goma gellan, hidroxipropilcelulosa, almidón y glicolato sódico de almidón. Los recubrimientos se utilizan para controlar la solubilidad del fármaco. Algunos ejemplos de recubrimientos incluyen carragenano, acetatoftalato de celulosa, etilcelulosa, goma gellan, maltodextrina, metacrilatos, metilcelulosa, celulosa microcristalina y goma laca. Los plastificantes se utilizan para controlar la velocidad de liberación del fármaco desde la forma farmacéutica. Algunos ejemplos de plastificantes incluyen ésteres de citrato, sebacato de dibutilo, ftalato de dietilo, acetatoftalato de polivinilo y triacetina. Algunos agentes de compresión incluyen carbonato cálcico, glucosa, fructosa, goma guar, miel, lactosa, maltodextrina, maltosa, manitol, celulosa microcristalina, melazas, sorbitol, almidón y sacarosa. Algunos agentes de granulación por vía húmeda incluyen carbonato cálcico, lactosa, maltodextrina, manitol, celulosa microcristalina, povidona y almidón. Algunos edulcorantes incluyen aspartamo, glucosa, fructosa, miel, lactosa, maltodextrina, maltosa, manitol, melazas, glicirricinato de monoamonio, sorbitol, sucralosa y sacarosa. Los excipientes que se utilizan generalmente en la fabricación de comprimidos masticables incluyen, a título ilustrativo y no de forma excluyente, glucosa, fructosa, goma guar, lactosa, maltodextrina, maltosa, manitol, celulosa microcristalina y sorbitol. Como es evidente a partir de la lista anterior, muchos de los mismos ingredientes pueden utilizarse para distintos fines en diferentes formas farmacéuticas.

La composición de *L. reuteri* para usar en la invención puede proporcionarse como una formulación al individuo en cualquier forma adecuada, y en realizaciones particulares están vivas, aunque en ciertas realizaciones están muertas. En realizaciones particulares, la formulación de *L. reuteri* para usar en la invención está formulada para dirigirse a una región del tubo gastrointestinal, incluyendo cualquier porción del tubo gastrointestinal. La formulación de *L. reuteri* está formulada para ser administrada en cualquier porción del tubo gastrointestinal.

La formulación puede administrarse en alimentos y/o bebidas, en realizaciones específicas. Algunos ejemplos particulares incluyen productos lácteos y/o alimentos enriquecidos con probióticos. Sin embargo, también existen comprimidos, cápsulas, chicles o polvos que contienen las bacterias en forma liofilizada. En realizaciones específicas, la formulación de *L. reuteri* para usar en la invención se administra en una píldora o en yogur, por ejemplo. La formulación puede administrarse en preparados para lactantes y/o cereales (infantiles o de otro tipo), en algunos casos.

Cada dosis de la composición de *L. reuteri* para usar en la invención puede comprender un cierto intervalo de células bacterianas. En casos específicos, la composición de *L. reuteri* para usar en la invención comprende un intervalo de aproximadamente 10^3 células a aproximadamente 10^{13} células. En ciertos casos, cada dosis está en el intervalo de aproximadamente 10^5 células a aproximadamente 10^{11} células, de aproximadamente 10^5 a aproximadamente 10^{10} células, de aproximadamente 10^7 células a aproximadamente 10^{10} células, y así sucesivamente. En otros casos, cada dosis está en el intervalo de aproximadamente 10^1 células a aproximadamente 10^1 células.

En algunos casos, preferentemente, los microorganismos probióticos no se liofilizan ni se secan por pulverización en

un producto listo para usar, porque es preferible que los microorganismos sean lo más robustos posible al entrar en los intestinos para competir con éxito con la parte proinflamatoria de la microflora ya presente en los intestinos. Sin embargo, algunas cepas pueden ser lo suficientemente robustas y/o algunos protocolos lo suficientemente suaves como para permitir el uso de microorganismos probióticos secados por pulverización o liofilizados en un producto listo para usar.

En el presente documento se describen formulaciones para usar en la invención que comprenden una cepa de *L. reuteri* adecuada para su administración a un individuo que la necesite. La formulación puede comprender además un material prebiótico, que es un ingrediente alimentario que fomenta el crecimiento del *L. reuteri*, tal como azúcares simples, hidratos de carbono complejos, fibras, grasas, proteínas o productos naturales, tales como vitaminas, minerales y polifenoles que estimulan la supervivencia, el crecimiento o la actividad de *L. reuteri* o fomentan su persistencia en el tubo gastrointestinal. La formulación puede comprender un portador ingerible, que puede ser un portador farmacéuticamente aceptable tal como una cápsula, un comprimido o polvo. En realizaciones específicas, el portador ingerible es un producto alimenticio tal como leche acidificada, yogur (congelado o sin congelar), leche en polvo, concentrado lácteo, queso para untar, aderezos y/o bebidas. La formulación puede comprender además una proteína y/o un péptido, en particular proteínas y/o péptidos ricos en glutamina/glutamato, un lípido, un hidrato de carbono, una vitamina, un mineral y/o un oligoelemento, por ejemplo. La formulación puede comprender además un adyuvante, un fármaco, un compuesto biológico o una mezcla de los mismos. La formulación puede ser un alimento o un medicamento, en ciertas realizaciones.

Puede administrarse una cantidad eficaz de *L. reuteri* a un individuo que lo necesite, y puede administrarse o no con uno o más probióticos adicionales, tales como una o más bacterias probióticas y/o levaduras adicionales. Las bacterias probióticas y/o las levaduras adicionales pueden estar en la misma composición que la *L. reuteri*, o las bacterias probióticas y/o levaduras adicionales pueden estar en una composición diferente a la de *L. reuteri*. Las bacterias probióticas y/o las levaduras adicionales pueden o no administrarse al individuo al mismo tiempo que la *L. reuteri*. Las bacterias probióticas y/o las levaduras adicionales pueden ayudar a tratar y/o prevenir al menos una deficiencia en la conducta social, y/o las bacterias probióticas adicionales pueden ser útiles para tratar y/o prevenir al menos un síntoma de otra afección médica. Otras afecciones médicas que pueden tratarse y/o prevenirse al mismo tiempo con otros probióticos incluyen al menos ansiedad, capacidad intelectual, esquizofrenia, trastorno bipolar, trastorno del estado de ánimo, trastorno afectivo estacional, síndrome de intestino irritable, enfermedad inflamatoria intestinal (EII), diarrea infecciosa (causada por virus, bacterias o parásitos), diarrea relacionada con antibióticos, afecciones cutáneas (tales como eccema), salud urinaria y vaginal, la prevención de alergias y resfriados, y la salud oral.

Las bacterias probióticas y/o levaduras adicionales pueden ser de cualquier tipo, siempre que no sean patógenas en la cantidad administrada al individuo. En realizaciones específicas, las bacterias probióticas y/o levaduras adicionales pueden ser *Lactobacillus acidophilus*, *L. bulgaricus*, *L. casei*, *L. fermentum*, *L. paracasei*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *L. salivarius*, *Bifidobacterium bifidum*, *B. infantis*, *B. animalis subesp. lactis*, *B. longum*, *Streptococcus thermophilis*, *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *Bifidobacterium*, *Saccharomyces boulardii* y *Lactobacillus bifidus*, *Parabacteroides distasonis*, *Helicobacter hepaticus*, *Bacteroides uniformis*, *Olsenella* sin clasificar, *Collinsella* sin clasificar, *Bifidobacterium pseudolongum*, *Lactobacillus johnsonii* o una combinación de las mismas. En los casos en donde se administren a un individuo una o más bacterias y/o levaduras, pueden administrarse en una relación particular. En los casos donde haya otras bacterias en la formulación, dicha relación puede ser 1:1, 1:2, 1:5, 1:10, 1:25, 1:50, y así sucesivamente. En los casos donde haya más de una de otras bacterias en la formulación, la relación particular puede ser de 1:1:1; 1:2:1; 1:10:1; 1:2:2; 1:10:10; 1:100:1; 1:100:100, y así sucesivamente.

El individuo también puede estar ingiriendo vitaminas y/o aceite de pescado, por ejemplo.

II. Realizaciones de tratamiento y administración

En realizaciones particulares, un individuo que es el objeto de los métodos y las composiciones descritas en el presente documento tiene una afección médica en la que al menos un síntoma es una deficiencia en la conducta social. En aspectos específicos, el individuo padece un trastorno del neurodesarrollo, y dicho trastorno puede tener cualquier causa, incluyendo privación, enfermedades genéticas y metabólicas, trastornos inmunitarios, enfermedades infecciosas, factores nutricionales, traumatismos físicos y factores tóxicos y ambientales, por ejemplo; el trastorno puede tener dos o más causas. En la invención, un régimen de tratamiento es para un individuo con TEA. En cualquier caso, el individuo puede ser hijo de una madre con una dieta rica en grasas, una madre obesa o una madre con sobrepeso, o la hembra puede estar embarazada.

A un individuo que presenta una deficiencia en la conducta social se le administra una cantidad eficaz de una formulación que comprende al menos una cantidad eficaz de *L. reuteri*. En algunos casos, puede haber un régimen que tenga una primera fase para un tratamiento inicial, que puede durar días, semanas, meses o años, y a continuación otra fase de mantenimiento, que puede durar semanas, meses o años. En una forma particular de la invención, un régimen de tratamiento inicial puede comprender al menos aproximadamente 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 o 10^{10} células por dosis. Dicho tratamiento se puede administrar una o más veces al día, incluyendo aproximadamente 1, 2, 3 o más veces al día, durante un periodo suficiente para estabilizar la microbiota intestinal. En otros casos, en una fase de mantenimiento, al individuo se le administra una cantidad menor de las bacterias y/o menos administraciones que la

fase inicial de tratamiento.

La duración de un régimen de tratamiento puede depender de cada paciente individual y de la fase de la afección médica. En algunos casos, un tratamiento continuado durante un cierto periodo de tiempo hasta que se produzca una mejora detectable en una deficiencia en la conducta social. En algunos casos, la mejora de la deficiencia en la conducta social se mantiene con un tratamiento adicional, aunque el tratamiento adicional puede reducirse en frecuencia y/o volumen.

Aunque en algunos casos, la formulación de *L. reuteri* se administra a un lactante o a un niño que presenta una deficiencia en la conducta social, en algunos casos, el lactante o el niño recibe la formulación de *L. reuteri* cuando no se ha detectado ninguna deficiencia en la conducta social pero el lactante o el niño tenía una madre biológica obesa o con sobrepeso y/o que seguía una dieta rica en grasas. En algunos casos, la madre biológica obesa o con sobrepeso o que sigue una dieta rica en grasas recibe la formulación antes del nacimiento del bebé. En ciertos casos, a un individuo adolescente o adulto se le administran dosis adecuadas de *L. reuteri* para mejorar una deficiencia en la conducta social, y ese individuo puede haber tenido o no una madre obesa, con sobrepeso o que sigue una dieta rica en grasas. En otros casos, la formulación de *L. reuteri* se administra a lactantes, niños, adolescentes, adultos y/o ancianos.

En los casos en donde la madre de un individuo con una deficiencia en la conducta social es obesa, pueden ser tratados la madre y/o el niño (la madre antes del parto). Se considera que una madre es obesa si tiene un índice de masa corporal (IMC) igual o superior a 30. Se considera que una madre tiene sobrepeso si su IMC oscila entre 25 y 29,9.

Un experto en la materia puede medir una o más deficiencias en la conducta social en seres humanos de diversas maneras. En realizaciones específicas, el experto emplearía las normas establecidas en el Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, quinta edición (DSM-5):

A. Dificultades persistentes en el uso social de la comunicación verbal y no verbal que se manifiestan por todo lo siguiente:

1. Deficiencias en el uso de la comunicación con fines sociales, tales como saludar y compartir información, de una forma apropiada para el contexto social.

2. Deterioro de la capacidad de cambiar la comunicación para adaptarla al contexto o a las necesidades del oyente, tal como hablar de forma diferente en un aula que en el patio de recreo, hablar de forma diferente a un niño y a un adulto y evitar el uso de un lenguaje demasiado formal.

3. Dificultades para seguir las normas de conversación y narración, tales como respetar los turnos en la conversación, reformular cuando no se le entienda y saber utilizar las señales verbales y no verbales para regular la interacción.

4. Dificultades para comprender lo que no se dice explícitamente (por ejemplo, hacer inferencias) y significados no literales o ambiguos del lenguaje (por ejemplo, modismos, humor, metáforas, múltiples significados que dependen del contexto para su interpretación).

B. Las deficiencias provocan limitaciones funcionales en la comunicación eficaz, la participación social, las relaciones sociales, el rendimiento académico o laboral, individualmente o en combinación.

C. La aparición de los síntomas se produce en el periodo de desarrollo temprano (pero las deficiencias pueden no manifestarse plenamente hasta que las demandas de comunicación social superen las capacidades limitadas).

D. Los síntomas no son atribuibles a otra afección médica o neurológica ni a una baja capacidad en los dominios o de la estructura de la palabra y la gramática, y no se explican mejor por un trastorno del espectro autista, discapacidad intelectual (trastorno del desarrollo intelectual), retraso global del desarrollo u otro trastorno mental.

E. Deficiencias persistentes en la comunicación social y la interacción social en múltiples contextos, manifestadas por lo siguiente, actualmente o por su historial (los ejemplos son ilustrativos, no exhaustivos, véase el texto):

1. Deficiencias en la reciprocidad socioemocional, que varían, por ejemplo, desde un acercamiento social anormal y el fracaso de una conversación normal de ida y vuelta; a una compartición reducida de intereses, emociones o afectos; a la incapacidad para iniciar o responder a las interacciones sociales.

2. Deficiencias en las conductas comunicativas no verbales utilizadas para la interacción social, que varían, por ejemplo, desde una comunicación verbal y no verbal mal integrada; a anomalías en el contacto visual y el lenguaje corporal o deficiencias en la comprensión y el uso de gestos; a una falta total de expresiones faciales y de comunicación no verbal.

3. Deficiencias en el desarrollo, el mantenimiento y la comprensión de las relaciones, que varían, por ejemplo, desde dificultades para ajustar la conducta a diversos contextos sociales; a dificultades para compartir juegos imaginativos o para hacer amigos; a la ausencia de interés por los compañeros.

4. Los síntomas causan un deterioro clínicamente significativo en el ámbito social, laboral u otras áreas importantes del funcionamiento actual.

En realizaciones particulares, se administra a un individuo que lo necesite una cantidad eficaz de *L. reuteri* de acuerdo con la invención con el fin de mejorar una deficiencia en la conducta social. En algunos casos, se administra intencionadamente a un individuo una cantidad eficaz de *L. reuteri* de acuerdo con la invención con el fin de mejorar al menos una deficiencia en la conducta social. Se puede administrar a una madre embarazada una cantidad eficaz de *L. reuteri* con el fin de prevenir o mejorar al menos una deficiencia en la conducta social en su crías, y en algunos casos esa madre es obesa, con sobrepeso o sigue una dieta rica en grasas. En algunos métodos, se identifica a una mujer embarazada que necesita una cantidad eficaz de *L. reuteri* porque es obesa, con sobrepeso y/o sigue una dieta rica en grasas, aunque en algunos casos no lo es. Un individuo puede correr el riesgo de tener al menos una deficiencia en la conducta social porque su madre biológica era obesa, con sobrepeso y/o con una dieta rica en grasas, y la identificación de dicho riesgo forma parte de algunos métodos. En otras realizaciones, puede administrarse *L. reuteri* de acuerdo con la invención para aumentar el vínculo social, mejorar el estado de ánimo, reducir la depresión y aumentar el bienestar de las personas, incluyendo amigos, miembros de la familia, colegas y socios.

En ciertos aspectos de la divulgación, se trata al menos un síntoma de al menos un trastorno del neurodesarrollo con una cantidad eficaz de *L. reuteri*. Se puede tratar a un individuo por deficiencias sociales y cambios en el microbioma intestinal proporcionando a la madre embarazada o a las crías una cantidad eficaz de una formulación de *L. reuteri*. La cantidad eficaz de la formulación de *L. reuteri* puede mejorar indirecta o directamente la interacción social porque induce indirecta o directamente una potenciación sináptica (LTP) en el área tegmental ventral (VTA) del individuo. La cantidad eficaz de la formulación de *L. reuteri* puede aumentar indirecta o directamente el número de neuronas inmunorreactivas a la oxitocina en el hipotálamo. Los aspectos de la divulgación influyen en las consecuencias de la dieta materna, la disbiosis de la microbiota intestinal, la plasticidad del VTA y la conducta social anormal administrando una terapia probiótica con *L. reuteri* eficaz para un individuo.

En realizaciones específicas, a un individuo se le administra una terapia o un preventivo para una o más deficiencias en la conducta social además de las composiciones para usar en la invención. Por ejemplo, además de *L. reuteri*, se le puede proporcionar lo siguiente: a) otras especies de bacterias, b) prebióticos y otros nutrientes (por ejemplo, vitaminas, lípidos, proteínas, etc.) con *L. reuteri*, y c) terapia conductual en combinación con *L. reuteri*.

L. reuteri puede no ser administrado como un microorganismo vivo, pero un extracto o una fracción específica producida a partir del microorganismo vivo pueden ser igualmente bioactivos. Esto ha quedado demostrado, por ejemplo, en el caso de la cicatrización de heridas en animales, en el que las mezclas sonicadas consumidas o los lisados preparados a partir de *L. reuteri* viva o muerta son biológicamente activos en un modelo de cicatrización de heridas (Poutahidis *et al.*, 2013; Varian *et al.*, 2016). Las mezclas, los lisados o los extractos pueden administrarse en forma de píldora o en cualquier otro modo de administración convencional (alimentos o bebidas líquidas, yogur, polvo seco mezclado en agua o bebida en el que dichas mezclas pueden dosificarse y consumirse eficazmente en un formato biológicamente activo.

III. Kits de la divulgación

En el presente documento también se describen kits. Se contemplan específicamente kits para la implementación de los métodos descritos en el presente documento. En algunos aspectos, existen kits para tratar deficiencias en la conducta social en un individuo y/o para prevenir la aparición de al menos un síntoma de deficiencias en la conducta social en un individuo. El kit puede proporcionarse para el tratamiento y/o la prevención de una deficiencia en la conducta social en un individuo, y en algunos casos, en donde la madre del individuo es obesa, con sobrepeso y/o con una dieta rica en grasas. En algunos aspectos, el kit es para una madre embarazada que es obesa, con sobrepeso y/o con una dieta rica en grasas, aunque en otros casos el kit es para cualquier madre embarazada o cualquier lactante, niño, adolescente o adulto.

El medio recipiente de los kits incluirá generalmente al menos un vial, tubo de ensayo, matraz, frasco, jeringuilla u otro medio recipiente, en el cual pueda colocarse un componente (incluyendo *L. reuteri*) y, preferentemente, alicuotarse adecuadamente. Cuando haya más de un componente en el kit que no sea un componente de *Lactobacillus* (incluyendo *L. reuteri*), el kit también contendrá generalmente un segundo, tercer u otro recipiente adicional en el que pueden colocarse los componentes adicionales (tales como otras bacterias) por separado. Sin embargo, en un vial pueden estar comprendidas diversas combinaciones de componentes. Los kits de la presente divulgación también incluirán normalmente un medio para contener las composiciones y cualquier otro recipiente de reactivo en un espacio cerrado para la venta comercial. Dichos recipientes pueden incluir recipientes de plástico inyectados o moldeados por soplado en los que se conserven los viales deseados.

Cuando los componentes del kit se proporcionan en una y/o más soluciones líquidas, la solución líquida es una solución acuosa, siendo particularmente útil una solución acuosa estéril. Sin embargo, los componentes del kit pueden proporcionarse como un pincho o polvos secos. Cuando los reactivos y/o los componentes se proporcionan como un polvo seco, el polvo puede reconstituirse mediante la adición de un disolvente adecuado. Se prevé que el disolvente también pueda proporcionarse en otro medio de recipiente. Los componentes de los kits pueden envasarse bien en medios acuosos o bien en forma liofilizada.

Un kit también incluirá instrucciones para emplear los componentes del kit, así como el uso de cualquier otro reactivo no incluido en el kit. Las instrucciones pueden incluir variaciones que pueden ser implementadas.

En algunos aspectos de la divulgación, en el kit se incluyen otros tratamientos para las deficiencias en la conducta social. Otros tratamientos pueden implicar tratamientos conductuales, medicamentos o ambos. Cuando el individuo padece uno de algunos trastornos del neurodesarrollo, el individuo puede tener afecciones médicas adicionales tales como trastornos del sueño, convulsiones y/o malestar gastrointestinal (GI), y los kits también pueden tener estas composiciones terapéuticas.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se incluyen para mostrar algunas realizaciones de la invención. Los expertos en la técnica deberían apreciar que las técnicas divulgadas en los ejemplos que siguen representan técnicas descubiertas por el inventor que funcionan bien en la práctica de la invención y por tanto se puede considerar que constituyen algunos modos para su práctica.

En realizaciones particulares, los hallazgos de la divulgación vinculan la disfunción del intestino y del cerebro. En el presente documento se describe que la dieta materna rica en grasas (MHFD) induce un cambio en la ecología microbiana que tiene un impacto negativo directo en la conducta social. De forma notable, se descubrió que los cambios inducidos por la MHFD en el microbioma intestinal de las crías bloquean la adaptación neural duradera en el sistema de recompensa mesolímbico dopaminérgico (área tegmental ventral, VTA). De interés aún más amplio e impacto considerable es la identificación de un candidato probiótico (una sola especie bacteriana, al menos en algunos casos) que revierte la función sináptica en el VTA, las conductas sociales, así como los niveles de oxitocina, "the social hormone" (Donaldson y Young, 2008; Insel, 2010), en el cerebro de las crías MHFD.

EJEMPLO 1

Las conductas sociales están deterioradas en las crías MHFD. Para investigar cómo la obesidad inducida por la dieta materna afecta al neurodesarrollo de las crías, se alimentaron ratones hembra con una dieta normal (DR) o con una dieta rica en grasas (HFD) durante 8 semanas, periodo convencional necesario para alcanzar un estado de obesidad inducida por la dieta en ratones (Aye *et al.*, 2015). A continuación, las hembras se aparearon con los machos para producir crías a las que se suministró una dieta normal tras el destete (FIG. 1A). Como se esperaba, la MHFD aumentó significativamente el peso materno (FIGS. 8A-8C). En consonancia con los informes de abortos espontáneos más frecuentes en madres obesas (King, 2006), el tamaño de la camada se redujo (FIG. 8D) y la latencia hasta la primera camada aumentó en los ratones hembra alimentados con HFD (FIG. 8E). Cabe destacar que no hubo diferencias significativas en el peso de las crías entre las cohortes de dieta materna a las 7-12 semanas de edad (FIGS. 8F y 8G), momento en el que se realizaron los experimentos conductuales y electrofisiológicos.

Dado que la obesidad materna está asociada al TEA (Bilder *et al.*, 2013; Dodds *et al.*, 2011; Krakowiak *et al.*, 2012; Moss y Chugani, 2014) y las interacciones sociales deficientes son una característica destacada de los individuos con TEA (Mefford *et al.*, 2012), se estudió la conducta social en las crías MRD y MHFD. En primer lugar, las interacciones sociales recíprocas se evaluaron registrando la cantidad de tiempo que una pareja de ratones pasaba interactuando en una arena neutra (FIG. 1B). Cuando se comparan con las crías MRD, las crías MHFD tuvieron menos interacciones recíprocas (FIGS. 1C, 1D, 9A y 9B). Después, se utilizó la prueba de las tres cámaras (Silverman *et al.*, 2010) para evaluar a) la sociabilidad comparando el tiempo que los ratones pasaban interactuando con una jaula de hilo metálico vacía frente a otra que contenía un ratón y b) la preferencia por la novedad social midiendo el tiempo que los ratones pasaban interactuando con un ratón familiar frente a otro desconocido (FIG. 1E). En consonancia con los resultados de las interacciones sociales recíprocas, las crías MHFD tenían una sociabilidad deteriorada y no mostraban preferencia por la novedad social (FIGS. 1F-1I, 9C y 9D). En conjunto, estos datos indican que las crías MHFD muestran deficiencias sociales.

Disbiosis de la microbiota intestinal en las crías MHFD. Diversos factores podrían contribuir a la etiología de las anomalías de la conducta social inducidas por la MHFD. Sin embargo, se ha demostrado que la obesidad materna altera el microbioma intestinal de las crías (Galley *et al.*, 2014; Ma *et al.*, 2014) y los individuos con diagnóstico de TEA suelen presentar también disbiosis de la microbiota intestinal (Kohane *et al.*, 2012; Mayer *et al.*, 2014; Parracho *et al.*, 2005). Para estudiar si la MHFD induce alteraciones en la microbiota intestinal de las crías, se analizaron la composición bacteriana y la estructura de la comunidad en las heces de las crías MRD y MHFD mediante secuenciación del gen 16S del ARN ribosómico (ARNr). Las comunidades microbianas de las crías MRD y MHFD estaban compuestas por una microbiota intestinal típica de ratón, dominada por *Bacteroidetes* y *Firmicutes* (FIGS.

10A-10D). Aunque la diversidad bacteriana calculada tomando como base las distancias UniFrac ponderadas [la evaluación de la estructura de la comunidad considerando la abundancia de unidades taxonómicas operativas (OTU)] no difirió significativamente entre las crías de ambos grupos de dieta (Figura 10E), los análisis no ponderados de las distancias UniFrac (la evaluación de la estructura de la comunidad considerando únicamente la presencia/ausencia de OTU) revelaron una notable diferencia entre las estructuras de las comunidades bacterianas (FIG. 1J). Además, la diversidad de la microbiota en las crías MHFD estaba reducida en comparación con la microbiota de las MRD (FIG. 10F). En consonancia con informes anteriores (Turnbaugh *et al.*, 2006), un régimen HFD en las madres indujo un cambio notable en la composición y diversidad del microbioma materno (FIGS. 11A y 11B), que era similar al observado en sus crías (FIGS. 1J y 10F).

La microbiota intestinal media en las deficiencias sociales inducidas por la MHFD. Aunque las comunidades microbianas varían de un individuo a otro (Yatsunenkov *et al.*, 2012), se sabe que los miembros de una familia que conviven comparten su microbiota (Song *et al.*, 2013). Dado que los ratones son coprófagos y se transfieren la microbiota intestinal entre sí por vía fecal-oral (Ridaura *et al.*, 2013), se estudió si el alojamiento conjunto de ratones MHFD con ratones MRD previene las deficiencias sociales en las crías MHFD. Para este fin, en el destete (3 semanas), un ratón MHFD fue alojado junto con tres ratones MRD (FIGS. 2A y 2B). Los grupos de control consistían en jaulas individuales que contenían cuatro ratones MHFD o cuatro ratones MRD (FIG. 2B). Se recogieron muestras fecales y se evaluó la conducta social de las crías MRD y MHFD cuando los ratones tenían 7-8 semanas de edad. Sorprendentemente, los ratones MHFD alojados junto con ratones MRD mostraron interacciones sociales recíprocas normales (FIGS. 2C, 2D, 12A y 12B), así como una sociabilidad normal y una preferencia por la novedad social, según se determinó mediante la prueba de 3 cámaras (FIGS. 2E, 2F, 12C y 12D). Por lo tanto, el alojamiento conjunto con ratones control corrige las deficiencias sociales de las crías MHFD.

A continuación se estudió si el alojamiento conjunto también corregía los cambios en la microbiota de las crías MHFD. De hecho, el alojamiento conjunto provocó un cambio en el perfil filogenético bacteriano de los ratones MHFD para asemejarse al de los ratones MRD o de los alojados junto con MRD (FIG. 2G), corrigiendo así las alteraciones inducidas por la MHFD en la microbiota comensal. De acuerdo con la idea de que la microbiota fecal de las crías MHFD carece de una o más especies bacterianas beneficiosas necesarias para una conducta social normal, el alojamiento conjunto de una cría MRD con tres MHFD fue suficiente para recuperar tanto las conductas sociales como el perfil filogenético de la microbiota de las crías MHFD (FIGS. 13A-13G).

La colonización de ratones asépticos (GF) con la microbiota de ratones MRD, pero no MHFD, revierte su conducta social deficiente. Los estudios realizados en ratones GF han demostrado que la microbiota intestinal puede influir en el desarrollo y la función cerebrales (Cryan y Dinan, 2012). Se consideró que, si la falta de una o más especies bacterianas en la microbiota de las crías MHFD es responsable de su conducta social defectuosa, los ratones GF también deben ser socialmente deficientes. Confirmando esta consideración, las conductas sociales estaban deterioradas en los ratones GF (FIGS. 3A-3D y 14A-14D).

Para identificar las diferencias funcionales entre las comunidades microbianas intestinales y determinar si su papel es causal, se trasplantó microbiota fecal (por sonda) de adultos MRD y crías MHFD en ratones GF de 4 semanas (FIG. 3E) y de 8 semanas de edad (FIG. 3F). De manera interesante, los ratones GF que recibieron microbiota fecal de crías MRD en el destete (4 semanas; FIGS. 3G, 3H, 14E y 14F), pero no a las 8 semanas (FIGS. 3I, 3J, 14G y 14H), mostraron una conducta social normal. Por el contrario, los ratones GF que recibieron microbiota fecal de crías MHFD permanecieron socialmente deteriorados, independientemente de la edad a la que se realizara la transferencia fecal (FIGS. 3G-3I y 14E-14H). Además, como en el caso de la separación filogenética de la microbiota MRD y MHFD (FIG. 1J), las comunidades bacterianas de los ratones GF que recibieron heces de crías donantes MHFD se agruparon por separado de las de los ratones GF que recibieron heces de crías donantes MRD, independientemente de si el trasplante fecal se realizó a las 4 o a las 8 semanas (FIGS. 3K, 3L y 15A-15F). Estos datos revelan una ventana del neurodesarrollo durante la cual la reconstitución microbiana mejora eficazmente la conducta social.

La MHFD impacta negativamente en un subconjunto de bacterias intestinales, y la reintroducción selectiva de *Lactobacillus (L.) reuteri* restablece las deficiencias sociales en las crías MHFD. Para investigar qué especies bacterianas están ausentes en la comunidad de la microbiota de las crías MHFD, se realizó una secuenciación metagenómica indiscriminada de muestras fecales de crías tanto MHFD como MRD. El análisis identificó varias especies cuya abundancia relativa estaba reducida drásticamente en la microbiota de las crías MHFD (FIG. 7). Entre éstas, *L. reuteri* era la más drásticamente reducida (>9 veces) en la población de la microbiota MHFD, en comparación con la microbiota MRD (FIG. 7).

Se ha demostrado que *L. reuteri* fomenta los niveles de oxitocina (Poutahidis *et al.*, 2013), una hormona que desempeña un papel crucial en las conductas sociales (Donaldson y Young, 2008). Se consideró que la disminución selectiva de *L. reuteri* en la microbiota de las crías MHFD estaba relacionada causalmente con sus deficiencias sociales. Para caracterizar esto, se introdujo *L. reuteri* en el agua de bebida de las crías MHFD en el momento del destete, durante 4 semanas, tras lo cual se analizó su conducta (FIG. 4A). Notablemente, el tratamiento con *L. reuteri* mejoró significativamente la sociabilidad y la preferencia por la novedad social en las crías MHFD (FIGS. 4B, 4C, 4E, 16A y 16B). Los resultados de varios experimentos de control subrayan la especificidad de la recuperación mediada por *L. reuteri* de las conductas sociales en las crías MHFD. En primer lugar, el agua de bebida tratada con medios de

resuspensión o con *L. reuteri* termoinactivada (80 °C durante 20 min) no logró restablecer la conducta social en las crías MHFD (FIGS. 4B-4D, 16A y 16B). En segundo lugar, el agua de bebida con *L. reuteri* viva no modificó la conducta social de las crías MRD (FIGS. 4B, 4C, 16A y 16B), presumiblemente porque su microbiota intestinal ya contiene abundante *L. reuteri*. Finalmente, la adición de *L. reuteri* al agua de bebida no tuvo ningún efecto importante sobre la

viabilidad bacteriana, y el procedimiento de termoinactivación anuló por completo las unidades formadoras de colonias (FIG. 16C). De manera importante, la mejora de la conducta social deficiente es específica de *L. reuteri*, porque un tratamiento similar con otra especie de *Lactobacillus*, *L. johnsonii*, cuya abundancia también está reducida en la microbiota intestinal de las crías MHFD (figura 7), no logró recuperar las conductas sociales en las crías MHFD (FIGS. 17A-17G).

La crías MHFD muestran otros rasgos conductuales que están asociados con el TEA, como conductas repetitivas y ansiedad (FIGS. 18A-18B - 19A-19F). De manera interesante, aunque el alojamiento conjunto de crías WMHFD con MRD restablece la conducta social (Figuras 4B y 4C), no logró recuperar el enterramiento de canicas (FIG. 18B), una tarea conductual que refleja una conducta repetitiva y perseverante (Thomas *et al.*, 2009). Por consiguiente, los ratones asépticos también mostraron un mayor enterramiento de canicas, y los trasplantes de microbios fecales de crías MRD (o MHFD) a ratones GF no lograron recuperar la conducta repetitiva (FIG. 18B). Por lo tanto, las conductas repetitivas en las crías MHFD no dependen de los cambios en el microbioma intestinal. Además, el tratamiento con *L. reuteri* no logró recuperar los cambios en la ansiedad de las crías MHFD (FIGS. 19B-19C). Considerados en conjunto, estos datos indican que la reconstitución con *L. reuteri* recupera específicamente la conducta social, pero no otros endofenotipos conductuales asociados al TEA.

Los niveles de oxitocina están reducidos en el hipotálamo de las crías MHFD. Cada vez hay más pruebas de que el neuropéptido oxitocina modula numerosos aspectos de la conducta social (Donaldson y Young, 2008; Insel, 2010) y está implicado en el TEA (Lerer *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2005). Se ha informado de que *L. reuteri*, que recuperó las conductas sociales en ratones MHFD (FIGS. 4B, 4C y 4E), aumenta los niveles de oxitocina (Poutahidis *et al.*, 2013). Dado que la oxitocina se sintetiza principalmente en los núcleos paraventriculares (PVN) del hipotálamo, se consideró comparar el número de células que expresan oxitocina en los PVN de las crías MRD y MHFD. De manera interesante, Las crías MHFD tenía significativamente menos neuronas inmunorreactivas a la oxitocina en comparación con las crías MRD (FIGS. 4F-4H, 4K y 4L). La reducción de la inmunorreactividad a la oxitocina no se debió a una disminución global de las neuronas de los PVN, porque el número total de neuronas no se modificó (según la tinción NeuN; FIGS. 4G, 4H, 4M y 4N). De forma notable, en las crías MHFD tratadas con *L. reuteri*, el número de células que expresaban oxitocina era mayor que en las crías MHFD tratadas con control (FIGS. 4I, 4J, 4O y 4P). Por lo tanto, el número de neuronas inmunorreactivas a la oxitocina en los PVN está reducido en las crías MHFD, pero puede restablecerse mediante el tratamiento con *L. reuteri*.

La función del sistema de recompensa dopaminérgico mesolímbico está deteriorada en las crías MHFD. Las regiones cerebrales que responden a estímulos naturalmente gratificantes, incluyendo el área tegmental ventral (VTA) y el núcleo *accumbens* (NAc), están crucialmente implicadas en las conductas sociales (Dolen *et al.*, 2013; Gunaydin *et al.*, 2014; Huang y Hessler, 2008). Además, las neuronas que expresan oxitocina en los PVN proyectan en el VTA (Melis *et al.*, 2007). La oxitocina activa las neuronas VTA tanto en ratones como en seres humanos, lo que influye en el procesamiento de las señales socialmente relevantes (Gregory *et al.*, 2015; Groppe *et al.*, 2013; Tang *et al.*, 2014) y el bloqueo de los receptores de oxitocina en el VTA impide el apego social en roedores (Pedersen *et al.*, 1994). Dado que la estimulación social puede ser particularmente gratificante y desencadena la potenciación sináptica en las neuronas DA del VTA de las aves (Huang y Hessler, 2008), se consideró si la interacción social directa provoca una potenciación a largo plazo (LTP) de las aferencias sinápticas a las neuronas DA del VTA (Figuras 20A-20C). Para este fin, Se registraron las relaciones AMPAR/NMDAR de las corrientes postsinápticas excitatorias glutamatérgicas (EPSC) en crías MRD y MHFD 24 horas después de una interacción recíproca de 10 min con un ratón desconocido o con uno familiar (FIG. 5A). En los ratones MRD de control, la interacción social con un ratón desconocido, pero no con uno familiar, desencadenó una LTP en las neuronas DA del VTA, como determina el aumento de las relaciones AMPAR/NMDAR (FIGS. 5B y 5D). Por el contrario, en las crías MHFD, la interacción social con un desconocido no logró inducir una LTP en sus neuronas DA del VTA (FIGS. 5C y 5E). Las curvas de entrada-salida, las relaciones de impulsos emparejados y la frecuencia y amplitud de las EPSCs en miniatura (mEPSCs) muestran que el deterioro de la LTP inducido por la interacción social en las crías MHFD no puede atribuirse a cambios en la transmisión sináptica basal (FIGS. 21A-21E).

Como reflejo de los resultados electrofisiológicos, las crías MRD pasaron significativamente más tiempo interactuando con un ratón desconocido que con uno conocido, pero no así las crías MHFD (FIGS. 5F y 5G). Por lo tanto, la interacción social induce un aumento duradero de la actividad del sistema de recompensa dopaminérgico de las crías MRD, pero no en las MHFD. El tratamiento con *L. reuteri* o con oxitocina invierte tanto la LTP en las neuronas DA del VTA como la conducta social en las crías MHFD. A continuación se consideró si el tratamiento con *L. reuteri*, que restablece la sociabilidad y la preferencia por la novedad social en las crías MHFD (FIGS. 4B, 4C y 4E), también recuperaría la interacción social recíproca y los cambios relacionados en la fortaleza sináptica en el VTA. La *L. reuteri* viva (FIGS. 5H y 5J), pero no la termoinactivada (FIGS. 5I y 5K), recuperó la LTP inducida por la interacción con desconocidos en el VTA, así como las interacciones sociales recíprocas, en las crías MHFD (FIG. 5L). Por lo tanto, *L. reuteri* restablece la LTP inducida por la interacción social en el VTA de crías MHFD.

Estos hallazgos, junto con el hecho de que el tratamiento con *L. reuteri* aumentó la inmunorreactividad de la oxitocina en los PVN de las crías MHFD (FIGS. 4I, 4J 4O y 4P), llevó a averiguar si la aplicación directa de oxitocina podría también revertir las deficiencias conductuales y electrofisiológicas características de las crías MHFD. Para caracterizar esto, se administró oxitocina por vía intranasal (un método preferido para administrar neuropéptidos al cerebro evitando procedimientos más invasivos (Penagarikano *et al.*, 2015)) a las crías MHFD, y se midieron las interacciones sociales recíprocas 30 min después. Aunque la oxitocina sola o la interacción social sola no lograron recuperar la LTP inducida por la interacción social en el VTA, la combinación de interacción social y tratamiento con oxitocina restableció la LTP en el VTA de las crías MHFD (FIGS. 6A y 6B), lo que respalda trabajos anteriores que implican un efecto sinérgico de la oxitocina y la dopamina en el procesamiento de las señales socialmente relevantes (Modi y Young, 2012). Por consiguiente, el tratamiento con oxitocina mejoró la interacción social recíproca (FIGS. 6C, 6D, 22A y 22B), así como la sociabilidad y la preferencia por la novedad social (FIGS. 6E, 6F, 22C y 22D). Por lo tanto, la administración de oxitocina recupera la conducta social y las adaptaciones neuronales relacionadas en el VTA de las crías MH-FD.

En conjunto, los datos muestran que la MHFD deteriora las adaptaciones sinápticas mediadas por la oxitocina en el VTA que subyacen a las conductas sociales.

Importancia de ciertas realizaciones

La reconstitución precisa del microbioma posee un potencial terapéutico para los individuos con TEA y otros trastornos del neurodesarrollo. Una encuesta reciente del Center for Disease Control and Prevention estima que aproximadamente uno de cada 45 niños padece TEA (Zablotsky *et al.*, 2015). A pesar del aumento significativo de su incidencia, actualmente no existen medicamentos que puedan curar el TEA o tratar los síntomas primarios. Por lo tanto, el desarrollo de nuevas estrategias de tratamiento reviste una importancia crucial. Aunque tanto la genética como el ambiente y sus interacciones, son sospechosos de causar el TEA, los factores ambientales pueden explicar una gran proporción de los casos de TEA (Hallmayer *et al.*, 2011). Sorprendentemente, el aumento de la prevalencia del TEA es un reflejo del aumento de la obesidad en el adulto. Esto representa un importante problema de salud, ya que más de la mitad de los bebés estadounidenses nacen de madres obesas o expuestas a una dieta rica en grasas (HFD) durante el embarazo (Ogden *et al.*, 2014) y cada vez hay más pruebas de que la obesidad materna aumenta el riesgo de trastornos neuropsiquiátricos en la descendencia, incluyendo el TEA (Devereux *et al.* 2012; Sullivan *et al.*, 2014). De hecho, un estudio reciente descubrió que las madres con obesidad tenían 1,5 veces más probabilidades de tener un hijo con TEA, y el aumento del riesgo de hijos con TEA era dos veces mayor en el caso de las madres embarazadas con obesidad y diabetes del embarazo (Connolly *et al.*, 2016). Aunque la mayor parte de la atención en este campo se ha centrado en la inflamación (Bolton y Bilbo, 2014) o en los cambios epigenéticos (Mathers y McKay, 2009), el mecanismo biológico por el que la obesidad materna afecta al neurodesarrollo de la descendencia sigue sin estar claro. Aquí se demuestra que la disfunción conductual asociada a la obesidad inducida por una MHFD está inducida por alteraciones en la microbiota intestinal de las crías. Varias pruebas respaldarían esta idea. En primer lugar, los individuos con diagnóstico de TEA suelen presentar también disbiosis de la microbiota intestinal (Kohane *et al.*, 2012; Mayer *et al.*, 2014; Parracho *et al.*, 2005). En segundo lugar, la obesidad materna provoca alteraciones en el microbioma intestinal de las crías en seres humanos y en primates no humanos (Galley *et al.*, 2014; Ma *et al.*, 2014). En tercer lugar, en ratones, la microbiota intestinal de las crías MHFD está alterada (FIGS. 1A-1J) por la reducción de especies bacterianas específicas (FIG. 7). En cuarto lugar, la manipulación de la comunidad del microbioma mediante el alojamiento conjunto de crías MHFD con crías MRD recupera las deficiencias sociales inducidas por la MHFD y corrige su perfil filogenético microbiano (FIGS. 2A-2G). En quinto lugar, los ratones GF están socialmente deteriorados y la microbiota fecal trasplantada de crías MRD (pero no MHFD) recupera la conducta social GF (FIGS. 3A-3L). Finalmente, el tratamiento con una sola especie bacteriana, *L. reuteri*, que está drásticamente reducida en las crías MHFD (FIG. 7), restablece la conducta social en los ratones MHFD (FIG. 4A-4P).

En realizaciones específicas, existe un modelo en el que *L. reuteri* mejora la conducta social al fomentar las funciones mediadas por la oxitocina. De manera coherente con este modelo, el tratamiento con *L. reuteri* aumenta los niveles de oxitocina en los PVN de los ratones MHFD (FIGS. 4I y 4J) y el tratamiento directo con oxitocina normaliza la conducta social de los MHFD (FIGS. 6A-6F). En realizaciones específicas, *L. reuteri* fomenta la oxitocina en el cerebro porque el nervio vago (Davari *et al.*, 2013; Foster y McVey Neufeld, 2013) es la principal vía de comunicación entre el intestino/*L. reuteri* y los cambios en la oxitocina de los PVN. Se sabe que las fibras nerviosas vagales proyectan en los PVN (Sabatier *et al.*, 2013; Uvnas-Moberg *et al.*, 2014). Además, la actividad neuronal en los PVN inducida por la colonización bacteriana se bloquea mediante una vagotomía subdiafragmática (Wang *et al.*, 2002). Especialmente relevantes son los informes de que el aumento de oxitocina mediado por *L. reuteri* depende del nervio vago (Poutahidis *et al.*, 2013), y de que otra especie de *Lactobacillus*, *L. rhamnosus*, redujo la ansiedad inducida por el estrés de una forma dependiente del vago (Bravo *et al.*, 2011).

Los resultados aportan nuevos conocimientos sobre el mecanismo por el que la MHFD causa el TEA y cómo un cambio notable en la ecología microbiana, debido a la MHFD, puede afectar negativamente a la conducta social y a los cambios neuronales relacionados en las crías. Estas adaptaciones neuronales, que subyacen a la conducta social aumentando la prominencia y el valor de recompensa de los estímulos sociales, se ven sorprendentemente perjudicadas por los cambios inducidos por la dieta materna en el microbioma intestinal (FIGS. 5A-5L). De manera interesante, de acuerdo con un artículo reciente, el restablecimiento de la permeabilidad intestinal a base de probióticos en un modelo de ratón de TEA puede mejorar algunas conductas similares al TEA, pero no las conductas sociales

(Hsiao *et al.*, 2013). Dado que los inventores identificaron un candidato probiótico diferente, *L. reuteri*, que recupera la conducta social (FIGS. 4A-4P y 5A-5L), pero no otras conductas similares al TEA (FIGS. 18A-18B y 19A-19F) en ratones MHFD, en realizaciones específicas, una combinación cuidadosamente seleccionada de probióticos es útil como tratamiento no invasivo para los millones de pacientes que padecen TEA.

5

EJEMPLO 2

EJEMPLOS DE MATERIALES Y MÉTODOS

10 **Ratones y dieta materna.** Los ratones C57Bl6/J se obtuvieron en Jackson Laboratories (#000-664) y se mantuvieron en un ciclo de luz/oscuridad de 12 h y tuvieron acceso a comida y agua a voluntad. Las hembras fueron sometidas a una dieta normal (DR) consistente en un 13,4 % de kcal procedentes de grasas, un 30 % de kcal procedentes de proteínas y un 57 % de kcal procedentes de hidratos de carbono (Lab Diets, nº 5001) o a una dieta rica en grasas (HFD) consistente en un 60 % de kcal procedentes de grasas, un 20 % de kcal procedentes de proteínas y un 40 %
15 de kcal procedentes de hidratos de carbono (Research Diets, #D12492). El peso materno se midió semanalmente. La masa total y la masa grasa maternas se midieron con un analizador de la composición corporal por RMN mq7.5 Minispec. Después de ocho semanas de dieta, las hembras se aparearon con machos adultos C57Bl6/J para producir las crías en cuestión. Las crías resultantes fueron destetadas a las tres semanas de edad y todas se colocaron en RD, independientemente de la dieta materna (MRD o MHFD). Los ratones asépticos (C57Bl6/J) se mantuvieron en un
20 aislador flexible con aire filtrado por HEPA, y se les proporcionó comida y agua irradiadas. Las crías asépticas fueron destetadas a las cuatro semanas de edad. Todas las pruebas conductuales se realizaron en ratones macho de 7-12 semanas de edad.

El cuidado de los animales y los procedimientos experimentales fueron aprobados por el Baylor College of Medicine's
25 Institutional Animal Care and Use Committee de acuerdo con todas las directrices establecidas por el Instituto Nacional de Ciencias de la Salud de EE.UU. Interacción social recíproca. Los ratones se colocaron en una arena de plexiglás de 25x25x25 cm, a la que no habían sido habituados previamente, con un congénere familiar (compañero de jaula) o desconocido emparejado por edad y sexo. En todos los experimentos, los ratones se emparejaron por pares para la dieta materna, la fuente de colonización y/o el tratamiento. Registramos el tiempo que una pareja de ratones
30 participaba en una interacción social (seguimiento cercano, tocamientos, olfateo de nariz con nariz, olfateo de nariz con ano y/o arrastre por encima/debajo del otro). El observador humano no conocía la dieta materna ni el grupo de tratamiento. La conducta social se analizó con el programa informático automatizado AnyMaze.

Prueba social de tres cámaras. La prueba de tres cámaras de Crawley para la sociabilidad y la preferencia por la
35 novedad social se realizó como se describe (Silverman *et al.*, 2010). En resumen, el ratón experimentó en primer lugar un periodo de habituación de 10 minutos durante el cual se le permitió explorar libremente una arena de plexiglás de 60x40x23 cm dividida en tres cámaras interconectadas de igual tamaño, (izquierda, centro, derecha). La sociabilidad se midió durante un segundo periodo de diez minutos en el que el sujeto podía interactuar bien con una cúpula vacía de hilo metálico (Vacío) o bien con una cúpula de hilo metálico que contenía un congénere desconocido de su misma
40 edad y sexo (Ratón 1). El tiempo dedicado a interactuar (olfatear, arrastrarse) con la cúpula vacía o con el ratón desconocido contenido en la otra cúpula, así como el tiempo pasado en cada cámara, fue registrado utilizando el programa informático AnyMaze, por observadores independientes. La colocación de cúpulas vacías en la cámara izquierda o derecha durante el periodo de sociabilidad se equilibró entre ensayos. Finalmente, la preferencia por la
45 novedad social se ensayó introduciendo un segundo ratón desconocido (Ratón 2) en la cúpula de hilo metálico previamente vacía. El tiempo pasado en cada cámara, así como el tiempo pasado interactuando con el Ratón 1 o el Ratón 2, fue registrado utilizando el programa informático automatizado AnyMaze por observadores independientes.

Enterramiento de canicas. El enterramiento de canicas se realizó como se describió anteriormente (Komai *et al.*, 2009). En resumen, se colocó a los ratones en una jaula de tamaño convencional que contenía 20 canicas negras
50 separadas periódicamente y asentadas sobre un lecho de virutas de madera fina de 5 cm de profundidad. Después de 20 minutos, se retiró el ratón y se contaron como enterradas las canicas con al menos dos tercios de su profundidad ocultos por las virutas de madera.

Campo abierto. Los ratones se colocaron en una arena abierta (40x40x20 cm) y se les permitió explorar libremente
55 durante 10 minutos mientras se controlaba continuamente su posición mediante un programa informático de seguimiento (ANY-Maze). El seguimiento permitió medir la distancia recorrida, la velocidad y la posición en la arena durante toda la tarea. Se registró el tiempo pasado en el centro de la arena, definido como el interior de 20x20 cm.

Secuenciación del gen del ARNr 16S. Los métodos se adaptaron a partir de los métodos desarrollados para el NIH-
60 Human Microbiome Project (Human Microbiome Project, 2012a, b). En resumen, el ADN genómico bacteriano se extrajo utilizando el kit de aislamiento de ADN MO BIO PowerSoil (Laboratorios MO BIO). La región V4 del ARNr 16S se amplificó mediante una PCR y se secuenció en la plataforma MiSeq (Illumina) utilizando el protocolo de 2x250 pb de extremos pareados que produce lecturas de extremo pareado que se solapan casi por completo. Los cebadores utilizados para la amplificación contienen adaptadores para la secuenciación MiSeq y códigos de barras de un solo
65 extremo que permiten la agrupación y secuenciación directa de los productos de la PCR (Caporaso *et al.*, 2012). Los pares de lecturas del gen del ARNr 16S se desmultiplexaron tomando como base los códigos de barras moleculares

únicos, y las lecturas se fusionaron utilizando USEARCH v7.0.1090 (Edgar, 2010), permitiendo cero discrepancias y un solapamiento mínimo de 50 bases. Las lecturas fusionadas se recortaron en la primera base con Q5. Se aplicó un filtro de calidad a las lecturas fusionadas resultantes. Se descartaron las lecturas que contenían más de 0,05 errores esperados. Las secuencias del gen del ARNr 16S se agruparon en unidades taxonómicas operativas (OTU) con un valor de corte de similitud del 97 % mediante el algoritmo UPARSE (Edgar, 2013). Las OTU se cartografiaron a una versión optimizada de la base de datos SILVA (Quast *et al.*, 2013) que contenía únicamente la región v4 de 16S para determinar las taxonomías. Las abundancias se recuperaron cartografiando las lecturas desmultiplexadas a las OTU UPARSE. Una secuencia de órdenes personalizada construyó una tabla de OTU enrarecidas a partir de los archivos de salida generados en las dos etapas anteriores para los posteriores análisis de la diversidad alfa, la diversidad beta (Lozupone y Knight, 2005) y las tendencias filogenéticas.

Secuenciación indiscriminada del genoma completo. Las bibliotecas individuales construidas a partir de cada muestra se cargaron en la plataforma HiSeq (Illumina) y se secuenciaron utilizando el protocolo de lectura de extremos pareados de 2x100 pb. Se construyeron bibliotecas Illumina de extremos pareados a partir del ADN genómico total aislado a partir de cada muestra. El ADN se cizalló en fragmentos de aproximadamente 400-600 pb, seguido de la unión de adaptadores Illumina que contenían códigos de barras moleculares para el desmultiplexado posterior. A continuación, estos productos se amplificaron mediante una PCR mediada por unión (LM-PCR) utilizando la ADN polimerasa KAPA HiFi (Kapa Biosystems, Wilmington, MA, EE.UU.). Tras la purificación de las microesferas con Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter, Brea, CA, EE.UU.), se determinó la cuantificación y la distribución por tamaños del producto de la LM-PCR utilizando el sistema de electroforesis LabChip GX (PerkinElmer, Akron, OH, EE.UU.). Las bibliotecas se agruparon en cantidades equimolares a razón de 6 muestras por grupo y se prepararon para la secuenciación con el kit TruSeq PE Cluster Generation (Illumina). Cada agrupación de bibliotecas se cargó en un carril de una celda de flujo HiSeq 2000 enriquecido con una biblioteca de control PhiX al 1 %. Los archivos de secuenciación se desmultiplexaron con CASAVA versión 1.8.3 (Illumina).

se filtraron por calidad, se recortaron, y la desmultiplexación se llevó a cabo mediante un conducto personalizado que contenía Trim Galore (Krueger, 2014) y cutadapt (Martin, 2011) para el recorte de adaptadores y de calidad, y PRINSEQ (Schmieder y Edwards, 2011) para el filtrado de baja complejidad y la deduplicación de secuencias. Además, se utilizó Bowtie2 v2.2.1 (Langmead y Salzberg, 2012) para cartografiar las lecturas a marcadores MetaPhlAn para la clasificación de las especies bacterianas (Segata *et al.*, 2012).

Colonización de ratones asépticos mediante un trasplante de microbiota fecal. Se recogieron muestras fecales recientes de ratones donantes/cohorta de microbioma y se homogeneizaron en hielo en PBS estéril en condiciones estériles. La suspensión resultante se centrifugó a 1000 g durante tres minutos a 4 °C. Los sobrenadantes se aislaron y se diluyeron a 5×10^9 UFC/ml en PBS estéril. A continuación, se colonizaron inmediatamente ratones receptores C57Bl6/J asépticos (GF) de cuatro u ocho semanas de edad mediante una única alimentación forzada con 0,2 ml de solución. Se recogieron muestras fecales de los ratones GF colonizados a las 24 h, 7d, 14d, 28d y 56d tras la colonización. Las muestras fecales se congelaron instantáneamente y se almacenaron a -80 °C hasta que se prepararon para la secuenciación. Los experimentos conductuales se iniciaron tres semanas después del trasplante.

Cultivo y tratamiento con *L. reuteri* y *L. johnsonii*. Se cultivaron *Lactobacillus reuteri* MM4-1A (ATCC-PTA-6475) y *Lactobacillus johnsonii* (ATCC 33200) anaeróbicamente en caldo MRS en un ambiente con un 90 % de N₂, un 5 % de CO₂, un 5 % de H₂. *L. reuteri* se termoinactivó manteniendo las bacterias a 80 °C durante 20 minutos (Wang *et al.*, 2010). La viabilidad bacteriana se evaluó mediante una siembra en placas y la eficacia del procedimiento de termoinactivación se confirmó por la ausencia de crecimiento de colonias tras la siembra en placas. Los cultivos se centrifugaron, se lavaron y se resuspendieron en solución anaerobia (PBS) y se congelaron a -80 °C hasta su uso. Se añadieron al agua de bebida PBS, *L. reuteri* viva o termoinactivada, que se cambiaba diariamente para minimizar la variabilidad de la dosis. Mientras que el grupo experimental recibió bacterias vivas, un grupo de control recibió cultivos preparados idénticamente de bacterias termoinactivadas. Un segundo grupo de ratones de control recibió agua tratada únicamente con PBS. Se suministraron *L. reuteri* vivas y termoinactivadas a una dosis de 1×10^8 organismos/ratón/día de forma continua en el agua de bebida. Los ratones consumieron el agua tratada a voluntad durante el periodo de tratamiento. El agua de bebida tratada de cada grupo se sustituyó diariamente dos horas antes del inicio del ciclo de oscuridad para minimizar la variación en la exposición microbiana. Los ensayos conductuales se iniciaron tras 4 semanas de tratamiento con *L. reuteri* o con el control. El protocolo de preparación y administración de *L. johnsonii* coincidía con el protocolo de *L. reuteri*. Las muestras fecales para la secuenciación y el tejido utilizado en los estudios de inmunofluorescencia se recogieron al final del tratamiento.

Inmunofluorescencia. Los ratones se anestesiaron profundamente por inhalación de isoflurano y se perfundieron transcardiacamente con 10 ml de solución salina tamponada con fosfato al 0,9 % seguida de 30 ml de paraformaldehído al 4 % en tampón de fosfato 0,1 M (PFA). Los cerebros se posfijaron en PFA al 4 % a 4 °C durante toda la noche, a continuación se crioprotegieron con sacarosa al 30 % en PB 0,1 M durante tres días. Se obtuvieron cortes frontales (de 30 µm de grosor) del tejido congelado utilizando un micrótopo de cuchilla deslizante, a continuación se transfirieron a PBS helado. Los cortes se bloquearon con suero de cabra normal al 5 %, Triton X-100 al 0,3 %, PB 0,1 M (PBTgs) durante 1 h con agitación a la TA, y a continuación se incubaron en anticuerpos primarios (anti-oxitocina de conejo, ImmunoStar #20068, 1:2000; anti-NeuN de ratón, Millipore, #MAB377, 1:2000) diluidos en PBTgs con agitación a 4 °C durante 24 h. A continuación, los cortes se lavaron tres veces con Triton X-100 al 0,3 %

en PB 0,1 M. Los anticuerpos primarios se visualizaron utilizando anticuerpos secundarios de cabra anti-conejo Alexa Fluor® 488 (ThermoFisher Scientific, #A-11034) y de cabra anti-ratón Alexa Fluor® 594 (ThermoFisher Scientific, #A-11032) (dilución 1:1000). Los cortes se incubaron en anticuerpos secundarios con agitación en la oscuridad durante 1 h a la TA. Unos lavados finales de cinco minutos con cada uno de los PBTgs, en PB 0,1 M y PB 0,05 M, precedieron al montaje en cubreobjetos recubiertos de gelatina al 2 % (Sigma-Aldrich, #G9391). Los núcleos se visualizaron utilizando Vectashield H-1200 con DAPI (Vector Labs, #H-1200). La obtención de imágenes fluorescentes y la adquisición de datos se realizaron con un microscopio Zeiss Axiomager.Z2 (Car Zeiss MicroImaging) montado con una cámara digital AxioCam (Carl Zeiss MicroImaging). Las imágenes se capturaron utilizando el programa informático de adquisición Axio-Vision (Carl Zeiss MicroImaging). Todas las imágenes dentro de un conjunto de datos dado se adquirieron con unos tiempos de exposición idénticos, dentro de un canal dado, para permitir la comparación de la intensidad de la señal. En algunas imágenes, el contraste y el brillo se ajustaron linealmente con Photoshop (Adobe). El procesamiento de imágenes se aplicó uniformemente a todas las imágenes dentro de un conjunto de datos dado. La intensidad de la fluorescencia se midió en ImageJ (NIH) seleccionando las regiones de interés (cuerpos celulares hipotalámicos positivos para oxitocina y NeuN). La población neuronal hipotalámica que expresa oxitocina y el número de células NeuN+ se evaluó en las imágenes utilizando la siguiente secuencia operativa: (1) abrir el archivo de imagen, (2) restar el fondo, (3) ajustar el umbral, (4) convertir en plantilla, (5) zona marginal, (6) analizar las partículas. La identificación automática de los límites celulares fue validada frente a la imagen de origen por un experimentador desconocedor de la asignación de grupos.

Administración de oxitocina. La oxitocina se obtuvo en Tocris Bioscience (producto 1910) y se solubilizó en dimetilsulfóxido (DMSO) al 10 % en PBS. Se usó DMSO al 10 % en PBS como vehículo de control. Los ratones recibieron oxitocina por vía intranasal (aproximadamente a 200 µg/kg) treinta minutos antes de la conducta. Se inyectaron 1,25 µl de oxitocina o de solución de vehículo en cada fosa nasal con la pipeta P10. La dosis de oxitocina se seleccionó de acuerdo con las dosis notificadas para recuperar la conducta social en modelos genéticos que expresan fenotípicamente conductas similares al TEA (Penagarikano *et al.*, 2015).

Electrofisiología. Los registros se realizaron como se ha descrito anteriormente (Ungless *et al.*, 2001; Zhu *et al.*, 2011) y los investigadores se mantuvieron desconocedores de las condiciones de tratamiento. En resumen, los ratones se anestesiaron con una mezcla de ketamina (100 mg/kg), xilacina (10 mg/kg) y acepromazina (3 mg/kg). Se realizaron cortes horizontales (225-300 µm de grosor) que contenían el VTA de los cerebros de los ratones C57BL/6J. Los ratones se perfundieron transcardiacamente con una solución oxigenada helada que contenía (en mM) NaCl, 87; NaHCO₃, 25; KCl, 2,5; NaH₂PO₄, 1,25; MgCl₂, 7; CaCl₂, 0,5; glucosa, 25; sacarosa, 75. Los cortes horizontales se realizaron con una cortadora de tejidos vibratoria (VF-100 Compressstome, Precisionary Instruments, San José, CA o Leica VT 1000S, Leica Microsystems, Buffalo Grove, IL), se incubaron a 34 °C durante 40 min, se mantuvieron a la temperatura ambiente durante al menos 30 minutos antes de transferirlos a una cámara de registro perfundida de forma continua con líquido cefalorraquídeo artificial (ACSF) a 32 °C y un caudal de 2-3 ml/min. El ACSF de registro contenía (en mM): NaCl 120, KCl 3,3, NaH₂PO₄ 1,25, NaHCO₃ 25, glucosa 10, MgCl₂ 1 y CaCl₂ 2. Las pipetas de registro se fabricaron con vidrio de borosilicato de paredes finas (TW150F-4, WPI, Sarasota, FL). Tras el llenado con solución intracelular (en mM): CsMeSO₃ 117; EGTA 0,4; HEPES 20; NaCl 2,8, ATP 2,5-Mg 2,0; GTP-Na 0,25; TEA-Cl 5, se ajustó a pH 7,3 con CsOH y 290 mosmol/l, tenían una resistencia de 3-5 MS₂. Los datos se obtuvieron con un amplificador MultiClamp 700B, se digitalizaron a 20 kHz con un Digidata 1440A, se registraron mediante un Clampex 10 y se analizaron con el programa informático Clampfit 10 (Molecular Devices). Las grabaciones se filtraron en línea a 3 kHz con un filtro de paso bajo de Bessel. Se aplicó un pulso hiperpolarizante de 2 mV antes de cada EPSC para evaluar la resistencia de entrada y de acceso (Ra). Los datos se descartaron cuando Ra era inestable o superior a 25MS₂, la corriente de mantenimiento era >200 pA, la resistencia de entrada disminuyó >20 % durante el registro o la situación inicial de las EPSC cambió >10 %. Tras establecer un sellado de gigaohmios (>2GS₂) y registrar disparos espontáneos estables en modo de pinza de voltaje acoplada a la célula (potencial de mantenimiento de -70 mV), se determinó el fenotipo celular midiendo la amplitud del potencial de acción y la presencia de una corriente Ih. Las relaciones AMPAR/NMDAR se calcularon como se ha descrito anteriormente (Ungless *et al.*, 2001). En resumen, se realizó un pinzamiento de voltaje de las neuronas a +40 mV hasta que la corriente de mantenimiento se estabilizó (a <200 pA). Se provocaron EPSC monosinápticas a 0,05 Hz con un electrodo de estimulación bipolar colocado 50-150 µm por encima del VTA lateral. Se añadió picrotoxina (100 µM) al ACSF de registro para bloquear las IPSC mediadas por GABARA. Después de registrar la EPSC de doble componente, se aplicó un baño de DL-AP5 (100 µM) durante 10 min para eliminar el componente NMDAR, que se obtuvo a continuación por la resta fuera de línea del componente AMPAR restante de la EPSC original. Las amplitudes máximas de los componentes aislados se utilizaron para calcular las relaciones AMPAR/NMDAR. La picrotoxina y la DL-AP5 se adquirieron en Tocris Bioscience, y todos los demás reactivos se obtuvieron en Sigma-Aldrich.

Análisis estadístico. Los datos se presentan como la media ± EEM. Para los experimentos conductuales, las estadísticas se basaron en las pruebas de la *t* de Student bilaterales para datos independientes, ANOVA uni- o bifactorial con un análisis *a posteriori* de Bonferroni para corregir las comparaciones múltiples, a menos que se indique otra cosa. *P*, *t* y los valores *F* se presentan en las leyendas de las figuras, los valores de *n* se proporcionan en las figuras. *p*<0,05 se consideró significativo. **P*<0,05, ***P*<0,01, ****P*<0,001, *****P*<0,0001. Se utilizó el programa informático Prism 6 de GraphPad (La Jolla, CA) para realizar los análisis estadísticos y para generar las representaciones gráficas de los datos. Para la secuenciación del gen del ARNr 16S, el análisis y la visualización de las comunidades del microbioma se realizaron con RStudio 0.99.292 [http://www.R-project.org/ (2014)], utilizando el

paquete phyloseq (McMurdie y Holmes, 2013) para importar los datos de las muestras y calcular las métricas de diversidad alfa y beta. Los datos de la secuenciación del gen del ARNr 16S se analizaron utilizando Silva 115 y 123 (Quast *et al.*, 2013). Los análisis se realizaron en conjuntos de datos enrarecidos 1000 veces, a continuación se promediaron y se redondearon. Las secuencias de amplicón se depositaron en el NCBI Sequence Read Archive con el número de registro TBD. El modelado de mezclas polinomiales de Dirichlet se realizó en madre (Schloss *et al.*, 2009). La importancia de las variables cualitativas se determinó mediante la prueba no paramétrica de Mann-Whitney para las comparaciones de dos categorías, o la prueba de Kruskal-Wallis cuando se comparaban tres o más categorías. Se realizó un ANOVA unifactorial seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett utilizando GraphPad's Prism 6. La correlación entre dos variables continuas se determinó mediante regresiones lineales, donde los valores de P indican la probabilidad de que la pendiente de la línea de regresión sea cero. En los gráficos de coordenadas principales se empleó la prueba de permutación de Monte Carlo para estimar los valores de P. Todos los valores de P se ajustaron para comparaciones múltiples con el algoritmo FDR (Benjamini *et al.*, 2001). El tamaño de la muestra se basó en la bibliografía publicada (Argilli *et al.*, 2008; Caporaso *et al.*, 2012; Chung *et al.*, 2015; Gkogkas *et al.*, 2013). No se excluyeron animales ni puntos de datos de los análisis.

EJEMPLO 3

EL TRATAMIENTO CON *L. REUTERI* RESTABLECE LAS CONDUCTAS SOCIALES EN MODELOS GENÉTICOS Y AMBIENTALES DEL TEA

A. El tratamiento con *L. reuteri* recupera la conducta social en ratones asépticos. Anteriormente hemos demostrado que el tratamiento con *L. reuteri* invierte las deficiencias en la conducta social en ratones MHFD. Sin embargo, actualmente se desconoce si una sola especie (*L. reuteri*) es directamente responsable del restablecimiento del fenotipo de conducta social en las crías MHFD o si el efecto de *L. reuteri* es indirecto al alterar o cambiar la actividad y/o el ecosistema bacteriano que son responsables del cambio biológico resultante en la conducta. Para distinguir entre estas dos posibilidades, tratamos ratones asépticos (GF) con *L. reuteri*, como hemos descrito anteriormente. De acuerdo con nuestros resultados anteriores, en comparación con los ratones colonizados convencionalmente, los ratones GF muestran conductas sociales deterioradas (**Fig. 23A**). De manera interesante, el tratamiento con *L. reuteri* fue suficiente para restablecer las deficiencias en la conducta social en los ratones GF (**Figs. 23A-23B**). Dado que los ratones GF están desprovistos, por definición, de cualquier bacteria o microbio, nuestros datos sugieren que el efecto de *L. reuteri* sobre la conducta social es directo (no está mediado por otra bacteria o microbio). Por lo tanto, el tratamiento con *L. reuteri* restablece las conductas sociales tanto en las crías MHFD como en los ratones GF.

B. El tratamiento con *L. reuteri* recupera las conductas sociales en un modelo genético de ratón de TEA. Para analizar si el tratamiento con *L. reuteri* podría restablecer las conductas similares al TEA en modelos genéticos de TEA, estudiamos ratones que carecían de la proteína similar asociada a la contactina 2 (CNTNAP2). Las mutaciones en la CNTNAP2 se han asociado a formas sindrómicas de TEA (Nascimento, *et al.*, 2016; Yoo, *et al.*, 2017; Zare, *et al.*, 2017; el-Sobky, *et al.*, 2004; Alarcon, *et al.*, 2008; Sampath, *et al.*, 2013; Chiocchetti, *et al.*, 2015), sirviendo así como modelo genético del autismo en ratones. En segundo lugar, los ratones que carecen de *Cntnap2* muestran conductas similares al TEA (Penagarikano, *et al.*). En tercer lugar, la oxitocina recupera las anomalías de la conducta social en ratones que carecen de *Cntnap2* (Penagarikano, *et al.*, 2015; Penagarikano, *et al.*, 2011). Como se ha descrito anteriormente (Seror *et al.*, 2015; Penagarikano, *et al.*, 2011), también descubrimos que los ratones que carecen de la CNTNAP2 muestran una conducta social deficitaria, como se demuestra por el deterioro de la sociabilidad y la novedad social (Figs. 24A-24B). Notablemente, descubrimos que el tratamiento con *L. reuteri* invierte las anomalías de la conducta social en ratones deficientes en *Cntnap2* (Figs. 24C-24D).

En resumen, hemos demostrado que a) la oxitocina restablece la conducta social en ratones deficientes en *Cntnap2* y b) *L. reuteri* fomenta la producción de oxitocina en los PVN y recupera las conductas sociales en crías MHFD, y c) *L. reuteri* invierte las conductas sociales en un modelo genético de ratón de TEA. Considerados en conjunto, nuestros datos respaldan la idea de que el tratamiento con *L. reuteri* recupera las conductas sociales en modelos de TEA ambientales (crías MHFD y ratones GF) y genéticos (ratones deficientes en *Cntnap2*), y tomados junto con nuestras descripciones previas de las relaciones entre la disfunción social, los niveles de oxitocina y muchas otras afecciones neurológicas, el uso de la terapia con *L. reuteri* puede considerarse un enfoque terapéutico más general si se dosifica y administra (bacterias vivas o extractos o lisados especialmente preparados) de forma eficaz.

EJEMPLO 4

TRATAMIENTO O PREVENCIÓN DE TRASTORNOS DEL NEURODESARROLLO, NEURODEGENERATIVOS Y PSIQUIÁTRICOS

En realizaciones particulares, la presente divulgación se refiere a trastornos del neurodesarrollo y psiquiátricos: Además de los trastornos del neurodesarrollo, la presente divulgación incluye afecciones médicas en las que el sistema oxitocinérgico es disfuncional, incluyendo el síndrome de Williams, el síndrome de Prader-Willi y el síndrome del cromosoma X frágil, por ejemplo (Francis, *et al.*, 2014). Además, en realizaciones particulares, el direccionamiento al sistema de la oxitocina a través de la administración de *L. reuteri* es útil para tratar conductas adictivas, incluyendo

trastornos de la alteración, drogadicción, trastorno bipolar y esquizofrenia, por ejemplo (Cochran, *et al.*, 2013; MacDonald, *et al.*, 2014; McQuaid, *et al.*, 2014; Sarnyai, *et al.*, 2014; Kirsch, *et al.*, 2015; Perez-Rodriguez, *et al.*, 2015; Rice, *et al.*, 2015; Romano, *et al.*, 2015; Zik, *et al.*, 2015; Brambilla, *et al.*, 2016; Bukovskaya, *et al.*, 2016; Lee, *et al.*, 2016; Quintana, *et al.*, 2017).

En realizaciones específicas, se administra una cantidad eficaz de *L. reuteri* a un individuo con o en riesgo de depresión. La depresión es uno de los trastornos psiquiátricos más habituales. Provoca síntomas graves que afectan a cómo uno se siente, piensa y se ocupa de las actividades cotidianas, tales como dormir, comer o trabajar. De manera interesante, la disminución de los niveles de oxitocina podría aumentar el riesgo de depresión, en particular la depresión puerperal (McQuaid, *et al.*, 2014; Arletti, *et al.*, 1987; Papp, *et al.*, 2000; Matsushita, *et al.*, 2010; Loyens, *et al.*, 2013; Moura, *et al.*, 2016; Amini-Khoei, *et al.*, 2017). Dado que *L. reuteri* fomenta la producción de oxitocina, en realizaciones particulares, *L. reuteri* es útil en el tratamiento de los principales trastornos depresivos.

En realizaciones particulares, drogadicción, enfermedad de Parkinson y trastornos compulsivos con alteración del sistema de recompensa dopaminérgico. Los inventores han demostrado que *L. reuteri* fomenta la actividad de las neuronas dopaminérgicas en un área clave de la recompensa. En la adicción, donde hay una conducta compulsiva de refuerzo (gratificante) y hay una pérdida de control en la limitación de la ingesta, las vías de recompensa dopaminérgicas están alteradas. En realizaciones específicas, *L. reuteri* es útil para el tratamiento de afecciones en las que el sistema dopaminérgico y de recompensa están suplantados, incluyendo la drogadicción (Hyman, *et al.*, 2006), la obesidad y la ingesta de alimentos (Kenny, *et al.*, 2011; Blum, *et al.*, 2014), la enfermedad de Parkinson y otras conductas adictivas, tales como ludopatía (Fenu, *et al.*, 2009; Matsumoto, *et al.*, 2015), por ejemplo.

En ciertas realizaciones, la presente divulgación mejora la función cognitiva social, tal como con trastornos neurodegenerativos. El deterioro cognitivo social, que puede conducir a una baja calidad de vida, problemas de salud mental y soledad (Kennedy, *et al.*, 2012), puede ser importante tras un daño cerebral agudo (por ejemplo), tal como una traumatismo craneoencefálico o un accidente cerebrovascular, y en realizaciones específicas, representa una característica esencial de las primeras fases de algunos trastornos neurológicos crónicos, tales como la demencia frontotemporal, la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson (Beer, *et al.*, 2006; Henry, *et al.*, 2016). Además, la oxitocina y la dopamina son fundamentales para la formación de la memoria social (Ferguson, *et al.*, 2000; Gonzalez-Burgos, *et al.*, 2008; Shamay-Tsoory, *et al.*, 2016). Dado que los inventores determinaron que *la L. reuteri* fomenta la producción de oxitocina y la plasticidad sináptica mediada por dopamina, dos sistemas que están secuestrados en los trastornos que presentan problemas de capacidad intelectual social (Rudelli, *et al.*, 1984; Gibb, *et al.*, 1989; Braak, *et al.*, 1990; Selden, *et al.*, 1994; Burns, *et al.*, 2005; Ross, *et al.*, 2009; Borroni, *et al.*, 2010; Finger, *et al.*, 2011; Tampi, *et al.*, 2017), esta especie bacteriana es útil para el tratamiento de la memoria social y la función cognitiva en trastornos neurológicos y neurodegenerativos.

El tratamiento con *L. reuteri* recupera la conducta social en ratones asépticos. Los inventores han demostrado previamente que el tratamiento con *L. reuteri* invierte las deficiencias en la conducta social en ratones MHFD. Sin embargo, actualmente se desconoce si una sola especie (*L. reuteri*) es directamente responsable del restablecimiento del fenotipo de conducta social en las crías MHFD o si el efecto de *L. reuteri* es indirecto al alterar o cambiar la actividad y/o el ecosistema bacteriano que son responsables del cambio biológico resultante en la conducta. Para distinguir entre estas dos posibilidades, los inventores trataron ratones asépticos (GF) con *L. reuteri*, como hemos descrito anteriormente. De acuerdo con nuestros resultados anteriores, en comparación con los ratones colonizados convencionalmente, Los ratones GF muestran conductas sociales deterioradas (FIGS. 23A-23B). De manera interesante, el tratamiento con *L. reuteri* fue suficiente para restablecer las deficiencias en la conducta social en los ratones GF (FIGS. 23A-23B). Dado que los ratones GF están desprovistos, por definición, de cualquier bacteria o microbio, nuestros datos sugieren que el efecto de *L. reuteri* sobre la conducta social es directo (no está mediado por otra bacteria o microbio). Por lo tanto, el tratamiento con *L. reuteri* restablece las conductas sociales tanto en las crías MHFD como en los ratones GF.

El tratamiento con *L. reuteri* recupera las conductas sociales en un modelo genético de ratón de TEA. Para analizar si el tratamiento con *L. reuteri* podría restablecer las conductas similares al TEA en modelos genéticos de TEA, los inventores estudiaron ratones que carecían de la proteína similar asociada a la contactina 2 (CNTNAP2). Las mutaciones en la CNTNAP2 se han asociado a formas sindrómicas de TEA (Nascimento *et al.*, 2016; Yoo *et al.*, 2017; Zare *et al.*, 2017; el-Sobky *et al.*, 2004; Alarcon *et al.*, 2008; Sampath *et al.*, 2013; Chiocchetti *et al.*, 2015), sirviendo de este modo como modelo genético de autismo en ratones. En segundo lugar, los ratones que carecen de *Cntnap2* muestran conductas similares al TEA (Penagarikano *et al.*, 2015). En tercer lugar, la oxitocina recupera las anomalías de la conducta social en ratones que carecen de *Cntnap2* (Penagarikano, *et al.*, 2015; Penagarikano *et al.*, 2011). Como se ha descrito anteriormente (Seror *et al.*, 2015; Penagarikano *et al.*, 2011), los ratones que carecen de la CNTNAP2 muestran un conducta social deficitaria, como se demuestra por el deterioro de la sociabilidad y la novedad social (FIGS. 24A-24B). Notablemente, el tratamiento con *L. reuteri* invierte las anomalías de la conducta social en ratones deficientes en *Cntnap2* (FIGS. 24C-24D).

En resumen, hemos demostrado que a) la oxitocina restablece la conducta social en ratones deficientes en *Cntnap2* y b) *L. reuteri* fomenta la producción de oxitocina en los PVN y recupera las conductas sociales en crías MHFD, y c) *L. reuteri* invierte las conductas sociales en un modelo genético de ratón de TEA. Considerados en conjunto, nuestros

datos respaldan la idea de que el tratamiento con *L. reuteri* recupera las conductas sociales en modelos de TEA ambientales (crías MHFD y ratones GF) y genéticos (ratones deficientes en *Cntnap2*), y tomados junto con nuestras descripciones previas de las relaciones entre la disfunción social, los niveles de oxitocina y muchas otras afecciones neurológicas, el uso de la terapia con *L. reuteri* puede considerarse un enfoque terapéutico más general si se dosifica y administra (bacterias vivas o extractos o lisados especialmente preparados) de forma eficaz.

REFERENCIAS

Alarcon, M., *et al.*, Linkage, association, and gene-expression analyses identify CNTNAP2 as an autism-susceptibility gene. *Am J Hum Genet*, 2008. 82 (1): págs. 150-9.

Amini-Khoei, H., *et al.*, Oxytocin mitigated the depressive-like behaviors of maternal separation stress through modulating mitochondrial function and neuroinflammation. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2017. 76: págs. 169-178.

Argilli, E., Sibley, D.R., Malenka, R.C., Inglatterra, P.M., y Bonci, A. (2008). Mechanism and time course of cocaine-induced long-term potentiation in the ventral tegmental area. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 28, 9092-9100.

Arletti, R. y A. Bertolini, Oxytocin acts as an antidepressant in two animal models of depression. *Life Sci*, 1987. 41 (14): págs. 1725-30.

Aye, I.L., Rosario, F.J., Powell, T.L., y Jansson, T. (2015). Adiponectin supplementation in pregnant mice prevents the adverse effects of maternal obesity on placental function and fetal growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112, 12858-12863.

Beer, J.S. y K.N. Ochsner, Social cognition: a multi level analysis. *Brain Res*, 2006. 1079 (1): págs. 98-105.

Benjamini, Y., Drai, D., Elmer, G., Kafkafi, N., y Golani, I. (2001). Controlling the false discovery rate in behavior genetics research. *Behavioural brain research* 125, 279-284.

Bilder, D.A., Bakian, A.V., Viskochil, J., Clark, E.A., Botts, E.L., Smith, K.R., Pimentel, R., McMahon, W.M., y Coon, H. (2013). Maternal prenatal weight gain and autism spectrum disorders. *Pediatrics* 132, e1276-1283.

Blum, K., P.K. Thanos y M.S. Gold, Dopamine and glucose, obesity, and reward deficiency syndrome. *Front Psychol*, 2014. 5: pág. 919.

Bolton, J.L., y Bilbo, S.D. (2014). Developmental programming of brain and behavior by perinatal diet: focus on inflammatory mechanisms. *Dialogues in clinical neuroscience* 16, 307-320.

Borroni, B., C. Costanzi y A. Padovani, Genetic susceptibility to behavioural and psychological symptoms in Alzheimer disease. *Curr Alzheimer Res*, 2010. 7 (2): págs. 158-64.

Braak, H. and E. Braak, Alzheimer's disease: striatal amyloid deposits and neurofibrillary changes. *J Neuropathol Exp Neurol*, 1990. 49 (3): págs. 215-24.

Brambilla, M., *et al.*, Effects of Intranasal Oxytocin on Long-Term Memory in Healthy Humans: A Systematic Review. *Drug Dev Res*, 2016. 77 (8): págs. 479-488.

Bravo, J.A., Forsythe, P., Chew, M.V., Escaravage, E., Savignac, H.M., Dinan, T.G., Bienenstock, J. y Cryan, J.F. (2011). Ingestion of *Lactobacillus* strain regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse via the vagus nerve. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 16050-16055.

Bukovskaya, O. y A. Shmukler, Oxytocin and Social Cognitions in Schizophrenia: A Systematic Review. *Psychiatr Q*, 2016. 87 (3): págs. 521-43.

Burns, J.M., *et al.*, White matter lesions are prevalent but differentially related with cognition in aging and early Alzheimer disease. *Arch Neurol*, 2005. 62 (12): págs. 1870-6.

Caporaso, J.G., Lauber, C.L., Walters, W.A., Berg-Lyons, D., Huntley, J., Fierer, N., Owens, S.M., Betley, J., Fraser, L., Bauer, M., *et al.* (2012). Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *The ISME journal* 6, 1621-1624.

Chiocchetti, A.G., *et al.*, Variants of the CNTNAP2 5' promoter as risk factors for autism spectrum disorders: a genetic and functional approach. *Mol Psychiatry*, 2015. 20 (7): págs. 839-49.

Chung, W., Choi, S.Y., Lee, E., Park, H., Kang, J., Park, H., Choi, Y., Lee, D., Park, S.G., Kim, R., *et al.* (2015). Social deficits in IRSp53 mutant mice improved by NMDAR and mGluR5 suppression. *Nature neuroscience* 18, 435-443.

- 5 Cochran, D.M., *et al.*, The role of oxytocin in psychiatric disorders: a review of biological and therapeutic research findings. *Harv Rev Psychiatry*, 2013. 21 (5): págs. 219-47.

Connolly, N., Anixt, J., Manning, P., Ping, I.L.D., Marsolo, K.A., and Bowers, K. (2016). Maternal metabolic risk factors for autism spectrum disorder-An analysis of electronic medical records and linked birth data. *Autism research: official journal of the International Society for Autism Research*.

Cryan, J.F., y Dinan, T.G. (2012). Mind-altering microorganisms: the impact of the gut microbiota on brain and behaviour. *Nature reviews Neuroscience* 13, 701-712.

- 15 Davari, S., Talaei, S.A., Alaei, H., y Salami, M. (2013). Probiotics treatment improves diabetes-induced impairment of synaptic activity and cognitive function: behavioral and electrophysiological proofs for microbiome-gut-brain axis. *Neuroscience* 240, 287-296.

20 Dodds, L., Fell, D.B., Shea, S., Armson, B.A., Allen, A.C. y Bryson, S. (2011). The role of prenatal, obstetric and neonatal factors in the development of autism. *Journal of autism and developmental disorders* 41, 891-902.

Dolen, G., Darvishzadeh, A., Huang, K.W. y Malenka, R.C. (2013). Social reward requires coordinated activity of nucleus accumbens oxytocin and serotonin. *Nature* 501, 179-184.

- 25 Donaldson, Z.R. y Young, L.J. (2008). Oxytocin, vasopressin, and the neurogenetics of sociality. *Science* 322, 900-904.

Edgar, R.C. (2010). Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* 26, 2460-2461.

- 30 Edgar, R.C. (2013). UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nature methods* 10, 996-998.

el-Sobky, E., *et al.*, Molecular cytogenetic profiles of hepatitis C infection in patients at Sharkia Governorate, Egipto. *J Egypt Soc Parasitol*, 2004. 34 (1 Supl.): págs. 401-15.

- 35 Fenu, S., J. Wardas y M. Morelli, Impulse control disorders and dopamine dysregulation syndrome associated with dopamine agonist therapy in Parkinson's disease. *Behav Pharmacol*, 2009. 20 (5-6): págs. 363-79.

Ferguson, J.N., *et al.*, Social amnesia in mice lacking the oxytocin gene. *Nat Genet*, 2000. 25 (3): págs. 284-8.

- 40 Finger, E.C., New potential therapeutic approaches in frontotemporal dementia: oxytocin, vasopressin, and social cognition. *J Mol Neurosci*, 2011. 45 (3): págs. 696-701.

Foster, J.A. y McVey Neufeld, K.A. (2013). Gut-brain axis: how the microbiome influences anxiety and depression. *Trends in neurosciences* 36, 305-312.

- 45 Francis, S.M., *et al.*, Oxytocin and vasopressin systems in genetic syndromes and neurodevelopmental disorders. *Brain Res*, 2014. 1580: págs. 199-218.

Frese, S.A., *et al.*, The evolution of host specialization in the vertebrate gut symbiont *Lactobacillus reuteri*. *PLoS Genet*. Febrero de 2011; 7 (2):e1001314. doi: 10.1371/journal.pgen.1001314.

Galley, J.D., Bailey, M., Kamp Dush, C., Schoppe-Sullivan, S. y Christian, L.M. (2014). Maternal obesity is associated with alterations in the gut microbiome in toddlers. *PloS one* 9, e113026.

- 55 Gibb, W. R., *et al.*, The substantia nigra and ventral tegmental area in Alzheimer's disease and Down's syndrome. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 1989. 52 (2): págs. 193-200.

Gkogkas, C.G., Khoutorsky, A., Ran, I., Rampakakis, E., Nevarko, T., Weatherill, D.B., Vasuta, C., Yee, S., Truitt, M., Dallaire, P., *et al.* (2013). Autism-related deficits via dysregulated eIF4E-dependent translational control. *Nature* 493, 371-377.

Gonzalez-Burgos, I. y A. Feria-Velasco, Serotonin/dopamine interaction in memory formation. *Prog Brain Res*, 2008. 172: págs. 603-23.

- 65 Gregory, R., Cheng, H., Rupp, H.A., Sengelaub, D.R. y Heiman, J.R. (2015). Oxytocin increases VTA activation to

infant and sexual stimuli in nulliparous and postpartum women. *Hormones and behavior* 69, 82-88.

Groppe, S.E., Gossen, A., Rademacher, L., Hahn, A., Westphal, L., Grunder, G. y Spreckelmeyer, K.N. (2013). Oxytocin influences processing of socially relevant cues in the ventral tegmental area of the human brain. *Biological psychiatry* 74, 172-179.

Gunaydin, L.A., Grosenick, L., Finkelstein, J.C., Kauvar, I.V., Fenno, L.E., Adhikari, A., Lammel, S., Mirzabekov, J.J., Airan, R.D., Zalocusky, K.A., *et al.* (2014). Natural neural projection dynamics underlying social behavior. *Cell* 157, 1535-1551.

Hallmayer, J., Cleveland, S., Torres, A., Phillips, J., Cohen, B., Torigoe, T., Miller, J., Fedele, A., Collins, J., Smith, K., *et al.* (2011). Genetic heritability and shared environmental factors among twin pairs with autism. *Archives of general psychiatry* 68, 1095-1102.

Henry, J.D., *et al.*, Clinical assessment of social cognitive function in neurological disorders. *Nat Rev Neurol*, 2016. 12 (1): págs. 28-39.

Hsiao, E.Y., McBride, S.W., Hsien, S., Sharon, G., Hyde, E.R., McCue, T., Codelli, J.A., Chow, J., Reisman, S.E., Petrosino, J.F., *et al.* (2013). Microbiota modulate behavioral and physiological abnormalities associated with neurodevelopmental disorders. *Cell* 155, 1451-1463.

Huang, Y.C. y Hessler, N.A. (2008). Social modulation during songbird courtship potentiates midbrain dopaminergic neurons. *PloS one* 3, e3281.

Human Microbiome Project, C. (2012a). A framework for human microbiome research. *Nature* 486, 215-221.

Human Microbiome Project, C. (2012b). Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature* 486, 207-214.

Hyman, S.E., R.C. Malenka y E.J. Nestler, Neural mechanisms of addiction: the role of reward-related learning and memory. *Annu Rev Neurosci*, 2006. 29: págs. 565-98.

Insel, T.R. (2010). The challenge of translation in social neuroscience: a review of oxytocin, vasopressin, and affiliative behavior. *Neuron* 65, 768-779.

Kennedy, D.P. y R. Adolphs, The social brain in psychiatric and neurological disorders. *Trends Cogn Sci*, 2012. 16 (11): págs. 559-72.

Kenny, P.J., Common cellular and molecular mechanisms in obesity and drug addiction. *Nat Rev Neurosci*, 2011. 12 (11): págs. 638-51.

King, J.C. (2006). Maternal obesity, metabolism, and pregnancy outcomes. *Annual review of nutrition* 26, 271-291.

Kirsch, P., Oxytocin in the socioemotional brain: implications for psychiatric disorders. *Dialogues Clin Neurosci*, 2015. 17 (4): págs. 463-76.

Kohane, I.S., McMurphy, A., Weber, G., MacFadden, D., Rappaport, L., Kunkel, L., Bickel, J., Wattanasin, N., Spence, S., Murphy, S., *et al.* (2012). The co-morbidity burden of children and young adults with autism spectrum disorders. *PloS one* 7, e33224.

Krakiwicz, P., Walker, C.K., Bremer, A.A., Baker, A.S., Ozonoff, S., Hansen, R.L. y Hertz-Picciotto, I. (2012). Maternal metabolic conditions and risk for autism and other neurodevelopmental disorders. *Pediatrics* 129, e1121-1128.

Krueger, F. (2014). Trim Galore. v.0.3.7. http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim_galore/.

Langmead, B. y Salzberg, S.L. (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature methods* 9, 357-359.

Lee, M.R., *et al.*, Targeting the Oxytocin System to Treat Addictive Disorders: Rationale and Progress to Date. *CNS Drugs*, 2016. 30 (2): págs. 109-23.

Lerer, E., Levi, S., Salomon, S., Darvasi, A., Yirmiya, N. y Ebstein, R.P. (2008). Association between the oxytocin receptor (OXTR) gene and autism: relationship to Vineland Adaptive Behavior Scales and cognition. *Molecular psychiatry* 13, 980-988.

Loyens, E., *et al.*, Antidepressant-like effects of oxytocin in mice are dependent on the presence of insulin-regulated aminopeptidase. *Int J Neuropsychopharmacol*, 2013. 16 (5): págs. 1153-63.

- Lozupone, C. y Knight, R. (2005). UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities. *Applied and environmental microbiology* 71, 8228-8235.
- 5 Ma, J., Prince, A.L., Bader, D., Hu, M., Ganu, R., Baquero, K., Blundell, P., Alan Harris, R., Frias, A.E., Grove, K.L., *et al.* (2014). High-fat maternal diet during pregnancy persistently alters the offspring microbiome in a primate model. *Nature communications* 5, 3889.
- MacDonald, K. y D. Feifel, Oxytocin's role in anxiety: a critical appraisal. *Brain Res*, 2014. 1580: págs. 22-56.
- 10 Martin, M. (2011). Cutadapt removes adaptor sequences from high-throughput sequencing reads. *EM-Bnetjournal* 17, 10-12.
- Mathers, J.C. y McKay, J.A. (2009). Epigenetics - potential contribution to fetal programming. *Advances in experimental medicine and biology* 646, 119-123.
- 15 Matsumoto, M., Dopamine signals and physiological origin of cognitive dysfunction in Parkinson's disease. *Mov Disord*, 2015. 30 (4): págs. 472-83.
- 20 Matsushita, H., *et al.*, Oxytocin mediates the antidepressant effects of mating behavior in male mice. *Neurosci Res*, 2010. 68 (2): págs. 151-3.
- Matsuzaki, M., *et al.*, Oxytocin: a therapeutic target for mental disorders. *J Physiol Sci*, 2012. 62 (6): págs. 441-4.
- 25 Mayer, E.A., Padua, D. y Tillisch, K. (2014). Altered brain-gut axis in autism: comorbidity or causative mechanisms? *BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 36, 933-939.
- Mayer, E.A., Tillisch, K. y Gupta, A. (2015). Gut/brain axis and the microbiota. *The Journal of clinical investigation* 125, 926-938.
- 30 McMurdie, P.J. y Holmes, S. (2013). phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS one* 8, e61217.
- McQuaid, R.J., *et al.*, Making room for oxytocin in understanding depression. *Neurosci Biobehav Rev*, 2014. 45: págs. 305-22.
- 35 Mefford, H.C., Batshaw, M.L. y Hoffman, E.P. (2012). Genomics, intellectual disability, and autism. *N Engl J Med* 366, 733-743.
- 40 Melis, M.R., Melis, T., Cocco, C., Succu, S., Sanna, F., Pillolla, G., Boi, A., Ferri, G.L. y Argiolas, A. (2007). Oxytocin injected into the ventral tegmental area induces penile erection and increases extracellular dopamine in the nucleus accumbens and paraventricular nucleus of the hypothalamus of male rats. *The European journal of neuroscience* 26, 1026-1035.
- 45 Modi, M.E. y Young, L.J. (2012). The oxytocin system in drug discovery for autism: animal models and novel therapeutic strategies. *Hormones and behavior* 61, 340-350.
- Moss, B.G. y Chugani, D.C. (2014). Increased risk of very low birth weight, rapid postnatal growth, and autism in underweight and obese mothers. *American journal of health promotion: AJHP* 28, 181-188.
- 50 Moura, D., M.C. Canavarro y M. Figueiredo-Braga, Oxytocin and depression in the perinatal period-a systematic review. *Arch Womens Ment Health*, 2016. 19 (4): págs. 561-70.
- Nascimento, P.P., *et al.*, Single nucleotide polymorphisms in the CNTNAP2 gene in Brazilian patients with autistic spectrum disorder. *Genet Mol Res*, 2016. 15 (1).
- 55 Ogden, C.L., Carroll, M.D., Kit, B.K. y Flegal, K.M. (2014). Prevalence of childhood and adult obesity in the United States, 2011-2012. *JAMA: the journal of the American Medical Association* 311, 806-814.
- 60 Oh P.L *et al.*, Diversification of the gut symbiont *Lactobacillus reuteri* as a result of host-driven evolution. *ISME J.* Marzo de 2010; 4 (3): 377-87.
- Papp, M. y J. Wieronska, Antidepressant-like activity of amisulpride in two animal models of depression. *J Psychopharmacol*, 2000. 14 (1): págs. 46-52.
- 65 Parracho, H.M., Bingham, M.O., Gibson, G.R. y McCartney, A.L. (2005). Differences between the gut microflora of

children with autistic spectrum disorders and that of healthy children. *Journal of medical microbiology* 54, 987-991.

Pedersen, C.A., Caldwell, J.D., Walker, C., Ayers, G. y Mason, G.A. (1994). Oxytocin activates the postpartum onset of rat maternal behavior in the ventral tegmental and medial preoptic areas. *Behavioral neuroscience* 108, 1163-1171.

Penagarikano, O., *et al.*, Absence of CNTNAP2 leads to epilepsy, neuronal migration abnormalities, and core autism-related deficits. *Cell*, 2011. 147 (1): págs. 235-46.

Penagarikano, O., *et al.*, Exogenous and evoked oxytocin restores social behavior in the Cntnap2 mouse model of autism. *Sci Transl Med*, 2015. 7 (271): págs. 271ra8.

Perez-Rodriguez, M., *et al.*, Oxytocin and social cognition in affective and psychotic disorders. *Eur Neuropsychopharmacol*, 2015. 25 (2): págs. 265-82.

Poutahidis, T., Kearney, S.M., Levkovich, T., Qi, P., Varian, B.J., Lakritz, J.R., Ibrahim, Y.M., Chatzigiagkos, A., Alm, E.J. y Erdman, S.E. (2013). Microbial symbionts accelerate wound healing via the neuropeptide hormone oxytocin. *PLoS one* 8, e78898.

Quast, C., Priesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J. y Glockner, F.O. (2013). The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic acids research* 41, D590-596.

Quintana, D.S., *et al.*, Oxytocin system dysfunction as a common mechanism underlying metabolic syndrome and psychiatric symptoms in schizophrenia and bipolar disorders. *Front Neuroendocrinol*, 2017.

Rice, L.J. y S.L. Einfeld, Cognitive and behavioural aspects of Prader-Willi syndrome. *Curr Opin Psychiatry*, 2015. 28 (2): págs. 102-6.

Ridaura, V.K., Faith, J.J., Rey, F.E., Cheng, J., Duncan, A.E., Kau, A.L., Griffin, N.W., Lombard, V., Henrissat, B., Bain, J.R., *et al.* (2013). Gut microbiota from twins discordant for obesity modulate metabolism in mice. *Science* 341, 1241214.

Romano, A., *et al.*, From Autism to Eating Disorders and More: The Role of Oxytocin in Neuropsychiatric Disorders. *Front Neurosci*, 2015. 9: págs. 497.

Ross, H.E. y L.J. Young, Oxytocin and the neural mechanisms regulating social cognition and affiliative behavior. *Front Neuroendocrinol*, 2009. 30 (4): págs. 534-47.

Rudelli, R.D., M.W. Ambler y H.M. Wisniewski, Morphology and distribution of Alzheimer neuritic (senile) and amyloid plaques in striatum and diencephalon. *Acta Neuropathol*, 1984. 64 (4): págs. 273-81.

Sabatier, N., Leng, G. y Menzies, J. (2013). Oxytocin, feeding, and satiety. *Frontiers in endocrinology* 4, 35.

Sampath, S., *et al.*, Defining the contribution of CNTNAP2 to autism susceptibility. *PLoS One*, 2013. 8 (10): págs. e77906.

Sarnyai, Z. y G.L. Kovacs, Oxytocin in learning and addiction: From early discoveries to the present. *Pharmacol Biochem Behav*, 2014. 119: págs. 3-9.

Schloss, P.D., Westcott, S.L., Ryabin, T., Hall, J.R., Hartmann, M., Hollister, E.B., Lesniewski, R.A., Oakley, B.B., Parks, D.H., Robinson, C.J., *et al.* (2009). Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied and environmental microbiology* 75, 7537-7541.

Schmieder, R. y Edwards, R. (2011). Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. *Bioinformatics* 27, 863-864.

Segata, N., Waldron, L., Ballarini, A., Narasimhan, V., Jousson, O. y Huttenhower, C. (2012). Metagenomic microbial community profiling using unique clade-specific marker genes. *Nature methods* 9, 811-814.

Selden, N., M.M. Mesulam y C. Geula, Human striatum: the distribution of neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Brain Res*, 1994. 648 (2): págs. 327-31.

Shamay-Tsoory, S.G. y A. Abu-Akel, The Social Salience Hypothesis of Oxytocin. *Biol Psychiatry*, 2016. 79 (3): págs. 194-202.

- Silverman, J.L., Yang, M., Lord, C., y Crawley, J.N. (2010). Behavioural phenotyping assays for mouse models of autism. *Nature reviews Neuroscience* 11, 490-502.
- 5 Skinner, A.C. y Skelton, J.A. (2014). Prevalence and trends in obesity and severe obesity among children in the United States, 1999-2012. *JAMA pediatrics* 168, 561-566.
- Song, S.J., Lauber, C., Costello, E.K., Lozupone, C.A., Humphrey, G., Berg-Lyons, D., Caporaso, J.G., Knights, D., Clemente, J.C., Nakielny, S., *et al.* (2013). Cohabiting family members share microbiota with one another and with their dogs. *eLife* 2, e00458.
- 10 Spinler, J.K., *et al.* From prediction to function using evolutionary genomics: human-specific ecotypes of *Lactobacillus reuteri* have diverse probiotic functions. *Genome Biol Evol.* 19 de junio de 2014; 6 (7): 1772-89. doi: 10.1093/gbe/evu137.
- 15 Sullivan, E.L., Nousen, E.K. y Chamlou, K.A. (2014). Maternal high fat diet consumption during the perinatal period programs offspring behavior. *Physiology & behavior* 123, 236-242.
- Tampi, R.R., *et al.*, Oxytocin for frontotemporal dementia: a systematic review. *Ther Adv Psychopharmacol*, 2017. 7 (1): págs. 48-53.
- 20 Tang, Y., Chen, Z., Tao, H., Li, C., Zhang, X., Tang, A. y Liu, Y. (2014). Oxytocin activation of neurons in ventral tegmental area and interfascicular nucleus of mouse midbrain. *Neuropharmacology* 77, 277-284.
- Thomas, A., Burant, A., Bui, N., Graham, D., Yuva-Paylor, L.A. y Paylor, R. (2009). Marble burying reflects a repetitive and perseverative behavior more than novelty-induced anxiety. *Psychopharmacology* 204, 361-373.
- 25 Tremaroli, V. y Backhed, F. (2012). Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. *Nature* 489, 242-249.
- 30 Turnbaugh, P.J., Ley, R.E., Mahowald, M.A., Magrini, V., Mardis, E.R. y Gordon, J.I. (2006). An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* 444, 1027-1031.
- Ungless, M.A., Whistler, J.L., Malenka, R.C. y Bonci, A. (2001). Single cocaine exposure *in vivo* induces long-term potentiation in dopamine neurons. *Nature* 411, 583-587.
- 35 Uvnas-Moberg, K., Handlin, L. y Petersson, M. (2014). Self-soothing behaviors with particular reference to oxytocin release induced by non-noxious sensory stimulation. *Frontiers in psychology* 5, 1529.
- Varian, B.J. *et al.*, Microbial lysate upregulates host oxytocin. *Brain Behavior Immun.*, 2017. 61 (0): págs. 36-49.
- 40 Wang, B., Mao, Y.K., Diorio, C., Pasyk, M., Wu, R.Y., Bienenstock, J. y Kunze, W.A. (2010). Luminal administration *ex vivo* of a live *Lactobacillus* species moderates mouse jejunal motility within minutes. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 24, 4078-4088.
- 45 Wang, X., Wang, B.R., Zhang, X.J., Xu, Z., Ding, Y.Q. y Ju, G. (2002). Evidences for vagus nerve in maintenance of immune balance and transmission of immune information from gut to brain in STM-infected rats. *World journal of gastroenterology* 8, 540-545.
- Wu, S., Jia, M., Ruan, Y., Liu, J., Guo, Y., Shuang, M., Gong, X., Zhang, Y., Yang, X. y Zhang, D. (2005). Positive association of the oxytocin receptor gene (OXTR) with autism in the Chinese Han population. *Biological psychiatry* 58, 74-77.
- 50 Yatsunencko, T., Rey, F.E., Manary, M.J., Trehan, I., Dominguez-Bello, M.G., Contreras, M., Magris, M., Hidalgo, G., Baldassano, R.N., Anokhin, A.P., *et al.* (2012). Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature* 486, 222-227.
- 55 Yoo, H.J., *et al.*, Family-based genetic association study of CNTNAP2 polymorphisms and sociality endophenotypes in Korean patients with autism spectrum disorders. *Psychiatr Genet*, 2017. 27 (1): págs. 38-39.
- 60 Zablotsky, B., Black, L.I., Maenner, M.J., Schieve, L.A. y Blumberg, S.J. (2015). Estimated Prevalence of Autism and Other Developmental Disabilities Following Questionnaire Changes in the 2014 National Health Interview Survey. *National Health Statistics Reports* 1-20.
- Zare, S., F. Mashayekhi y E. Bidabadi, The association of CNTNAP2 rs7794745 gene polymorphism and autism in Iranian population. *J Clin Neurosci*, 2017. 39: págs. 189-192.
- 65

Zhu, P.J., Huang, W., Kalikulov, D., Yoo, J.W., Placzek, A.N., Stoica, L., Zhou, H., Bell, J.C., Friedlander, M.J., Krnjevic, K., *et al.* (2011). Suppression of PKR promotes network excitability and enhanced cognition by interferon-gamma-mediated disinhibition. *Cell* 147, 1384-1396.

- 5 Zik, J.B. y D.L. Roberts, The many faces of oxytocin: implications for psychiatry. *Psychiatry Res*, 2015. 226 (1): págs. 31-7.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una formulación que comprende *Lactobacillus reuteri* MM4-1A (ATCC-PTA-6475) y/o un extracto bioactivo o fracción de la misma para usar en un método de tratamiento o prevención de una o más deficiencias en la conducta social en un individuo con trastorno del espectro autista, que comprende las etapas de proporcionar al individuo y/o a la madre durante la gestación del individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de la formulación.
- 10 2. La formulación para el uso de la reivindicación 1, en donde al proporcionar la formulación al individuo, la madre del individuo era obesa, con sobrepeso o con una dieta rica en grasas durante el embarazo del individuo, o la madre tenía un microbioma intestinal alterado.
- 15 3. La formulación para el uso de la reivindicación 1, en donde el método comprende proporcionar la formulación a la madre durante la gestación del individuo.
- 15 4. La formulación para usar de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde la deficiencia en la conducta social comprende una sociabilidad deteriorada, preferencia por la novedad social, dificultad en el uso social de la comunicación verbal y no verbal, o una combinación de las mismas.
- 20 5. La formulación para usar de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, comprendiendo además el método la etapa de identificar que la madre es o era obesa, con sobrepeso o con una dieta rica en grasas durante el embarazo del individuo, y en donde la formulación se administra al individuo o a la madre intencionadamente para tratar o prevenir la deficiencia en la conducta social en el individuo.
- 25 6. La formulación para usar de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde la formulación comprende una especie bacteriana o un nutriente o nutrientes adicionales.
7. La formulación para usar de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde la formulación se administra a través de una píldora o un supositorio.
- 30 8. La formulación para usar de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde la formulación es un alimento, una bebida, yogur, polvo seco o polvo seco mezclado en agua u otra bebida.
9. La formulación para usar de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde se administra al individuo una cantidad eficaz de una o más especies de bacterias distintas de *L. reuteri*, uno o más prebióticos u otros nutrientes, y/o terapia conductual.
- 35 10. La formulación para el uso de la reivindicación 9, en donde el nutriente es uno o más de vitaminas, lípidos o proteínas.
- 40 11. La formulación para usar de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde el individuo tiene o corre el riesgo de tener uno o más de los siguientes trastornos cognitivos sociales, síndrome de Williams, síndrome de Prader-Willi, síndrome del cromosoma X frágil, una o más conductas adictivas, trastorno bipolar, esquizofrenia, depresión, depresión puerperal, ansiedad, enfermedad de Parkinson y/o enfermedad de Alzheimer.
- 45 12. La formulación para el uso de la reivindicación 11, en donde la conducta adictiva afecta a uno o más de alimentos, alcohol, fármacos, apuestas, inhalantes y tabaco.
- 50 13. La formulación para usar de las reivindicaciones 1-12, en la que se toma *L. reuteri* MM4-1A (ATCC-PTA-6475) o un extracto biológicamente activo, lisado, molécula(s) activa(s) semipurificada(s) o purificada(s) de *L. reuteri* MM4-1A (ATCC-PTA-6475) como terapia profiláctica para fomentar el bienestar general, la salud cerebral, el estado de ánimo y/o las conductas sociales y la memoria social.

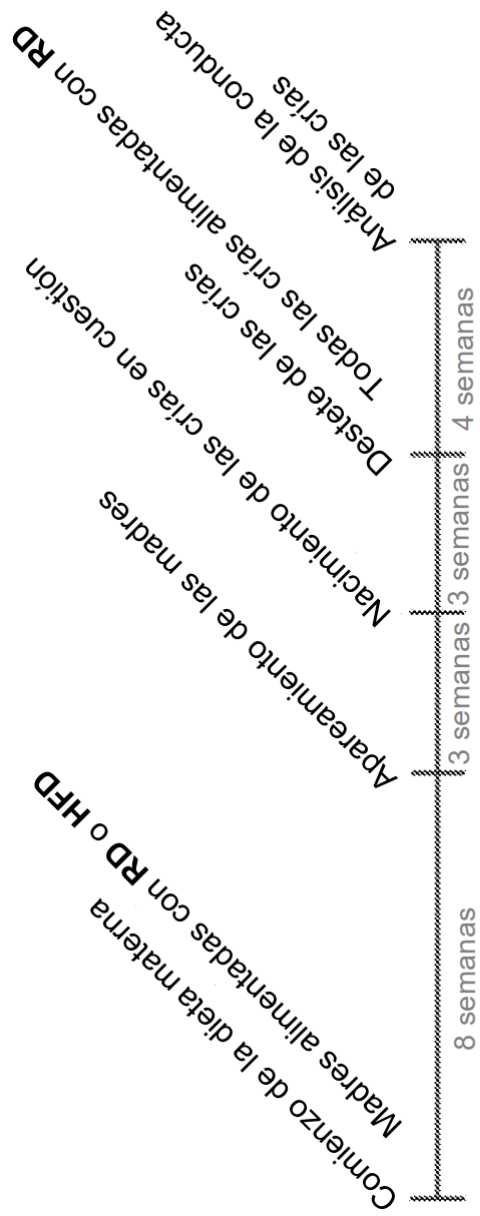


FIG. 1A

FIG. 1B

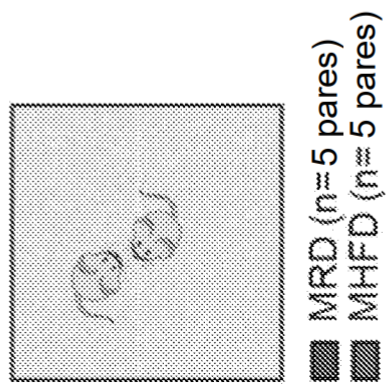


FIG. 1C

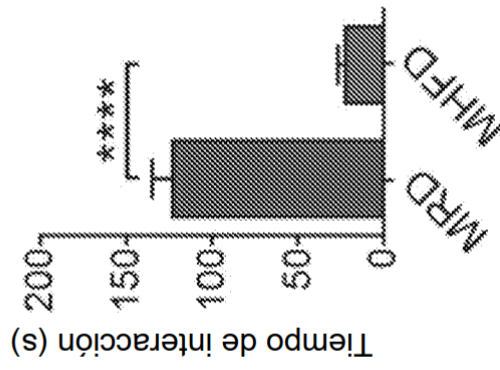


FIG. 1D

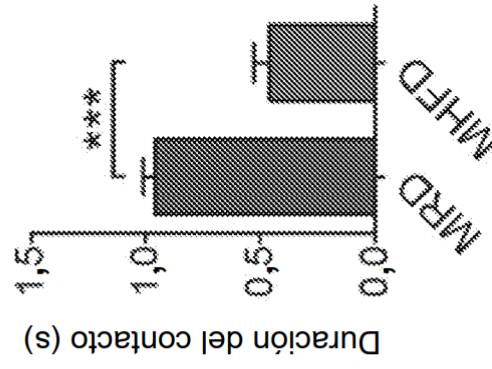
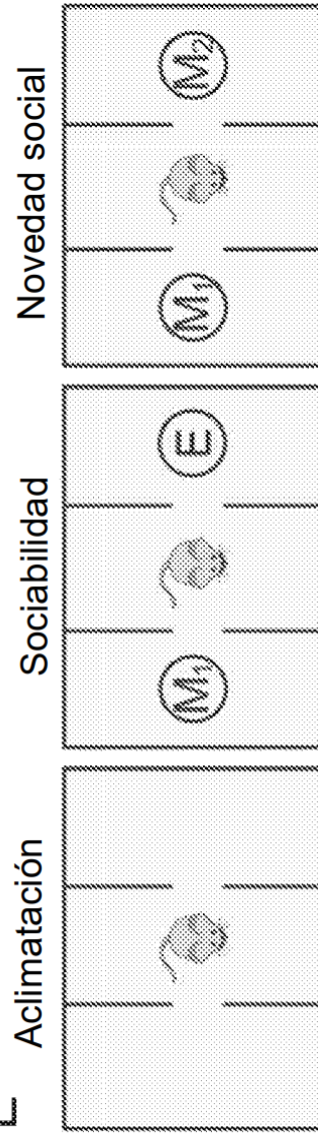


FIG. 1E



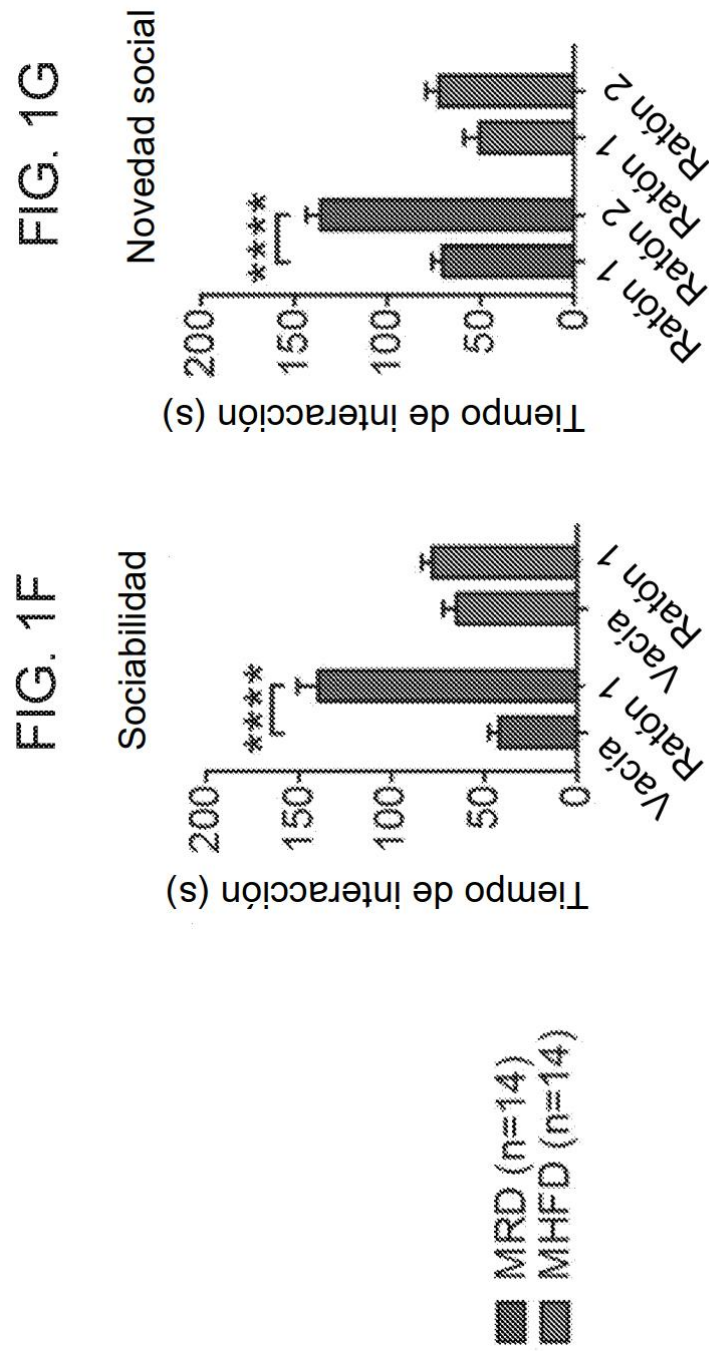


FIG. 1I

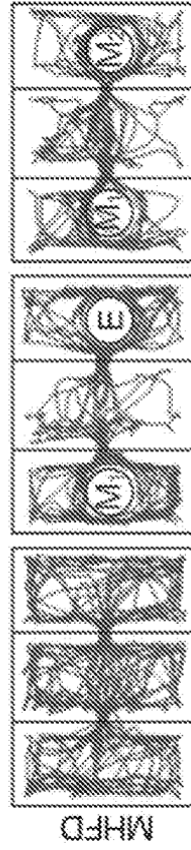


FIG. 1H

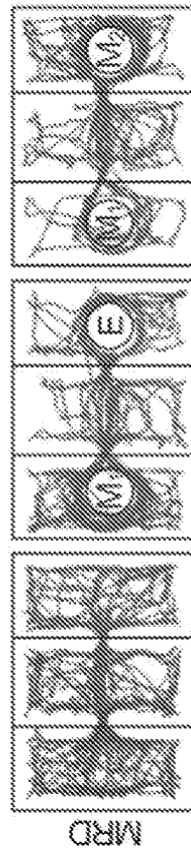


FIG. 1J

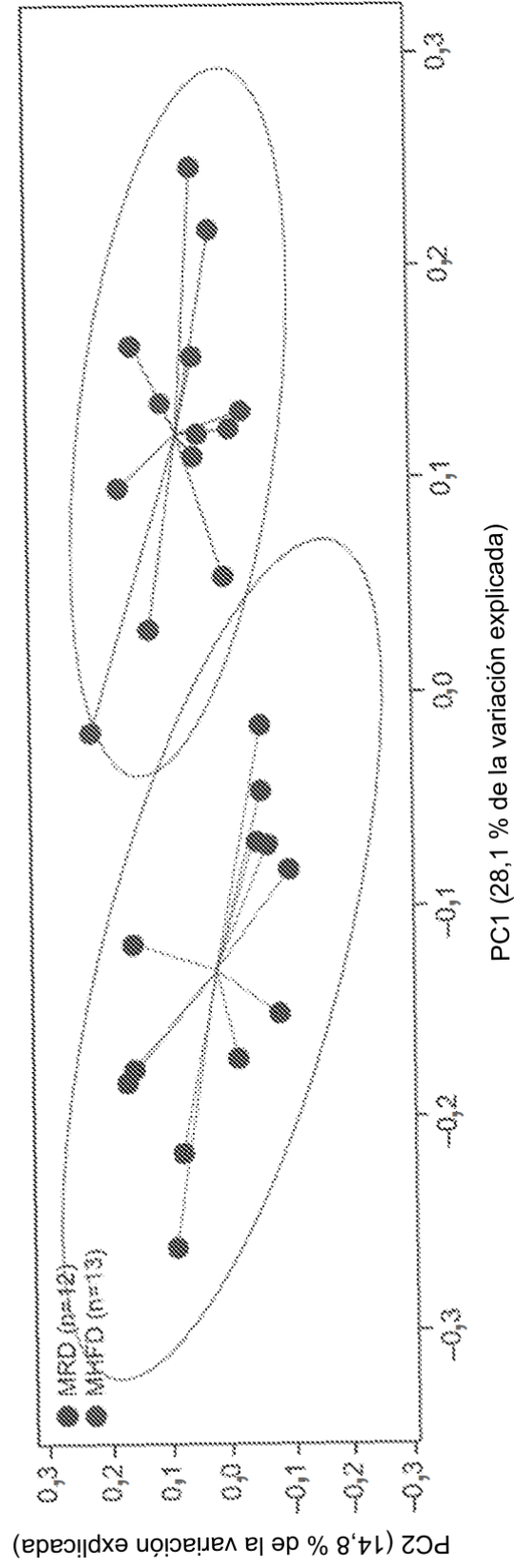


FIG. 2A

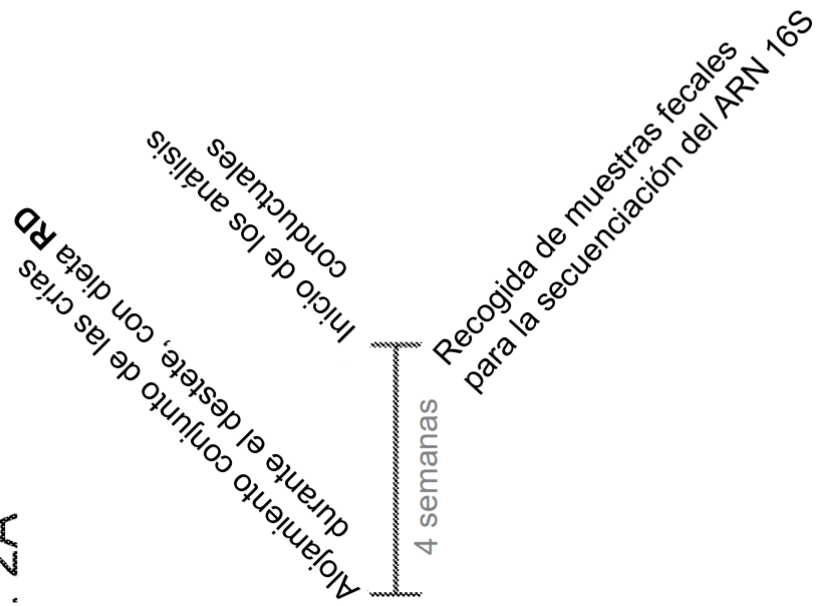


FIG. 2B

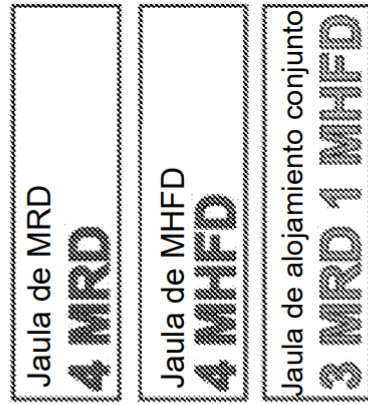


FIG. 2C

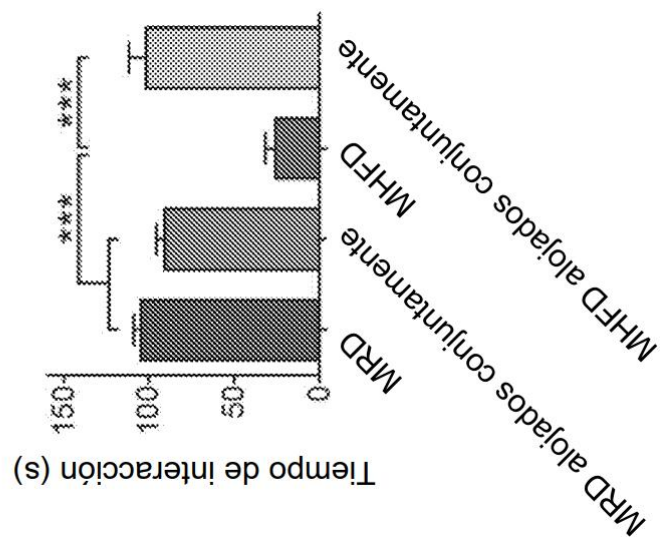


FIG. 2D

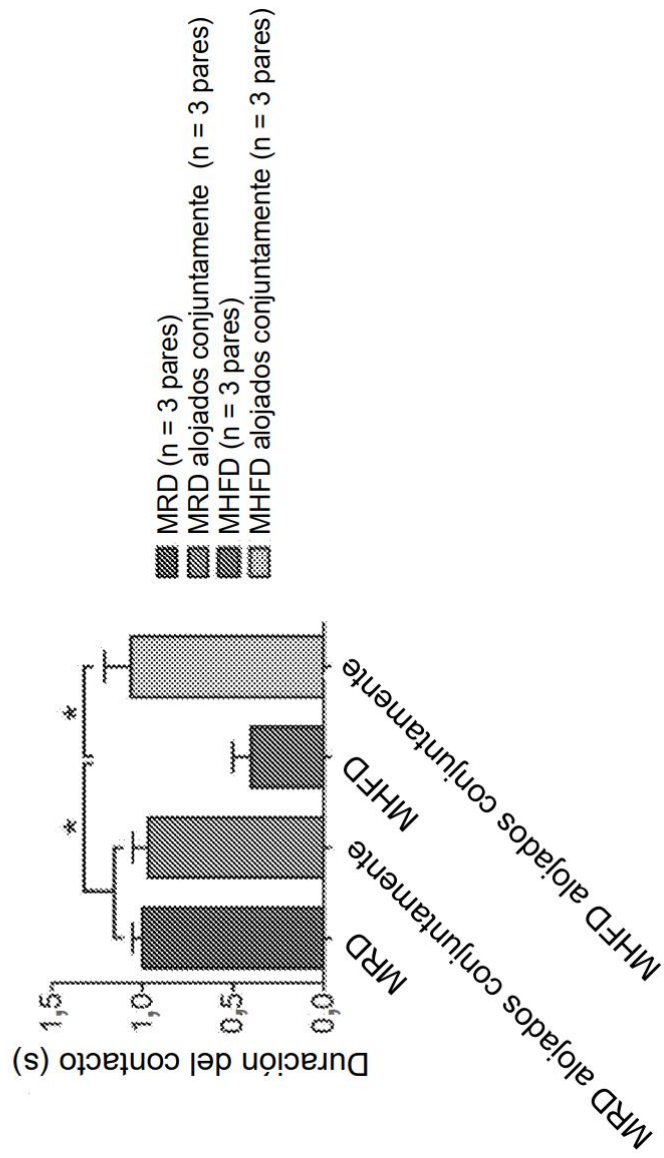


FIG. 2E

Sociabilidad

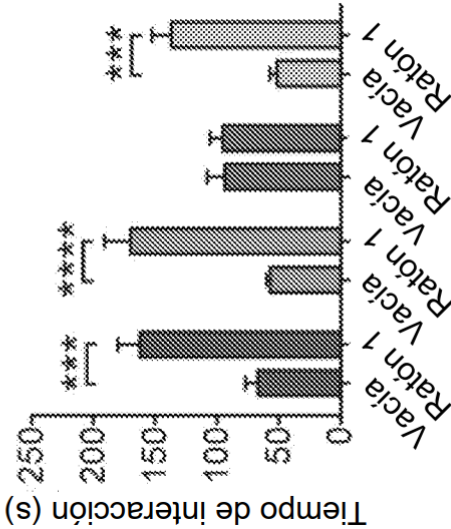
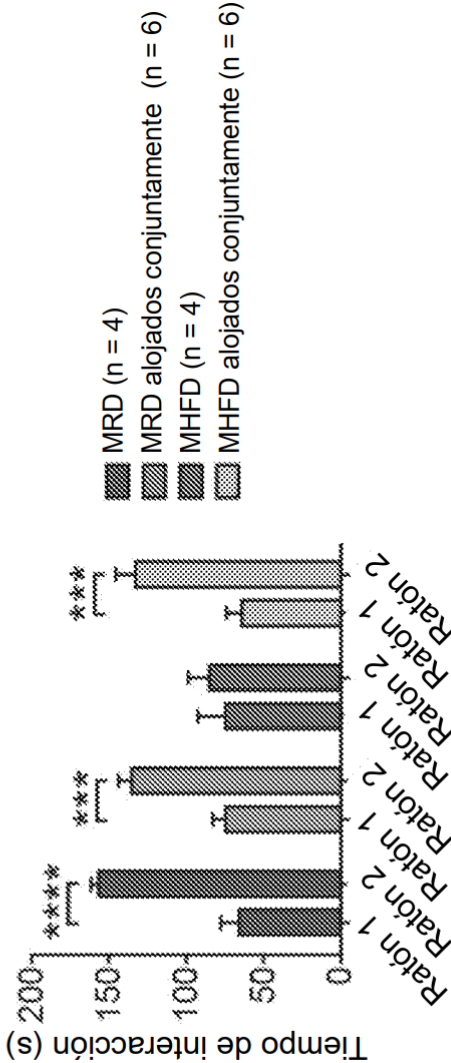


FIG. 2F

Novedad social



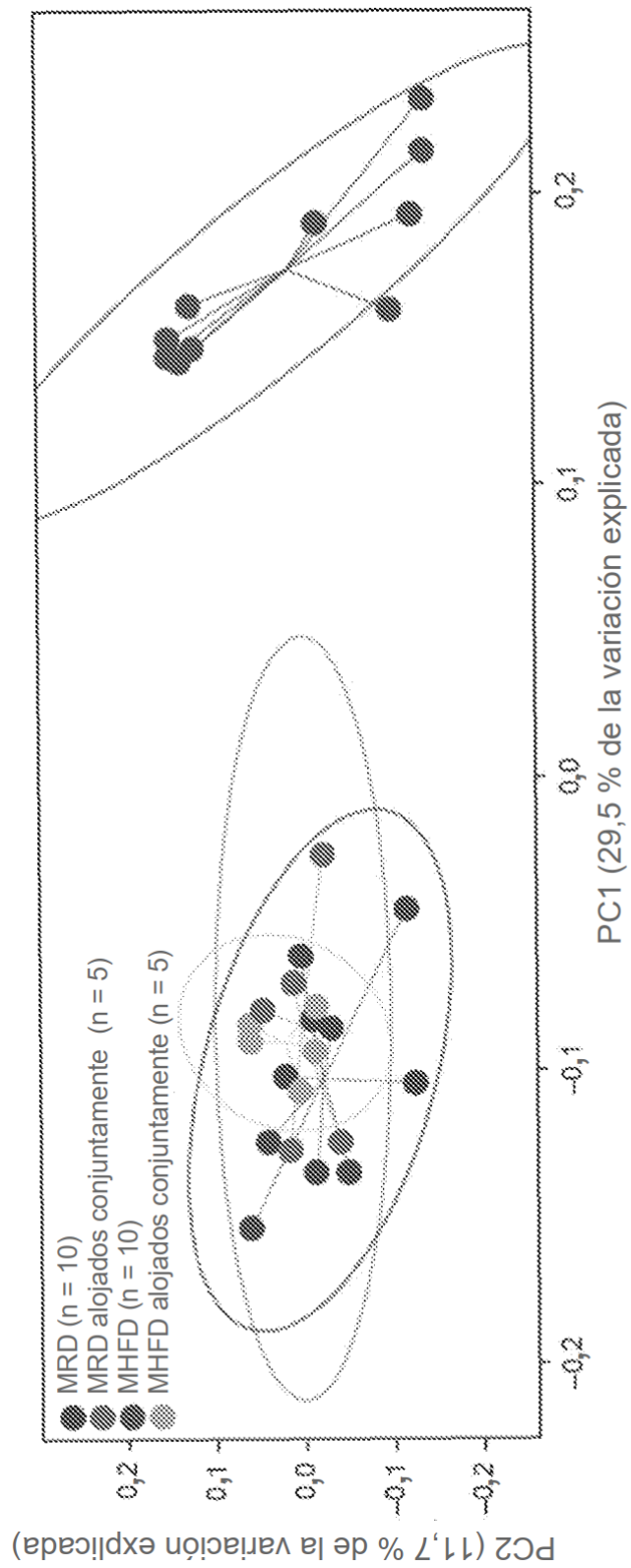


FIG. 2G

FIG. 3A

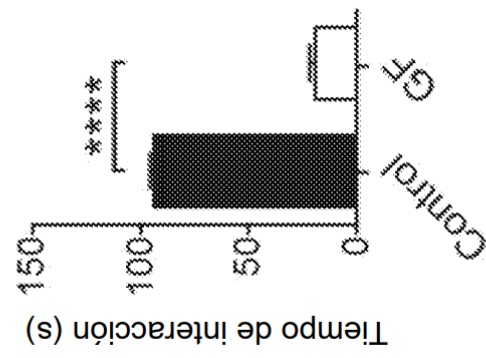
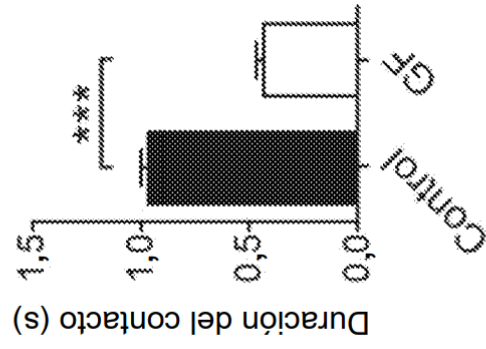


FIG. 3B



■ Control (n = 3 pares)
□ Aséptico (n = 3 pares)

FIG. 3D

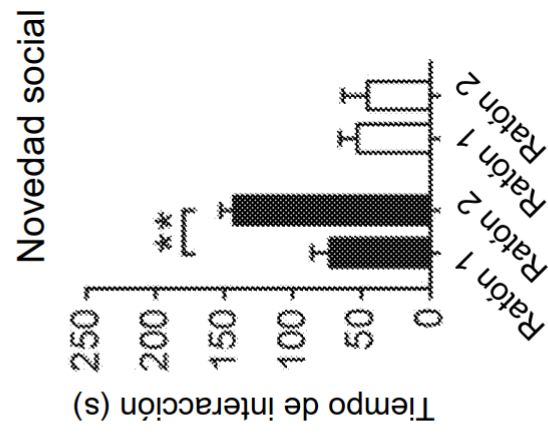
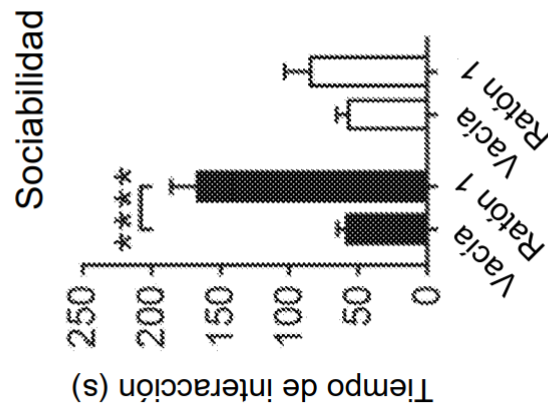


FIG. 3C



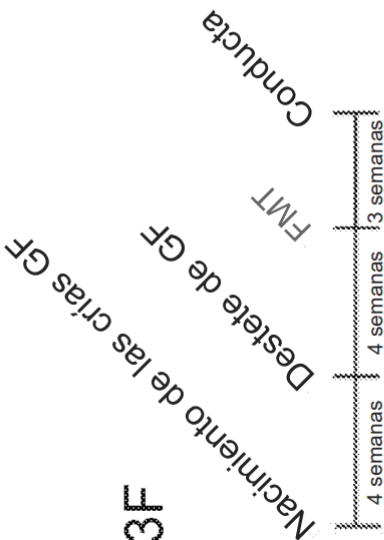


FIG. 3F

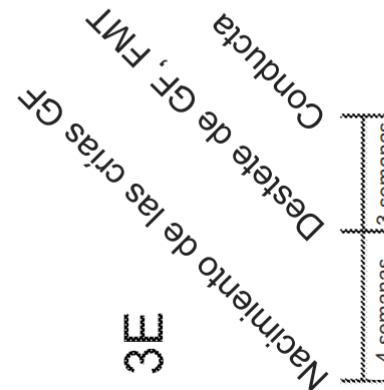


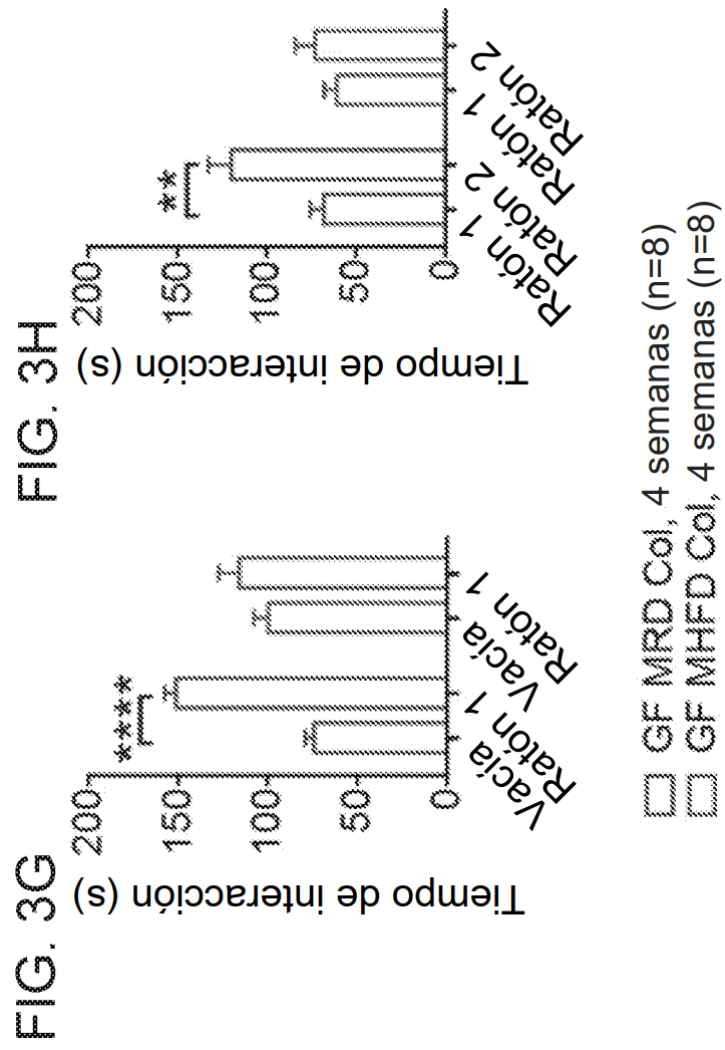
FIG. 3E

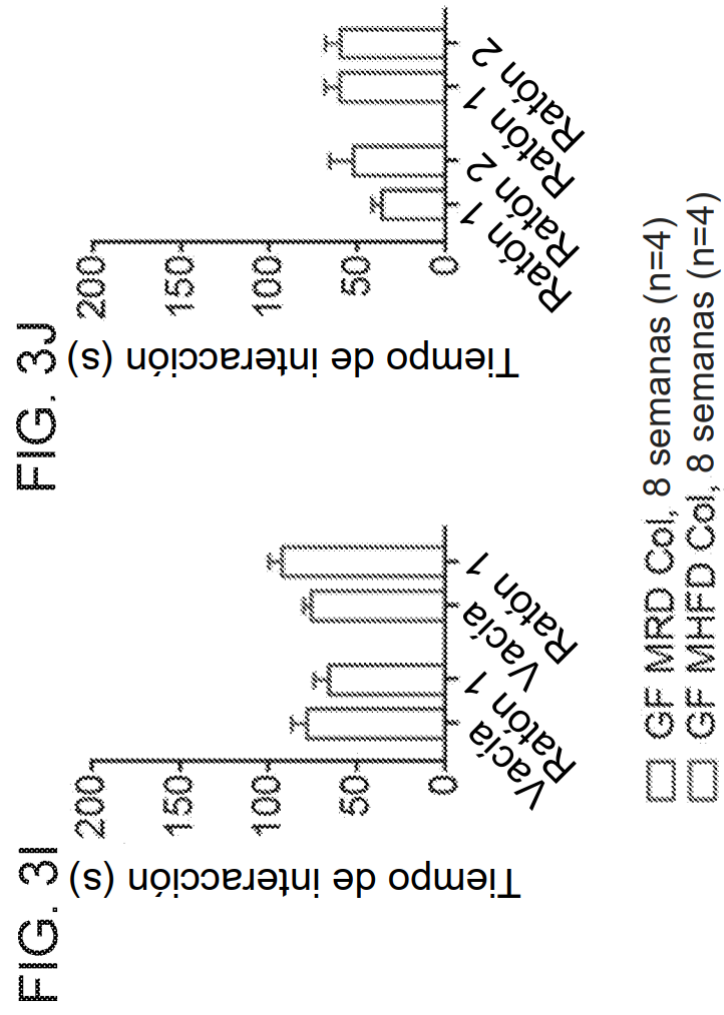
FMT de ratones GF de 8 semanas de edad

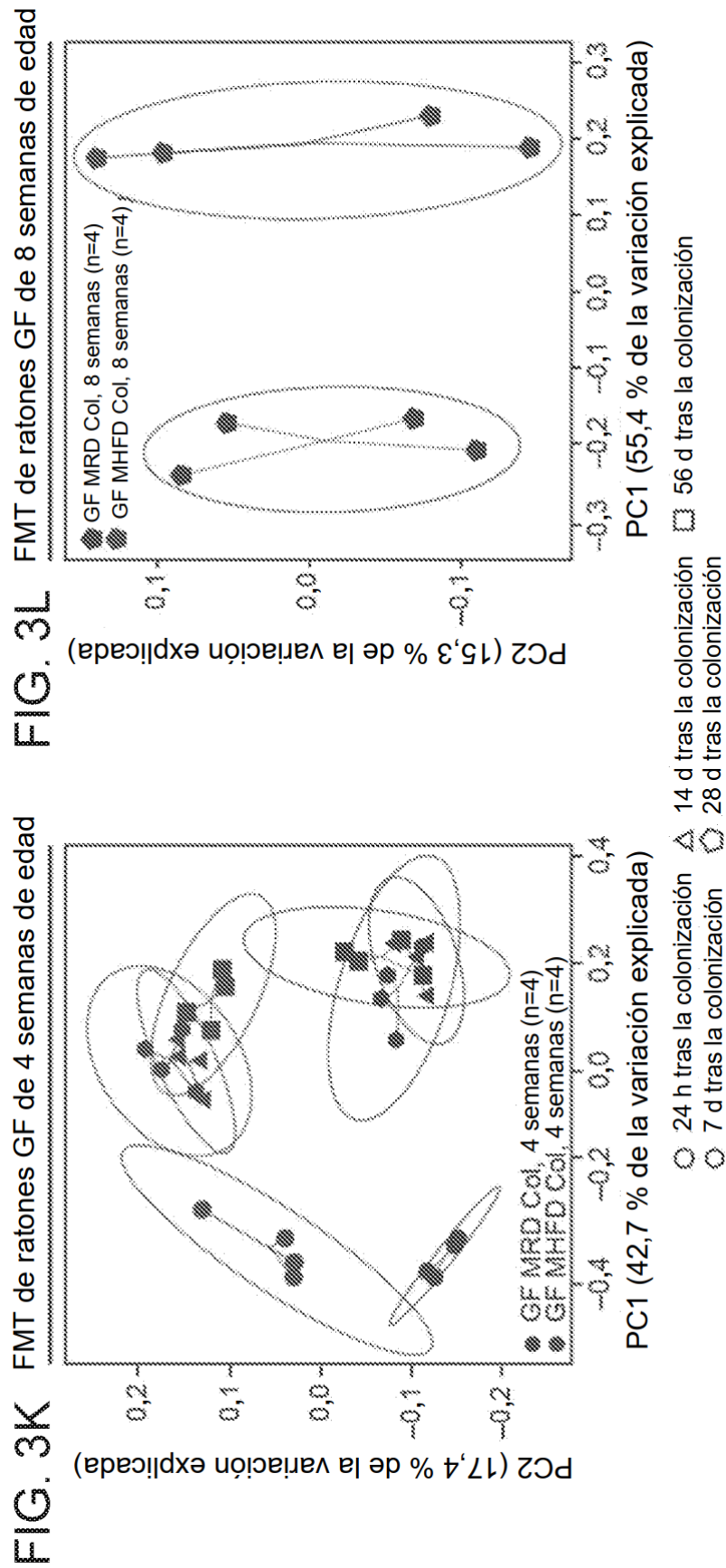
Sociabilidad Novedad social

FMT de ratones GF de 4 semanas de edad

Sociabilidad Novedad social







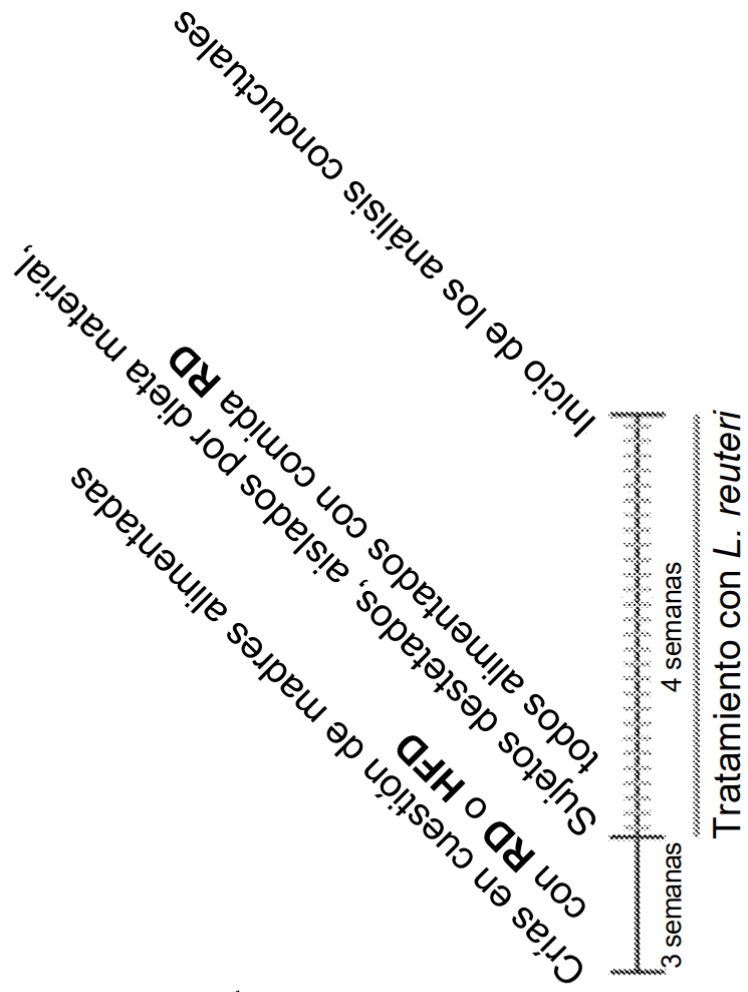


FIG. 4A

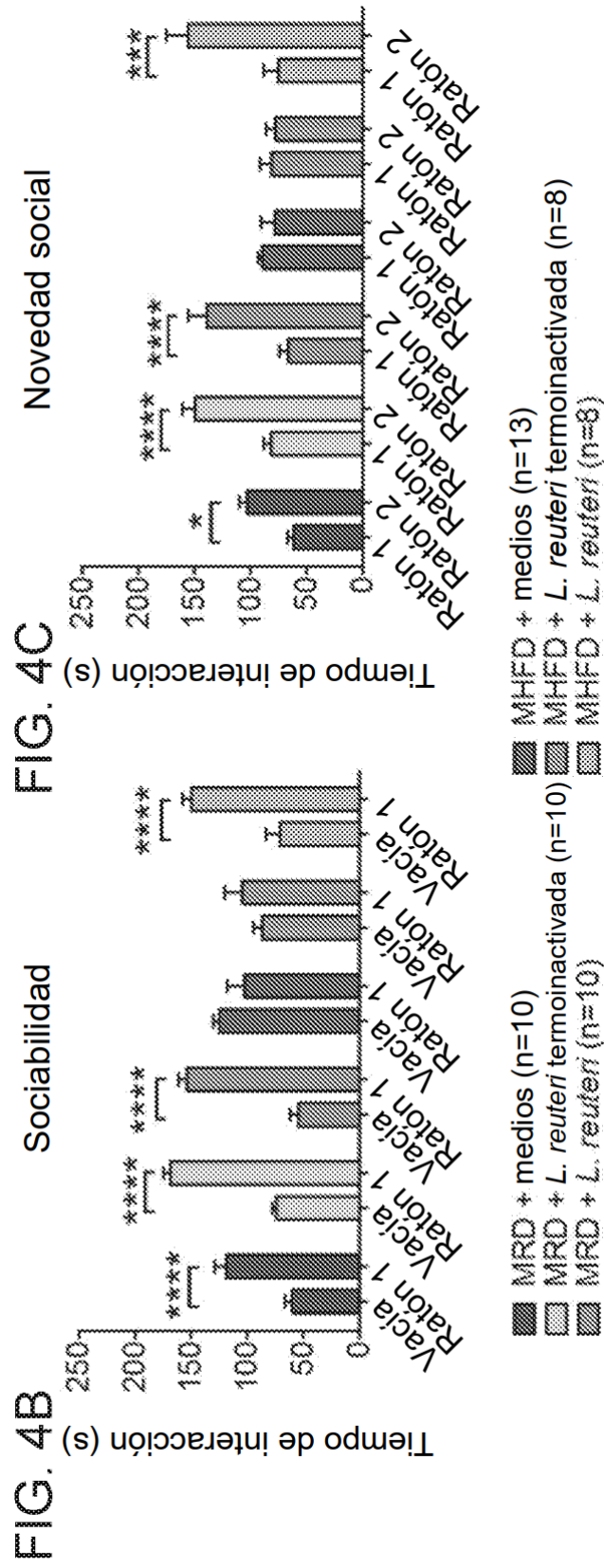


FIG. 4D

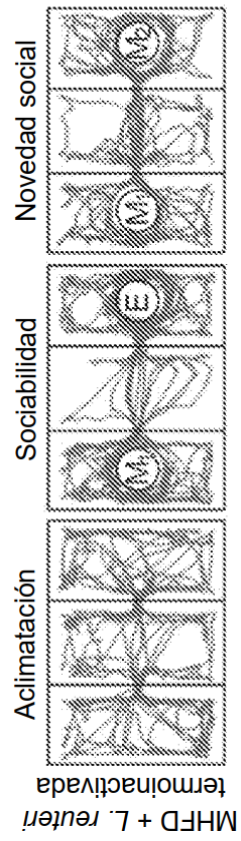
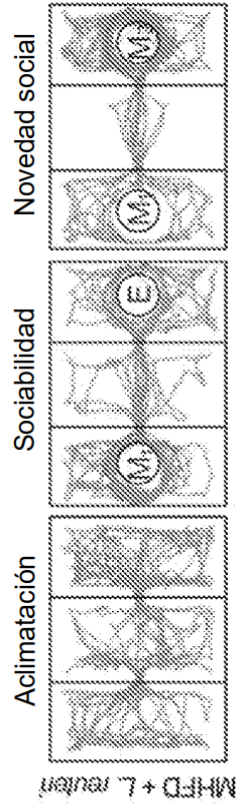
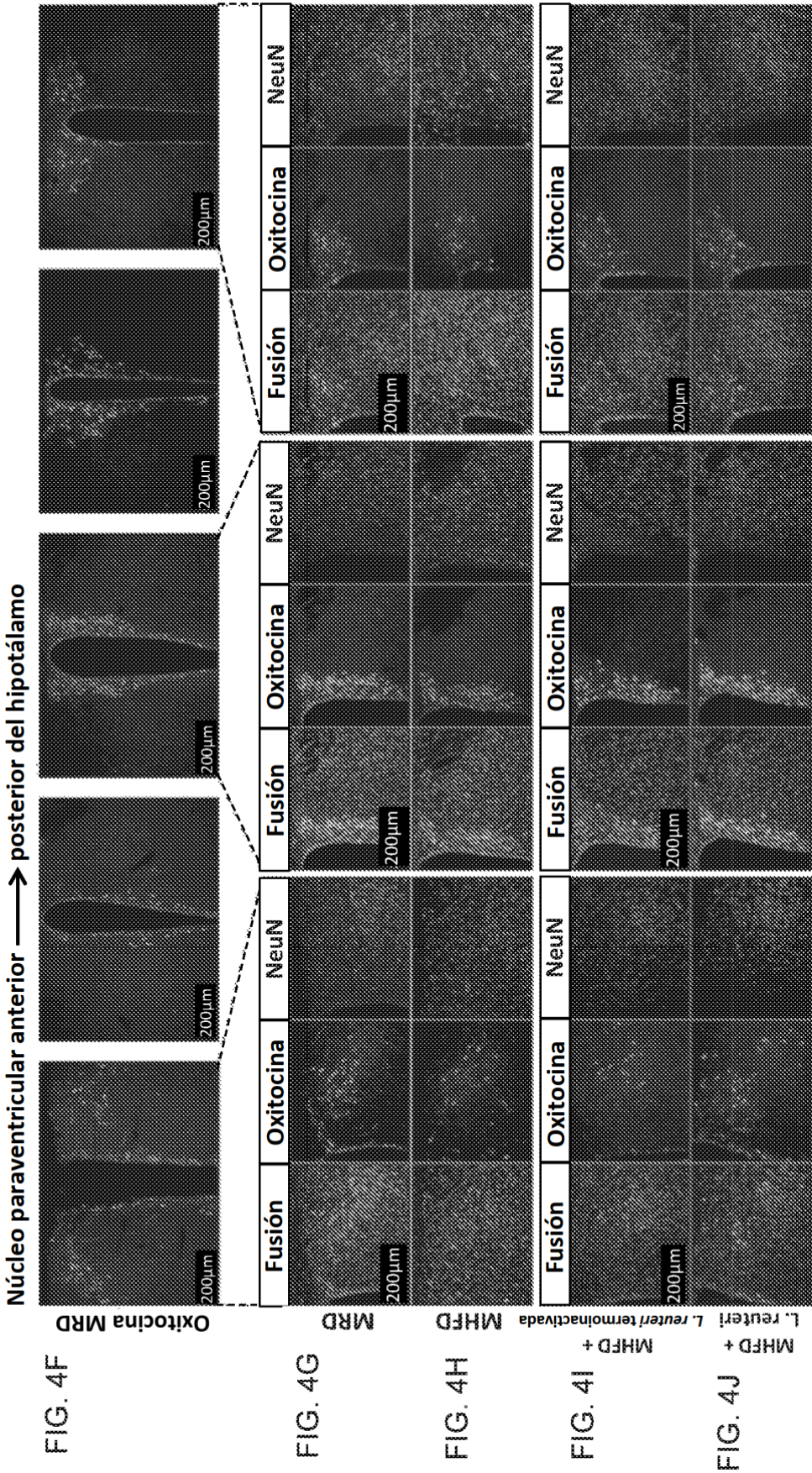
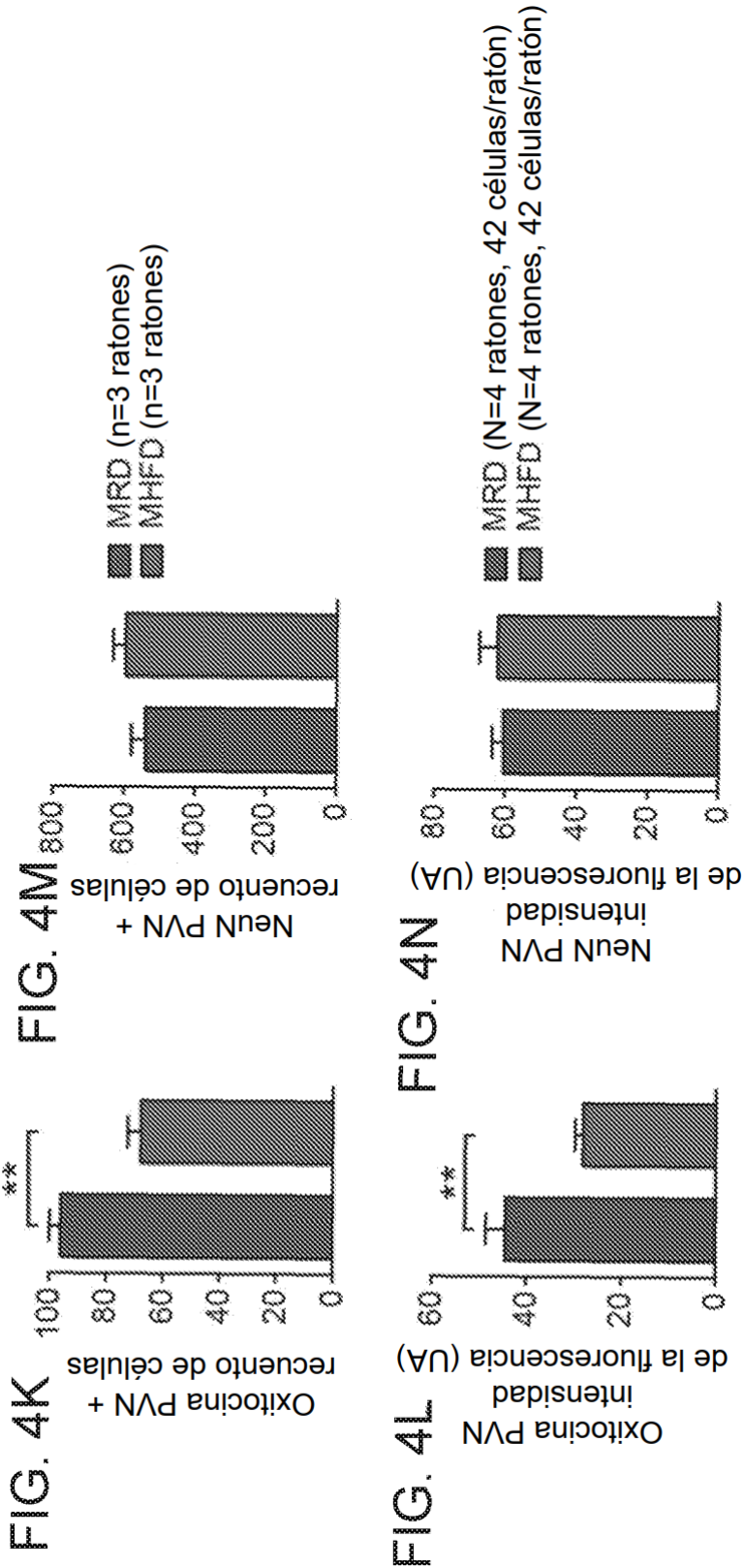
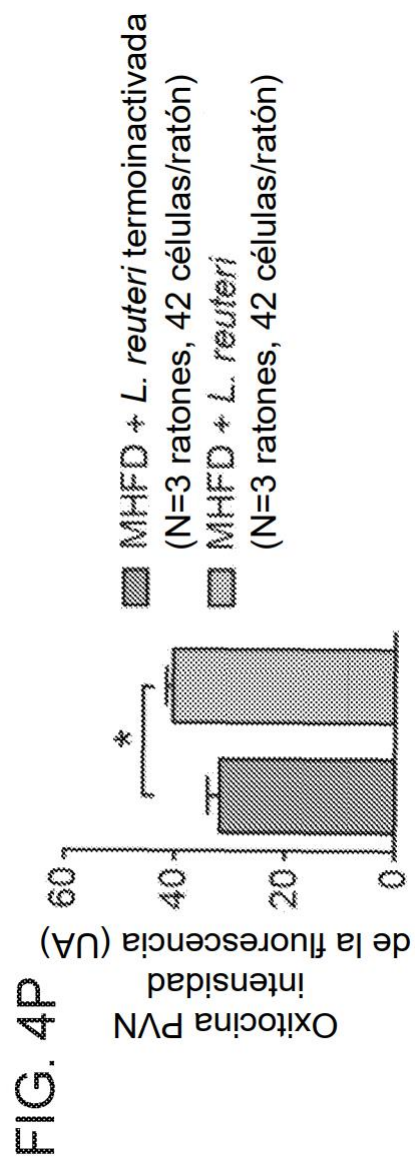
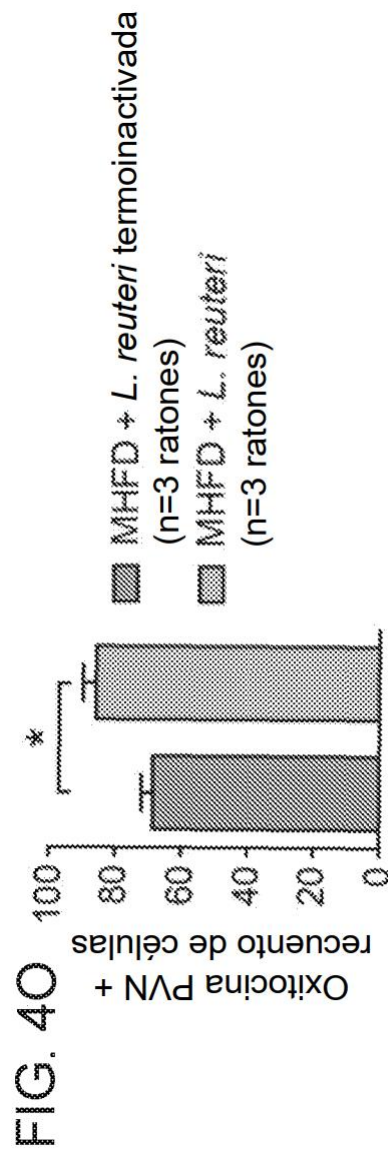


FIG. 4E









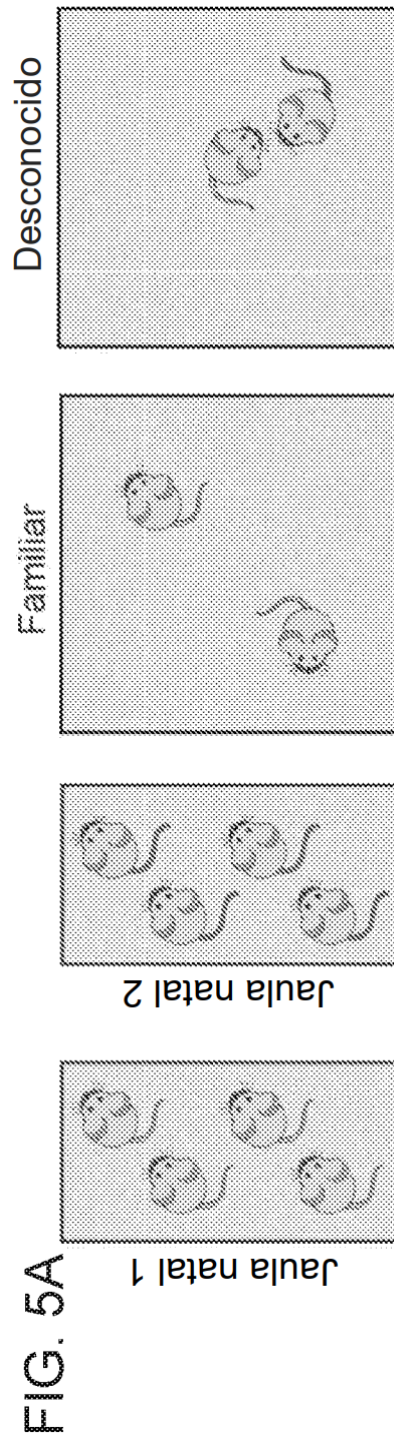


FIG. 5B

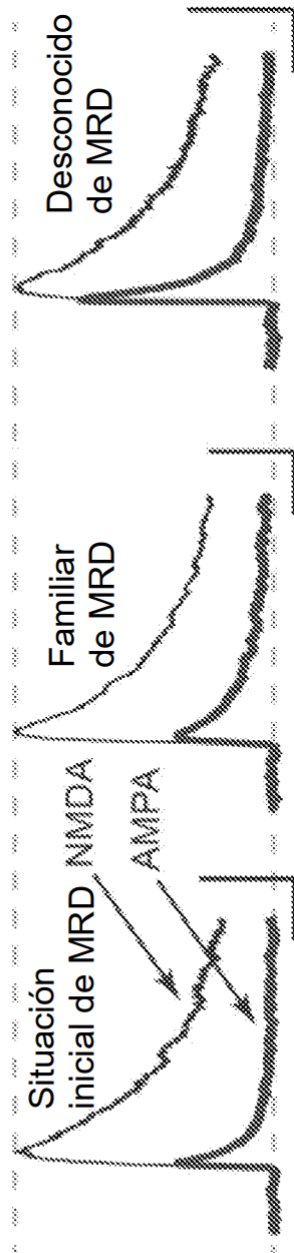
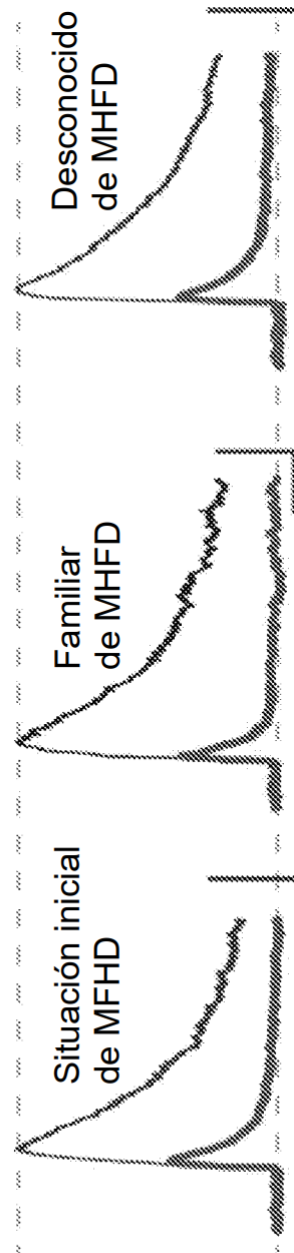


FIG. 5C



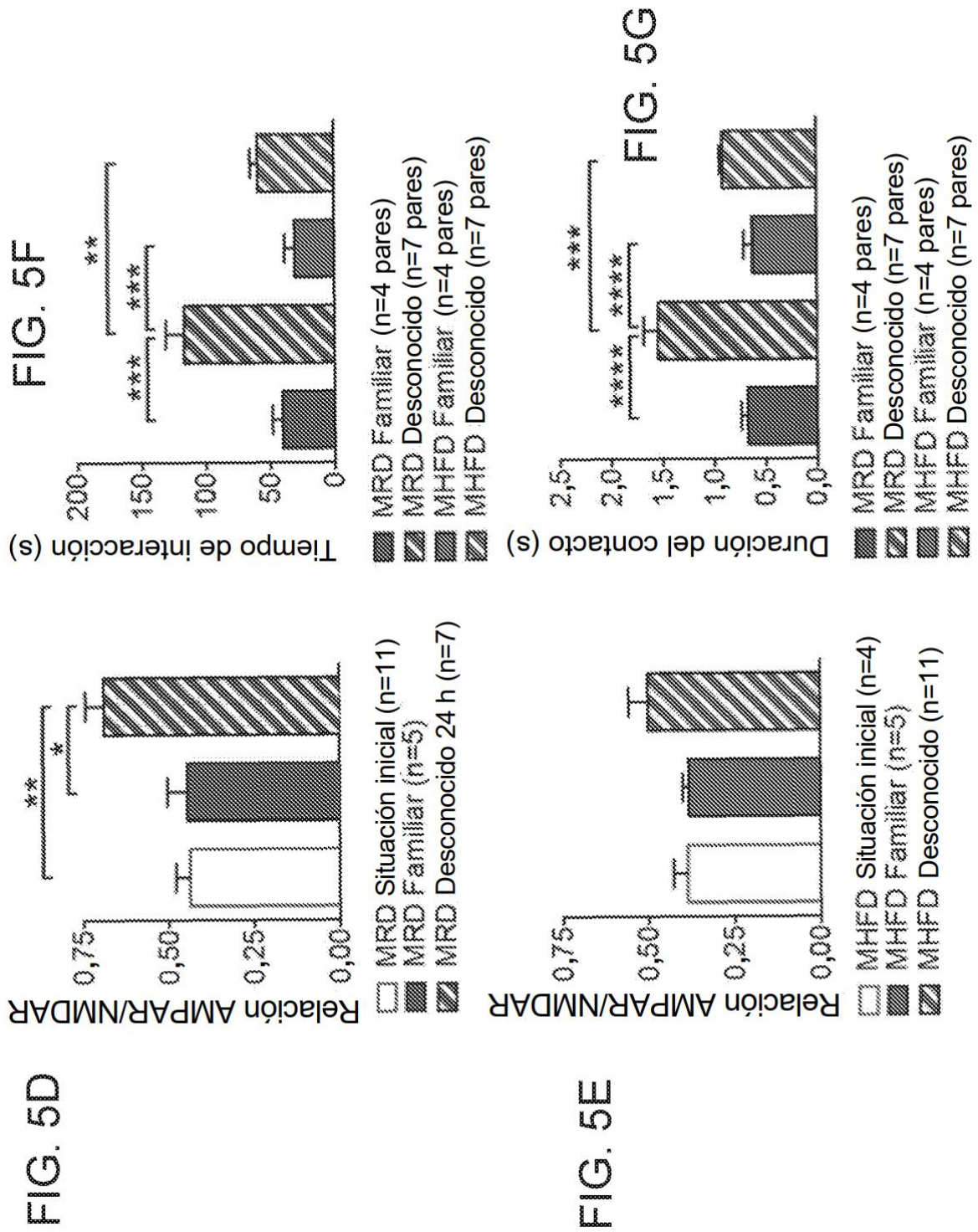


FIG. 5H

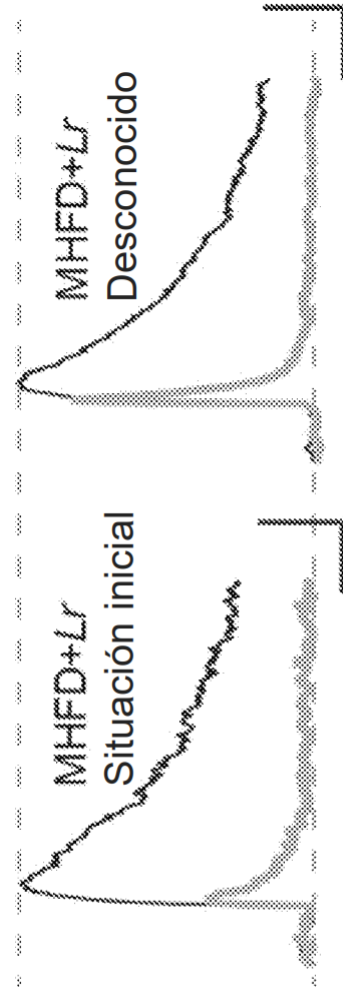


FIG. 5I

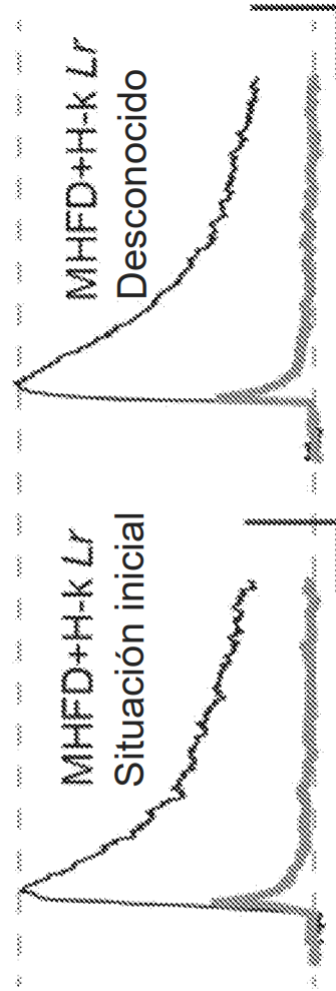


FIG. 5J

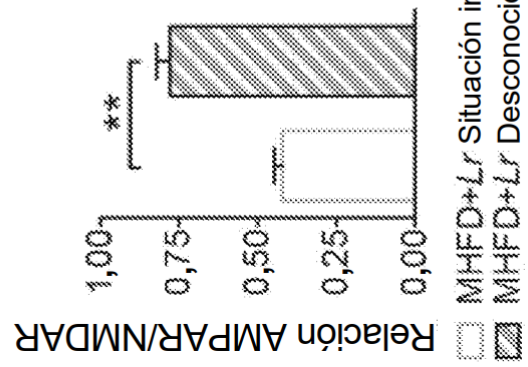


FIG. 5K

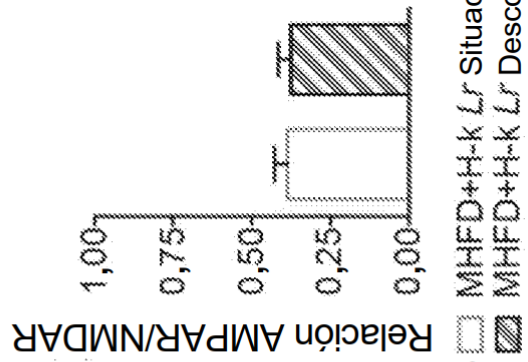


FIG. 5L

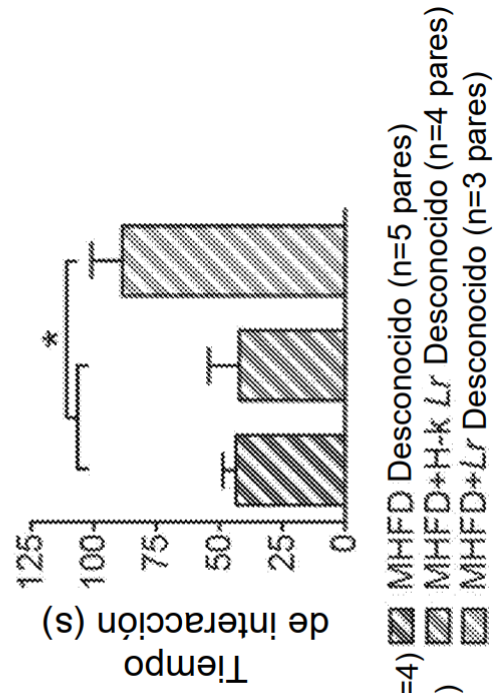
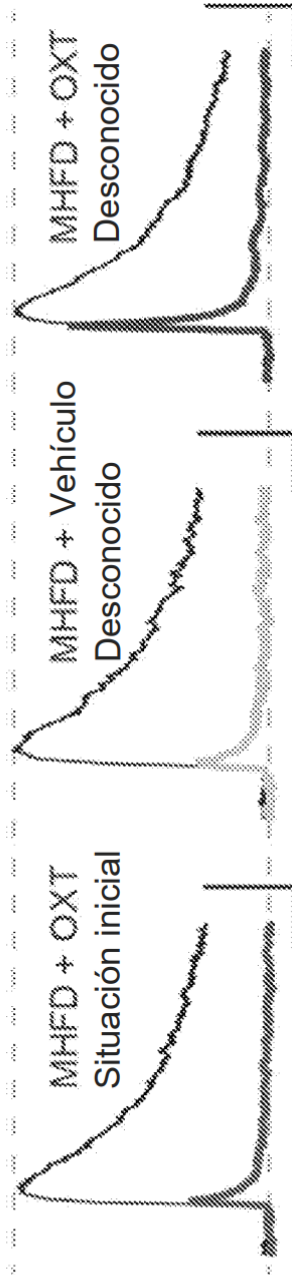


FIG. 6A



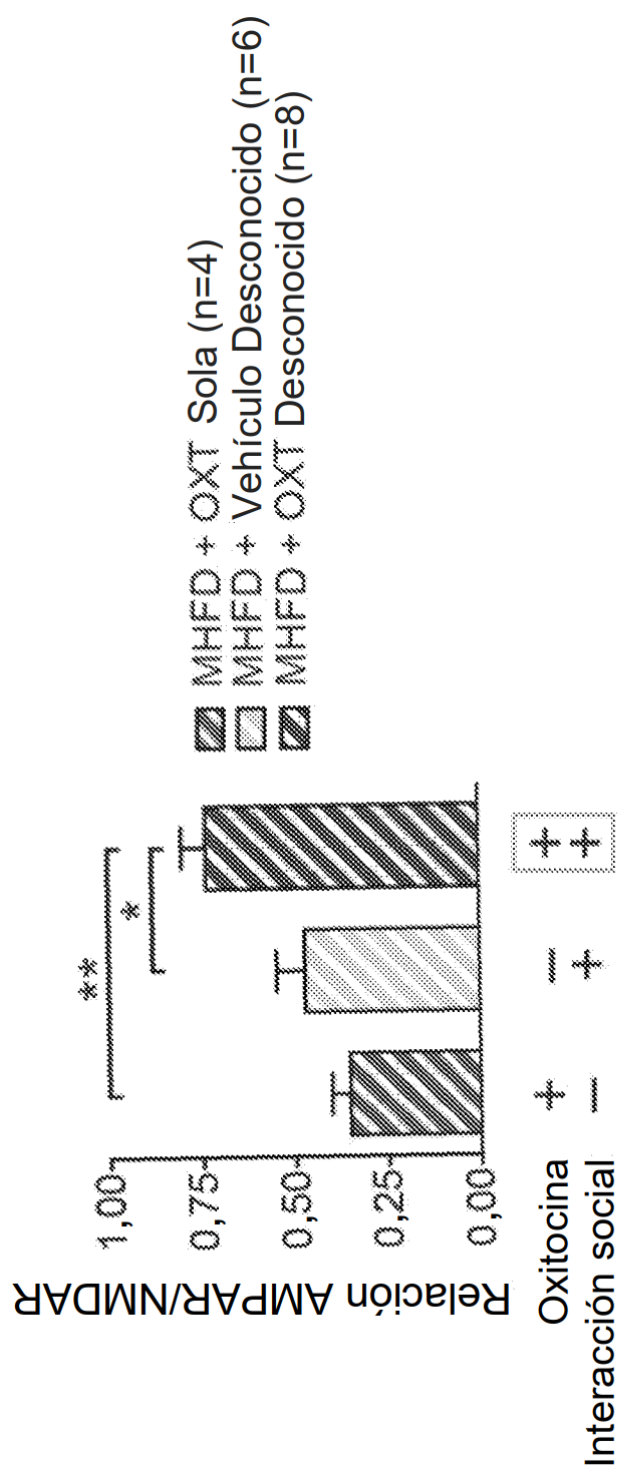


FIG. 6B

FIG. 6C

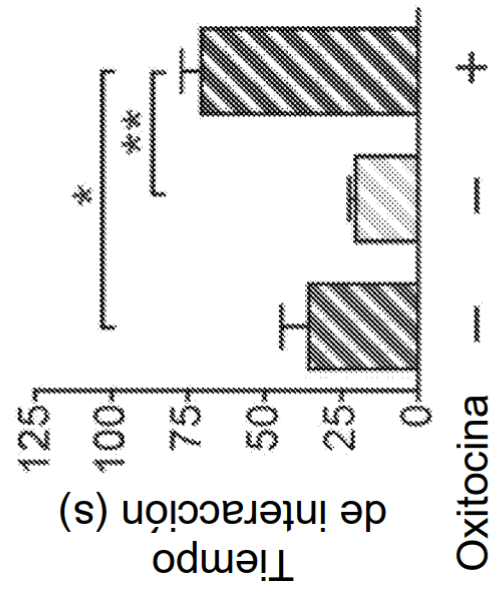


FIG. 6D



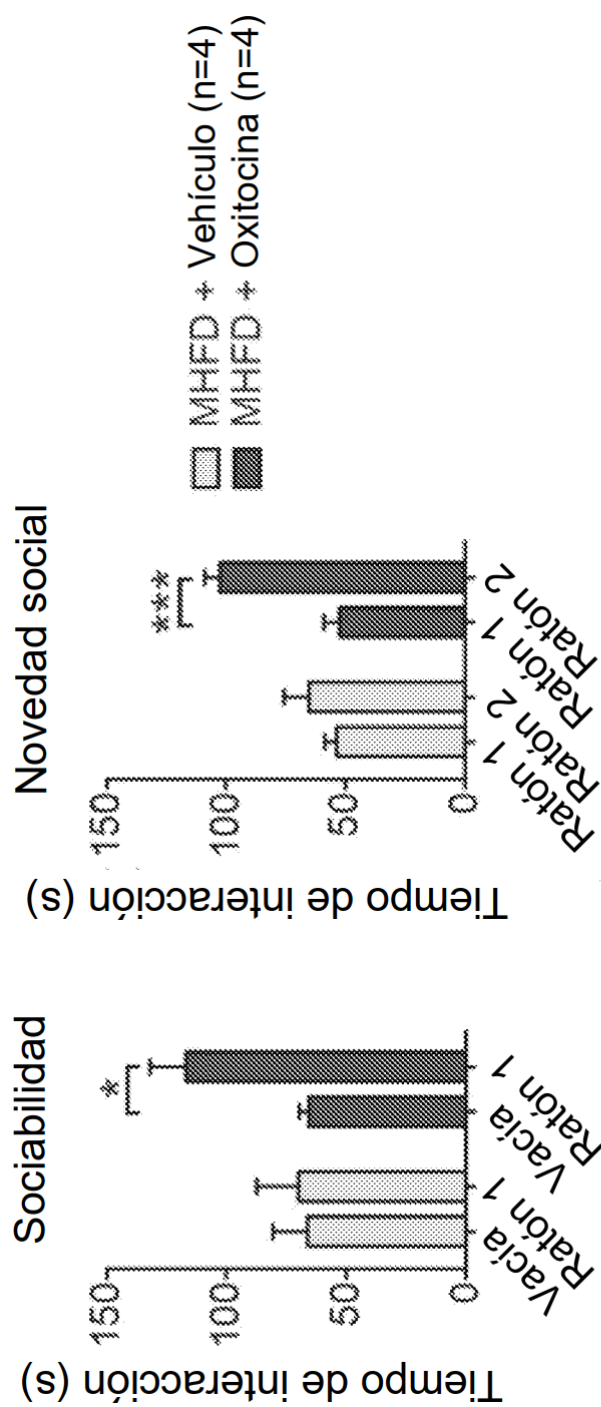


FIG. 6E

FIG. 6F

Fig. 7

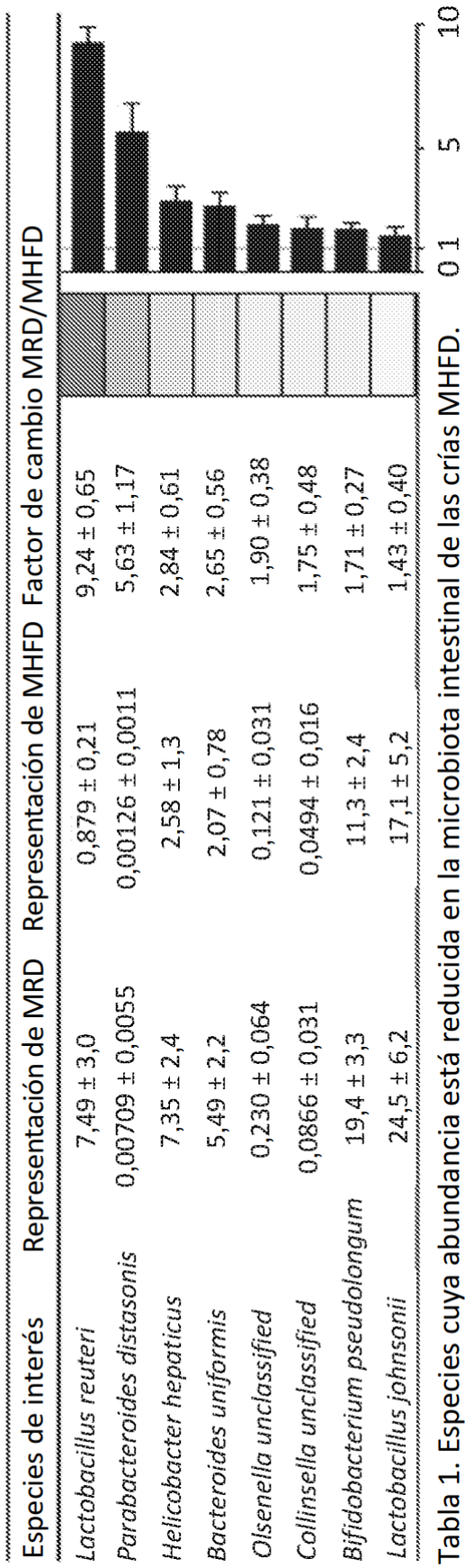
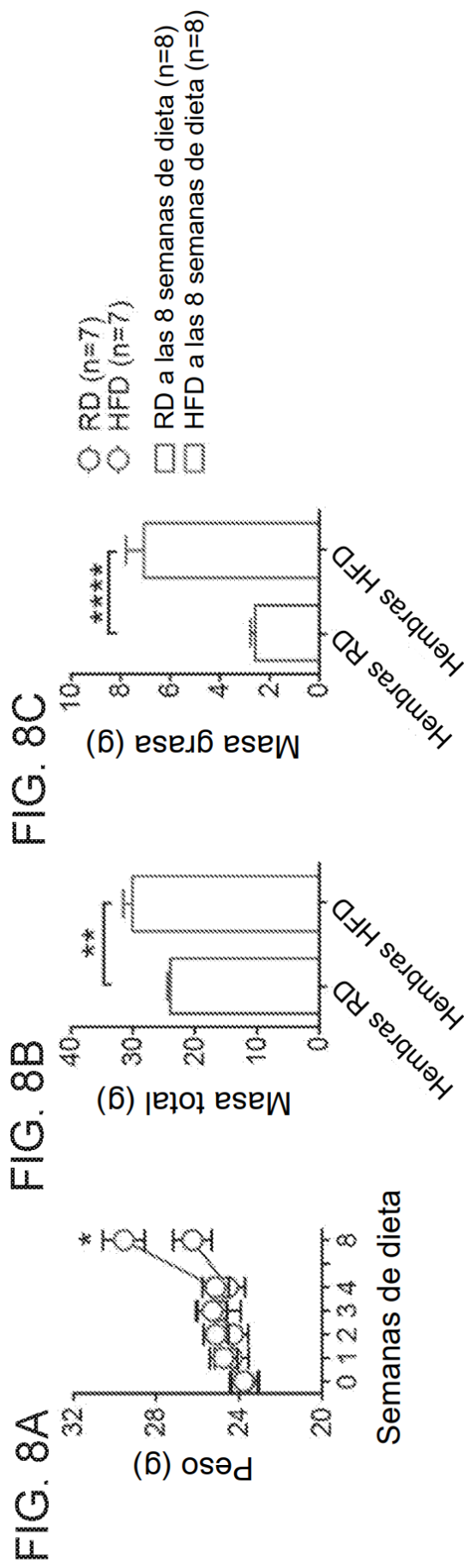


Tabla 1. Especies cuya abundancia está reducida en la microbiota intestinal de las crías MHFD.



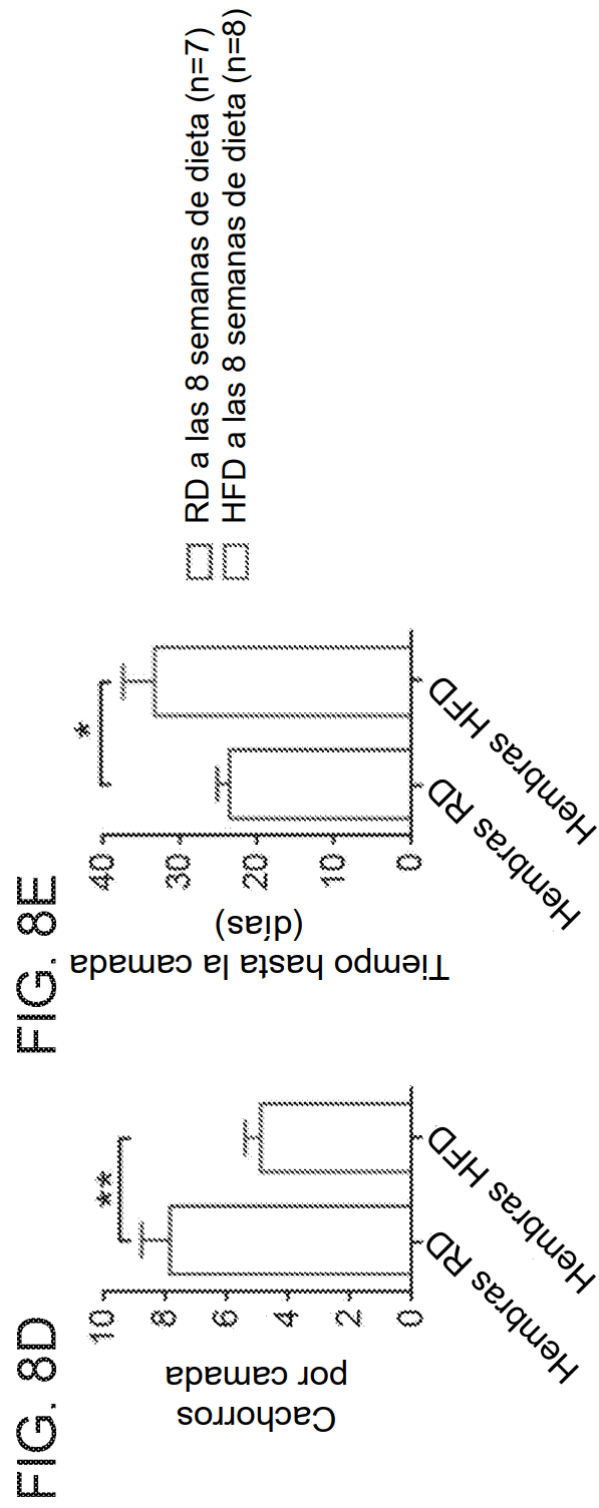


FIG. 8F 7-8 semanas

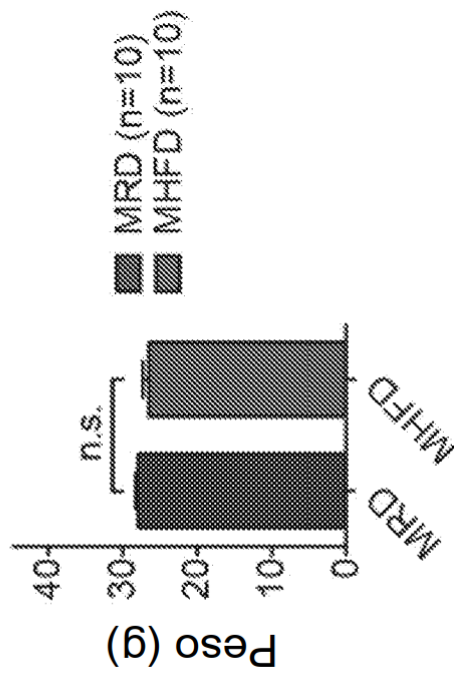
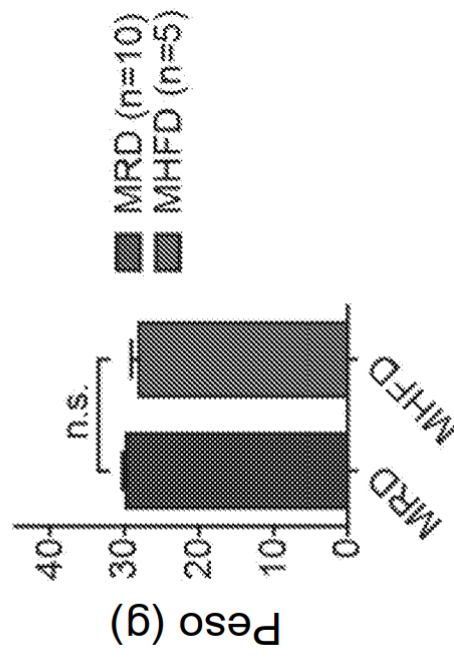


FIG. 8G 11-12 semanas



Social recíproco

FIG. 9A

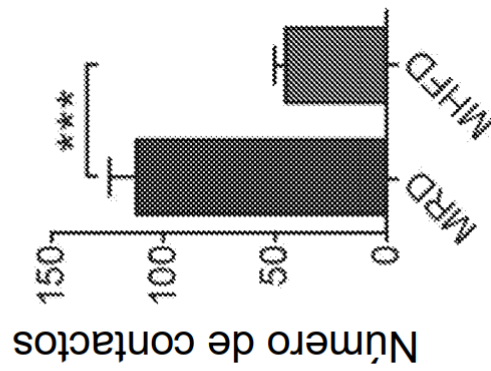


FIG. 9B

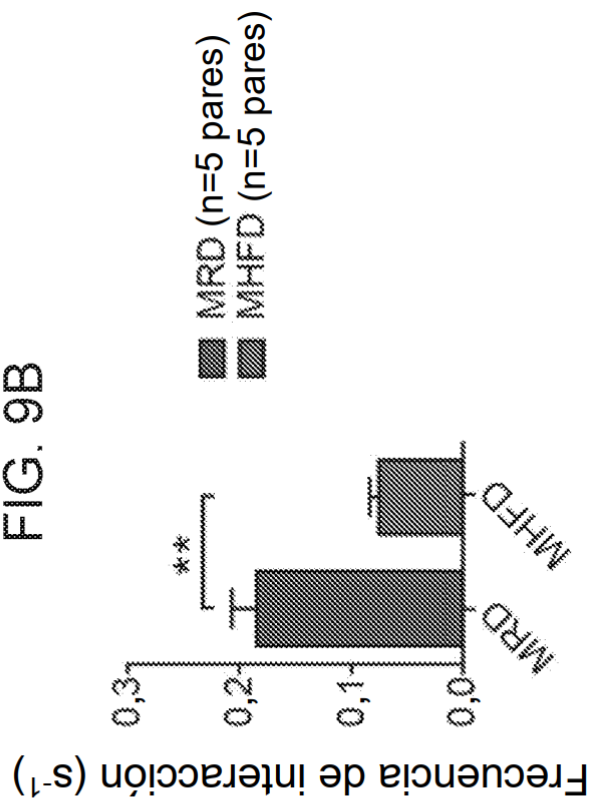


FIG. 9D

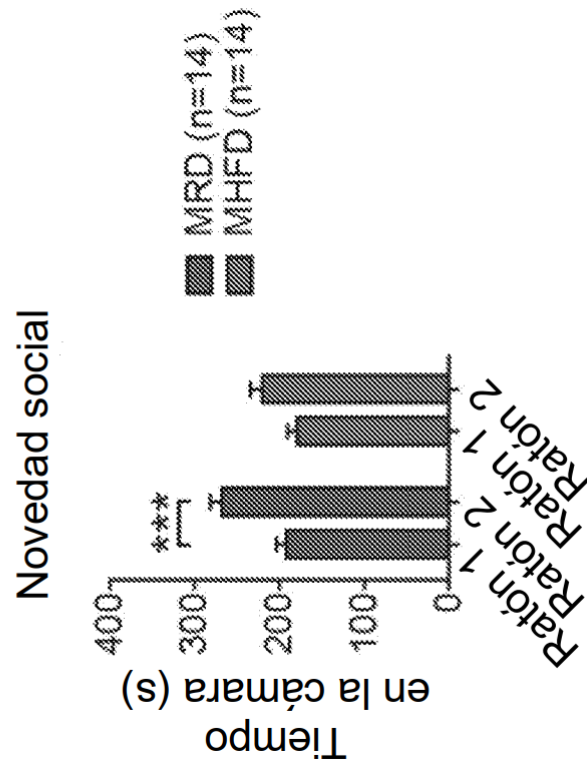
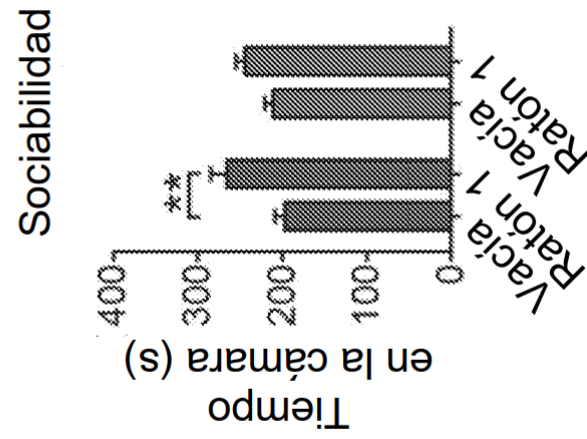
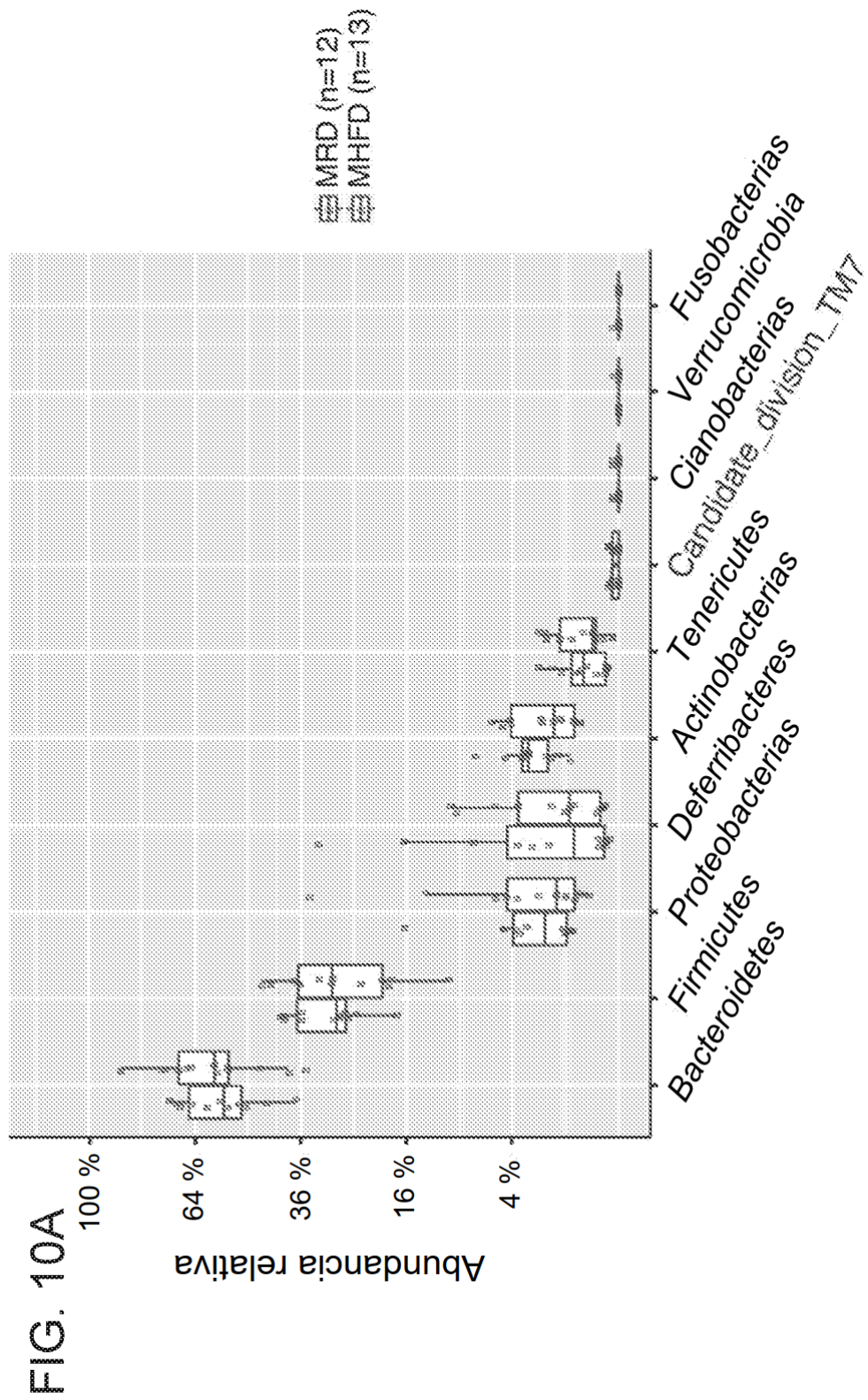


FIG. 9C



3 cámaras



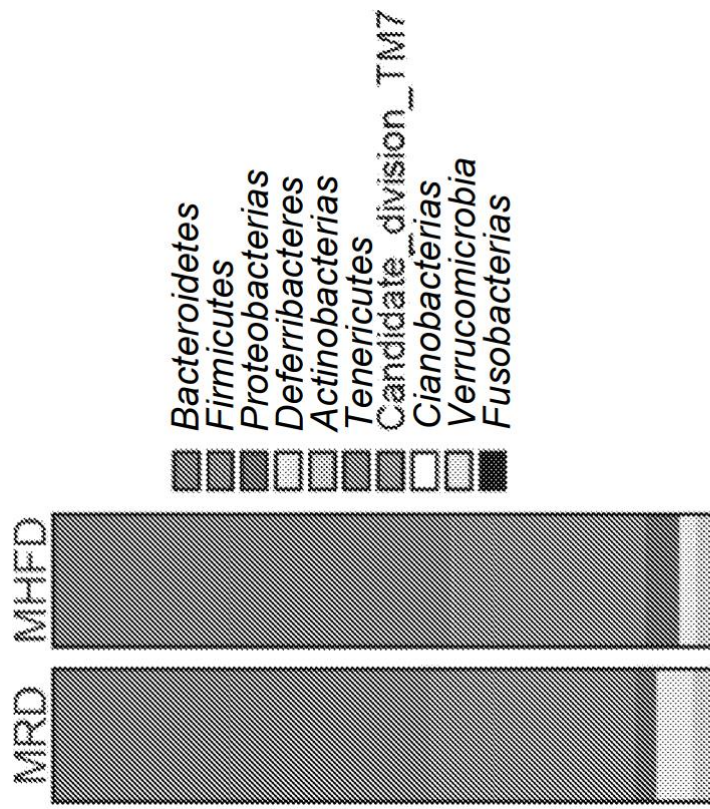
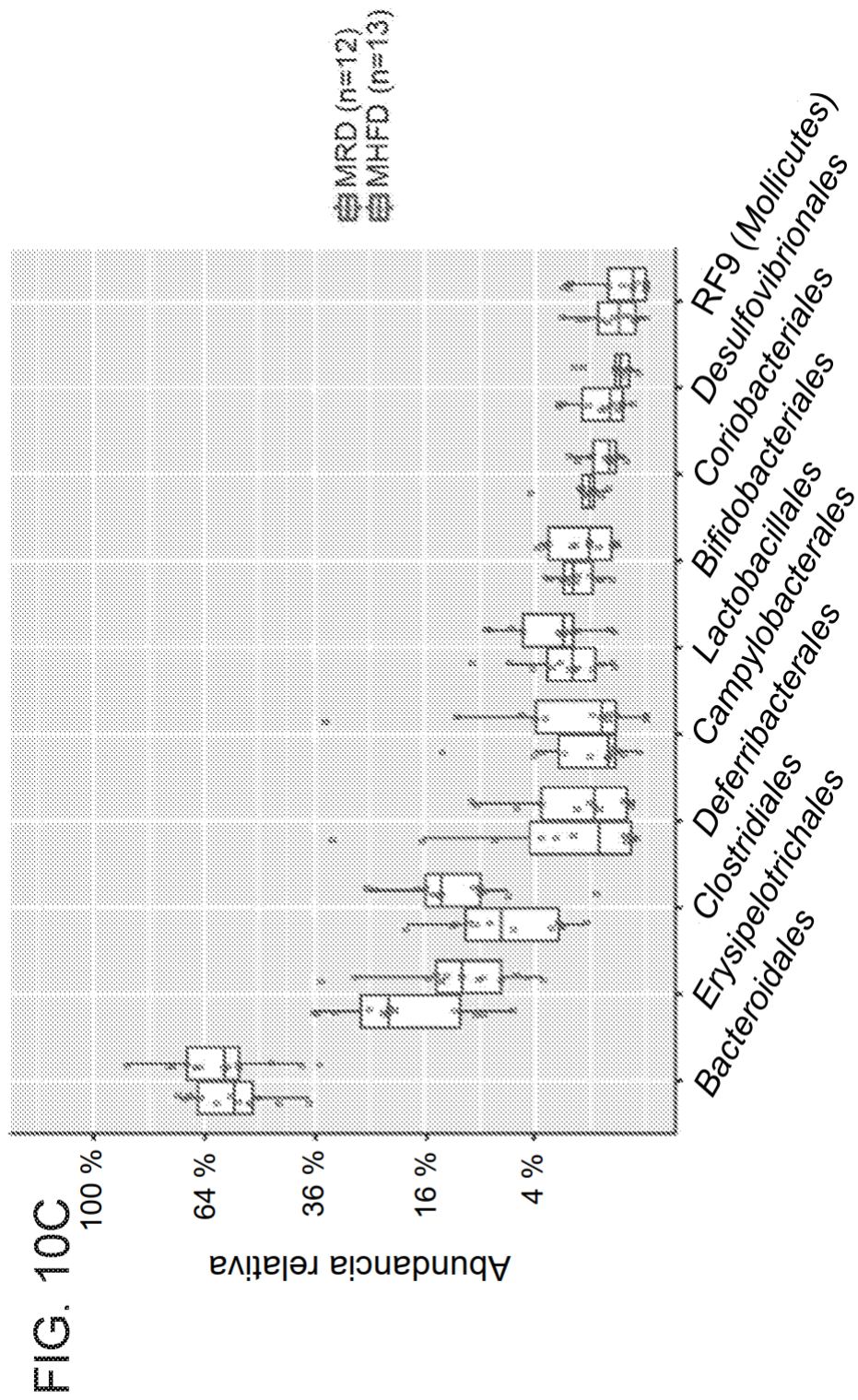


FIG. 10B



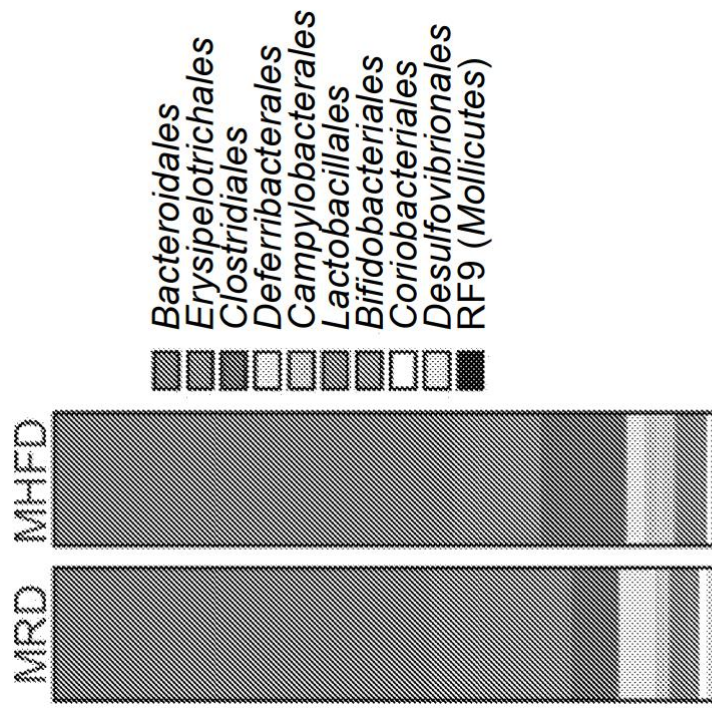


FIG. 10D

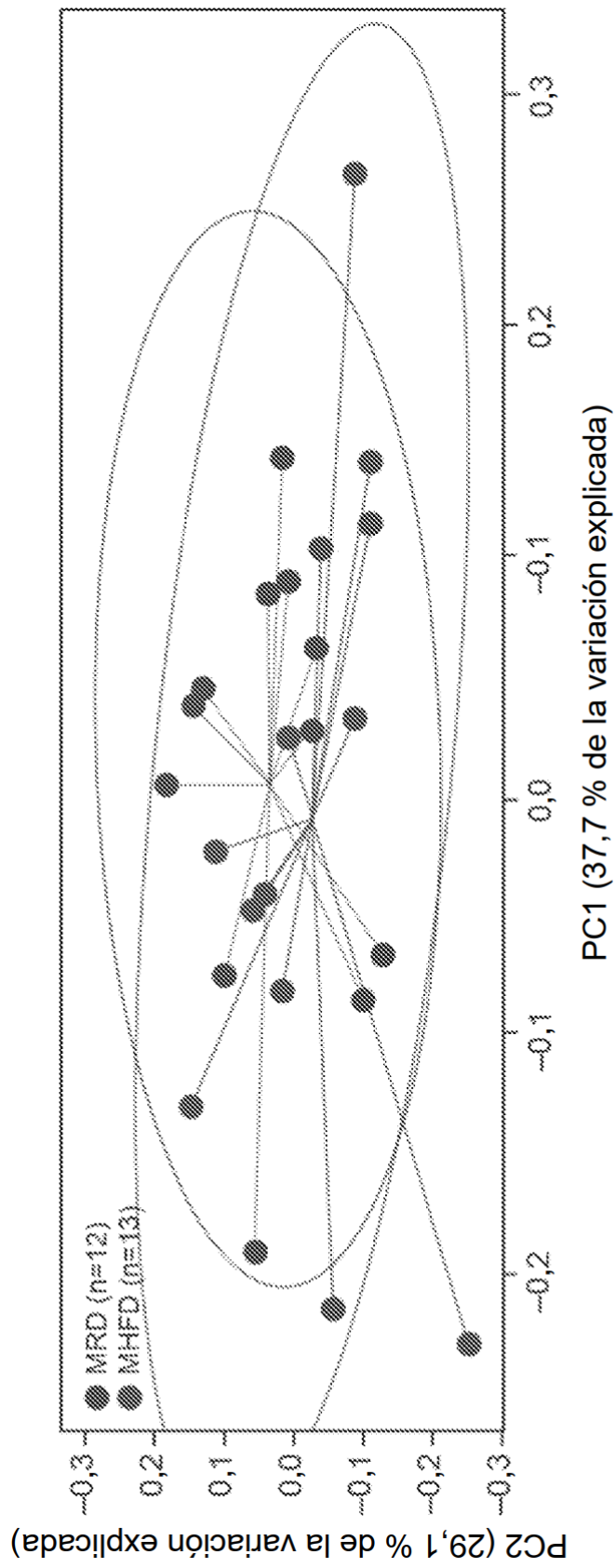


FIG. 10E

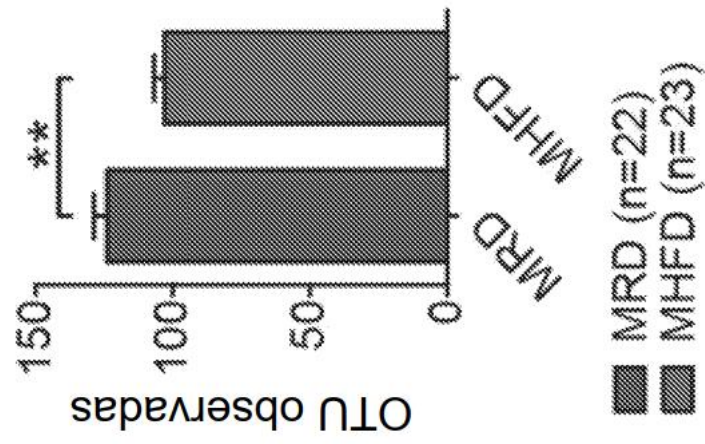
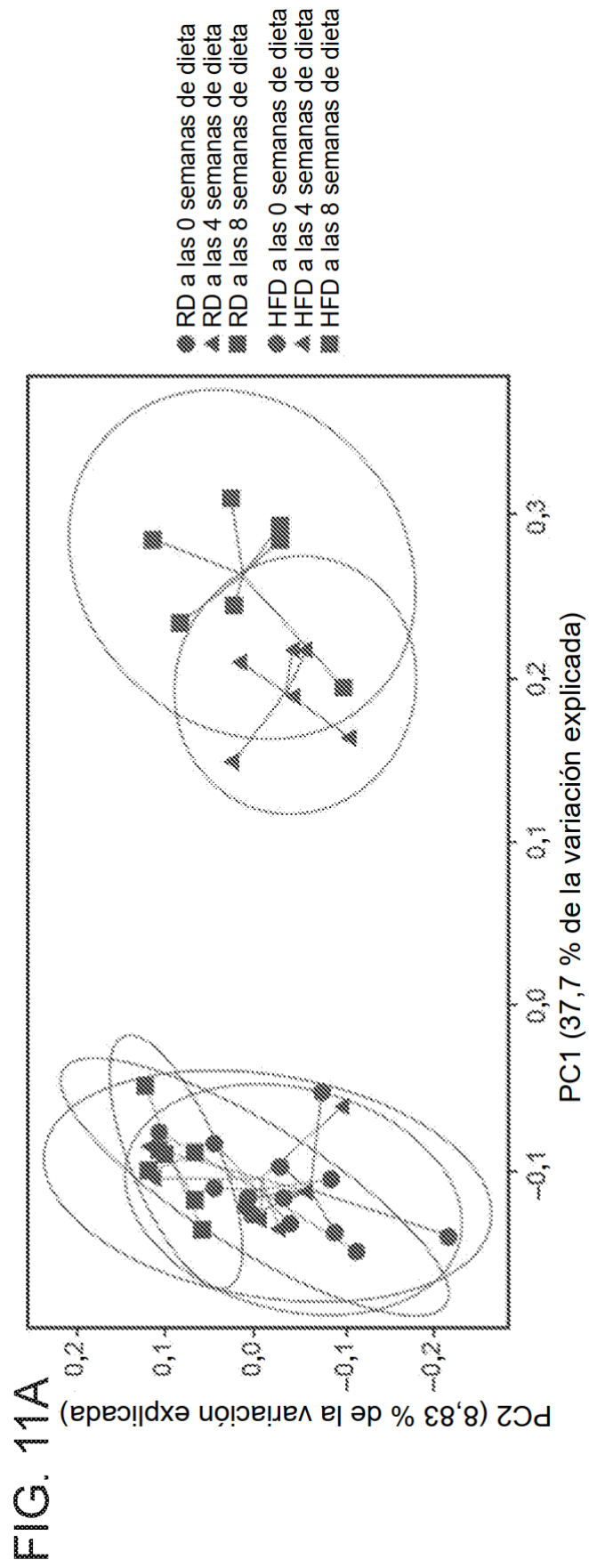
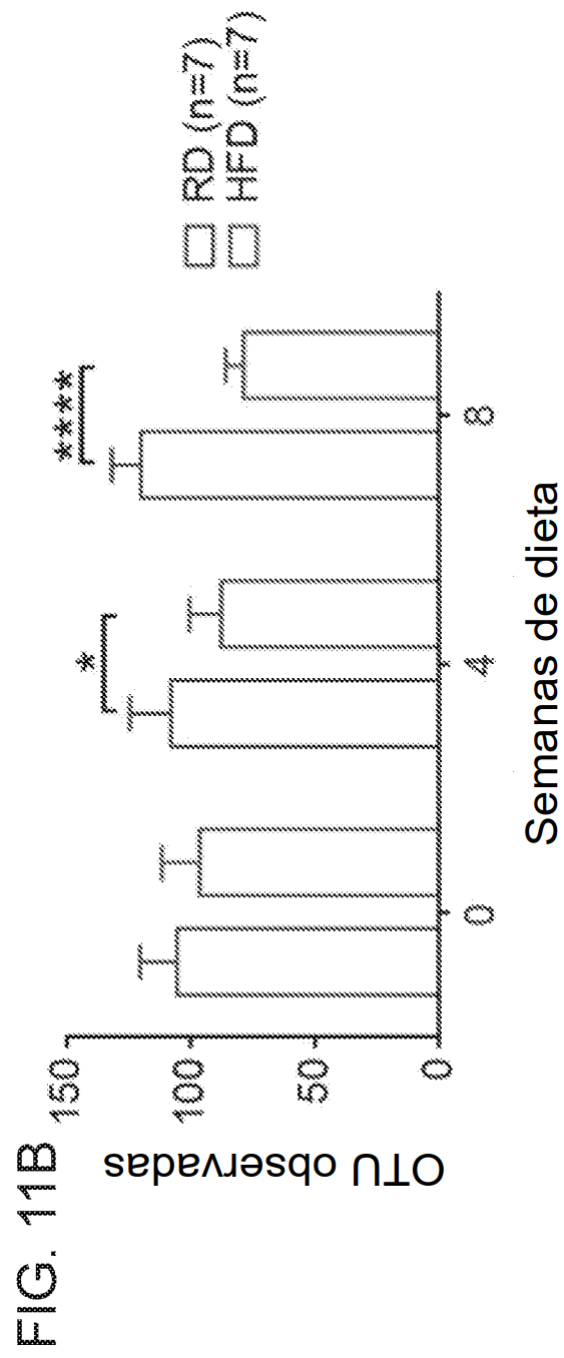


FIG. 10F





Social recíproco

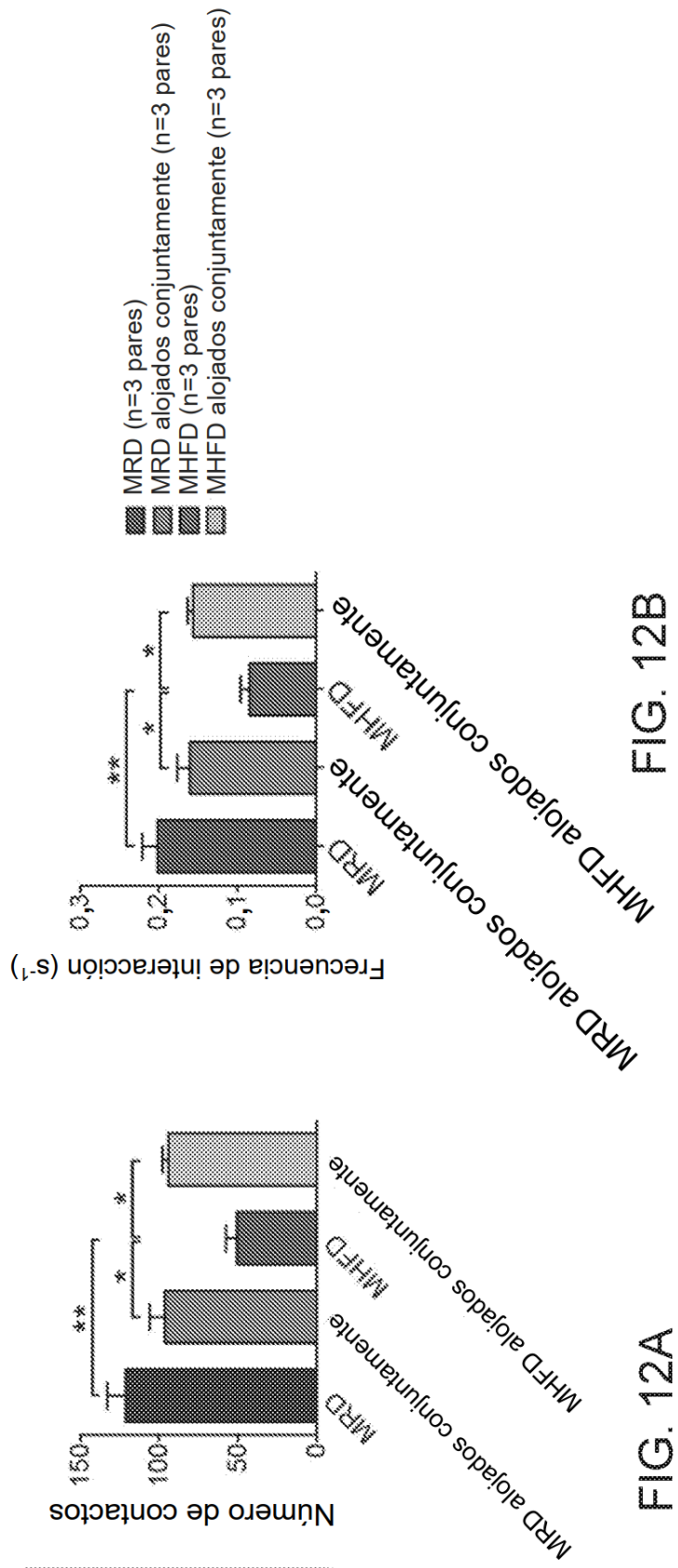


FIG. 12D

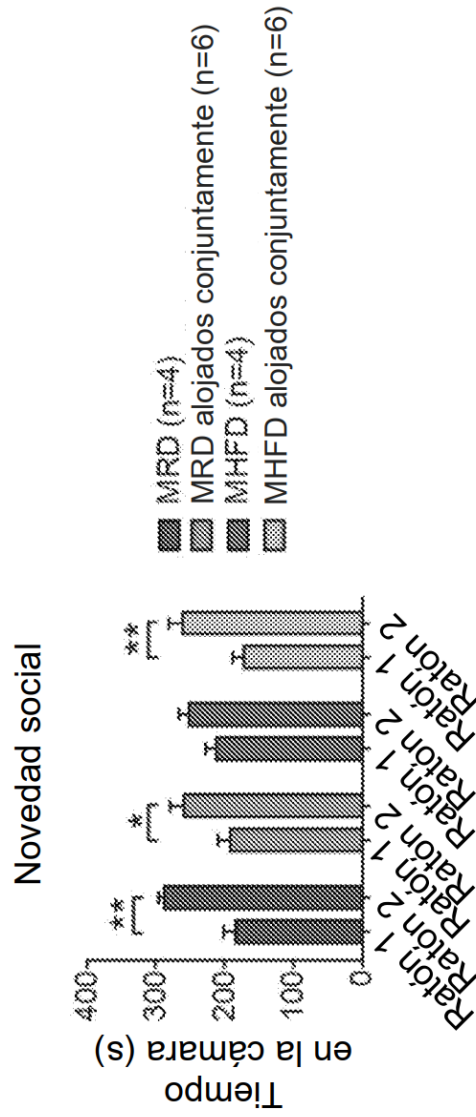


FIG. 12C

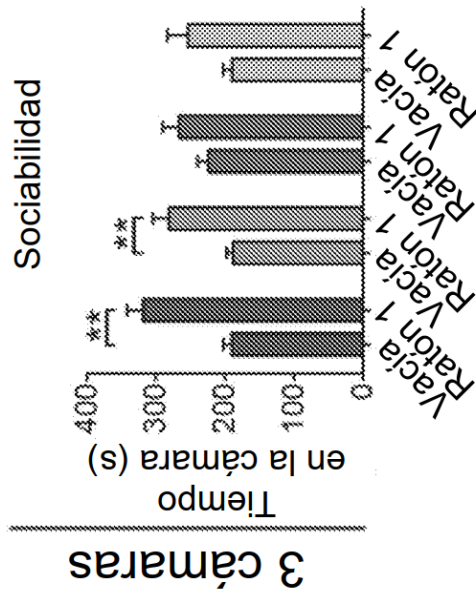


FIG. 13B

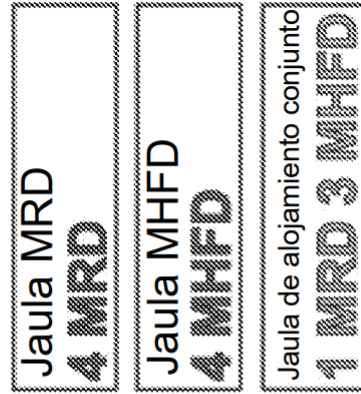


FIG. 13A

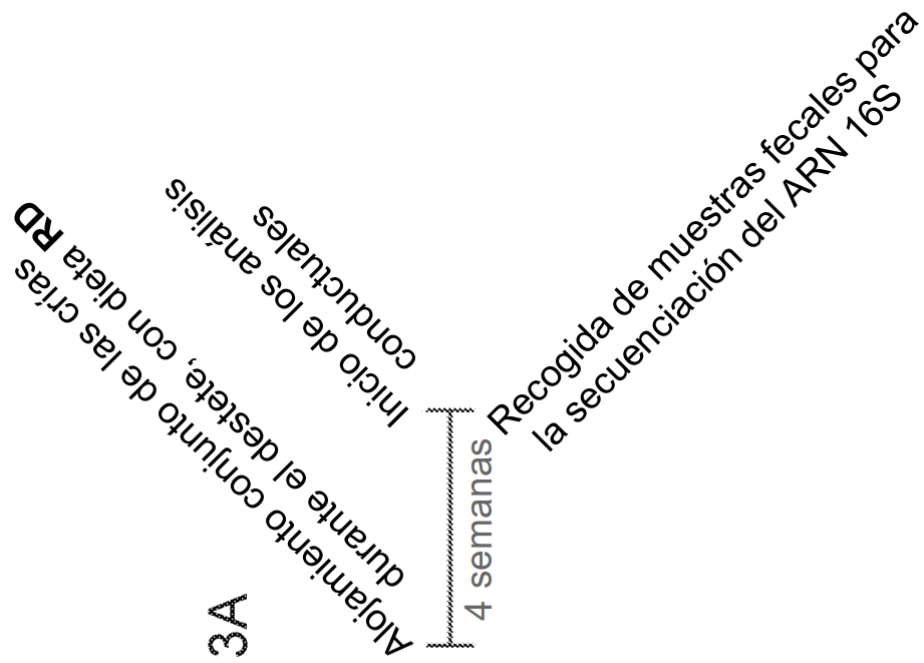


FIG. 13C

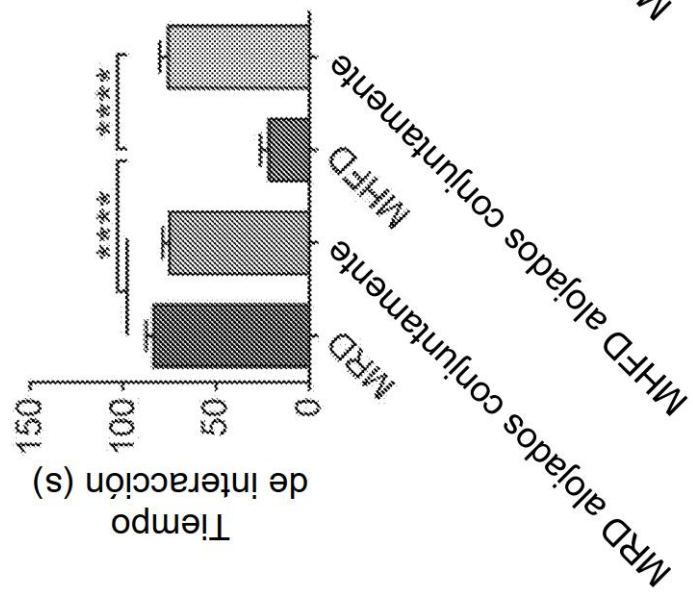
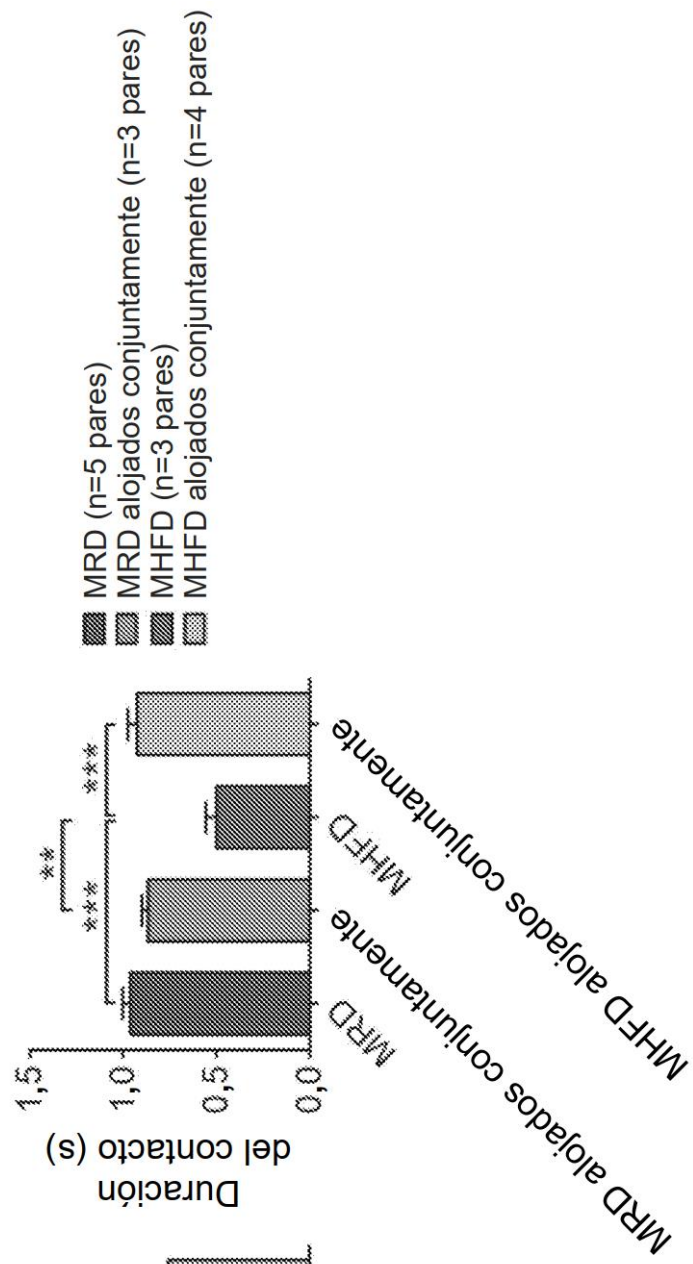


FIG. 13D



MRD (n=5 pares)
 MRD alojados conjuntamente (n=3 pares)
 MHFD (n=3 pares)
 MHFD alojados conjuntamente (n=4 pares)

FIG. 13E

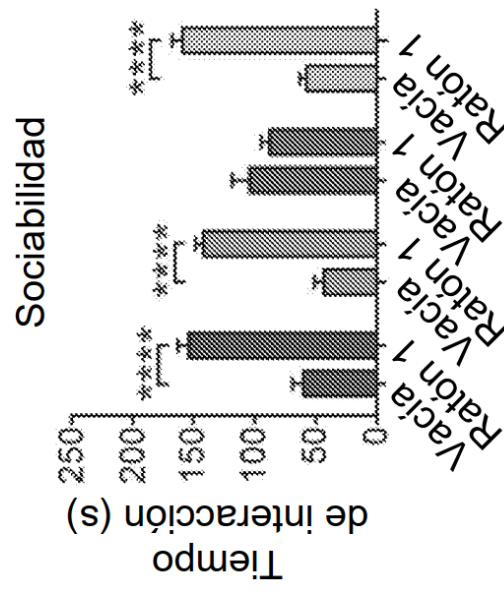
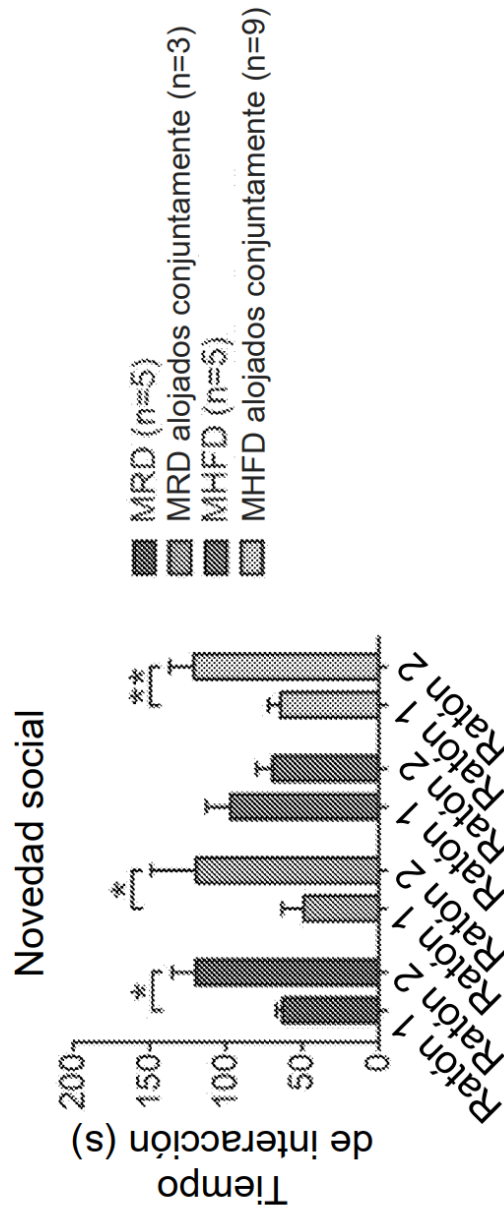


FIG. 13F



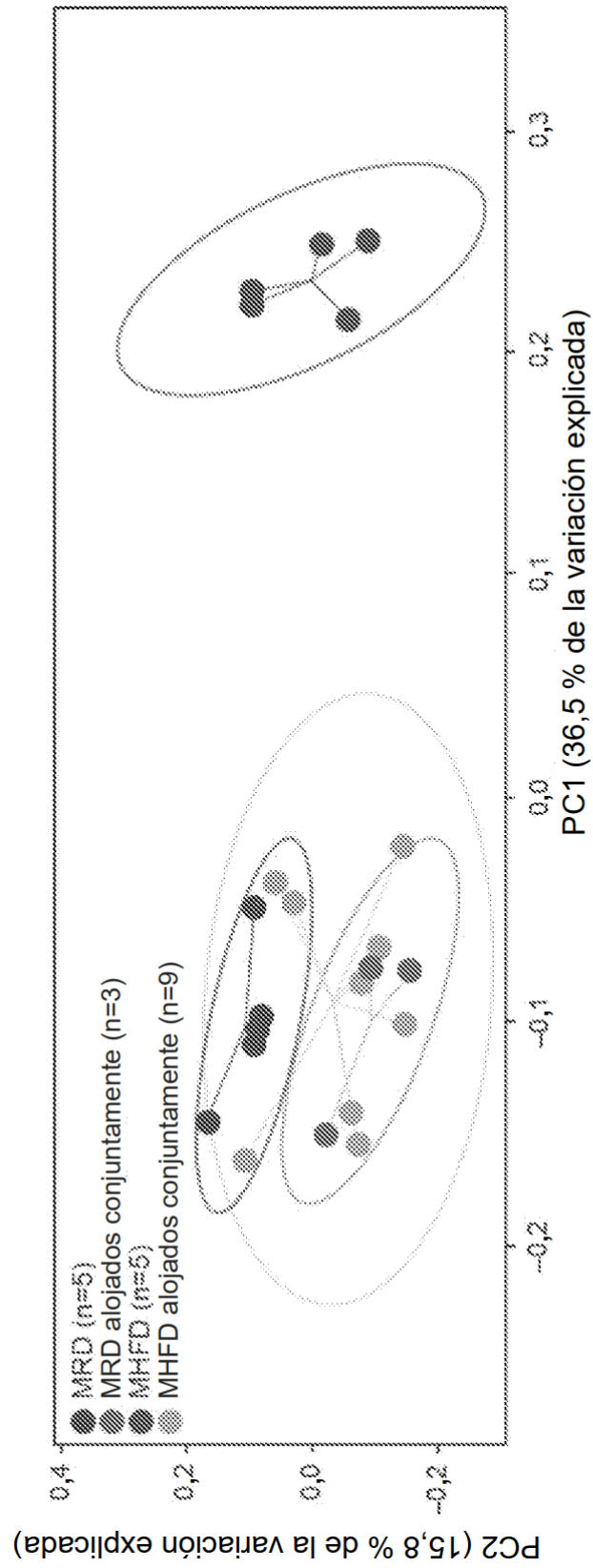


FIG. 13G

FIG. 14A

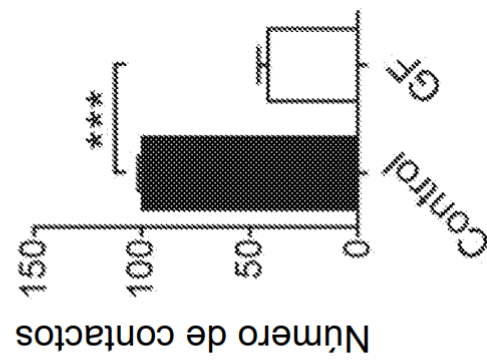
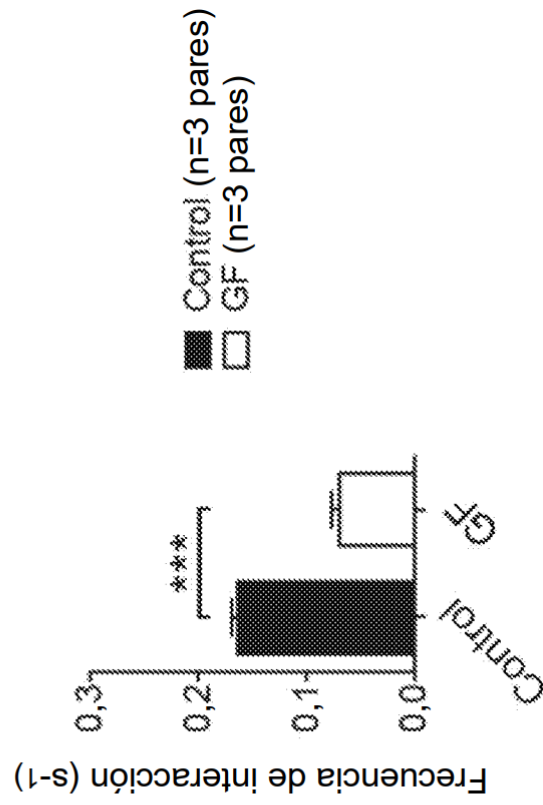


FIG. 14B



Social recíproco

FIG. 14D

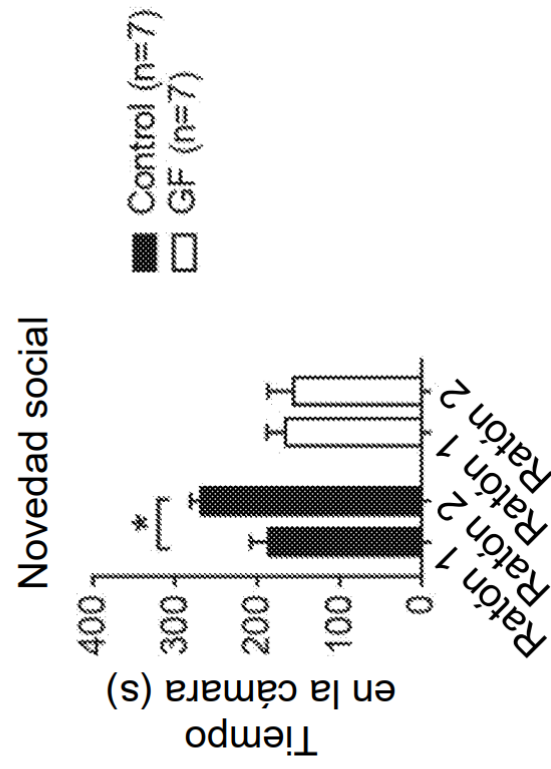


FIG. 14C

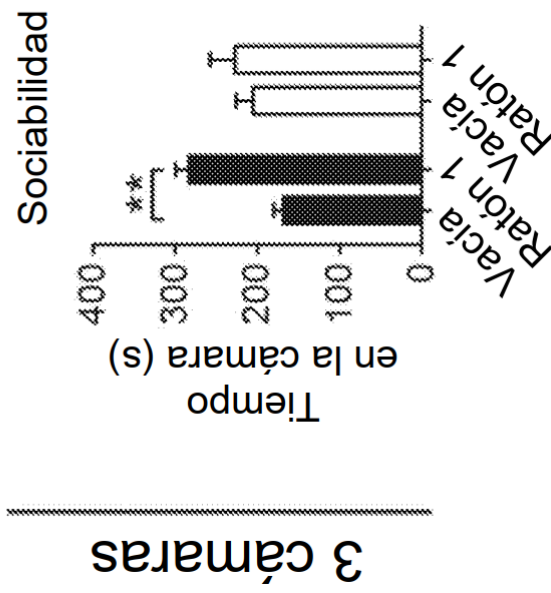


FIG. 14F

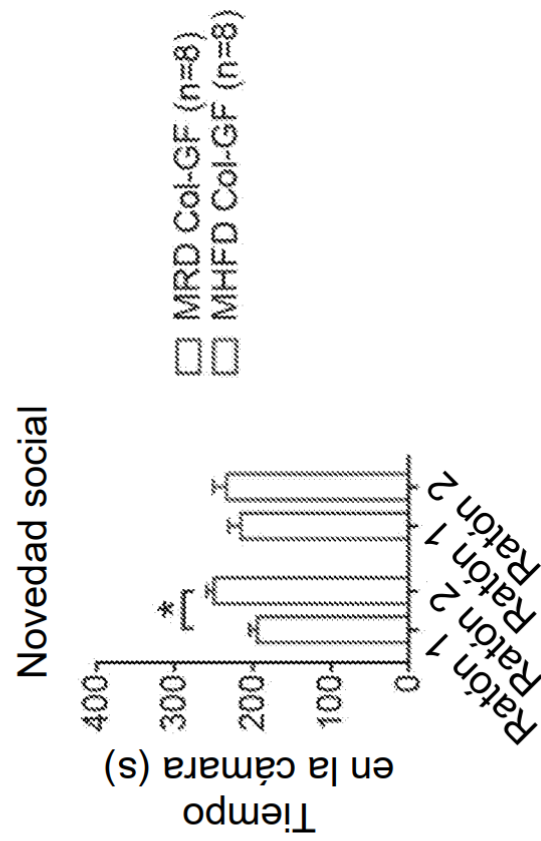


FIG. 14E

Colonización de GF
a las 4 semanas de edad
3 cámaras

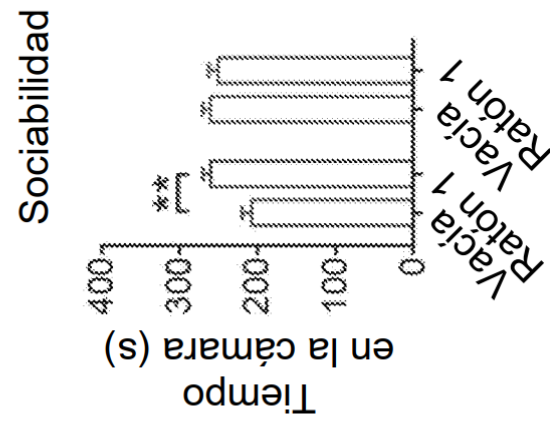


FIG. 14G

Colonización de GF
a las 8 semanas de edad
3 cámaras

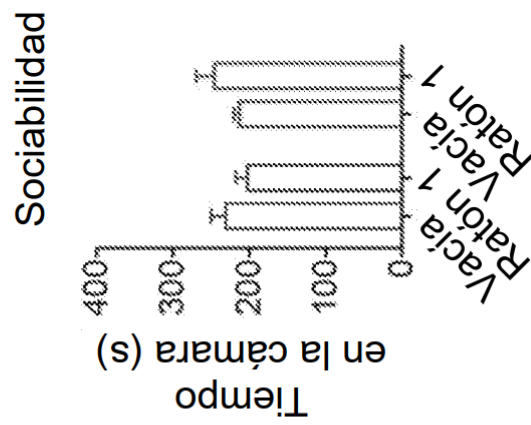


FIG. 14H

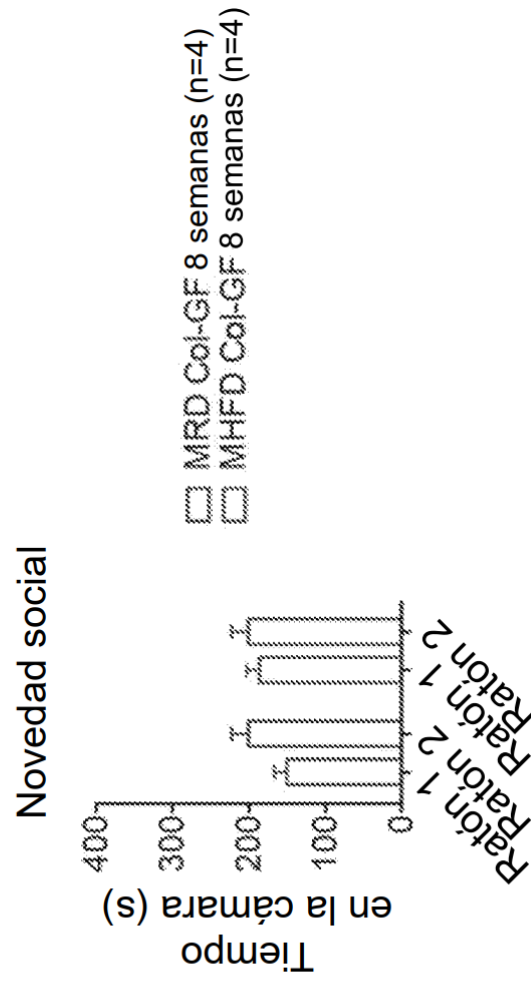
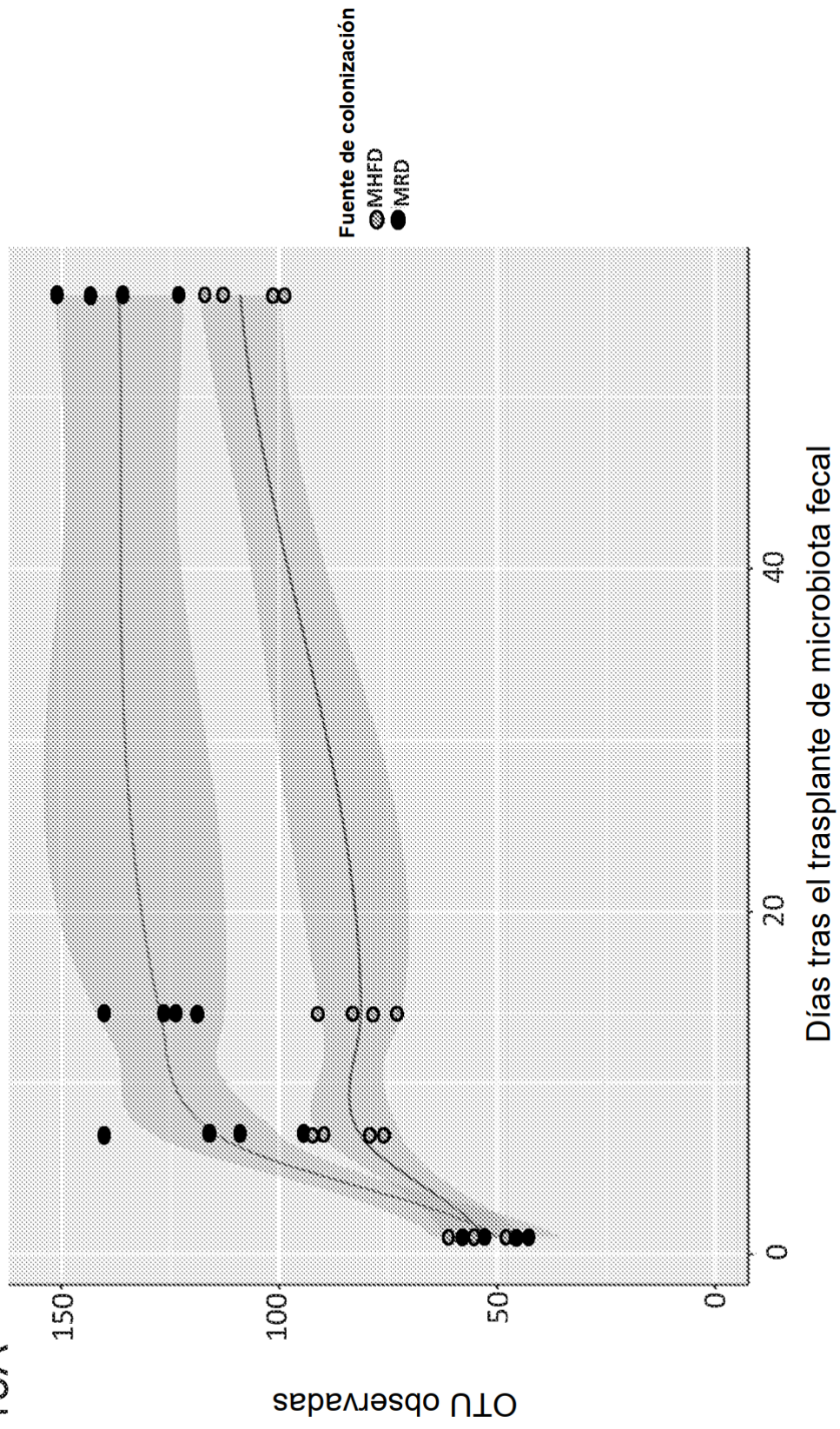


FIG. 15A



FMT de ratones GF de 8 semanas de edad
4 semanas

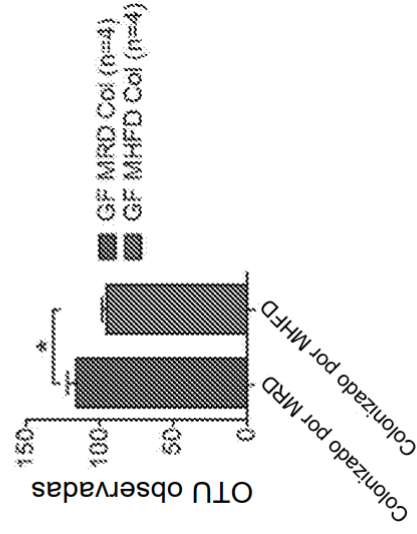


FIG. 15F

FMT de ratones GF de 4 semanas de edad
8 semanas

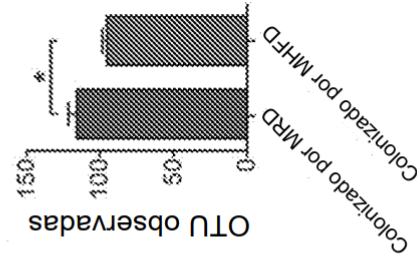


FIG. 15E

FMT de ratones GF de 4 semanas de edad
2 semanas

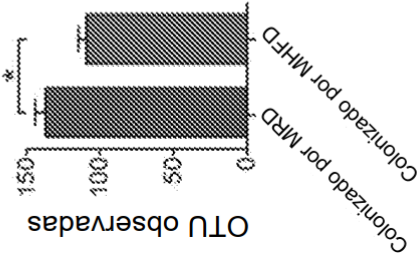


FIG. 15D

FMT de ratones GF de 4 semanas de edad
1 semana

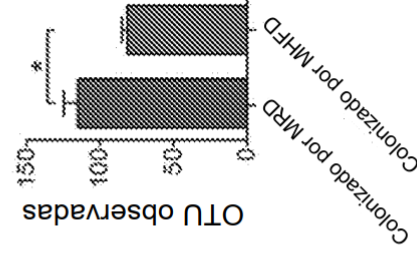


FIG. 15C

FMT de ratones GF de 4 semanas de edad
1 día

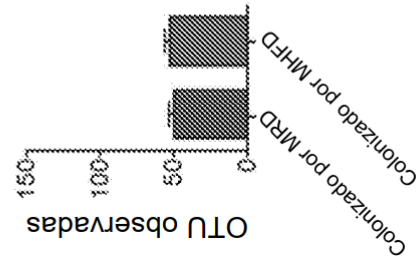
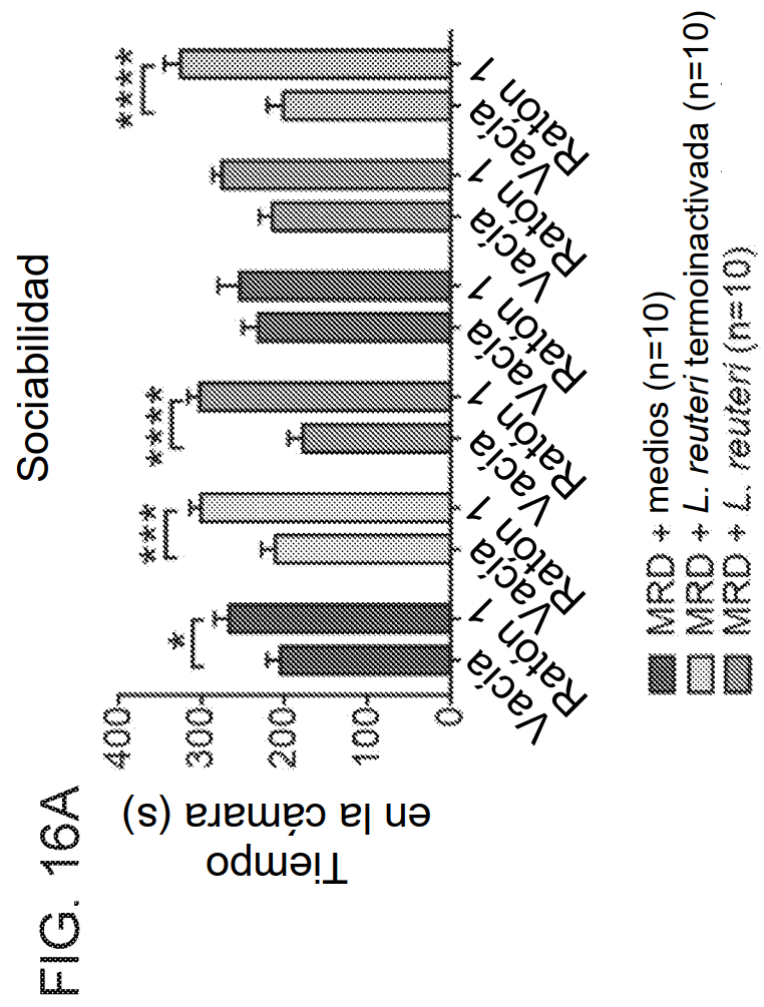
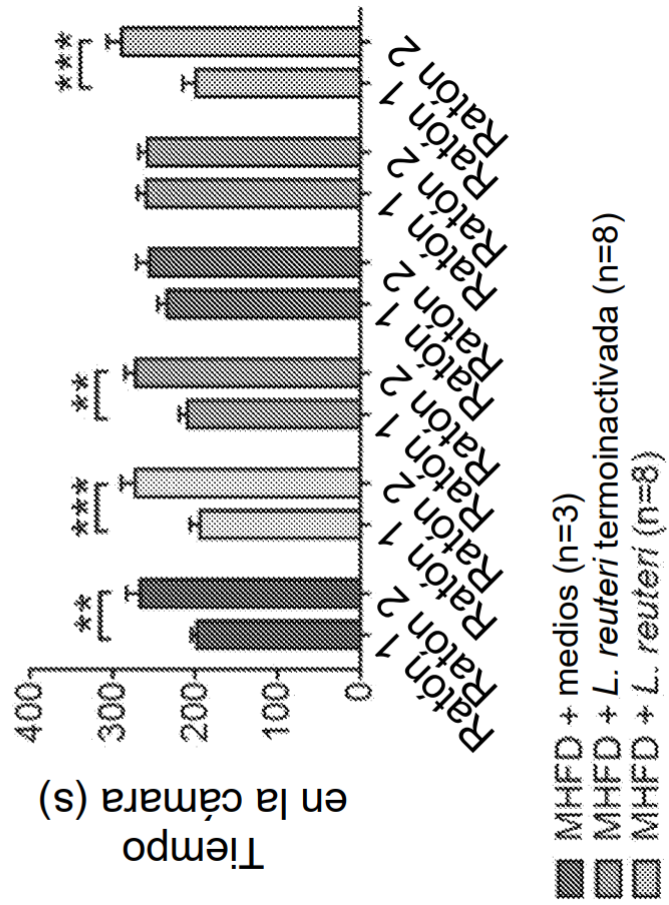


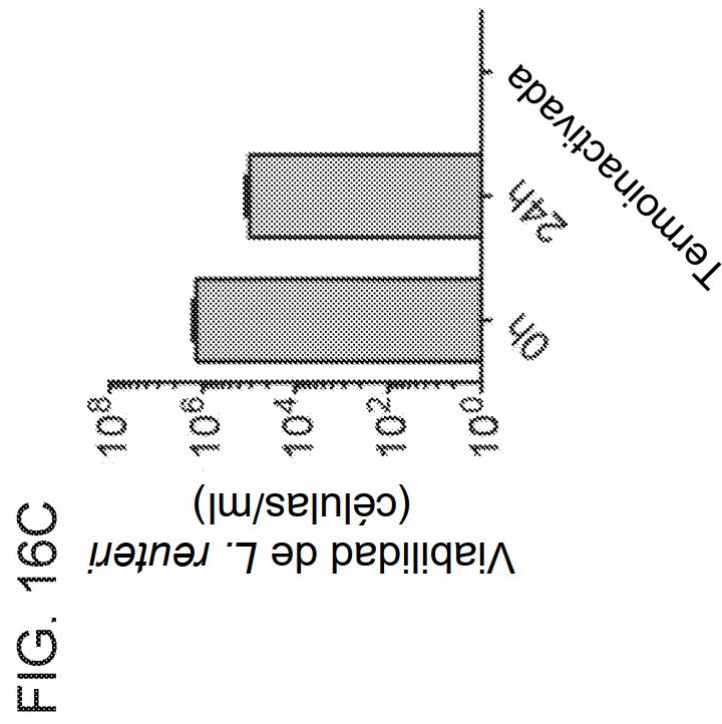
FIG. 15B



Novedad social

FIG. 16B





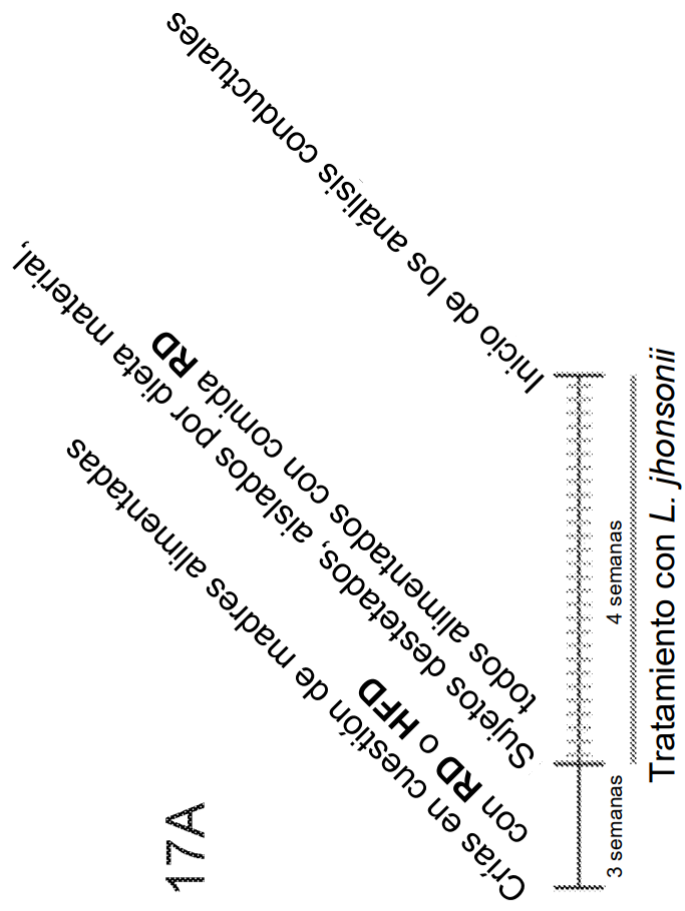


FIG. 17A

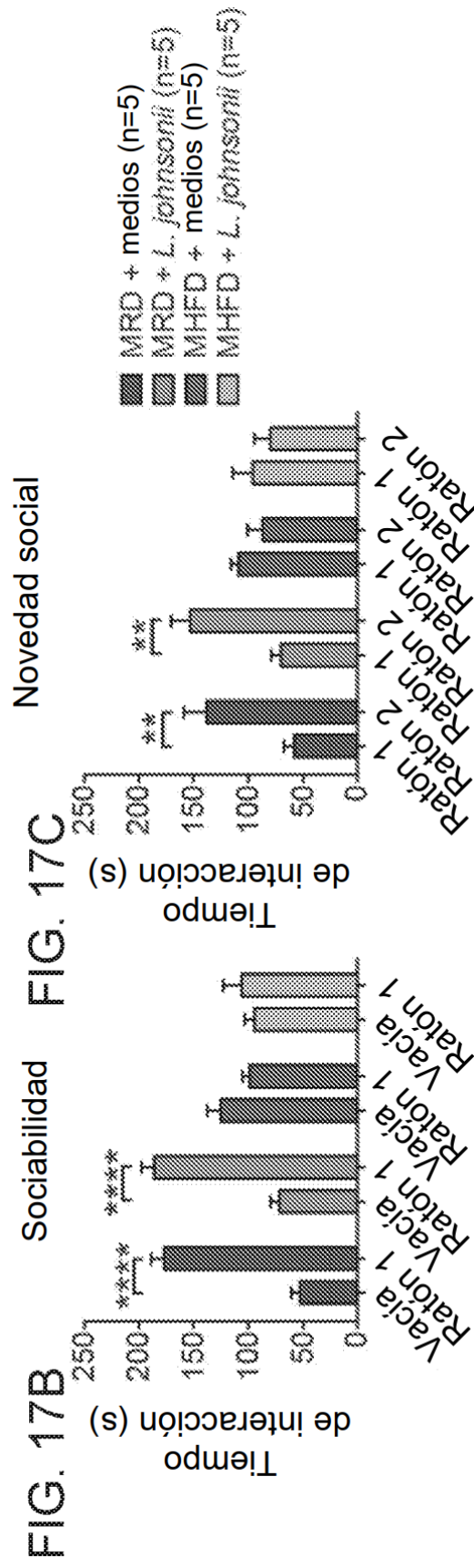


FIG. 17E

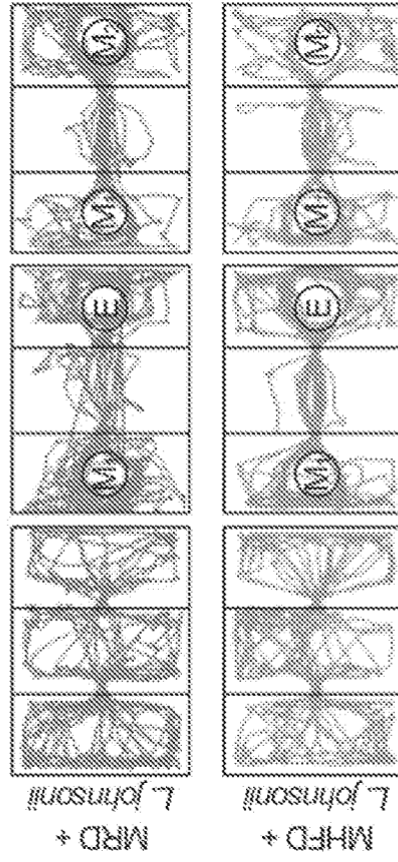


FIG. 17G

FIG. 17D

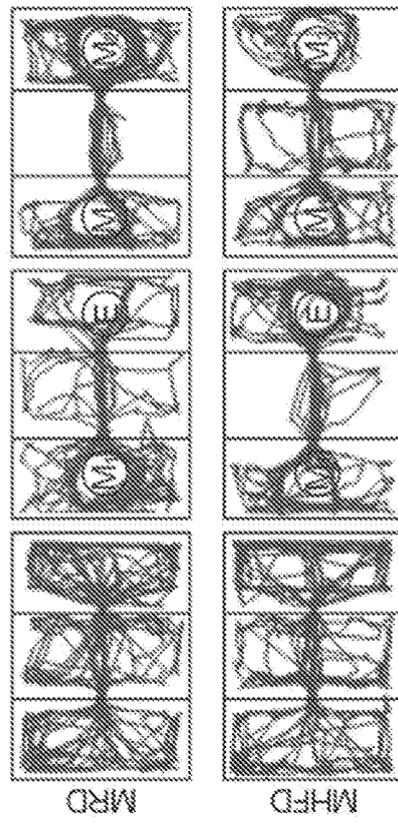
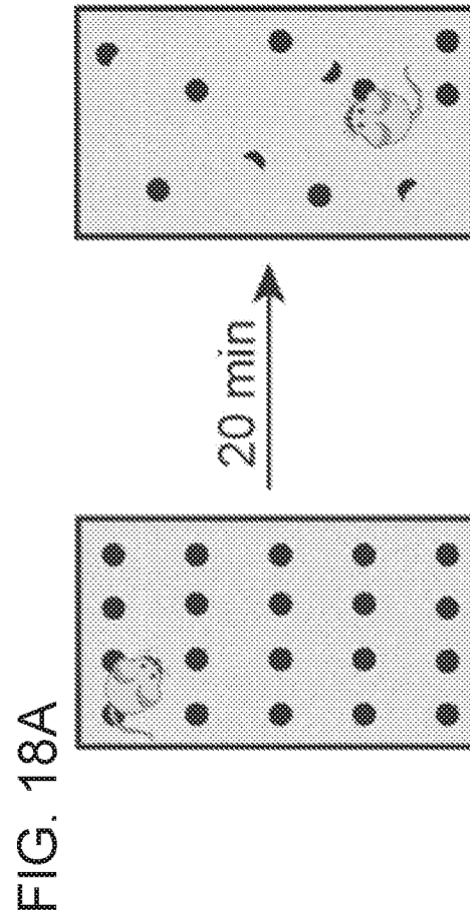
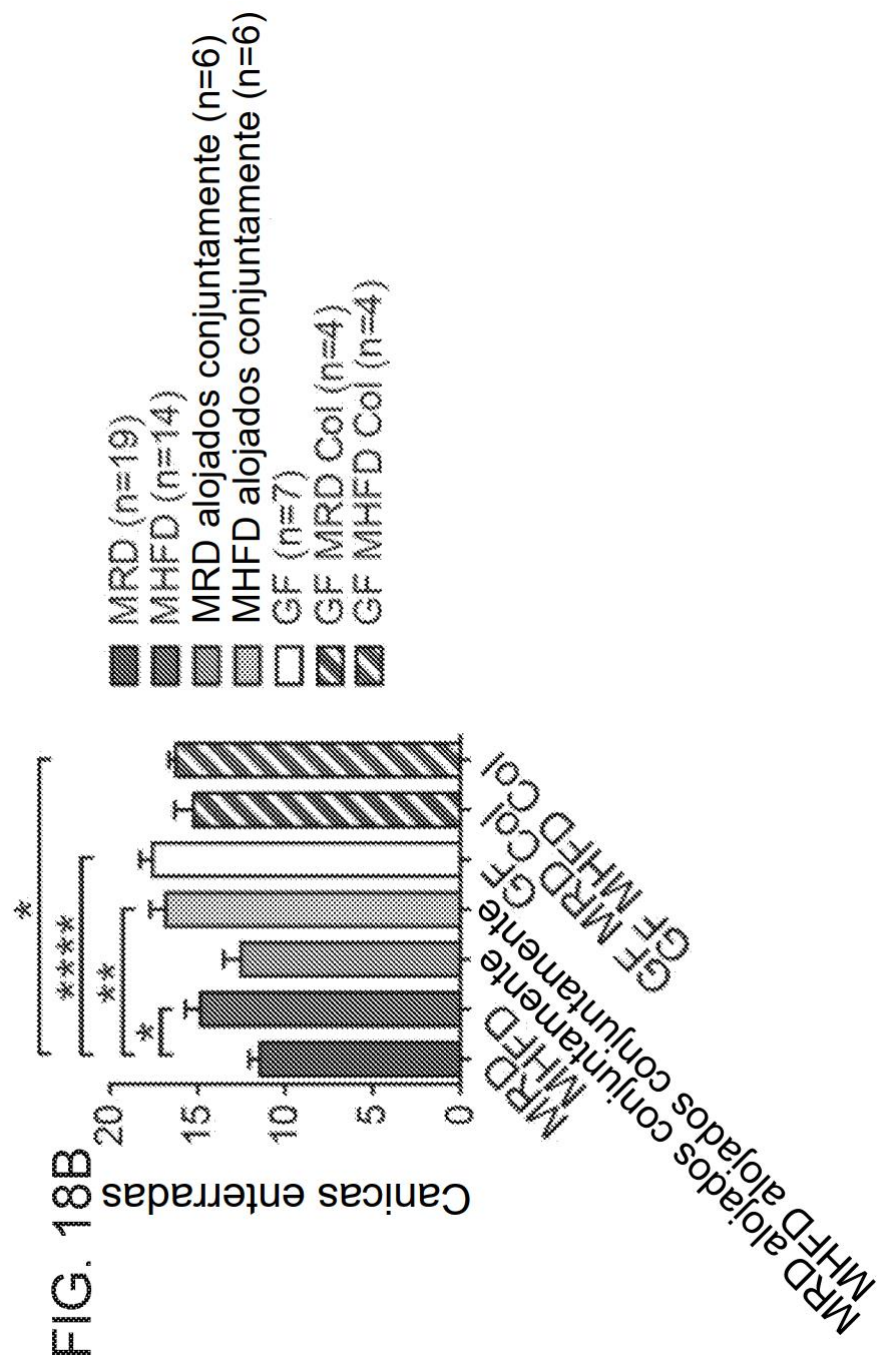
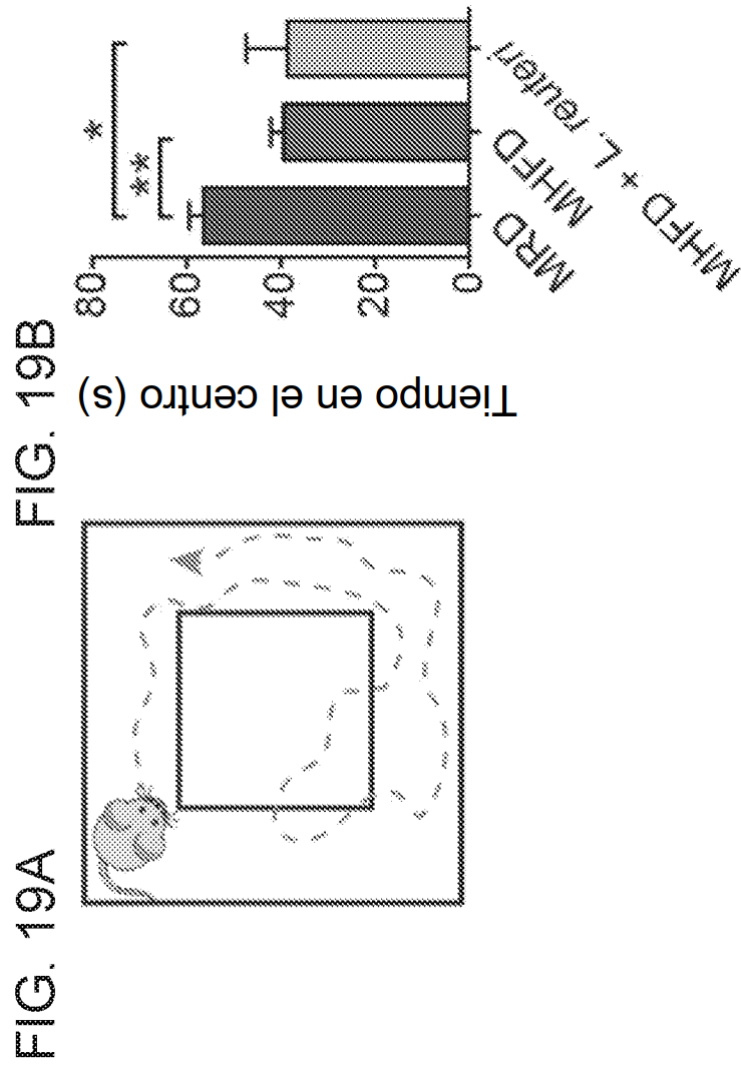
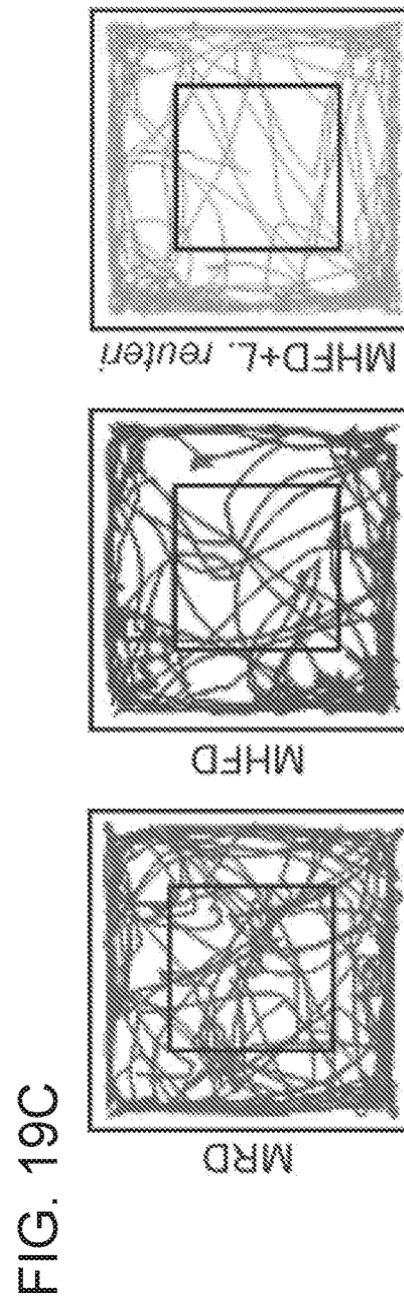


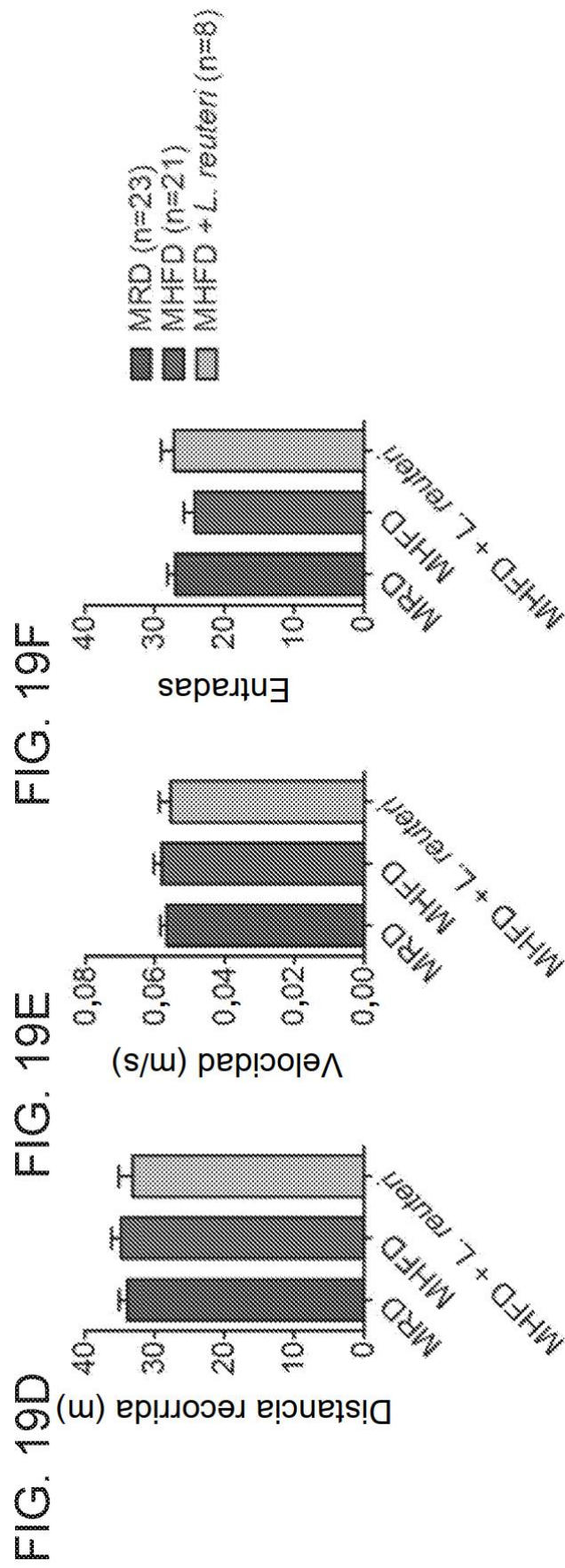
FIG. 17F

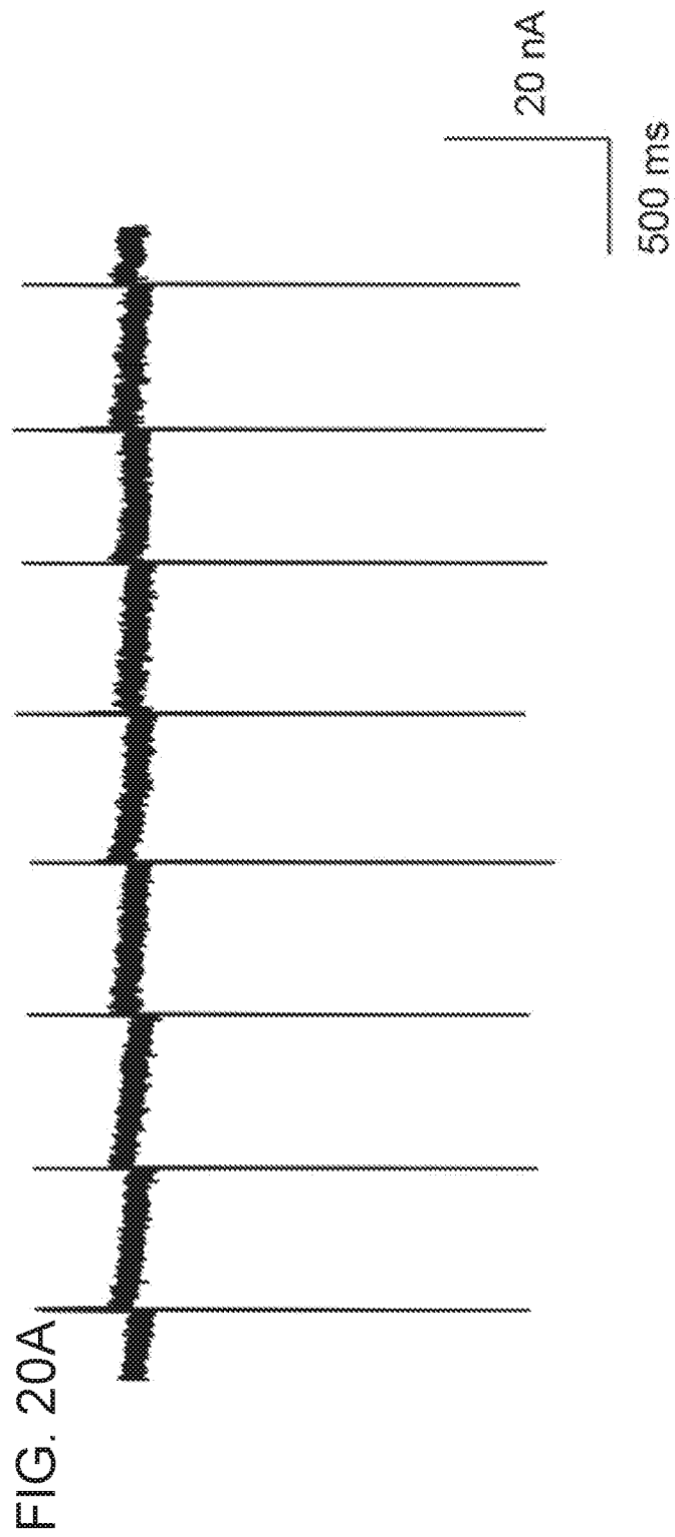


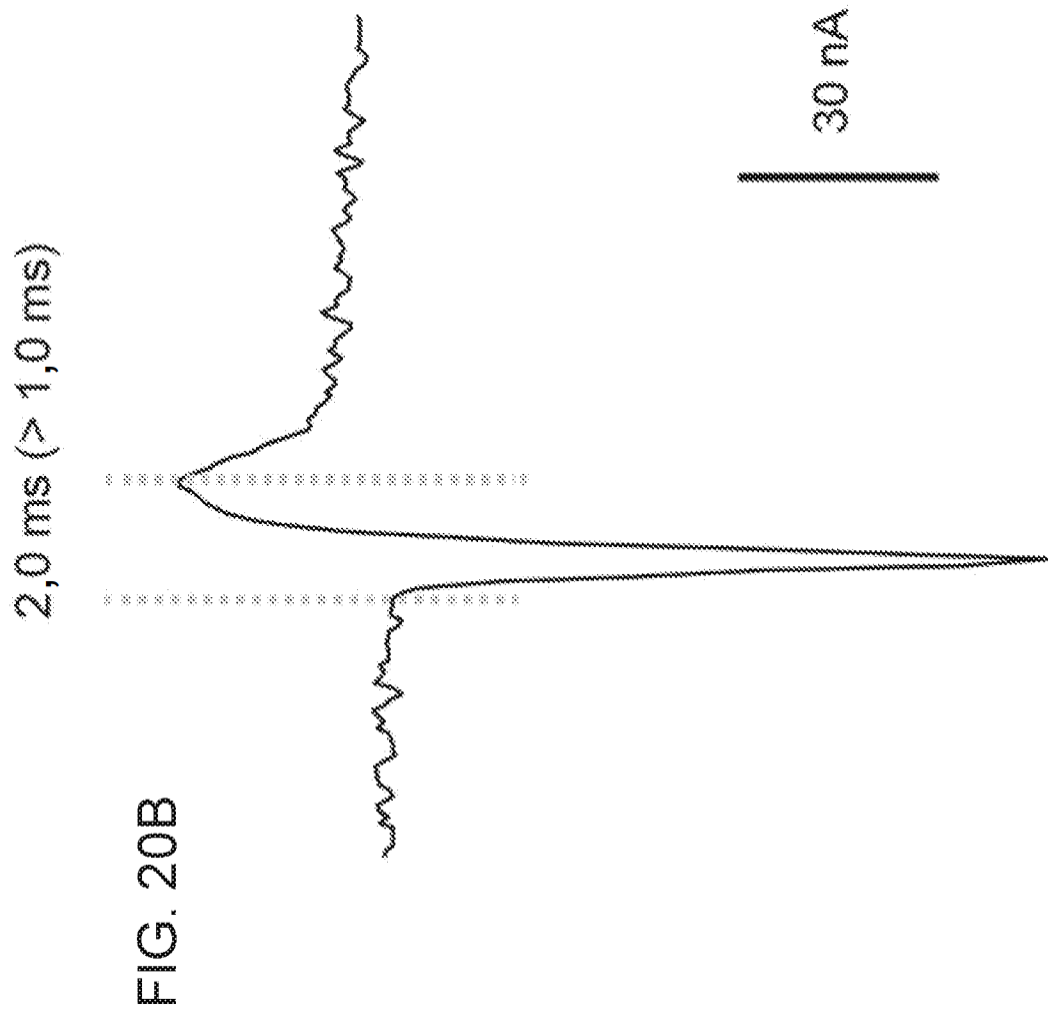












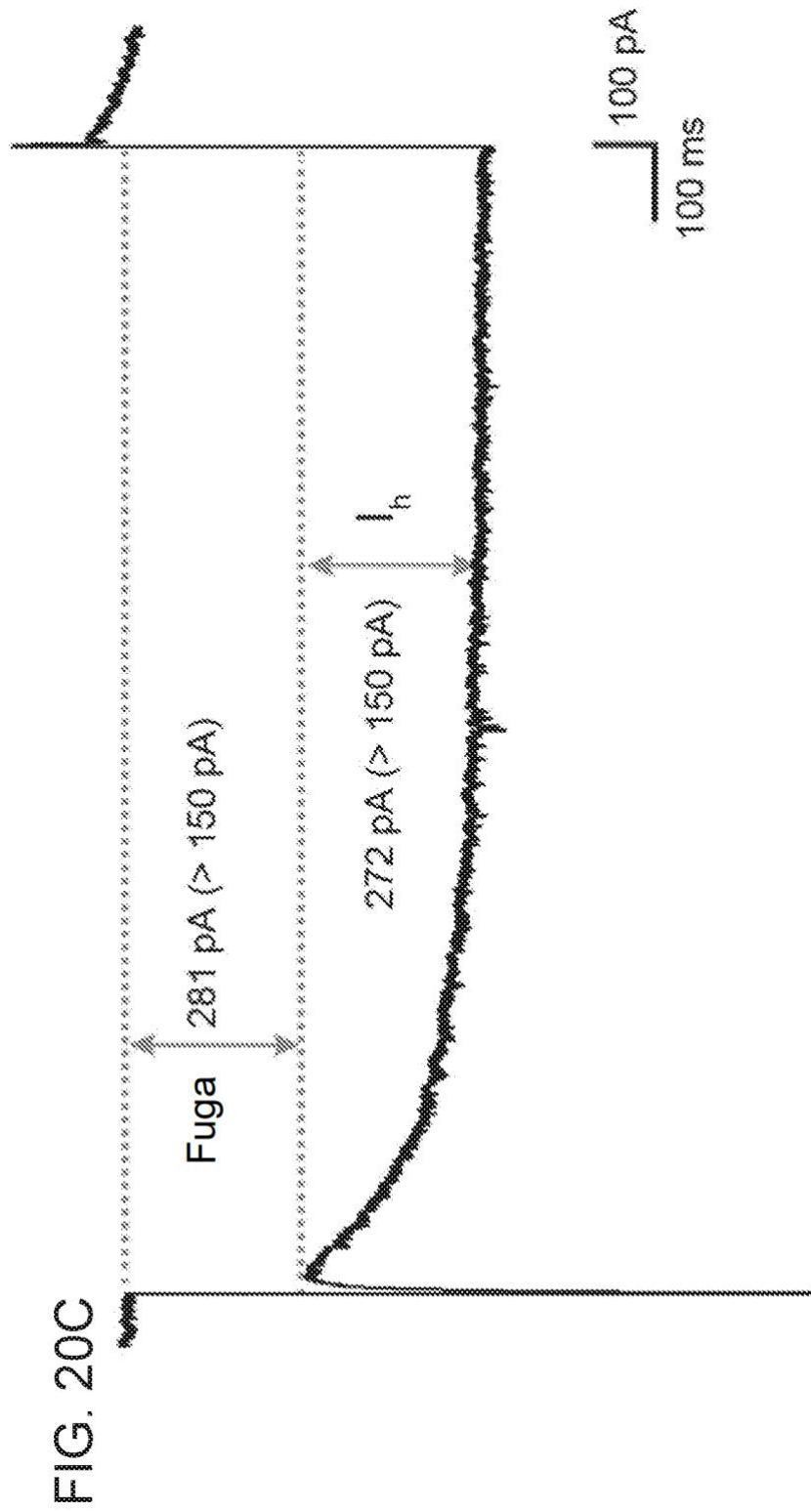
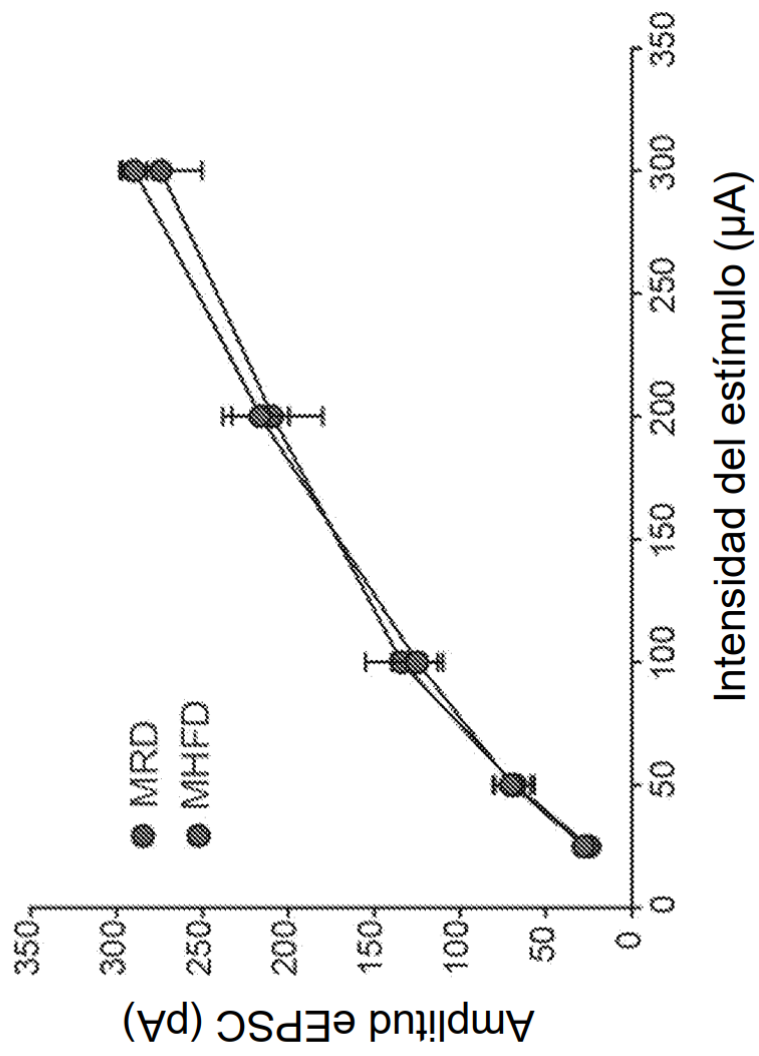
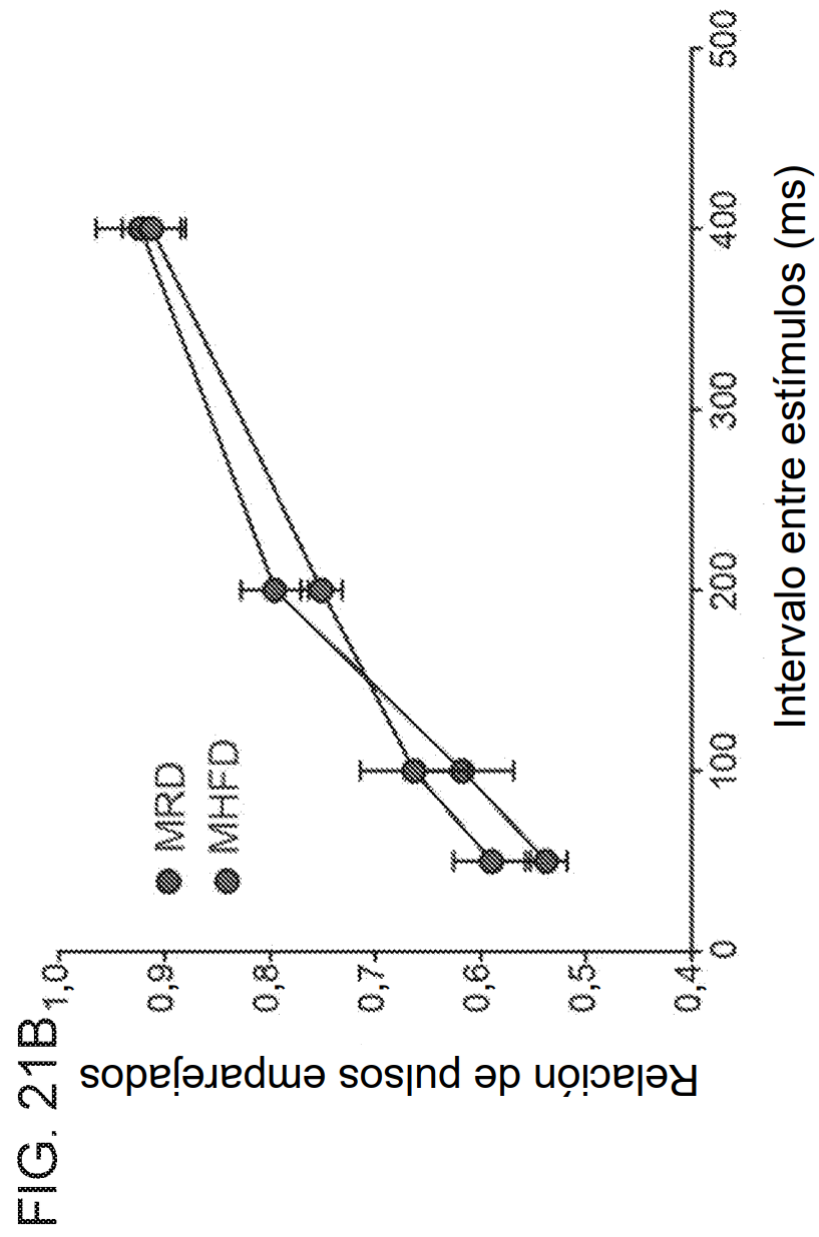


FIG. 21A





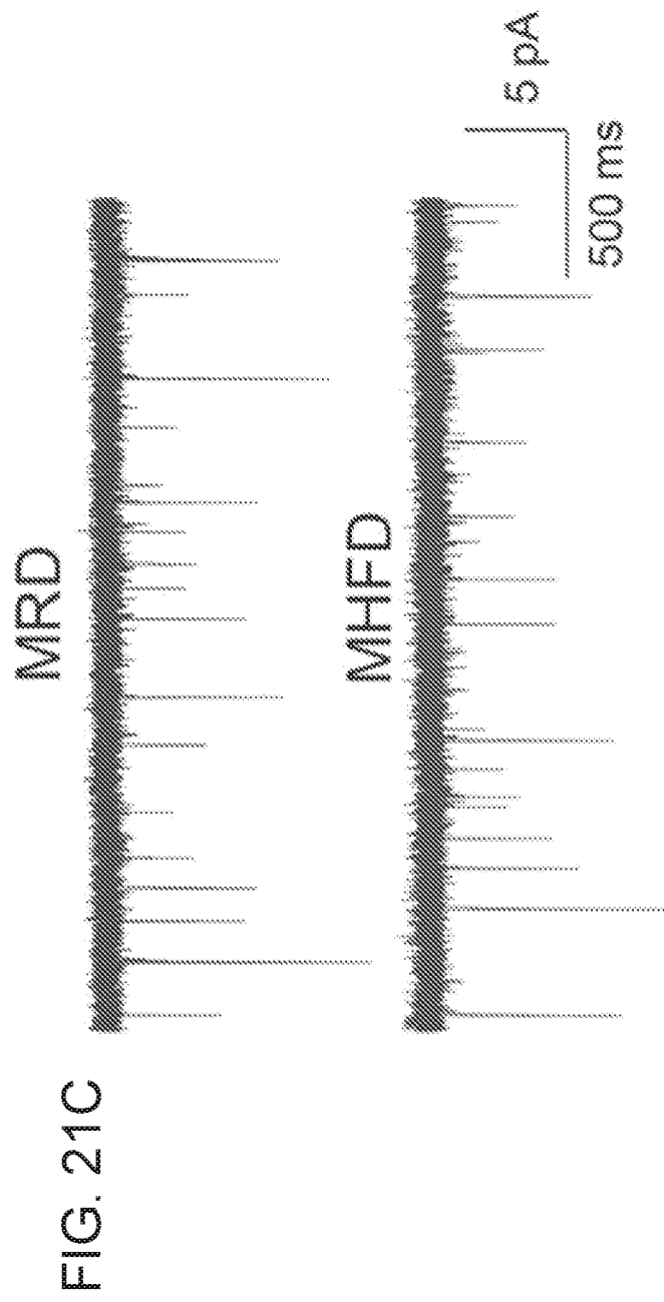


FIG. 21E

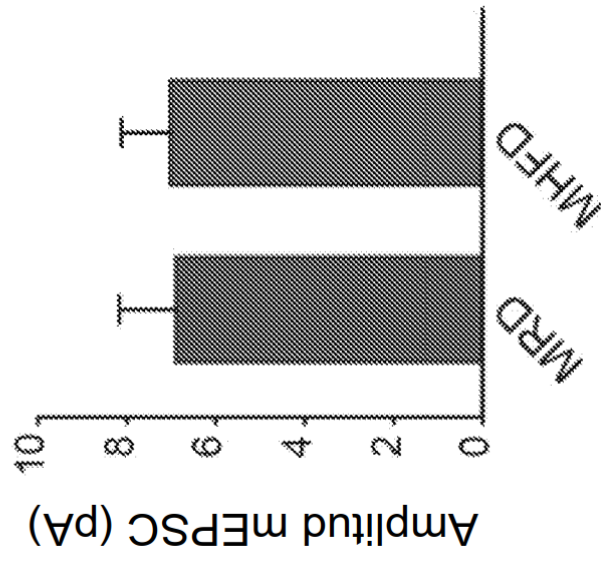
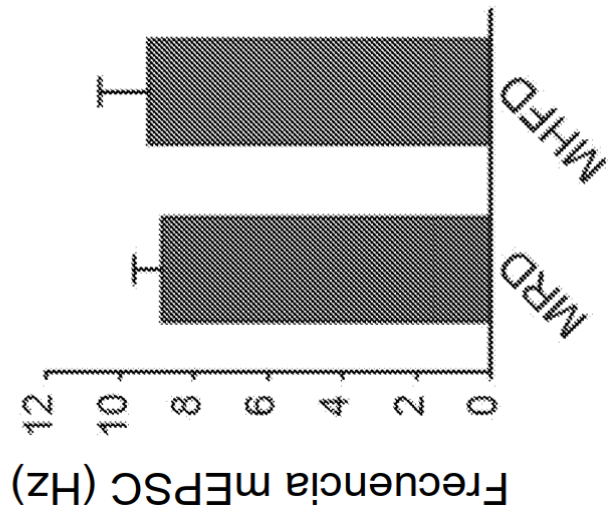


FIG. 21D



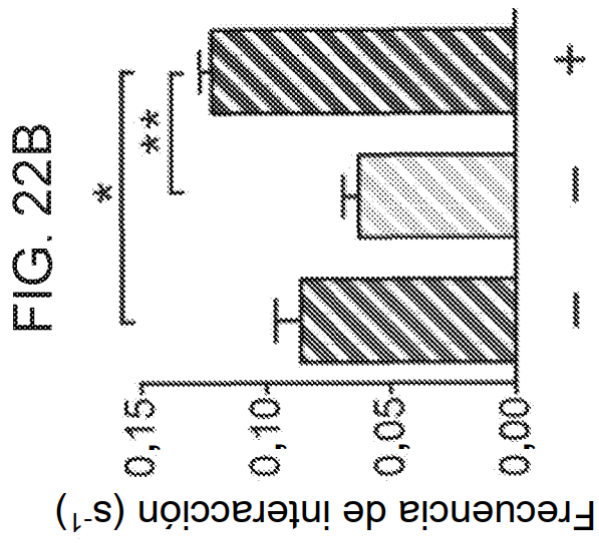
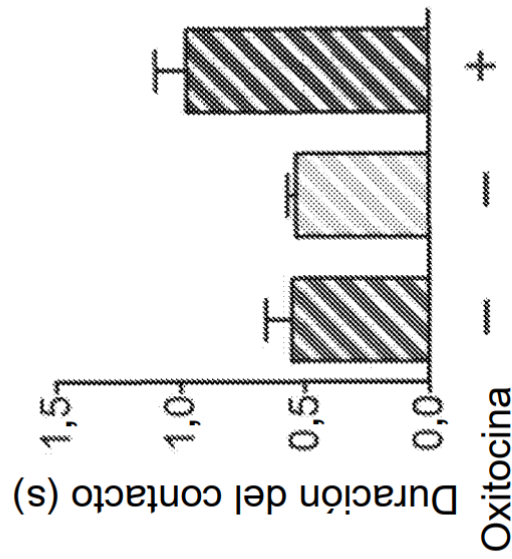


FIG. 22A



- MHFD Desconocido (n=4 pares)
- ▨ MHFD + Vehículo Desconocido (n=3 pares)
- ▩ MHFD + OXT Desconocido (n=4 pares)

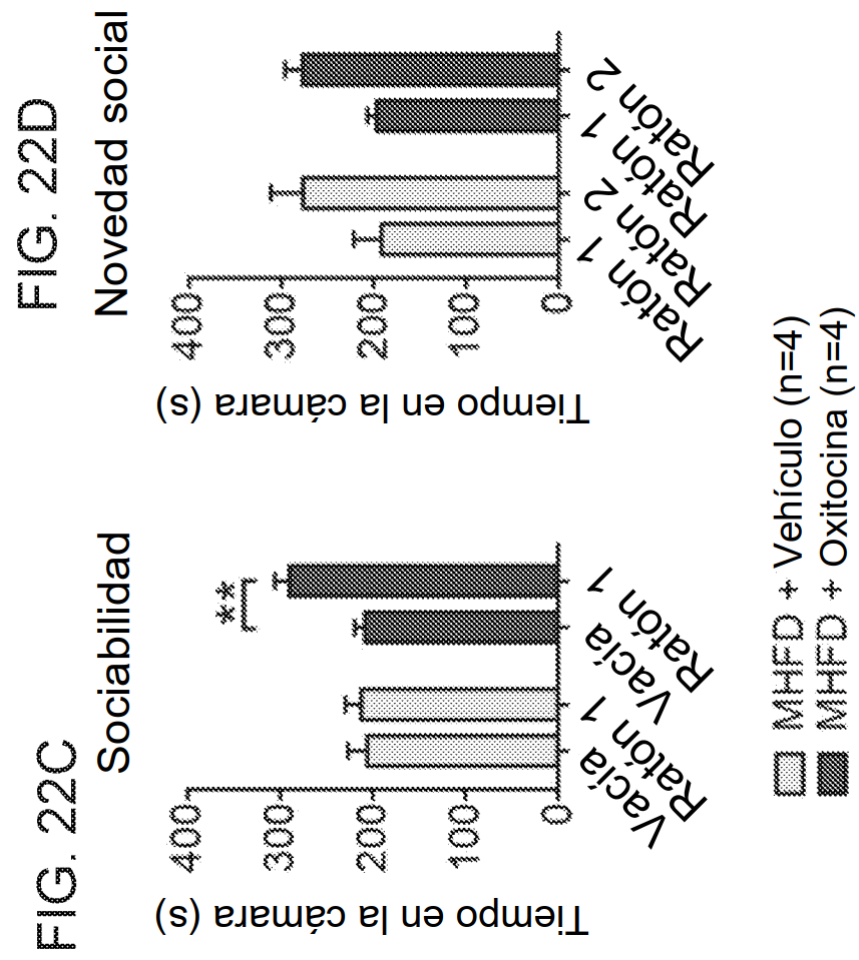


FIG. 23A

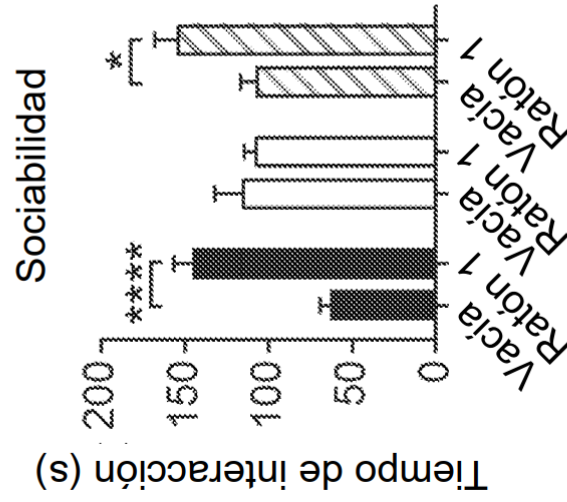
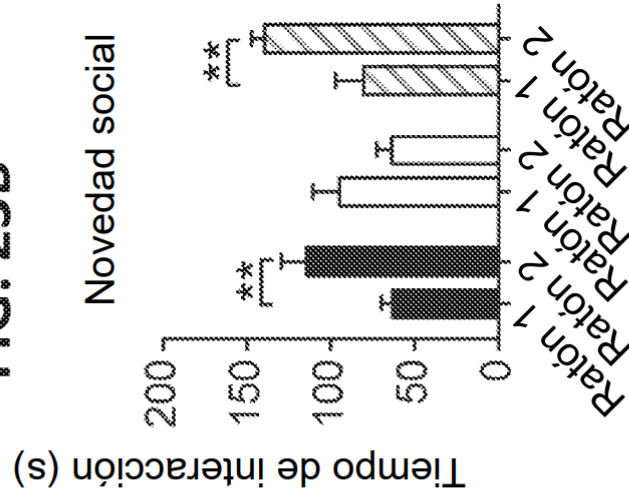


FIG. 23B



■ Control con colonización convencional (n=8)
□ GF+H2O (n=7)
▨ GF+L. reuteri (n=6)

FIG. 24A

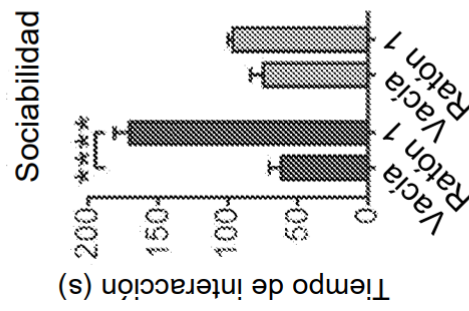


FIG. 24B

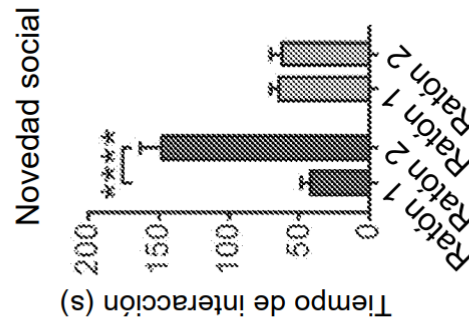


FIG. 24C

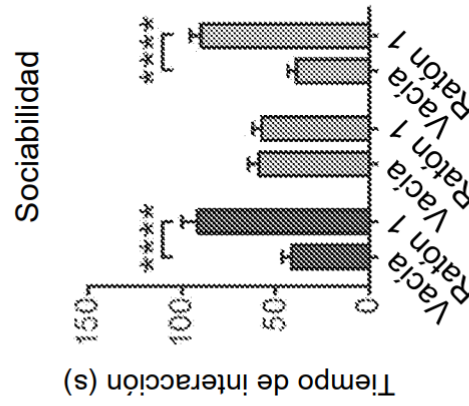
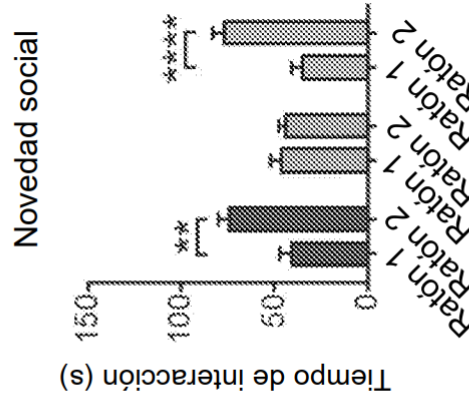


FIG. 24D



■ Natural (n=8)

▨ *Cntrp2^{-/-}* (n=9)

■ Natural (n=8)

▨ *Cntrp2^{-/-}* + Medios (n=12)

▩ *Cntrp2^{-/-}* + *L. reuteri* (n=13)