

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 933 976**

21 Número de solicitud: 202130786

51 Int. Cl.:

A61K 35/76

(2015.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

11.08.2021

43 Fecha de publicación de la solicitud:

15.02.2023

71 Solicitantes:

**FUNDACIÓ INSTITUT D'INVESTIGACIÓ
BIOMÈDICA DE GIRONA DR. JOSEP TRUETA -
IDIBGI - (61.0%)
C/ DR. CASTANY S/N - EDIFICI M2 PARC
HOSPITALARI MARTÍ I JULIÀ,
17190 Salt (Girona) ES;
UNIVERSITAT POMPEU FABRA (24.0%);
FUNDACIÓN PARA EL FOMENTO DE LA
INVESTIGACIÓN SANITARIA Y BIOMÉDICA DE
LA COMUNIDAD VALENCIANA - FISABIO -
(7.5%);
CONSORCIO CENTRO DE INVESTIGACIÓN
BIOMÉDICA EN RED, M.P. - CIBER- (5.0%) y
UNIVERSITAT DE VALÈNCIA (2.5%)**

72 Inventor/es:

**FERNÁNDEZ-REAL LEMOS, José Manuel;
MAYNERIS PERXACHS, Jordi;
ARNORIAGA RODRÍGUEZ, María;
CASTELLS NOBAU, Anna;
MALDONADO LÓPEZ, Rafael;
MOYA SIMARRO, Andrés y
PÉREZ BROCAL, Vicente**

74 Agente/Representante:

CUETO PRIEDE, Sénida Remedios

Observaciones:

La lista de secuencias está accesible al público en la página web de la OEPM para su descarga en formato electrónico.

54 Título: **BACTERIÓFAGO PARA USO TERAPÉUTICO**

57 Resumen:

Bacteriófago para uso terapéutico.

La presente invención divulga un bacteriófago cuyo genoma es la secuencia de nucleótidos de la SEQ_ID No 1 o una secuencia que tiene una identidad de al menos el 85% con ella para su uso terapéutico, más concretamente para alteraciones cognitivas como funciones ejecutivas o la memoria. Dicho bacteriófago se puede administrar como una composición farmacéutica, una preparación de heces y/o una composición alimenticia.

ES 2 933 976 A1

DESCRIPCIÓN

BACTERIÓFAGO PARA USO TERAPÉUTICO

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención está relacionada con la aplicación terapéutica de bacteriófagos. Se refiere más concretamente al bacteriófago *Lactococcus* 936, y una composición
5 farmacéutica y un extracto de heces que comprende dicho bacteriófago para su uso terapéutico en la mejora de las capacidades cognitivas.

ANTECEDENTES

Cada vez más estudios clínicos y preclínicos implican al microbioma intestinal como un actor clave en la regulación de los procesos neurogenerativos, la modulación de la
10 cognición y los trastornos neurológicos. La mayor parte de estas evidencias provienen de estudios sobre bacterias. Sin embargo, nuevas pruebas sugieren que los virus también pueden afectar profundamente a la fisiología del huésped y a la enfermedad. Los componentes más numerosos del viroma humano son los bacteriófagos. Los bacteriófagos temperados (lisogénicos) pueden transferir genes a sus huéspedes
15 bacterianos, modulando así la expresión génica bacteriana y alterando su fenotipo. De hecho, más del 80% de los genomas bacterianos albergan profagos. De ahí que los bacteriófagos puedan desempeñar un papel importante en la configuración de la diversidad y la función bacteriana y, por tanto, de la salud humana.

Las comunidades de bacteriófagos del intestino muestran una gran variación interindividual y estabilidad temporal, y están dominadas por *Caudovirales* temperados
20 (familias *Myoviridae*, *Podoviridae* y, principalmente, *Siphoviridae*) y *Microviridae* virulentos (líticos). En particular, los niveles de fagos de la familia *Microviridae* aumentan con la edad y se correlacionan negativamente con la abundancia relativa de fagos de la familia *Siphoviridae* (1,2). Además, se ha demostrado que la dieta altera la composición
25 del viroma intestinal. En concreto, la transición de una dieta normal a una dieta alta en grasas dio lugar a una disminución significativa de los bacteriófagos de la familia *Siphoviridae*, acompañada de un aumento de los *Microviridae* (3). Se ha sugerido la existencia de un fagooma intestinal humano sano, dominado por bacteriófagos temperados, mientras que la disbiosis fágica, caracterizada por el aumento de fagos
30 líticos y/o profagos activados, se ha asociado con la enfermedad.

Sin embargo, el papel de los bacteriófagos en los trastornos cognitivos se encuentra prácticamente inexplorado. Más concretamente la presente invención divulga el uso terapéutico del bacteriófago *Lactococcus* 936 en el tratamiento de trastornos cognitivos.

La patente US10790060B2 divulga el empleo de tratamientos con bacteriófagos para el tratamiento de enfermedades mentales, sin embargo, esta patente no divulga que dicho tratamiento pueda suponer una mejora en la memoria del individuo tratado. Aunque este documento menciona *Lactococcus lactis* en algunas realizaciones concretas, en ningún momento hace mención concreta a la familia 936.

La solicitud de patente US2020157609A1 divulga un método para determinar alteraciones cognitivas en pacientes con cirrosis basado en la presencia de una serie de microorganismos de la microbiota. El objeto de este documento es diferente al objeto de la presente invención y aunque se divulga que un posible tratamiento podría ser la administración de fagos, en ningún momento se menciona que sea el *fago 936*. Así mismo, este documento no divulga la relación con individuos obesos o una posible mejora en la memoria.

DESCRIPCIÓN

En la presente memoria “bacteriófago *Lactococcus 936*”, “*fago 936*” y “*bacteriófago 936*” son sinónimos y se usan de forma intercambiable.

El término “individuo”, tal y como se utiliza en la memoria, se refiere a animales, preferiblemente mamíferos, y más preferiblemente, humanos. El término “individuo” no pretende ser limitativo en ningún aspecto, pudiendo ser éste de cualquier edad, sexo y condición física.

La expresión “uso terapéutico” en la presente memoria significa: prevenir una afección de interés o el desarrollo de una afección de interés; inhibir la progresión de una afección de interés; detener o prevenir el desarrollo posterior de una afección de interés; reducir la gravedad de una afección de interés; mejorar o aliviar los síntomas asociados con una afección de interés; y provocar una regresión de una afección de interés o de uno o más de los síntomas asociados con una afección de interés.

Las expresiones “alteraciones cognitivas” y “trastornos cognitivos” son sinónimos y se emplean de forma intercambiable.

La expresión “alteraciones cognitivas” en la presente memoria comprende trastornos mentales que afectan principalmente a las capacidades cognitivas, como el aprendizaje, la memoria, la percepción y la resolución de problemas.

Los términos “suplementar” y “complementar” son sinónimos y se emplean de forma intercambiable.

El primer objeto de esta invención se refiere a un bacteriófago cuyo genoma es na secuencia que tiene una identidad de al menos el 85% con ella, preferentemente el 90%, más preferentemente el 92%, aún más preferentemente el 94%, aún más preferentemente un 96%, aún más preferentemente un 98% para su uso terapéutico.

- 5 En una realización particular, el genoma del bacteriófago para su uso terapéutico es la secuencia de nucleótidos de la SEQ_ID No 1.

La secuencia SEQ_ID No 1 es la secuencia del genoma del *bacteriófago 936* se encuentra depositada en GeneBank con el número de acceso KC182544.1.

- 10 Este bacteriófago pertenece a la familia, *Siphoviridae*, más concretamente es un fago que infecta a la especie *Lactococcus Lactis*. La identidad taxonómica del bacteriófago es NCBI:txid39838

- 15 Un segundo objeto adicional de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende al menos un bacteriófago que tiene un genoma que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ_ID No 1 y/o una secuencia que tiene una identidad de al menos el 98% con ella, preferentemente el 96%, más preferentemente el 94%, aún más preferentemente el 92%, aún más preferentemente un 90%, aún más preferentemente un 85% y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable para su uso terapéutico.

- 20 En una realización particular el uso terapéutico comprende el tratamiento de alteraciones cognitivas, las causas de dichas alteraciones pueden ser el delirio, demencia, Alzheimer, enfermedad de Huntington, la enfermedad de los cuerpos de Lewy, las lesiones cerebrales traumáticas, amnesia, esquizofrenia, la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de los priones, los problemas neurocognitivos debidos a la infección por el VIH, trastornos del espectro autista o aquellos causados por una
25 patología cerebral subyacente.

En otra realización particular, las alteraciones cognitivas comprenden funciones ejecutivas y la memoria.

En otra realización particular, el uso terapéutico del tratamiento de las alteraciones cognitivas comprende la mejora de las capacidades cognitivas.

- 30 La mejora de las capacidades cognitivas es respecto al nivel basal que posee el individuo en condiciones normales, esto es, sin sufrir ninguna enfermedad y/o alteración cognitiva.

El *bacteriófago 936* el ingrediente activo de la composición farmacéutica.

En una realización particular, el *bacteriófago 936* puede ser el agente activo único o en combinación con uno o más agentes activos adicionales.

En otra realización particular el individuo no sufre ninguna alteración cognitiva y el uso terapéutico tiene un efecto profiláctico con el objetivo de evitar o retrasar la aparición de
5 dichas alteraciones.

La composición farmacéutica de la invención se puede emplear como tratamiento subsiguiente o simultáneo con otras terapias.

La composición farmacéutica de la invención se puede administrar a un individuo por vía oral.

10 La composición farmacéutica para su administración oral puede estar presente como una forma unitaria de dosis, tal como una gragea líquida, o un comprimido tipo gel. Se fabrican por un procedimiento conocido. Por ejemplo, el *bacteriófago 936* para su administración oral se puede preparar mezclando dicho bacteriófago con un excipiente farmacéuticamente aceptable, granulando la mezcla si fuera necesario, y a
15 continuación, formulando la mezcla o el granulado en forma de un comprimido tipo gel o una gragea líquida.

Otra forma de administración por vía oral pueden ser cápsulas selladas blandas fabricadas de gelatina y un plastificante, tal como glicerol o sorbitol. En la cápsula blanda, los *bacteriófagos 936* se suspenden en un líquido apropiado, bien un disolvente
20 orgánico o polar, por ejemplo, aceite fijo, aceite de vaselina o polietilenglicol líquido, y se puede añadir un estabilizante en el mismo.

Otra forma de administración por vía oral puede ser líquida por ejemplo un jarabe o bebida.

Otro objeto adicional de la invención se refiere a un extracto o una preparación de heces de un donante humano que comprende el bacteriófago definido anteriormente
25

y

un mayor nivel de bacteriófagos de la familia *Siphoviridae* que de la familia *Microviridae*,

El extracto ha de tener niveles más elevados de fagos de la familia *Siphoviridae*, entre ellos el bacteriófago *Lactococcus 936* que de fagos de la familia *Microviridae* ya que
30 elevados niveles de bacteriófagos de este género se asocian con un mejor resultado en pruebas de capacidades cognitivas.

En la presente memoria, “extracto de heces” y “preparación de heces” son sinónimos y se usan de manera intercambiable.

En la presente memoria, “extracto o preparación de heces” y “trasplante de microbiota fecal (FMT)” son sinónimos y se usan de manera intercambiable.

- 5 La determinación de los niveles de los fagos se puede hacer por cualquier procedimiento conocido en el estado de la técnica, como PCR, RNA seq, o determinación de metabolitos que se asocian a los mismos.

- 10 En una realización particular el extracto o preparación tiene un nivel de fagos de la familia Siphoviridae al menos 1.5 veces superior al de los fagos de la familia *Microviridae.*, preferentemente al menos 2 veces superior, más preferentemente al menos 3 veces superior y aún más preferentemente al menos 5 veces superior.

El extracto o preparación descrito anteriormente se puede emplear para uso terapéutico, el uso terapéutico comprende el tratamiento de alteraciones cognitivas.

- 15 El extracto o preparación se puede obtener de un donante, que puede ser cualquier individuo que no entre en al menos uno de los siguientes criterios de exclusión; Diabetes mellitus de tipo 2, enfermedades sistémicas inflamatorias crónicas, infecciones agudas o crónicas en el mes anterior; uso de antibióticos, antimicóticos, antivirales o tratamiento con inhibidores de la bomba de protones; trastornos graves de la conducta alimentaria o antecedentes psiquiátricos importantes; enfermedades neurológicas, antecedentes de
20 traumatismos o lesiones cerebrales, trastornos del lenguaje; y consumo excesivo de alcohol (≥ 40 g OH/día en las mujeres u 80 g 514 OH/día en los hombres).

- Opcionalmente el individuo que recibe el trasplante puede someterse previamente a un tratamiento con antibióticos. Estos antibióticos pueden ser uno o más de ampicilina, metronidazol, vancomicina, ciprofloxacina HCl e imipenem, al menos una vez al día
25 durante un periodo de tiempo que un experto en la materia sabría reconocer como adecuado, por ejemplo 14 días.

El método de obtención del extracto o preparación puede hacerse por cualquier método conocido en el estado de la técnica, por ejemplo, el descrito en la patente ES2636439T3.

- 30 En una realización particular el extracto o preparación se administra a un individuo por vía oral. Este método de administración presenta la ventaja de que no es necesario un paso previo de purificación del fago.

Adicionalmente el extracto o preparación, puede llevar un excipiente farmacéuticamente apropiado para su administración a un individuo. Estos excipientes pueden ser cualquiera de los descritos anteriormente o mencionados en la patente ES2636439T3.

5 El individuo es preferentemente un mamífero, más preferentemente un humano, aunque se pueden tratar otros sujetos alternativos, en el curso de la investigación sobre enfermedades. La dosis de la composición que se administrará a un sujeto depende de la especie y el tamaño del sujeto, la naturaleza de la afección que se está tratando y puede ser determinada fácilmente por un experto en la materia.

10 Una sola administración de la composición farmacéutica puede ser suficiente para lograr el efecto terapéutico deseado, pero en realizaciones alternativas, se pueden administrar más de una dosis de la composición farmacéutica. Por ejemplo, una primera dosis puede ser seguida por una dosis de refuerzo después de una semana, dos semanas, tres semanas, cuatro semanas, un mes, dos meses, tres meses, cuatro meses, cinco meses, seis meses o intervalos más largos.

15 Otro objeto adicional de la invención se refiere a una composición alimenticia que comprenda al menos un *bacteriófago 936*.

En una realización particular, la composición alimenticia comprende un bacteriófago que tiene un genoma que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ_ID No 1 o una secuencia que tiene una identidad de al menos el 98% con ella, preferentemente el 96%,
20 más preferentemente el 94%, aún más preferentemente el 92%, aún más preferentemente un 90%, aún más preferentemente un 85%.

La composición alimenticia puede ser obtenida mediante una fermentación láctica

De manera alternativa, la composición alimenticia puede ser cualquier alimento que se haya complementado con el *bacteriófago 936*.

25 Otro objeto adicional de la invención se refiere a un procedimiento de obtención de una composición alimenticia, que comprende complementar un alimento con el *bacteriófago 936*.

30 El *bacteriófago 936* empleado en la composición alimenticia y/o composición farmacéutica ha de haberse aislado y crecido siguiendo cualquier protocolo habitual en el campo, un experto en la materia sabría identificar. las condiciones idóneas para obtener el mayor rendimiento en la producción y purificación del *fago 936* previamente a su complementación con una composición alimenticia.

En una realización particular, la composición alimenticia comprende al menos, 10.000 UFP del *fago 936*, por cm² de la superficie de la composición, preferentemente al menos 25000 UFP, más preferentemente al menos 50000 UFP por cm² de la superficie de la composición.

- 5 En otra realización particular, la composición alimenticia comprende al menos, 10.000 UFP de un bacteriófago que tiene un genoma que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ_ID No 1 o una secuencia que tiene una identidad de al menos el 98% con ella, preferentemente el 96%, más preferentemente el 94%, aún más preferentemente el 92%, aún más preferentemente un 90%, aún más preferentemente
- 10 un 85% por cm² de la superficie de la composición, preferentemente al menos 25000 UFP, más preferentemente al menos 50000 UFP por cm² de la superficie de la composición.

- En otra realización particular, la composición alimenticia comprende al menos, 5.000 UFP del *fago 936*, por gramo de la composición, preferentemente al menos 10000 UFP,
- 15 más preferentemente al menos 20000 UFP por gramo de la composición.

- En una realización particular, la composición alimenticia comprende al menos, 5.000 UFP de un bacteriófago que tiene un genoma que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ_ID No 1 o una secuencia que tiene una identidad de al menos el 98% con ella, preferentemente el 96%, más preferentemente el 94%, aún más
- 20 preferentemente el 92%, aún más preferentemente un 90%, aún más preferentemente un 85 por gramo de la composición, preferentemente al menos 10000 UFP, más preferentemente al menos 20000 UFP por gramo de la composición.

- En una realización particular el bacteriófago que se produce y purifica puede ser un bacteriófago que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ_ID No 1 o una
- 25 secuencia que tiene una identidad de al menos el 98% con ella, preferentemente el 96%, más preferentemente el 94%, aún más preferentemente el 92%, aún más preferentemente un 90%, aún más preferentemente un 85%.

- Preferentemente, el alimento que se complementa con el bacteriófago ha de estar a una temperatura igual a inferior a 40°C, preferentemente inferior a 35°C, más
- 30 preferentemente inferior a 30°C, aún más preferentemente inferior a 25°C y aún más preferentemente inferior a 20°C para evitar que el bacteriófago se inactive.

La composición alimenticia que comprende el bacteriófago no puede ser sometida a un procedimiento térmico superior o igual a 90°C por un tiempo de al menos 1 min. Debido

a que el bacteriófago es termolábil. El bacteriófago ha de estar intacto y/o ser infectivo para poder usar el método de la invención.

En una realización adicional el *bacteriófago 936* es un aditivo de la industria alimentaria y/o un probiótico que se puede adquirir en las farmacias.

- 5 Salvo que se indique lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el que comúnmente entiende un experto ordinario en la materia a la que pertenece esta invención. En la realización de la presente invención se pueden utilizar métodos y materiales similares o equivalentes a los aquí descritos. A lo largo de la descripción y de las reivindicaciones, la palabra
- 10 "comprender" y sus variaciones no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Los objetos, ventajas y características adicionales de la invención se harán aparentes a los expertos en la materia al examinar la descripción o podrán aprenderse mediante la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos, dibujos y tablas se proporcionan a título ilustrativo y no pretenden limitar de modo alguno
- 15 la presente invención.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. a-d) Gráficos de dispersión de las correlaciones parciales de rango de Spearman entre los valores de bacteriófagos fecales transformados en relación logarítmica centrada (clr) y función ejecutiva evaluada por la *Trial Marking Test B* (TMTB) y la prueba de cuenta de dígitos hacia atrás en hombres y mujeres de la cohorte de descubrimiento.

20

Figura 2: a) Diagramas de violín de las puntuaciones de la prueba de Fluidez Verbal Fonética (n=841) y **b)** de la Prueba de dígitos (n=827) según la mediana de *Siphoviridae* transformada en clr después de ajustar la edad, el IMC, el género, los años de educación, la ingesta de medicamentos con efectos secundarios en el sistema nervioso central (grupo ATC N), la actividad física (METS/min/semana; donde MET es Equivalente metabólico), las puntuaciones de depresión y los niveles de glucosa y colesterol en la cohorte de validación 1 (IMAGEOMICS, n=942). Los puntos representan la media. **c)** Gráficos de violín de la prueba de Fluidez Verbal Fonética (n=470), **d)**

25

30 Prueba de Símbolos y Dígitos (n=461), **e)** Puntuaciones de Recuerdo Libre Emparejado (n=454) y **f)** Cognición (n=408), según los terciles de *Siphoviridae* transformados por clr después de ajustar por las covariables anteriores en hombres de la cohorte de validación 1 (IMAGEOMICS, n=942). La significación global se evaluó mediante una prueba de tendencia de Mann-Kendall.

Figura 3: **a)** Diseño experimental para el estudio de trasplante de la preparación o extracto de heces. **b)** Gráficos de dispersión de la correlación parcial de rango de Spearman entre los valores de *Siphoviridae* del donante transformados en clr y la puntuación de la prueba de reconocimiento de objetos nuevos en 24 horas (NORII24h) de los ratones receptores, controlando la edad, el IMC, el sexo y los años de formación del donante. **c)** igual que **b)** pero para *Microviridae*

Figura 4: **a)** Diagrama de volcán de los transcritos de genes expresados diferencialmente en la corteza prefrontal medial de los ratones receptores asociados a los *Siphoviridae* del donante y **b)** Red de interacción génica construida a partir de genes expresados diferencialmente y asociados a los valores transformados en clr de *Siphoviridae* a través de la base de datos *Search Tool for the Retrieval of Interacting Proteins/Genes* (STRING). Los nodos de la red son genes y los enlaces representan las interacciones funcionales previstas. El grosor indica el grado de confianza de la predicción de la interacción. Se detectó un clúster funcional que comprende genes implicados en la formación de la memoria: *Arc*, *Pmp22*, *Egr2*, *Fos*, *Sik1*, *Ier2*, *Btg2*, *Csrnp1*, *Dusp1*, *Trib1*, *Cyr61* y *Socs3*.

Figura 5: Representación esquemática del paradigma de memoria gustativa aversiva.

Figura 6: **Izquierda** Porcentaje promedio del reflejo de extensión probóscide (PER) de hembras fecundadas de diez días de edad. La prueba de memoria gustativa aversiva fue realizado con 5 ensayos de entrenamiento (intervalo de 3 minutos entre ensayos), seguidos de 15 ensayos de memoria (intervalo de 2 minutos entre ensayos). Suma del PER medio de un mínimo de 4 experimentos independientes con un mínimo de 15 moscas por experimento. **Centro** Las barras representan el PER promedio(%) en el ensayo de entrenamiento nº 3 de las moscas de tipo silvestre. **Derecha**, las barras representan el porcentaje medio de PER a los 10, 20 y 30 min. después del aprendizaje. La significación se calculó con La prueba exacto de Fisher (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, y *** $p < 0,001$).

Figura 7: **Izquierda**, Porcentaje promedio del PER de hembras fecundadas de diez días de edad, la prueba de memoria gustativa aversiva fue realizado con 5 ensayos de entrenamiento (intervalo de 3 minutos entre ensayos), seguido de 15 ensayos de memoria (intervalo de 2 minutos entre ensayos). Suma del PER promedio de un mínimo de 4 experimentos independientes con un mínimo de 15 moscas por experimento. **Derecha**, Las barras representan el porcentaje de PER promedio a los 10, 20 y 30 minutos después del aprendizaje. La significación se calculó con la prueba exacta de Fisher (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, y *** $p < 0,001$).

Figura 8: Izquierda Porcentaje promedio del PER de hembras fecundadas de diez días de edad, la prueba de memoria gustativa aversiva fue realizado con 5 ensayos de entrenamiento (intervalo de 3 minutos entre ensayos), seguidos de 15 ensayos de memoria (intervalo de 2 minutos entre ensayos). Suma del PER promedio de un mínimo de 4 experimentos independientes con un mínimo de 15 moscas por experimento. **Derecha**, las barras representan el porcentaje promedio de PER a los 10, 20 y 30 min. después del aprendizaje. La significación se calculó con La prueba exacto de Fisher (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, y *** $p < 0,001$).

Figura 9: Izquierda Porcentaje promedio del PER de hembras fecundadas de diez días de edad, la prueba de memoria gustativa aversiva fue realizado con 5 ensayos de entrenamiento (intervalo de 3 minutos entre ensayos), seguidos de 15 ensayos de memoria (intervalo de 2 minutos entre ensayos). Suma del PER promedio de un mínimo de 4 experimentos independientes con un mínimo de 15 moscas por experimento. **Derecha**, las barras representan el porcentaje promedio de PER a los 10, 20 y 30 min. después del aprendizaje. La significación se calculó con La prueba exacto de Fisher (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, y *** $p < 0,001$).

Figura 10: Resultados de la qRT-PCR, las barras representan la expresión génica relativa en cabezas de mosca. Cada muestra contiene un conjunto de 10-15 cabezas de mosca. **Panel superior:** Niveles de transcripción de las moscas alimentadas con (dieta con suero de leche, *whey diet*) WD + *fago 936* en comparación con WD y **panel inferior:** (dieta convencional, *standard diet*) SD + *fago 936* en comparación con SD. Las barras de error representan la S.E.M. normalizada, los valores p se determinaron utilizando las pruebas de Brown-Forsythe y de Brown-Forsythe y Welch.

EJEMPLOS DE REALIZACIÓN

25 Materiales y Métodos

Reclutamiento de los individuos del estudio

Los individuos elegibles fueron evaluados en el Servicio de Endocrinología del Hospital Universitario Dr. Josep Trueta. Se incluyeron sujetos consecutivos con obesidad (índice de masa corporal, $IMC \geq 30 \text{ kg/m}^2$) y sujetos no obesos emparejados por edad y sexo ($IMC 18,5 - < 30 \text{ kg/m}^2$). Los criterios de exclusión fueron: diabetes mellitus de tipo 2, enfermedades sistémicas inflamatorias crónicas, infecciones agudas o crónicas en el mes anterior; uso de antibióticos, antifúngicos, antivirales o tratamiento con inhibidores de la bomba de protones; trastornos graves de la conducta alimentaria o antecedentes psiquiátricos importantes; enfermedades neurológicas, antecedentes de traumatismos

o lesiones cerebrales, trastornos del lenguaje; y consumo excesivo de alcohol (≥ 40 g OH/día en las mujeres u 80 g OH/día en los hombres).

En general, se incluyeron en el estudio dos cohortes diferentes disponibles con criterios comunes de inclusión y exclusión. Incluyendo una cohorte de descubrimiento (n =114) y una cohorte de validación (n=942).

La cohorte de validación (IMAGEOMICS, n=942). El estudio Aging Imageomics es un estudio observacional que incluye participantes de dos estudios de cohorte independientes (MESGI50 y MARK). La descripción detallada de las cohortes puede encontrarse en (4). Brevemente, la cohorte MESGI50 incluyó una población de edad ≥ 50 años, mientras que la cohorte MARK incluyó una muestra aleatoria de pacientes de 35 a 74 años con riesgo cardiovascular intermedio. Los criterios de elegibilidad incluían una edad ≥ 50 años, residir en la comunidad, no tener antecedentes de infección durante los últimos 15 días, no tener contraindicaciones para la Imagen por Resonancia Magnética y dar el consentimiento para ser informado de los posibles hallazgos incidentales.

Parámetros clínicos y de laboratorio

La composición corporal se evaluó mediante una absorciometría de rayos X de doble energía (DEXA, GE lunar, Madison, Wisconsin). Los niveles de glucosa plasmática en ayunas (FPG), el perfil de lípidos y la proteína C reactiva de alta sensibilidad (hsCRP) se midieron mediante un analizador (Cobas®8000 c702, Roche Diagnostics, Basilea, Suiza). La hemoglobina glicosilada (HbA1c) se determinó mediante cromatografía líquida de rendimiento (ADAM_A1c HA-8180V, ARKRAY, Inc., Kyoto, Japón).

Patrón dietético

Las características dietéticas de los individuos se recogieron en una entrevista personal mediante un cuestionario validado de frecuencia alimentaria (5).

Sintomatología depresiva

Se utilizó el Cuestionario de Salud del Paciente-9 (PHQ-9) para medir la frecuencia y la gravedad de la sintomatología depresiva durante las últimas 32 semanas. El PHQ-9 es un instrumento común utilizado como herramienta de cribado de la depresión en con un corte ≥ 10 , que tiene una sensibilidad y especificidad de 0,88 y 0,85, respectivamente, para detectar un episodio depresivo mayor (6).

Evaluación neuropsicológica en humanos

Cuenta de los dígitos hacia atrás

El *Digit Span* es una subprueba de la Escala de Inteligencia para Adultos de Wechsler-III (WAIS-III) (7). Se basa en los números e incluye las pruebas de cuenta de dígitos hacia delante y hacia atrás. En la cuenta de dígitos hacia atrás, el examinado repite en

5 orden inverso series de dígitos que se van alargando. Se trata de una tarea ejecutiva que depende especialmente de la memoria de trabajo. Una puntuación más alta refleja una mejor memoria de trabajo.

Pruebas de Trail Making B

El *Trail Making Test* (TMT) está compuesto por las subpruebas TMTA y TMTB. El TMTA

10 (mayor foco de atención) consistió en una página estandarizada en la que los números del 1 al 25 están dispersos dentro de los círculos, y se pidió a los participantes que conectaran los números en orden lo más rápidamente posible. Antes de comenzar la prueba, se administró una prueba de práctica de 6 ítems a los participantes para asegurarse de que entendían ambas tareas. Se permitió un tiempo máximo de 300 s

15 antes de suspender la prueba. Las puntuaciones directas del TMTA eran el tiempo en segundos que se tardaba en completar cada tarea. Del mismo modo, el TMTB (Sendero B, más centrado en la función ejecutiva) consistía en una secuencia alternada de círculos numerados y letras. En ambas pruebas, los tiempos más cortos hasta la finalización indican un mejor rendimiento.

20 *Prueba de Aprendizaje Verbal de California-II (CVLT)*

El CVLT se utiliza para evaluar el aprendizaje verbal y la memoria (8). La puntuación del *CVLT Long Delayed Free Recall* evalúa la memoria a largo plazo. Tras 20 minutos en los que se realizan tareas no verbales, se pide a los sujetos que repitan una lista de palabras que el examinador ha presentado previamente, sin facilitación semántica. Una

25 puntuación más alta refleja una mejor función de la memoria.

Prueba de Símbolos y Dígitos (SDT)

El SDT es una subprueba de la Escala de Inteligencia para Adultos de Wechsler-III (WAIS-III). Incluye una clave de codificación que muestra nueve símbolos abstractos, cada uno emparejado con un número, y debajo de la clave se presentaron series de

30 símbolos. Se pidió a los participantes que escribieran los números correspondientes asociados a los símbolos abstractos lo más rápidamente posible. Esta tarea es una medida de la velocidad de procesamiento de la información. Se puntuó el número de

sustituciones correctas durante un intervalo de 90 segundos, y los números más altos indican un mejor rendimiento.

Fluidez verbal fonética (PVF)

El PVF es una tarea de producción verbal espontánea que consiste en producir palabras con una letra determinada (P) durante un minuto. Esta tarea es una medida de la capacidad lingüística y de la función ejecutiva y está influida por la velocidad de procesamiento. Se puntúa el número de palabras correctas y los números más altos indican un mejor rendimiento.

Cognición general

Se calculó una puntuación cognitiva compuesta como la suma de las puntuaciones estandarizadas de cada individuo para cada prueba incluida en la cohorte IMAGEOMICS.

Ratones

Se emplearon ratones machos C57BL/6J (Charles River, Francia), que pesaban entre 23 y 26 g al inicio del experimento. Los ratones se alojaron individualmente en condiciones de laboratorio controladas, con una temperatura mantenida de $21 \pm 1^\circ\text{C}$, una humedad de $55 \pm 10\%$ y ciclos de luz/oscuridad de 7h30 / 19h30. Todos los animales fueron alimentados con una dieta estándar RM1 (envasada al vacío, Dietex International Ltd.). El estado de salud de cada uno de los ratones incluidos en el programa experimental se comprobó cada día antes de las sesiones experimentales y se registró en el cuaderno de protocolo del experimentador. Los controles del estado de salud incluían el peso corporal, el aspecto físico, el comportamiento y los signos clínicos. No se registraron anomalías en los animales incluidos en este estudio. Los procedimientos con animales se llevaron a cabo siguiendo estrictamente las directrices de la Directiva 86/609/CEE de las Comunidades Europeas que regula la investigación con animales y fueron aprobados por el comité ético local (CEEA-PRBB). Todos los experimentos se realizaron en condiciones ciegas (el investigador que administró la microbiota estaba cegado en relación con las puntuaciones de memoria de los sujetos que proporcionaron las heces). A los ratones se les administró un cóctel de ampicilina y metronidazol, vancomicina (todos a 500 mg/L), ciprofloxacina HCl (200 mg/L), imipenem 621 (250 mg/L) una vez al día durante 14 días consecutivos en el agua de bebida, como se describió anteriormente (9). Setenta y dos horas más tarde, los animales fueron colonizados por medio de la ingestión diaria de microbiota del donante (150 mL) durante 3 días. A los animales se les administró por vía oral solución salina ($n = 11$) y materia

fecal de muestras de voluntarios sanos con una amplia gama de puntuaciones cognitivas (n = 22) emparejados por edad, IMC, sexo y años de educación. Para compensar los posibles efectos de confusión y/o de la jaula y para reforzar el fenotipo de la microbiota del donante, se realizaron inoculaciones de refuerzo dos veces por semana a lo largo del estudio. Los animales fueron expuestos a una serie de pruebas de comportamiento que incluían la prueba de reconocimiento de objetos nuevos (NOR) y el condicionamiento del miedo con la nocicepción evaluada por la prueba de la placa caliente para garantizar la especificidad.

Al final del estudio, los animales fueron sacrificados consecutivamente. Se extrajo el ciego, se pesó y se guardó, y se recogieron las heces y se guardaron a -80°C para un posterior análisis de la microbiota.

Pruebas de comportamiento en ratones: Prueba de reconocimiento de objetos nuevos (NOR)

El NOR se llevó a cabo en un laberinto en V como se publicó anteriormente (10). Se realizaron tres fases de 9 minutos en días consecutivos. Los ratones se acostumbraron primero al laberinto en V. El segundo día, se les presentaron 2 objetos idénticos (piezas de ajedrez) y se registró el tiempo que pasaban explorando cada objeto. En la fase de prueba (3 horas más tarde para la memoria a corto plazo o 24 horas más tarde para la memoria a largo plazo), se sustituyó uno de los objetos familiares por un objeto nuevo (una pieza de ajedrez diferente), y se calculó el tiempo empleado en explorar cada objeto (nuevo y familiar). Se calculó un índice de discriminación como la diferencia entre el tiempo que el animal pasó explorando el objeto novedoso (Tn) y el familiar (Tf) dividido por el tiempo total de exploración del objeto: $(T_n - T_f) / (T_n + T_f)$.

Método de propagación del fago Lactococcus 936

1. Preparar un cultivo del huésped permisivo. *L. Lactis* la noche anterior, por ejemplo, en medio de cultivo GM17 (Fórmula típica* g/litro: Triptona 5,0; Peptona de soja 5,0; Polvo 'Lab-Lemco' 5,0; Extracto de levadura 2,5; Ácido ascórbico 0,5; Sulfato de magnesio 0,25; Glicerofosfato de di-sodio 19,0; pH 6,9 ± 0,2 a 25°C). El huésped permisivo puede ser cualquier bacteria perteneciente al género *Lactococcus*, preferentemente *Lactococcus lactis*.

2. Diluir 1 mL dicho cultivo en 5-15 mL de medio fresco (dilución 1:5, 1:15, preferentemente dilución 1:10) para cada lisado de fago. Incluir una dilución adicional como control sin fago para comparar la turbidez con los cultivos lisados.

3. Cultivar estos cultivos a 30°C durante 30-60 minutos (hasta que la DO600 sea ~0,2). Se recomienda iniciar un control sin fago al mismo tiempo (es decir, un matraz adicional de huésped diluido sin fago añadido) para comparar la turbidez con los cultivos lisados.
 4. Recoger una placa fresca crecida la noche anterior (para el lisado clonal) o raspe el
5 caldo congelado con un palillo estéril o una punta de pipeta. Lo ideal es conseguir un inóculo de ~10⁶ UFP (unidades formadoras de placas).
 5. Agitar a ~200 RPM a la temperatura adecuada hasta que el cultivo se lise completamente. Debería tener poca o ninguna turbidez en comparación con el control sin fagos. Por lo general, también se verán trozos de restos celulares agregados.
 - 10 6. Añadir 50-100 µL de cloroformo y agitar en vórtex
 7. Centrifugar 5min a 5000 × g (RCF)
 8. Transferir el lisado (sobrenadante) a un tubo limpio
 - o Para el almacenamiento a largo plazo a 4°C, añadir 50 µL de cloroformo para evitar el crecimiento bacteriano
 - 15 o Para el almacenamiento a largo plazo a -80°C, añadir glicerol al 20% y mezclar bien.
- El protocolo indicado arriba sirva a modo de ejemplo no limitativo, un experto en la materia sabría que modificaciones habría que hacer, así como emplear otro protocolo habitual para lograr la propagación del fago *lactococcus* 936.

Determinación del título viral

- 20 La titulación de fagos es un procedimiento utilizado para cuantificar la densidad de unidades formadoras de placas (PFU, análogas a las unidades formadoras de colonias de un cultivo bacteriano) en un lisado determinado de fagos líticos. Para ello, se debe exponer a las bacterias en fase de crecimiento exponencial al bacteriófago de interés antes de permitir que los bacteriófagos se propaguen durante la noche.
- 25 1. Caliente el frasco de agar GM17 hasta que se derrita.
2. Deje que el agar se enfríe hasta que sea manejable, entonces prepare alícuotas de 4 ml en tubos de ensayo pequeños para tantas muestras como vaya a manejar. Colocar los tubos en un bloque de calor o en un baño de agua a 60°C.
3. Prepare diluciones del stock de fago en GM17. Normalmente, una serie de diluciones
30 de 100 a 10¹⁰ en incrementos de 10² dará una placa con un número contable de placas.

4. Combinen 100 µl de células huésped en crecimiento exponencial y 100 µl de dilución de fago en un nuevo Eppendorf.

5. Añadir cada muestra a una alícuota de agar superior. Mezcle rápida pero minuciosamente por medio de un vórtex. Pueden agitar a toda velocidad para que el remolino llegue al fondo del tubo sin que se derrame por la parte superior. Vierte todo el contenido del tubo de ensayo sobre una placa LB y gira rápidamente la placa para que el agar cubra toda la superficie de manera uniforme antes de que se enfríe.

6. Deje que las placas se enfríen ~15-30 minutos a temperatura ambiente y luego transfíralas a una incubadora a 30°C.

10 El protocolo indicado arriba sirva a modo de ejemplo no limitativo, un experto en la materia sabría que modificaciones habría que hacer, así como emplear otro protocolo habitual para lograr la determinación del título viral del fago *lactococcus* 936.

Obtención del extracto de heces de ratones

15 Los ratones se colocaron por separado en una jaula limpia y desnuda donde se les permitió defecar 5-6 pellets fecales (tiempo aproximado 20-60 min). A continuación, se recogieron muestras de pellets fecales frescas utilizando una muestra por ratón y se colocaron en un vial en hielo hasta que se recogieron todas las muestras. Una vez recogidas todas las muestras, se almacenaron a -80 °C.

Preparación de la muestra de trasplante de microbiota fecal

20 Para la preparación de la muestra fecal para la inoculación, se colocó 1 g de muestra fecal en un tubo de 15 ml y se añadieron 10 ml de PBS (o solución salina) con 15% (v/v) de glicerol. Se preparó la papilla fecal agitando en vórtex cada tubo hasta que la mezcla fuera homogénea. La muestra se congeló a -80°C en alícuotas de 1 ml hasta su uso posterior (Kelly et al., 2016 Journal of Psychiatric Research).

25 *Estudio de la expresión génica en la corteza prefrontal de ratón*

Preparación de la muestra

30 Los cerebros de los ratones se extrajeron rápidamente y se diseccionó la corteza prefrontal medial según el atlas de coordenadas estereotáxicas del cerebro de los ratones. A continuación, los tejidos cerebrales se congelaron por inmersión en 2-metilbutano rodeado de hielo seco, y se almacenaron a -80°C. El ARN se puede extraer empleando cualquier protocolo y kit comercial específicamente diseñado para extraer

ARN de tejidos, preferentemente de tejidos murinos, más preferentemente de tejido cerebral murino.

Control de calidad del ARN (Ácido ribonucleico)

El control de calidad del ARN se realizó utilizando el chip RNA 6000 Nano (Agilent) en un Agilent Bioanalyzer 2100 obteniendo valores RIN (*RNA Integrity Number*) entre 8,7 - 9,8.

Bibliotecas de ARN

Las bibliotecas se prepararon a partir de 500 ng de ARN total utilizando el kit de preparación de bibliotecas de ARNm trenzado TruSeq (Illumina, #20020594) con TruSeq RNA Single Indexes (Illumina, #20020492 y #20020493) según las instrucciones del fabricante, reduciendo el tiempo de fragmentación del ARN a 4,5 minutos. Las bibliotecas preparadas se analizaron en un chip DNA 1000 en el Bioanalyzer y se cuantificaron utilizando el kit de cuantificación de bibliotecas KAPA (Roche, #07960204001) en un instrumento de qPCR ABI 7900HT (Applied Biosystems). La secuenciación se llevó a cabo con lecturas de 2x50 pb por pares en un HiSeq 2500 (Illumina) utilizando la química de secuenciación HiSeq v4.

Las lecturas de secuenciación crudas en los archivos fastq se mapearon con la versión 2.5.3a de STAR a la versión 17 de Gencode basada en el genoma de referencia GRCm38.p6 y el archivo GTF correspondiente. La tabla de recuentos se obtuvo con la función FeatureCounts del paquete subread, versión 1.5.1.

*Cepas de *Drosophila melanogaster* y mantenimiento*

La cepa de *Drosophila* de tipo silvestre se obtuvo originalmente de Bestgene. El stock final se ha obtenido cambiando el alelo w- de la cepa que la empresa utiliza habitualmente para inyectar transgenes basados en elementos P por un alelo w+ (Castells-Nobau et al., 2019).

Las moscas se criaron y mantuvieron con dieta estándar (SD) (1L: levadura 27,5 g, harina de maíz amarilla 52 g, azúcar 110 g, agar 5 g, ácido propiónico 5 ml, 0,1% de metilparabeno en etanol 5 ml) o dieta de suero (WD) (1L: suero 30 g, harina de maíz amarilla 52 g, azúcar 110 g, agar 5 g, ácido propiónico 5 ml, 0,1% de metilparabeno en etanol 5 ml). La dieta estándar estéril (SD 121 °C) y la dieta de suero estéril (WD 121 °C) se generaron siguiendo la misma receta que la SD y la WD respectivamente y se esterilizaron en el autoclave durante 20 minutos a 121°C. Para generar WD 100°C y WD 45°C, se añadieron 30g/L de suero de leche en polvo a la mezcla de alimentos a 100 °C

y se hirvieron durante 3 min o 45 °C respectivamente. Para generar SD + *fago 936* y WD + *fago 936*, se complementó SD estéril o WD estéril con 50.000 PFU de *bacteriófago 936* respectivamente según el protocolo mencionado anteriormente. Se añadió una gota de 50 ul que contenía 50.000 PFU de *bacteriófago 936* a la superficie del alimento cuando éste estaba a temperatura ambiente (21 °C). Las moscas se transfirieron a un vial de alimento fresco que contenía la dieta correspondiente cada 4 días. Las poblaciones de moscas se mantuvieron a 25 °C, en un ciclo de luz y oscuridad de 12:12 horas. El *fago 936* de *Lactococcus lactis* (número HER: 203) se obtuvo del Centro de Referencia Félix d'Hérelle para virus bacterianos de la Universidad Laval (Québec, Canadá).

Preparación de la composición alimenticia con el bacteriófago 936

Se añadieron 50.000 UFP de *bacteriófago 936* en la parte superior de la comida solidificada de las moscas (un agar especial para *Drosophila*). 5 ul de purificado vírico conteniendo 50.000 UFP se diluye con 45 ul de PBS o agua (el PBS o agua deben estar a temperatura ambiente). El agar para *Drosophila* debe estar solidificado y a una temperatura de 4°C a 25°C antes de añadir el *bacteriófago 936*, que debe estar bien esparcido por toda la superficie. La cantidad de bacteriófago por unidad de superficie será de aproximadamente 10.000 UFP por cm².

Cada recipiente (con 50.000 UFP) contiene un máximo de 50 animales y estos se mantienen el recipiente durante un máximo de 4 días, seguidamente se trasladan los animales a un nuevo bote con comida fresca con 50.000 UFP de bacteriófago en la superficie.

Las moscas se alimentan con esta mezcla durante todo su desarrollo y etapa adulta. únicamente se comen la parte superficial del agar (los primeros milímetros, por tanto, la superficie donde se ha inoculado el virus).

Memoria gustativa aversiva

Las moscas pueden detectar sabores mediante receptores gustativos situados en la boca (probóscide) y en las patas (tarsos). La detección de sabores dulces promueve la alimentación, induciendo el reflejo de extensión de la probóscide (PER), un comportamiento robusto innato. Por otro lado, la detección de compuestos amargos inhibe la alimentación y el sabor amargo es un potente inductor de la memoria gustativa aversiva, que permite modificar la elección de alimentos por experiencia previa a los animales. El paradigma de memoria gustativa aversiva se adaptó a partir del protocolo descrito anteriormente (Kirkhart y Scott, 2015; Masek et al., 2015). Se recogieron

moscas hembras fecundadas de diez días de edad, se colocaron con comida fresca durante 24 h y a continuación se dejaron en ayunas durante 40 h en un vial sobre un papel Kimwipe húmedo. A continuación, las moscas se anestesiaron con CO₂ y se pegaron a un portaobjetos de vidrio con esmalte de uñas por el tórax; cualquier mosca con los tarsos o la probóscide pegados al esmalte de uñas se retiró del estudio. Las moscas se recuperaron durante al menos 2,5 horas en una cámara húmeda a 25°C. Antes del entrenamiento, las moscas fueron saciadas con agua y se les presentó un estímulo con 100 mM de sacarosa en los tarsos tres veces (Pre-test). Cualquier mosca que no mostrara una respuesta robusta de extensión de la probóscide (PER) a cada estímulo de sacarosa del pre-test fue eliminada del estudio. Durante el entrenamiento, cada mosca fue sometida a 5 ensayos de entrenamiento con 3 minutos de intervalo entre ensayos, presentándose una gota de sacarosa 100mM en sus tarsos, seguida rápidamente por una estimulo de quinina 50 mM en la probóscide. Cada 2 ensayos de entrenamiento, las moscas podían consumir agua. Tras el entrenamiento, se testó la memoria, presentando sólo una gota de 100 mM de sacarosa en los tarsos a las moscas. Las pruebas de memoria se realizaron con un intervalo entre ensayos de 2 min, durante un periodo de 30 min. Cada cinco ensayos de memoria, las moscas pudieron consumir agua. Se anotó el número de PER de cada mosca durante los ensayos de aprendizaje y la prueba de memoria, dándose un valor de 1 a la extensión completa de la probóscide, 0,5 a la extensión parcial de la probóscide y 0 a la supresión de la extensión de la probóscide. El porcentaje de PER (PER %) se calculó sumando los resultados de un mínimo de 4 experimentos independientes con 15 moscas cada uno por condición. Los porcentajes promedio de PER para el total de moscas se reportan en los gráficos, el porcentaje promedio de PER se calculó haciendo el promedio de PER (%) entre el ensayo de interés el anterior y el posterior. Las diferencias en la frecuencia de PER entre grupos se compararon mediante la prueba exacta de Fisher, para datos categóricos.

Extracción de ADN y PCR

Para determinar la presencia del *bacteriófago* 936 en las diferentes dietas y en el suero de leche en polvo, se recogieron 200 mg de alimento. La extracción de ADN se realizó siguiendo el método del fenol-cloroformo siguiendo un protocolo habitual en el área. Un total de 200 mg de cada muestra se añadieron a 250µl de tampón de lisis (TrisHCl 0,1M (pH9,0), Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 0,1M y Dodecilsulfato sódico (SDS) 1%) y se incubaron durante 30 min a 65°C. Para precipitar el ADN, se añadieron 56 µl de acetato de sodio 5M pH 5, se agitó en vórtex durante 1 min y se incubó en hielo durante 15 min. Se añadieron 250µl de tampón saturado de fenol/cloroformo (pH 7,5-

7,8) a cada muestra y se centrifugó durante 10 min a 6.000 rpm dos veces. La capa acuosa se transfirió a un tubo de 1,5 ml que contenía 150 µl de isopropanol.

La muestra se centrifugó (12 min, 13.000 rpm), y el pellet se lavó con etanol al 70%. El pellet se secó al aire y se resuspendió en 50 µl de agua Milli-Q mediante vórtex y se almacenó a -20 °C antes de su uso.

Extracción de ARNm y síntesis de ADNc

Se seleccionaron hembras fecundadas de diez días de edad de tipo salvaje para la qRT-PCR. Se recogieron un total de diez cabezas adultas por muestra y se transfirieron a una solución de RNAlater (Sigma). El ARN total se extrajo utilizando el kit de purificación de ARN Arcturus PicoPure (Thermo Fisher Scientific). Para evitar la amplificación a partir del ADN genómico, se realizó un tratamiento con DNasa utilizando el kit Ambion libre de ADN y el ARN se transcribió de forma inversa a ADNc utilizando la transcripción inversa de ADNc de alta capacidad (Applied Biosystems) siguiendo las instrucciones del fabricante.

15 PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR)

Las PCR cuantitativas (qPCR) se realizaron utilizando el LightCycler 480 SYBR Green Master (Roche) en una máquina LightCycler 480 II (Roche). Las secuencias de los cebadores de los genes analizados y de los genes de referencia RNAPol2 y 1tub23cf se proporcionan en la Tabla 4. Cada muestra contenía un conjunto de 10-15 cabezas de mosca.

Para cada condición, se analizaron un mínimo de 7 réplicas biológicas y dos réplicas técnicas. La expresión génica diferencial se calculó utilizando el método $2\Delta\Delta Ct$ (Livak y Schmittgen, 2001). Se calculó el valor Ct medio de cada muestra y se restó del valor Ct medio geométrico de los genes de referencia RNAPol2 y 1tub23cf para calcular el valor ΔCt (Qureshi y Sacan, 2013). Las pruebas de ANOVA de Brown-Forsythe y Welch (GraphPad Prism versión 9.00 para Mac) se emplearon para los cálculos de los valores P.

Análisis estadístico

En primer lugar, se comprobó la distribución normal y la homogeneidad de las varianzas. Los resultados se expresan como número y frecuencias para las variables categóricas, media y desviación estándar (SD) para las variables continuas de distribución normal y mediana y rango intercuartil [CI] para las variables continuas de distribución no normal. Para determinar las diferencias entre los grupos de estudio, se utilizó la χ^2 para las

variables categóricas, la prueba de la t de Student no apareada en las cuantitativas normales y la prueba de la U de Mann-Whitney para las variables cuantitativas no normales. Se utilizó el análisis de correlación parcial de Spearman para determinar la correlación entre las variables cuantitativas tras controlar las covariables. En consecuencia, se generaron gráficos de dispersión con los residuos clasificados del modelo ajustado por las covariables seleccionadas. Las tendencias monotónicas no paramétricas según los terciles de *Siphoviridae* para las variables de interés se evaluaron mediante la prueba de tendencia de Mann-Kendall. Estos análisis estadísticos se realizaron con SPSS, versión 19 (SPSS, Inc, Chicago, IL) o R. Las estadísticas se encuentran en las figuras y leyendas.

Análisis metagenómico.

Para tener en cuenta la estructura composicional de los datos del microbioma y descartar posibles asociaciones espurias, a los recuentos brutos de *Siphoviridae* y *Microviridae* se les aplicó una transformación log-ratio centrada (clr) utilizando el paquete R "ALDEx2" (11). Primero utiliza un modelo Dirichlet-multinomial para intercalar la abundancia a partir de los recuentos de lecturas y luego aplica una transformación clr a cada instancia. Utilizamos 128 instancias Dirichlet Monte Carlo en la función `aldex.clr`. Las especies y funciones bacterianas asociadas diferencialmente con los niveles de bacteriófagos transformados por clr se identificaron utilizando el paquete R "DESeq2" (12), ajustando por edad, índice de masa corporal, sexo y años de educación. Los taxones y las funciones bacterianas se filtraron previamente para que solo se seleccionaran aquellos con más de 10 lecturas en al menos dos muestras. Los valores p para los taxones bacterianos se ajustaron (p_{adj}) para comparaciones múltiples utilizando el procedimiento Benjamini-Hochberg para la tasa de falsos descubrimientos (FDR). Para las funciones bacterianas, que incluían un mayor número de pruebas (se incluyeron 5714 funciones bacterianas después del filtrado), los valores p se ajustaron para comparaciones múltiples utilizando una bondad de ajuste secuencial (13) implementada en el paquete R "SGoF". A diferencia de los métodos FDR, que disminuyen su poder estadístico a medida que aumenta el número de pruebas, los métodos SGoF aumentan su poder con el aumento del número de pruebas. El SGoF ha demostrado comportarse particularmente mejor que los métodos FDR con un número elevado de pruebas y un tamaño de muestra bajo, que es el caso de los grandes conjuntos de datos ómicos. La significación estadística se fijó en $p_{adj} < 0,1$.

Análisis metabolómico.

Los datos de la metabolómica se normalizaron primero mediante una normalización probabilística del cociente. A continuación, los datos se analizaron mediante métodos de aprendizaje automático (ML). En particular, se adoptó una estrategia de selección de variables de ML de toda relevancia aplicando un método basado en bosques aleatorios múltiples (RF) como el implementado en el algoritmo Boruta. Se ha propuesto recientemente como uno de los dos métodos de selección de variables de mejor rendimiento que hacen uso de RF para conjuntos de datos ómicos de alta dimensión (Degenhardt et al., 2019). El algoritmo de Boruta es un algoritmo envolvente que realiza la selección de características basándose en el rendimiento del aprendizaje del modelo.

Realiza la selección de variables en tres pasos: a) Aleatorización, que se basa en la creación de una copia duplicada de las características originales permutadas aleatoriamente a través de las observaciones; b) Construcción del modelo, basada en la RF con el conjunto de datos ampliado para calcular las puntuaciones de importancia de la variable de permutación normalizada (VIM); c) Prueba estadística, para encontrar aquellas características relevantes con una VIM más alta que la mejor variable permutada aleatoriamente utilizando una prueba binomial de dos colas corregida por Bonferroni; y d) Iteración, hasta que se decida el estado de todas las características. Ejecutamos el algoritmo de Boruta con 500 iteraciones, un corte de nivel de confianza de 0,005 para los valores p ajustados por Bonferroni, 5000 árboles para hacer crecer el bosque (ntree), y un número de características muestreadas aleatoriamente en cada división dado por el número redondeado de características/3 (el mtry recomendado para la regresión).

Análisis de ARN-seq.

Los análisis de expresión diferencial de los genes se realizaron sobre los recuentos de genes utilizando el paquete R "limma". En primer lugar, se filtraron los genes de baja expresión, de modo que solo se seleccionaron los genes con más de 10 lecturas en al menos 2 muestras. Tras el filtrado, se retuvieron 15.546 genes de 22.204 para los análisis posteriores. Los datos de RNA-seq se normalizaron para la composición del RNA utilizando la media recortada del valor M (TMM) tal y como se implementó en el paquete edgeR. Los recuentos normalizados se convirtieron en log2 de recuento por millón (logCPM) con pesos de precisión asociados para tener en cuenta las variaciones en la precisión entre diferentes observaciones utilizando la función "voom" con la edad del donante, el IMC, el sexo y los años de educación como covariables. A continuación, se ajustó a los datos un modelo de regresión lineal robusto ajustado a las covariables anteriores mediante la función "lmFit" con la opción método = "robusto", para limitar la influencia de las muestras periféricas. Por último, se aplicó un método de Bayes

empírico para tomar prestada la información entre genes con la función "eBayes". Los valores P se ajustaron para comparaciones múltiples mediante un procedimiento SGoF y la significación estadística se fijó en $p_{adj} < 0,05$.

Los genes expresados diferencialmente se mapearon en la base de datos *Search Tool for Retrieval of Interacting Proteins/Genes* (STRING) (que integra las interacciones conocidas y predichas entre proteínas y genes) para predecir las redes de interacción funcional entre genes. A continuación, se determinaron los clústeres locales funcionales en la red de interacción utilizando un algoritmo de Markov Cluster (MCL) con un parámetro de inflación = 3. Para construir las redes de interacción se utilizaron fuentes de interacción activas que incluían la minería de textos, los experimentos, las bases de datos, la coexpresión y la coocurrencia y una puntuación de interacción $> 0,4$. Además, los papeles funcionales de los genes expresados diferencialmente se caracterizaron mediante análisis de sobrerrepresentación basados en las bases de datos Gene Ontology, Pathway Interaction Database (PID) y Wikipathways. La significación de las vías se evaluó mediante una prueba hipergeométrica y se aplicó un procedimiento de Storey (valores q) para la corrección de pruebas múltiples. La significación estadística se fijó en un valor $q < 0,1$.

Resultados

Asociación de bacteriófagos del microbioma intestinal con funciones cognitivas

Para evaluar esta asociación se empleó una cohorte de descubrimiento ($n = 114$, Tabla 1) que se sometió a una batería de pruebas cognitivas.

Tabla 1: Características de los individuos de la cohorte de descubrimiento

	Total (n=114)	No Obesos (n=51)	Obesos (n=63)	valor p
Edad (años)	50.4 [41.8-58.4]	53.9 [44.4-59.0]	48.6 [40.8-56.7]	0,084
Mujeres (n,%)	80 (70.2)	34 (42.5)	46 (57.5)	0,538
Educación (años)	12.5 [11-17]	15 [12-17]	12 [9-14]	1,50E-07
IMC (kg/m ²)	34.6 [25.3-43.3]	24.8 [23.1-26.8]	43 [39.9-47.3]	5,40E-20
Cintura (cm)	110 [92-126]	88 [84-97.3]	125 [116-132]	1,10E-18
Grasa Total (%)	43.5 [33.8-50.6]	33.1 [26.7-37.8]	50.1 [47.3-53.6]	1,80E-17
P. Sistólica (mmHg)	131 [121-146]	124.3 (15.8)	139.7 (20.6)	1,70E-05
P. diastólica (mmHg)	75 [67.5-82]	71.2 (10.9)	77.5 (11.3)	0,004
Glucosa (mg/dL)	96 [89.8-103]	95[89-101]	97 [93-105]	0,166
Colesterol (mg/dL)	197 [172-225]	200 [181-229]	186 [162-221]	0,106
HDL-C (mg/dL)	56 [45-68]	65 [55-77]	49 [42-59]	9,40E-07
LDL-C (mg/dL)	118.5 [95.5-146.3]	119 [99-143]	118 [93-147]	0,844
Triglicéridos (mg/dL)	89.5 [65-134.3]	79 [58-96]	113 [81-156]	1,30E-04

A1c (%)	5.5 [5.3-5.7]	5.5 (0.3)	5.6 (0.3)	0,043
hsCRP (mg/dL)	2.4 [0.7-5.9]	0.7 [0.4-1.3]	5.1 [2.7-9.7]	1,20E-13
TMTB (time)	69 [56-98]	68 [54-86]	75 [57-107]	0,162
Cuenta hacia atrás dígitos (puntuación)	6 [5-7]	7 [5-8]	6 [4-7]	0,037

El valor p indica si hay diferencia significativa para un parámetro entre los individuos obesos y no obesos.

En todos los análisis, se controlaron los factores de confusión de la edad, el IMC, el sexo y los años de formación. Después de aplicar una transformación logarítmica centrada para tener en cuenta la naturaleza de la composición de los datos del microbioma, observamos que las mujeres con niveles más altos de *Siphoviridae* tenían puntuaciones más bajas en el *Trial Marking Test B* (TMTB) (Fig. 1a), lo que implica un mejor rendimiento en las funciones ejecutivas centrales (un tipo de función cognitiva). Del mismo modo, los niveles de *Siphoviridae* en los hombres se asociaron con una mejor función ejecutiva medida por la prueba de dígitos hacia atrás (Fig. 1b) Por el contrario, los niveles de *Microviridae* se asociaron con un mayor deterioro de la función ejecutiva tanto en mujeres como en hombres (Fig. 1c, d)

A continuación, evaluamos las asociaciones de estas dos familias de bacteriófagos con la composición y funcionalidad bacteriana. Los niveles de *Siphoviridae* estaban fuertemente asociados de forma positiva con las bacterias lácticas (orden *Lactobacillales*), particularmente con las especies *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus* (*Lactococcus Lactis*) y *Enterococcus*, y de forma negativa con las especies del género *Bacteroides*. Esto es coherente con el hecho de que todos los fagos de bacterias lácticas pertenecen al orden *Caudovirales* y la mayoría de ellos a la familia *Siphoviridae*. Cabe destacar que las bacterias del ácido láctico son reconocidas como probióticas que conllevan efectos de promoción de la salud, incluyendo efectos en el sistema nervioso central. En particular, ~40% de las especies más fuertemente vinculadas con *Siphoviridae* también se asociaron significativamente con las puntuaciones de TMTB. Por el contrario, los niveles de *Microviridae* se asociaron negativamente con varios *Lactobacillus*, *Streptococcus* y *Enterococcus*, mientras que se vincularon positivamente con especies de *Bacteroides* y *Prevotella*.

A continuación, validamos estos resultados en una cohorte de validación independiente (IMAGEOMICS, n = 942, Tabla 2) (4).

Tabla 2: Características de los individuos de la cohorte de validación IMAGEOMICS

Edad (años)	67.1 [61.8-72.4]
Mujeres (n,%)	427 (46%)
Nivel de educación	12.5 [11-17]
- Sin estudios	26 (2.8%)
- Primaria	510 (54.7%)
- Secundaria	138 (14.8%)
- Formación Profesional	146 (15.7%)
- Universidad	112 (12.0%)
IMC (kg/m ²)	27.9 [24.8-30.1]
- delgado (18.5-25)	237 (25.2%)
- Sobrepeso (25-30)	445 (47.4%)
- Obeso (>30)	250 (26.6%)
Cintura (cm)	98.9 [92.0-107.0]
P. Sistólica (mmHg)	139.5 [125.0-153.0]
P. diastólica (mmHg)	84.0 [77.0-90.0]
Glucosa (mg/dL)	102.0 [94.0-121.0]
Colesterol (mg/dL)	195.0 [172.0-219.0]
HDL-C (mg/dL)	50.0 [42.0-61.0]
LDL-C (mg/dL)	118.0 [96.5-140.0]
Triglicéridos (mg/dL)	105.0 [77.0-146.0]
HbA1c (%)	5.7 [5.5-6.2]
PVF (puntuación)	10.0 [8.0-11.0]
SDT (puntuación)	46.0 [33.0-59.0]
TFR (puntuación)	11.0 [8.0-14.0]
CVLT_FR_L1 (puntuación)	6.0 [5.0-8.0]
CVLT_DFR_L1 (puntuación)	6.0 [5.0-8.0]
Cognición (puntuación)	0.0019 [-0.38-0.47]

En consonancia con los hallazgos anteriores, los niveles de *Siphoviridae* se asociaron positivamente con las bacterias lácticas. En particular, las especies bacterianas más asociadas a esta familia de bacteriófagos en la cohorte de validación fueron las mismas que las identificadas en la cohorte de descubrimiento. No solo eso, sino que, en consonancia con los resultados de la cohorte de descubrimiento, los sujetos con niveles de *Siphoviridae* transformados en clr por encima de la mediana tenían puntuaciones más altas tanto en las medidas de actividad de la corteza frontal como en la función ejecutiva (Fluidez verbal fonética, Figura Fig. 2a) (14) y la velocidad de procesamiento de la información (Symbol Digit Test, Figura Fig. 2b) (15), después de controlar la edad, el IMC, el sexo, los años de educación, la ingesta de medicamentos con efectos secundarios en el sistema nervioso central (código ATC N), la actividad física (METS/min/semana), las puntuaciones de depresión (PHQ-9) y los niveles de glucosa y

colesterol en la cohorte de validación. En los hombres, los niveles de *Siphoviridae* no sólo se asociaron con la función ejecutiva y la velocidad de procesamiento de la información (Fig. 2 c y d), sino también con la memoria verbal a corto y largo plazo (Paired, Delayed, and Total Free Recall; Fig. 2f) y la cognición general (Fig. 2f).

- 5 Estos datos demuestran que las poblaciones de *Siphoviridae* y *Microviridae* están inversamente correlacionadas y a su vez tienen efectos opuestos en las funciones cognitivas de los seres humanos.

Las funciones bacterianas están vinculadas a los bacteriófagos del intestino

- Los análisis funcionales realizados mediante KEGG *pathways* también revelaron asociaciones significativas entre las rutas bacterianas, los bacteriófagos y la función ejecutiva del huésped humano. En concreto, los niveles de *Siphoviridae* se encuentran fuertemente asociados de forma negativa con el metabolismo de un carbono mediado por el folato. El metabolismo del folato es fundamental para múltiples procesos fisiológicos, proporcionando unidades de 1 carbono (1C) necesarias para los procesos
- 10 celulares. Las unidades de 1C activadas por el folato son necesarios para la vía de síntesis de nucleótidos, que es esencial para la replicación y reparación del ADN. También participan en el ciclo de la metionina, necesario para la síntesis de S-adenosilmetionina (SAM), el donante universal de metilo para numerosas reacciones de metilación, incluida la del ADN. A través de la vía de la transulfuración, regula la defensa
- 15 redox mediante la síntesis de antioxidantes como la taurina y el glutatión a partir de la cisteína. Sorprendentemente, todas estas vías bacterianas también estaban fuertemente asociadas con los niveles de *Siphoviridae* e inversamente con *Microviridae*. También encontramos asociaciones negativas entre el metabolismo de las vitaminas B2 y B6, que son cofactores esenciales en el ciclo del folato, y *Siphoviridae*. Los análisis
- 20 funcionales a nivel enzimático, revelaron que los genes bacterianos *thyX* y *dut*, ambos implicados en la biosíntesis de pirimidina mediada por el folato, tenían las asociaciones más fuertes con los niveles de *Siphoviridae*. En concreto, *thyX* codifica para la timidilato sintasa (TYMS en humanos).
- 25

- Todos estos datos refuerzan las funciones opuestas que tienen los fagos de las familias
- 30 *Siphoviridae* y *Microviridae*.

Los metabolitos plasmáticos y fecales humanos reflejan funciones bacterianas moduladas por los bacteriófagos

A continuación, realizamos un perfil metabólico del plasma y las heces mediante ¹H-NMR (Resonancia Magnética Nuclear de protón) para revelar firmas metabólicas

relacionadas con los bacteriófagos. Aplicando una estrategia de selección de variables de aprendizaje automático basada en el bosque aleatorio, (16) identificamos varios metabolitos asociados con los niveles de *Microviridae* y *Siphoviridae*. La mayoría de los metabolitos están directamente implicados en el metabolismo de un carbono. Incluían

5 metabolitos que aportan unidades de 1C al pool de folato (colina, glicina, formato, histidina y glucosa) y catabolitos relacionados (urocanato, glutamato, inosina, BAIBA y metionina sulfóxido). En particular, la colina y la glicina, que son la fuente más importante de unidades de folato 1C, presentaron las asociaciones más fuertes con los niveles de *Microviridae* y *Siphoviridae*, respectivamente. En línea con estos resultados,

10 las vías metabólicas bacterianas de la glicina y la histidina también se asociaron negativa y positivamente con los niveles de *Siphoviridae* y *Microviridae*, respectivamente. Específicamente, identificamos fuertes asociaciones entre los bacteriófagos y varios genes que codifican para las enzimas involucradas en el metabolismo y transporte de glicina e histidina. La glicina puede obtenerse a partir del

15 catabolismo de la colina y la serina de la dieta que alimentan las unidades de carbono del metabolismo 1C. La serina también puede ser sintetizada a partir del 3-fosforilglicerato, e intermedio en la glucólisis. La propia glicina es también una fuente de 1C a través del sistema de escisión de la glicina (GCS) que produce una unidad de carbono para la metilación del THF. De forma consistente, los niveles de bacteriófagos

20 se asociaron con los genes que participan en el GCS (gcvH, gcvP y gcvR), la síntesis de serina (serB y serA) y el transporte y catabolismo de colina (sox, opuD). Cabe destacar que los genes GCS tuvieron la asociación negativa más fuerte con los niveles de *Siphoviridae*, mientras que el represor transcripcional GCS (gcvR) se asoció positivamente con la familia *Microviridae*. Las mutaciones en los genes que codifican el

25 GCS han demostrado que predisponen a defectos del tubo neural y a disfunciones neurológicas tanto en ratones como en humanos.

Todos estos datos refuerzan las funciones opuestas que tienen los fagos de las familias *Siphoviridae* y *Microviridae* y su relación con disfunciones cognitivas

30 *Los bacteriófagos intestinales inducen cambios en la función cognitiva y la expresión génica cerebral de los ratones receptores*

Para comprobar si los bacteriófagos y las comunidades bacterianas asociadas procedentes de donantes humanos podían provocar cambios cognitivos en los ratones receptores, realizamos un experimento de trasplante de microbiota fecal (FMT). La microbiota de 22 pacientes fue suministrada a ratones receptores tratados con

35 antibióticos (Fig. 3a). Después de 4 semanas, observamos un tipo de efectos dosis-

respuesta según los niveles de *Siphoviridae* presentes en el microbioma del donante: cuanto más altos eran los niveles de *Siphoviridae*, más altas eran las puntuaciones en la prueba de reconocimiento de objetos nuevos (NOR), que se utiliza para evaluar la cognición, en particular la memoria. Por el contrario, el aumento de los niveles de

5 *Microviridae* en el microbioma del donante se asoció con el deterioro de la cognición de los ratones receptores (Fig. 3b y Fig. 3c). También comprobamos si el FMT podía afectar al transcriptoma del cerebro de los ratones receptores. Una secuenciación de ARN de la corteza prefrontal (PFC) de los ratones receptores, que está implicada en las funciones ejecutivas y la memoria, identificó 23 y 18 de los 15.547 genes regulados al

10 alza y a la baja asociados con los niveles de *Siphoviridae* del donante, respectivamente (Fig. 4a y Fig. 4b). En particular, varios de los genes más regulados con el aumento de los niveles de *Siphoviridae* del donante son genes conocidos que promueven la memoria (es decir, *Arc*, *Fos*, *Egr2* y *Btg2*).

Para conocer mejor los mecanismos moleculares de los bacteriófagos asociados a la

15 cognición, se utilizaron genes significativos para construir una red de interacción gen-gen utilizando la base de datos STRING. Esto reveló un grupo de genes altamente conectados, mayormente regulados con la familia *Siphoviridae* que incluía *Arc*, *Dusp1*, *Fos*, *Btg2*, *Egr2*, *Cyr61*, *Pmp22*, *Sik1*, *Csrnp1*, *Ier2*, y *Trib1*. Los genes de este grupo estaban implicados en la regulación positiva de la actividad de la proteína quinasa tau,

20 la activación de la MAP quinasa y la red de factores de transcripción AP-1. La gran mayoría de estos transcritos están codificados por genes tempranos inmediatos (IEGs), crucialmente involucrados en la plasticidad sináptica y el desarrollo neuronal. Tanto la plasticidad sináptica como la inducción de IEGs dependen de la activación del factor de transcripción AP-1 y de la cascada de señalización MAPK/ERK. Además, el

25 enriquecimiento ambiental en ratones transgénicos redujo notablemente los niveles y la deposición de amiloide- β en paralelo a la expresión regulada de IEGs en el hipocampo, incluyendo *Fos*, *Arc*, *Egr2*, *Dusp1*, *Btg2* e *Ier2*.

Además, complementamos estos análisis realizando análisis de sobrerrepresentación utilizando la base de datos de vías de consenso. El análisis basado en la ontología de

30 genes destacó la cognición como el proceso biológico más sobrerrepresentado asociado a los niveles de *Siphoviridae* del donante. Otros procesos biológicos relevantes incluyeron el aprendizaje asociativo y la diferenciación y desarrollo de las neuronas, la neurogénesis, la mielinización y el desarrollo del sistema nervioso. Esto está en consonancia con el hecho de que los IEGs juegan un papel importante en la plasticidad

35 sináptica, que es crítica para las funciones cerebrales clave, incluyendo el aprendizaje y la memoria. También es consistente con nuestros hallazgos, el aprendizaje y la

adquisición de la memoria regulan la expresión de los IEGs *Arc*, *Fos*, *Btg2*, *Sik1*, *Dusp1*, *Ier2*, y *Egr2* en el hipocampo y la corteza retrosplenial de ratones adultos. La metilación del ADN desempeña un papel fundamental en la regulación de la expresión de los genes y en la mediación de la plasticidad sináptica mediante la modulación de la expresión de los genes potenciadores/supresores de la memoria. En particular, la transcripción de los IEGs es muy susceptible a la metilación del ADN debido a la gran presencia de islas CpG. Hemos demostrado que los niveles de *Siphoviridae* estaban asociados principalmente con el metabolismo 1C mediado por el folato. Dado que desempeña un papel crítico en la regulación epigenética, incluyendo la metilación del ADN, los bacteriófagos de la familia *Siphoviridae* y más concretamente el *bacteriófago* 936 mejora el rendimiento cognitivo a través de la regulación del estado de metilación de los IEG.

El bacteriófago Lactococcus 936 aumenta la retención de la memoria y altera la expresión de los genes relacionados con la misma en Drosophila melanogaster.

El paradigma de memoria gustativa aversiva evalúa las capacidades de aprendizaje y memoria. *Drosophila* es capaz de discriminar las modalidades de sabor, incluyendo el dulce y el amargo. La percepción de un sabor duce por las moscas, como por ejemplo una solución de sacarosa en contacto con los tarsos (patas), estimula a la alimentación de las moscas, induciendo el reflejo de extensión probóscide (PER). Por otra parte, la percepción de sabores amargos como la quinina, el reflejo de extensión probóscide (PER). Durante el ensayo previo, las moscas son examinadas para ver si extienden completamente la probóscide (boca) tras aplicar una gota de sacarosa en los tarsos. Durante los ensayos de entrenamiento (período de aprendizaje) se aplica una gota de sacarosa en los tarsos (patas) seguida de la aplicación de una gota de quinina en la probóscide. Tras el entrenamiento, se evalúa la memoria asociativa observando la supresión del PER en respuesta a la estimulación con sacarosa en los tarsos. (Figura 5 y Figura 6). Las moscas de tipo silvestre entrenadas (verde) muestran una supresión del PER durante la prueba de memoria, mientras que las moscas sin entrenar (negro) muestran una fuerte PER (Figura 6 izquierda). Las moscas entrenadas muestran una reducción significativa del PER en el ensayo de aprendizaje 3 (Figura 6 centro) y a los 10 y 20 min después del entrenamiento (Figura 6 derecha).

El bacteriófago *Lactococcus* 936 fue la especie de *Siphoviridae* más abundante en la cohorte de descubrimiento. Además, es uno de los fagos más frecuentemente aislados en las fermentaciones lácteas. Las moscas fueron alimentadas con dietas suplementadas con suero de leche.

Las moscas fueron alimentadas con diferentes dietas suplementadas o no con suero, un derivado de la leche rico en bacteriófagos tipo *Lactococcus* 936. Dado que los bacteriófagos son termolábiles, para generar dietas de suero (WD) libres de bacteriófagos, se generaron dietas de suero a partir de lactosuero (WD) libres de
 5 bacteriófagos sometiendo el suero en polvo a un tratamiento térmico durante 15 min a 121 ° C (WD 121 ° C) o 3 min a 100 ° C (WD 100 ° C). Para preservar la integridad de los bacteriófagos, también generamos WD 45 ° C, añadiendo suero de leche en polvo al alimento de la mosca a 45 ° C.

Para preservar la integridad de los bacteriófagos, generamos WD 45 °C, agregando
 10 suero en polvo a la comida para moscas a 45 °C. Después de realizar la PCR convencional, se detectaron productos de PCR que confirmaron la presencia de ADN de fagos de tipo *Lactococcus* 936 en muestras de suero en polvo y WD a 45°C, mientras que se observaron productos de PCR débiles o ausencias después de la amplificación por PCR de WD Muestras de 100 °C o WD 121, probablemente debido a la degradación
 15 del ADN de los bacteriófagos debido al tratamiento térmico. No se amplificó ADN de la especie del bacteriófago *lactococcus* 936 después de PCR convencional de muestras de dietas sin suero, dieta estándar (SD) o dieta estándar esterilizada (SD 121 °C). Lo que indica que la presencia de especies de *Lactococcus* 936 en la dieta de las moscas se proporcionó únicamente a partir de la adición de suero en polvo.

20 Las moscas de tipo silvestre alimentadas con WD 45 °C mostraron una supresión del PER más prolongada durante la prueba de memoria en comparación con las moscas alimentadas con dietas tratadas térmicamente WD 121 °C o WD 100 °C. Es decir, aquellas moscas alimentadas con dietas con suero en las que el bacteriófago no se hubiera degradado por el tratamiento esterilizante térmico fueron capaces de mantener
 25 la memoria gustativa aversiva durante períodos más largos (Figura 7 izquierda y derecha). No se observaron diferencias en el aprendizaje o memoria gustativa aversiva entre grupos de moscas alimentadas con una dieta estándar sin suero de leche (SD) esterilizada o no a 121°C. Estos resultados demuestran que los componentes termolábiles del suero en polvo promueven la memoria. Potencialmente, la presencia de
 30 bacteriófagos en este producto puede promover este efecto.

Posteriormente, se determinó si el incremento en las capacidades de retención de la memoria estaba mediado por el bacteriófago *Lactococcus* 936 suplementado a la dieta. Para ello se esterilizó la dieta con suero de leche (WD) y la dieta estándar (SD) a 121°C para eliminar cualquier posible contaminación bacteriófaga y se complementó con
 35 50.000 UFP del fago-936 después de que la comida estuviera a temperatura ambiente.

El *fago* 936 se obtuvo según el protocolo de propagación del *fago* 936 descrito en la sección anterior.

El rendimiento del aprendizaje y la memoria de las moscas hembra se evaluó con el paradigma de memoria gustativa aversiva. Las moscas alimentadas con WD + *fago* 936 mostraron una mayor supresión del PER durante la prueba de memoria respecto a las moscas alimentadas con dieta de suero de leche estéril sin complementar con el *fago* 936, además de una reducción significativa del PER 10, 20 y 30 min después del entrenamiento lo que indica una mayor retención de la memoria (Figura 8 izquierda y derecha). Resultados similares se obtuvieron cuando las moscas se alimentaron con una dieta estándar sin suero (SD), esterilizada a 121 °C y complementada o no con el *fago* 936 (Figura 9 izquierda y derecha). Estos resultados demuestran que el *fago* 936 es capaz por sí mismo de mejorar las capacidades de memoria de *Drosophila melanogaster* cuando se ingiere.

Para comprender mejor los mecanismos moleculares mediados por el *fago* 936 y su impacto en la memoria, estudiamos un grupo de genes relacionados con el aprendizaje y la memoria (Tabla 3) con expresión regulada al alza en el cerebro de ratón tras el trasplante de microbiota enriquecida con *Siphoviridae* (Figura 4A, nodos de *Arc*, *Pmp22*, *Egr2*, *Fos*, *Sik1*, *Ier2*, *Btg2*, *Csmp1*, *Dusp1*, *Trib1*, *Cyr61* y *Socs3* en la red de interacción genética de la Figura 4B).

20

Tabla 3 ortólogos de *Drosophila* y ratón

Ratón	Ortólogos de <i>Drosophila</i>		
Símbolo	Símbolo	Anotación	Puntuación conservación
<i>Arc</i>	<i>Arc1</i>	CG12505	2 de 5
<i>Fos</i>	<i>kay</i>	CG33956	6 de 15
<i>Egr2</i>	<i>sr</i>	CG7847	6 de 15
<i>Btg2</i>	-	-	ninguna
<i>Dusp1</i>	<i>puc</i>	CG7850	3 de 15
<i>Cyr61</i> (<i>CCN1</i>)	<i>Ccn</i>	CG32183	7 de 15
<i>Pmp22</i>	-	-	ninguna
<i>Sik1</i>	<i>Sik2</i>	CG42856	4 de 15
<i>Csmp1</i>	<i>Axud1</i>	CG4272	9 de 15
<i>Ier2</i>	-	-	ninguna
<i>Trib1</i>	<i>trbl</i>	CG5408	10 de 15
<i>Socs3</i>	<i>Socs44A</i>	CG2160	4 de 15

Después de la identificación de los correspondientes ortólogos de *Drosophila* (Tabla 3), se examinó la expresión relativa de estos genes en cabezas de mosca mediante qRT-PCR, y se compararon los niveles de expresión génica entre moscas alimentadas con dietas suplementadas con *fago* 936 y no suplementadas. Sorprendentemente, la expresión relativa de los transcritos de todos los genes estaba significativamente regulada al alza en el grupo de moscas alimentadas con WD + *fago* 936, lo que correlaciona con los resultados obtenidos en los cerebros de los ratones (Figura 10 panel superior), en las cabezas de las moscas (medido por qRT-PCR, la secuencia de polinucleótidos de los cebadores se encuentra en la tabla 4). Excepcionalmente, *Kay*, el homólogo de *Fos*, se reguló significativamente a la baja. Del mismo modo, las moscas alimentadas con SD + *fago* 936 mostraron incrementos significativos en la expresión génica de *Axud*, *Trbl* y *Socs44a*. También se observó una tendencia al aumento de *Arc1*, *sr* y *Sik2* (Figura 10 panel inferior).

Tabla 4 cebadores empleados

	amplicon PCR	Cebadores (5' a 3')
SEQ_ID No 2	Fago 936-Fw	TCAATGGAAGACCAAGCGGA
SEQ_ID No 3	Fago 936-Rv	GTAGGAGACCAACCCAAGCC
SEQ_ID No 4	Arc1 q-PCR Fw	TCGGCAACATCGAGACATAC
SEQ_ID No 5	Arc1 q-PCR Rv	CGTAGAACAGCAGCGAGATG
SEQ_ID No 6	Kayak q-PCR Fw	ACGCACAATGCGAATATCAG
SEQ_ID No 7	Kayak q-PCR Rv	TGTTGCAATCGGTTATCCAG
SEQ_ID No 8	Stripe q-PCR Fw	CGATATTCCCTCGTTCTTCG
SEQ_ID No 9	Stripe q-PCR Rv	TATCACCTGGGGTTCCAAAG
SEQ_ID No 10	Puc q-PCR Fw	GGAGGCCTACGACTTTATCG
SEQ_ID No 11	Puc q-PCR Rv	TTGTACCGCATGACGTAGG
SEQ_ID No 12	Sik2 q-PCR Fw	GCCAAGGAGAGATCTTCGATTA
SEQ_ID No 13	Sik2 q-PCR Rv	CAGTACTCCACCGCCGATA
SEQ_ID No 14	Axud1 q-PCR Fw	GCAGCACTCAGATCACTTCC
SEQ_ID No 15	Axud1 q-PCR Rv	ACCGCACAGGAGCTATACG
SEQ_ID No 16	Trbl q-PCR Fw	TATCCTCAGGGACCTCAAGC
SEQ_ID No 17	Trbl q-PCR Rv	CATTGAGCCTTCCAGTGATTC
SEQ_ID No 18	Ide q-PCR Fw	AATGCGGTAACTCTGAGCAC
SEQ_ID No 19	Ide q-PCR Rv	GCTGCCGAACCTTGCTGTAG
SEQ_ID No 20	1tub23cf q-PCR Fw	TAATGGGCTCGGTCTACTCC
SEQ_ID No 21	1tub23cf q-PCR Rv	TGTCGAATACCTCTTCTTGACG
SEQ_ID No 22	RNApol2_Q q-PCR Fw	CCGCGATACTTCTCTCCAC
SEQ_ID No 23	RNApol2_Q q-PCR Rv	GACCAGCTAGGCGACATTC
SEQ_ID No 24	ccn q-PCR Fw	CGTTTCCCGAAAGCTGTATC

SEQ_ID No 25	ccn q-PCR Rv	GGACACAGCAACTCAACCTG
SEQ_ID No 26	Socs44A q-PCR Fw	TCCGAGATGCTCAACCAAG
SEQ_ID No 27	Socs44A q-PCR Rv	CAGTCGGCTTGCTCACTCAAC

Sr, *puc*, *kay*, *Sik2* y *Arc1* forman parte de los genes regulados por la actividad de *Drosophila* (*activity-regulated genes* ARGs). Al igual que los IEGs de mamíferos, estos genes son transductores iniciales de la actividad neural implicados en los primeros
5 pasos de la formación de la memoria, siendo su expresión transitoriamente regulada al alza en la actividad neural. Los niveles de expresión basal de estos genes parecen estar regulados diferencialmente en *Drosophila* tras la administración del *fago 936* con una o ambas dietas. Los genes ARGs también están involucrados en la plasticidad neuronal y el neurodesarrollo. La expresión diferencial de estos genes en estado estacionario
10 puede dar lugar a un estado neuronal que potencie diferentes formas de memoria a corto plazo.

La serina/treonina pseudoquinasa Tribbles (*Trbl*) (el ortólogo de TRIBs de mamíferos) estaba fuertemente regulado al alza en *Drosophila* después de suplementar ambas dietas con el *fago 936*. Del mismo modo, observamos que la expresión de *Trib1* estaba
15 regulado al alza en el córtex prefrontal de los ratones tras el trasplante de microbiota de donantes humanos con niveles elevados de *Siphoviridae*. Todas las pseudoquinasas TRIB muestran una amplia expresión en el sistema nervioso de invertebrados y vertebrados, y su función molecular parece estar conservada evolutivamente. Los TRIB actúan como coactivadores y represores transcripcionales en el núcleo, como
20 inhibidores de MAP quinasas y AKT y como adaptadores del proteasoma en el citoplasma. En *Drosophila*, *Trbl* es esencial para la formación adecuada de la memoria, y las mutaciones en *Trbl* se asocian con defectos en la memoria a corto plazo. Curiosamente, *Trbl* es un conocido regulador de *slow poked* (un homólogo de la familia de factores de transcripción C/EBP) dirigiéndola a la vía del proteasoma. De forma
25 similar, las TRIBs se unen y dirigen la degradación de varios miembros de la familia C/EBP al proteasoma en mamíferos. Varios miembros de la superfamilia C/EBP de factores de transcripción actúan para restringir la conversión de la potenciación sináptica de corto a largo plazo y el almacenamiento de la memoria de corto a largo plazo, por lo que actúan como inhibidores de la memoria. En consecuencia, la regulación al alza de
30 las TRIBs puede conducir a una mejora de la degradación de los C/EBPs, lo que resulta en una mejor capacidad de memoria. Este podría ser un mecanismo molecular atractivo para explicar cómo la regulación al alza de las pseudoquinasas Tribbles, en los dos

modelos animales utilizados en la presente invención (*Drosophila* y ratón), está asociada a una mejora de las capacidades de memoria.

La presente invención, divulga que los bacteriófagos más prevalentes en la microbiota intestinal funcionan en paralelo a la cognición del huésped humano a través de la manipulación del metabolismo del huésped que resulta en un perfil metabólico favorable/desfavorable dependiendo de la proporción *Siphoviridae/Microviridae*. Además, la suplementación directa de bacteriófagos *Siphoviridae* de tipo 936 en la dieta de las moscas (bien complementado tras la propagación, bien presente en suero) y tras el trasplante de microbiota en ratones favorece el aumento de las capacidades de memoria a través de la regulación al alza de la expresión de genes implicados en la plasticidad sináptica, el desarrollo neuronal y la formación de la memoria. Lo que se traduce a un tratamiento dirigido a mejorar las alteraciones cognitivas y la memoria.

REFERENCIAS

1. Lim, E., Zhou, Y., Zhao, G. *et al.* Early life dynamics of the human gut virome and bacterial microbiome in infants. *Nat Med* **21**, 1228–1234 (2015).
<https://doi.org/10.1038/nm.3950>.
2. Gregory AC, Zablocki O, Zayed AA, Howell A, Bolduc B, Sullivan MB. The Gut Virome Database Reveals Age-Dependent Patterns of Virome Diversity in the Human Gut. *Cell Host Microbe*. 2020;28(5):724-740.e8.
doi:10.1016/j.chom.2020.08.003.
3. Schulfer A, Santiago-Rodriguez TM, Ly M, et al. Fecal Viral Community Responses to High-Fat Diet in Mice. *mSphere*. 2020;5(1):e00833-19. Published 2020 Feb 26. doi:10.1128/mSphere.00833-19.
4. Puig, J., Biarnes, C., Pedraza, S., Vilanova, J.C., Pamplona, R., Fernández-Real, J.M., Brugada, R., Ramos, R., Coll-de-Tuero, G., Calvo-Perxas, L., et al. (2020). The aging imageomics study: rationale, design and baseline characteristics of the study population. *Mech. Ageing Dev.* 111257.
5. Vioque, J., Navarrete-Muñoz, E.-M., Gimenez-Monzó, D., García-de-la-Hera, M., Granado, F., Young, I.S., Ramón, R., Ballester, F., Murcia, M., Rebagliato, M., et al. (2013). Reproducibility and validity of a food frequency questionnaire among pregnant women in a Mediterranean area. *Nutr. J.* 12, 26.
6. Levis, B., Benedetti, A., and Thombs, B.D. (2019). Accuracy of Patient Health 783 Questionnaire-9 (PHQ-9) for screening to detect major depression: Individual participant data meta-analysis. *BMJ* 365.

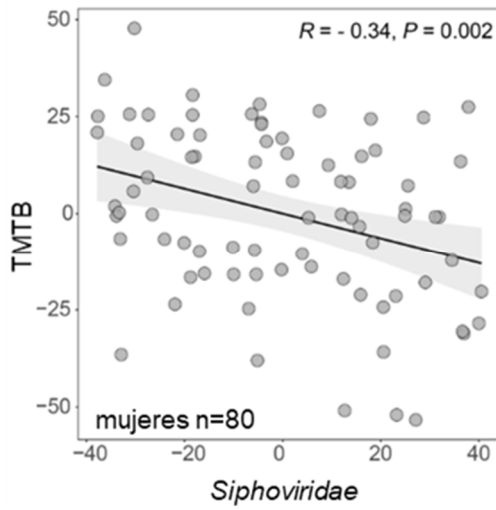
7. Wechsler, D. (2012). WAIS-IV. Escala de inteligencia de Wechsler para adultos-IV. Manual técnico y de interpretación (Madrid: NCS Pearson).
8. Delis, D.C., Kramer, J.H., Kaplan, E., and Ober, B.A. (2000). Manual for the California Verbal Learning Test, (CVLT-II) (San Antonio, Texas: The Psychological Corporation).
9. J. R. Kelly, Y. Borre, C. O' Brien, E. Patterson, S. El Aidy, J. Deane, P. J. Kennedy, S. Beers, K. Scott, G. Moloney, A. E. Hoban, L. Scott, P. Fitzgerald, P. Ross, C. Stanton, G. Clarke, J. F. Cryan, T. G. Dinan, Transferring the blues: Depression-associated gut microbiota induces neurobehavioural changes in the rat. *J. Psychiatr. Res.* 82, 109–118 (2016).
10. A. Burokas, E. Martín-García, J. Gutiérrez-Cuesta, S. Rojas, J. R. Herance, J. D. Gispert, M.-Á. Serra, R. Maldonado, Relationships between serotonergic and cannabinoid system in depressive-like behavior: a PET study with [11C]-DASB. *J. Neurochem.* 130, 126–35 (2014).
11. Fernandes, A.D., Reid, J.N.S., Macklaim, J.M., McMurrough, T.A., Edgell, D.R., and Gloor, G.B. (2014). Unifying the analysis of high-throughput sequencing datasets: Characterizing RNA-seq, 16S rRNA gene sequencing and selective growth experiments by compositional data analysis. *Microbiome* 2, 15.
12. Love, M.I., Huber, W., and Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNAseq data with DESeq2. *Genome Biol.* 15, 550.
13. Carvajal-Rodríguez, A., de Uña-Alvarez, J., and Rolán-Alvarez, E. (2009). A new multitest correction (SGoF) that increases its statistical power when increasing the number of tests. *BMC Bioinformatics* 10, 209.
14. Herrmann, M.J., Horst, A.K., Löble, S., Möll, M.T., Katzorke, A., and Polak, T. (2017). Relevance of Dorsolateral and Frontotemporal Cortex on the Phonemic Verbal Fluency – A fNIRS-Study. *Neuroscience* 367, 169–177.
15. Silva, P.H.R., Spedo, C.T., Baldassarini, C.R., Benini, C.D., Ferreira, D.A., Barreira, A.A., and Leoni, R.F. (2019). Brain functional and effective connectivity underlying the information processing speed assessed by the Symbol Digit Modalities Test. *Neuroimage* 184, 761–770.
16. M. B. Kursu, W. R. Rudnicki, Feature selection with the boruta package. *J. Stat. Softw.* 36, 1–13 (2010).

REIVINDICACIONES

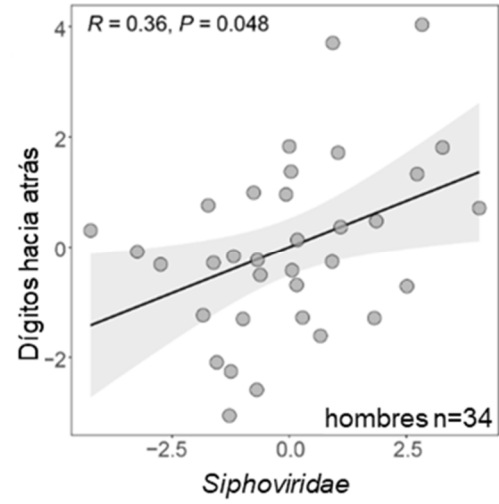
1. Un bacteriófago cuyo genoma es una secuencia que tiene una identidad de al menos el 85% con la SEQ_ID 1, preferentemente un 90%, más preferentemente, 92%, aún más preferentemente 94%, aún más preferentemente 96% y aún más preferentemente un 98% con la SEQ_ID 1 para su uso terapéutico.
2. El bacteriófago, de acuerdo con la reivindicación anterior cuyo genoma es la secuencia de nucleótidos de la SEQ_ID No 1 para su uso terapéutico.
3. Una composición que comprende al menos un bacteriófago definido en una de las reivindicaciones 1 a 2 y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable para su uso terapéutico.
4. La composición según la reivindicación anterior, que comprende el bacteriófago de la reivindicación 1 o 2, para uso en alteraciones cognitivas.
5. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 4, que se emplea como tratamiento subsiguiente o simultáneo con otras terapias.
6. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 4, que se emplea como tratamiento profiláctico.
7. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6, para su administración a un individuo por vía oral.
8. Una preparación de heces de un donante humano que comprende el bacteriófago definido en la reivindicación 1 o 2
- y
- un mayor nivel de bacteriófagos de la familia *Siphoviridae* que de la familia *Microviridae*.
9. La preparación según la reivindicación anterior en la que el nivel de fagos de la familia *Siphoviridae* es al menos 1.5 veces superior a la de los fagos de la familia *Microviridae*.
10. La preparación según una de las reivindicaciones anteriores 8 a 9 para su uso terapéutico.
11. La preparación según una de las reivindicaciones anteriores 8 a 10 para uso en alteraciones cognitivas.
12. La preparación según una de las reivindicaciones anteriores 8 a 11 que se administra por vía oral.

13. Una composición alimenticia que comprende al menos 10.000 UFP del bacteriófago descrito en las reivindicaciones 1 o 2 por cm² de la superficie de la composición alimenticia.
- 5 14. Una composición alimenticia que comprende al menos 5.000 UFP del bacteriófago descrito en las reivindicaciones 1 o 2 por gramo de la composición alimenticia.
15. Una composición alimenticia según la reivindicación 13 o 14 para su uso terapéutico.
16. La composición alimenticia según la reivindicación anterior para uso en alteraciones cognitivas.
- 10 17. Procedimiento de obtención de una composición alimenticia definida en una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15, que comprende complementar un alimento con el bacteriófago descrito en las reivindicaciones 1 o 2.

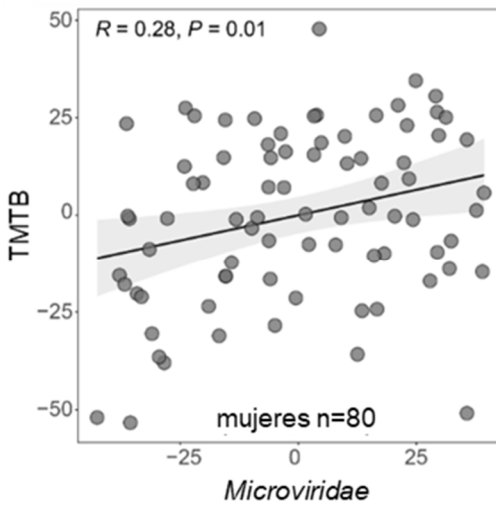
A)



B)



C)



D)

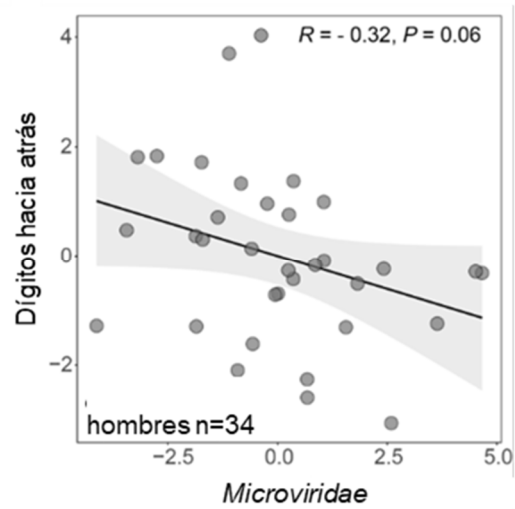


FIG. 1

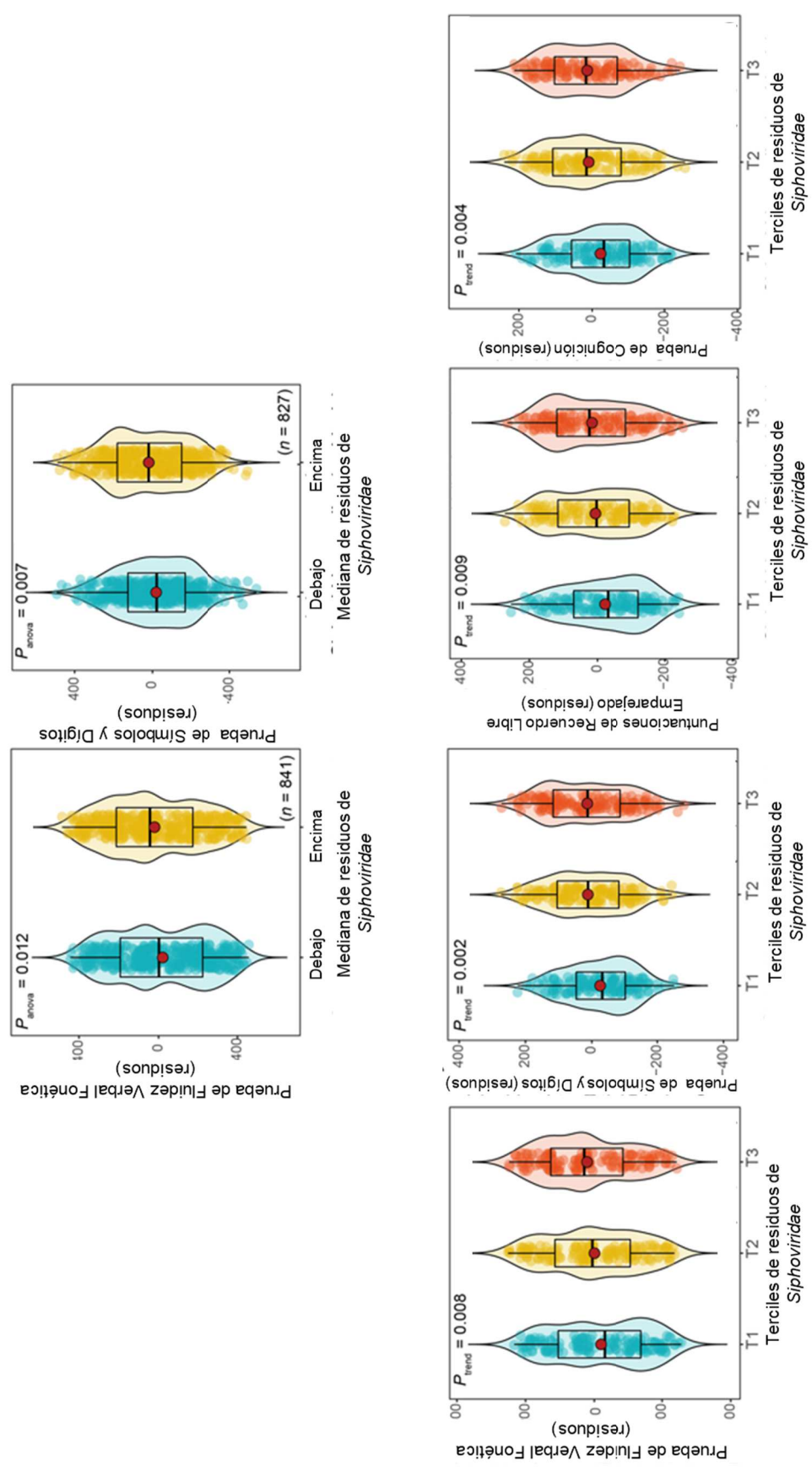
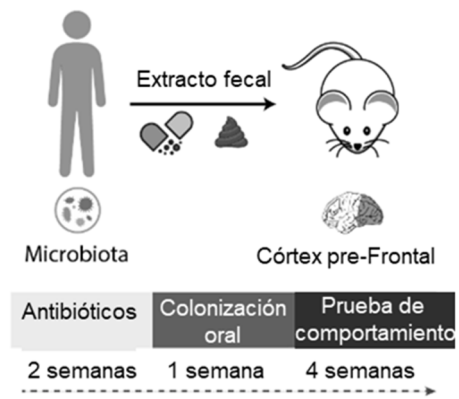
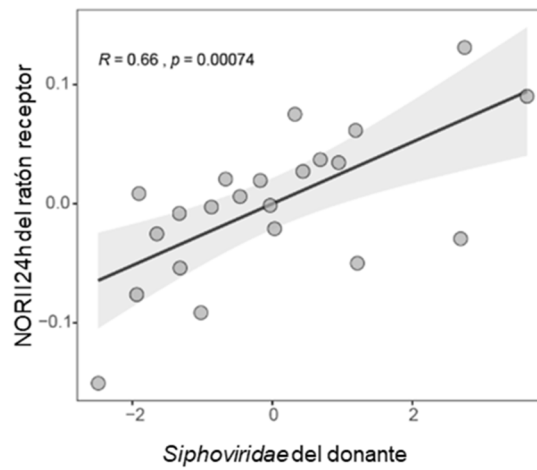


FIG. 2

A)



B)



C)

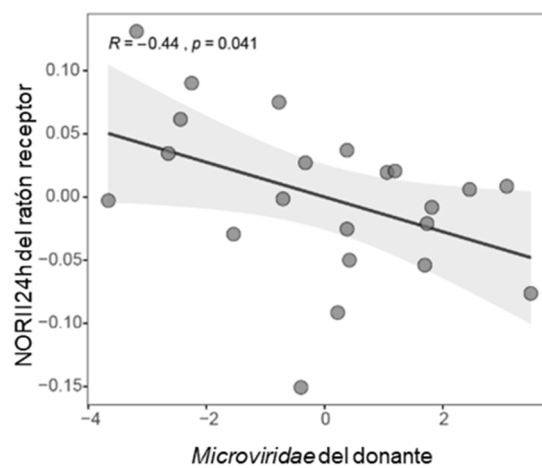


FIG. 3



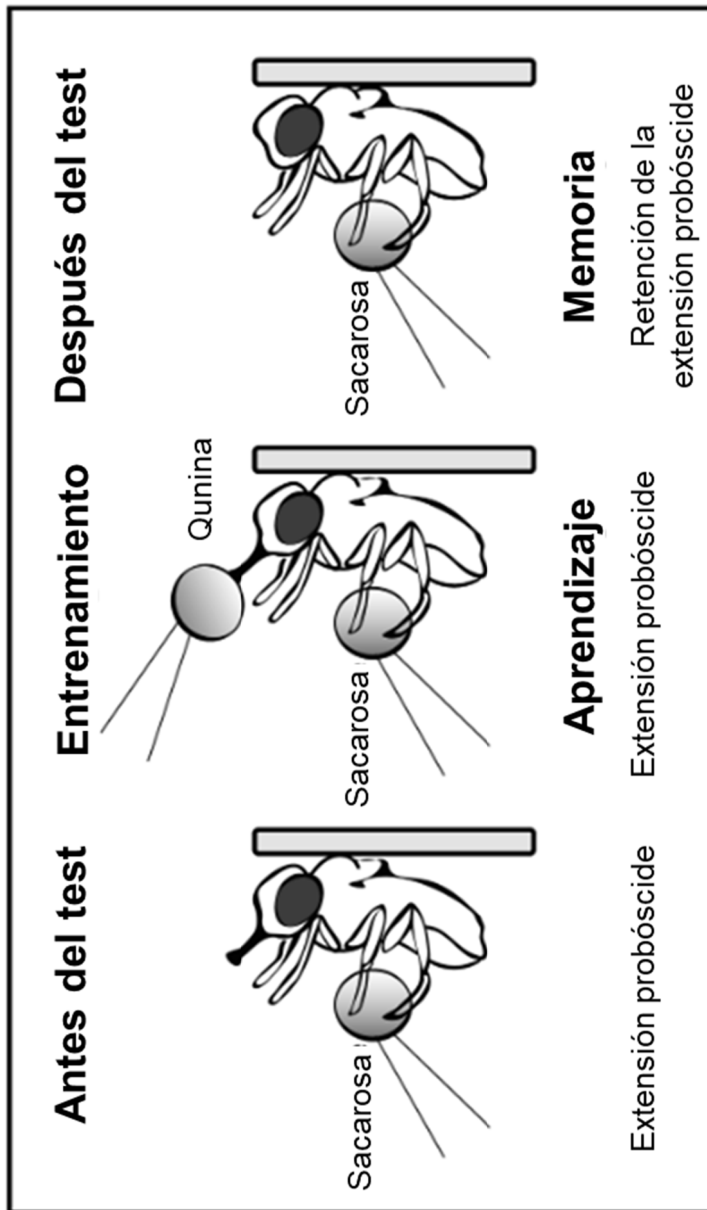


FIG. 5

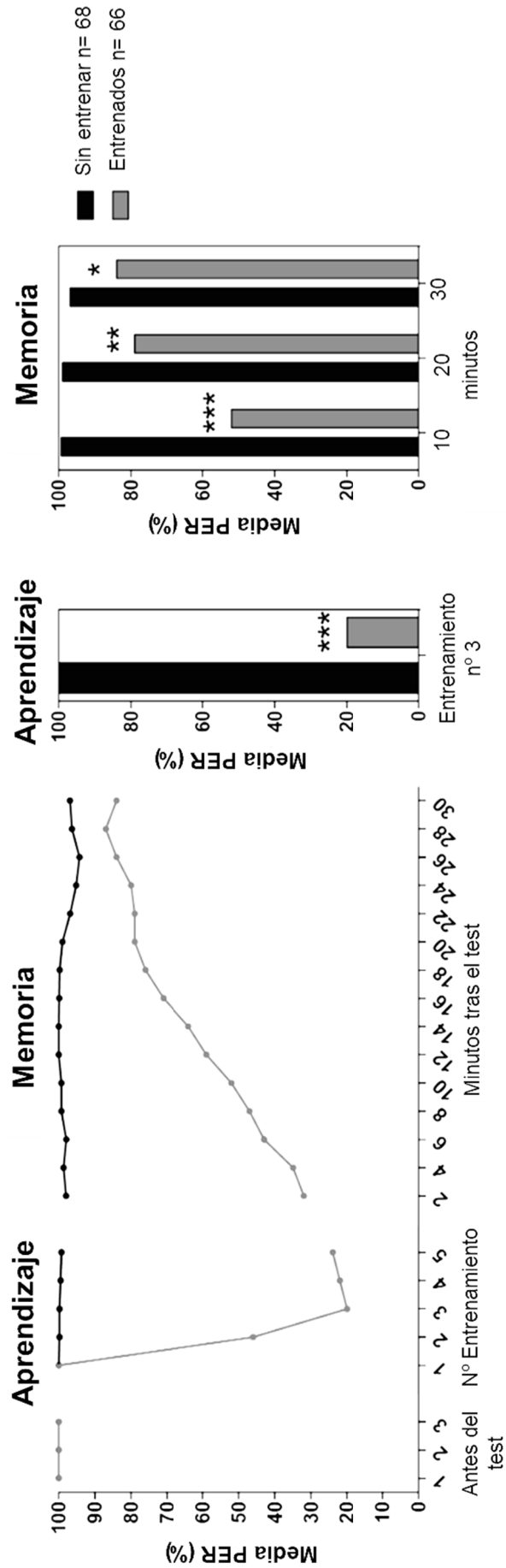


FIG. 6

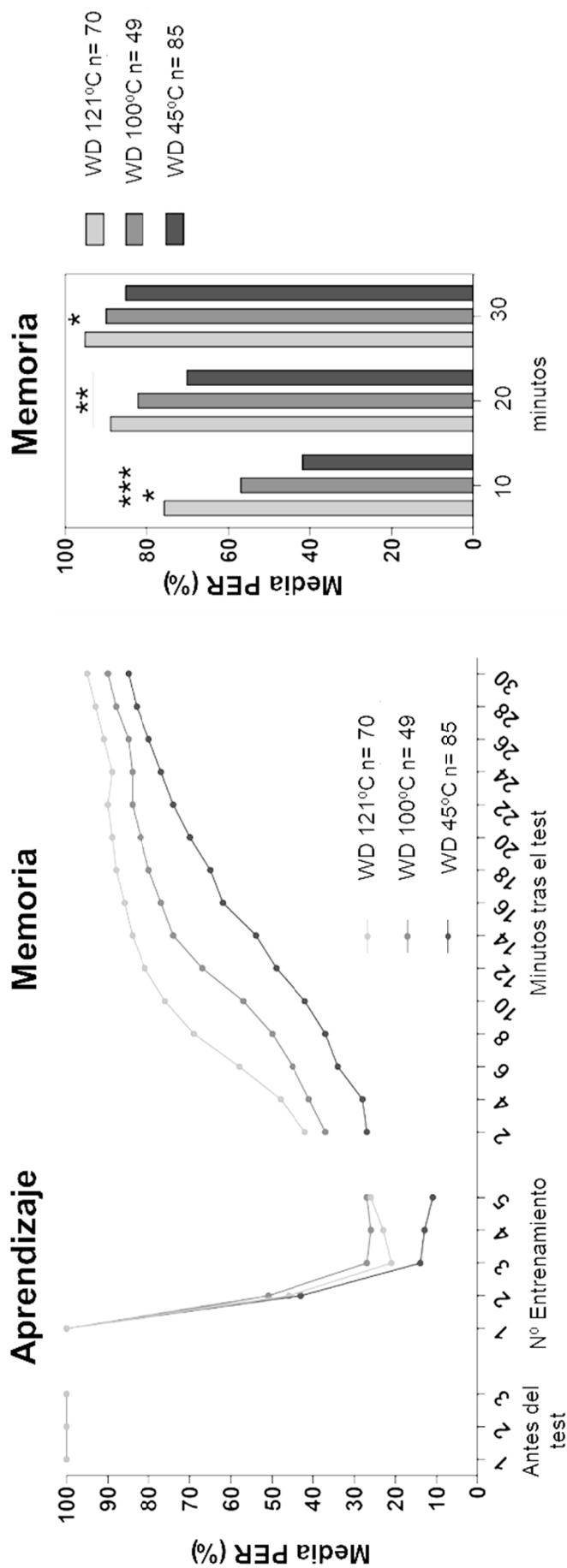


FIG 7

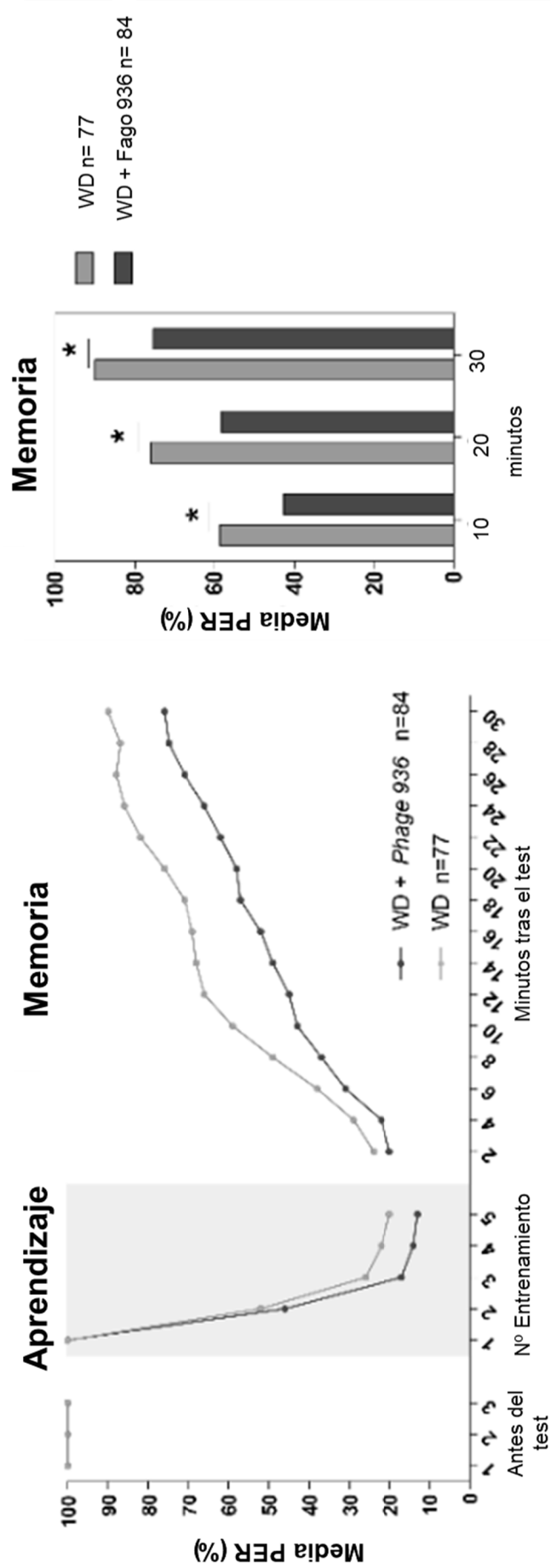


FIG. 8

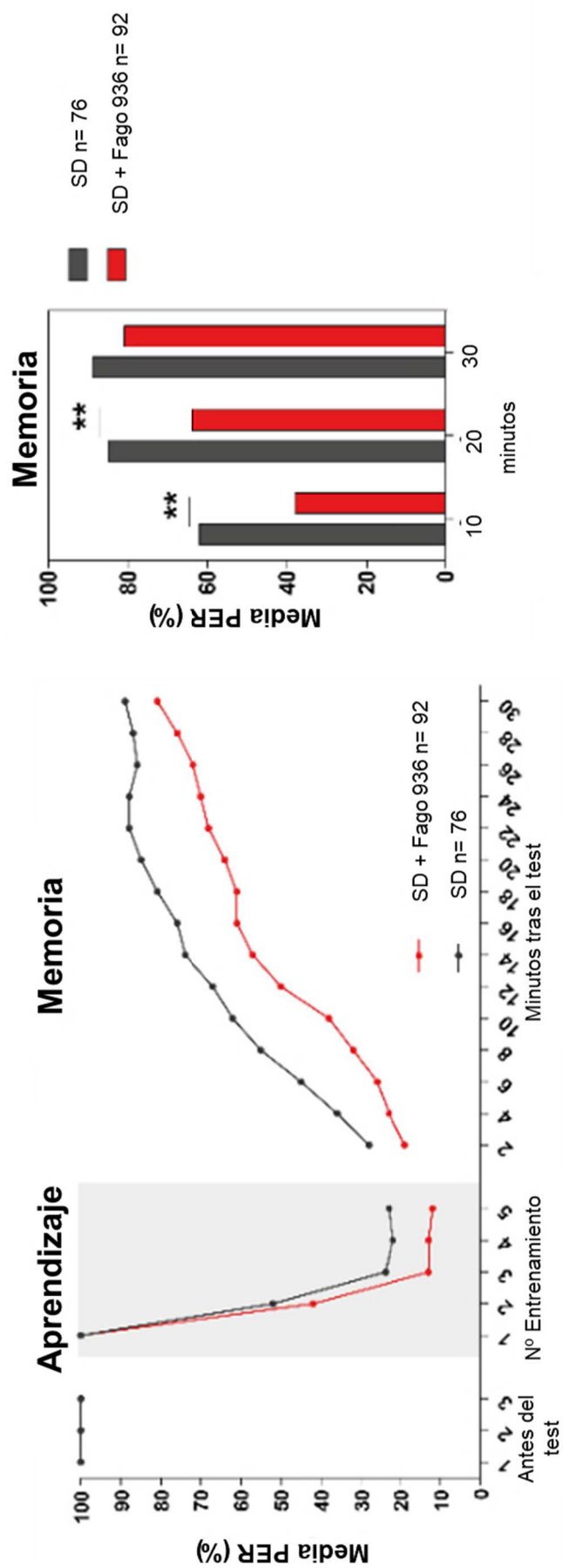


FIG. 9

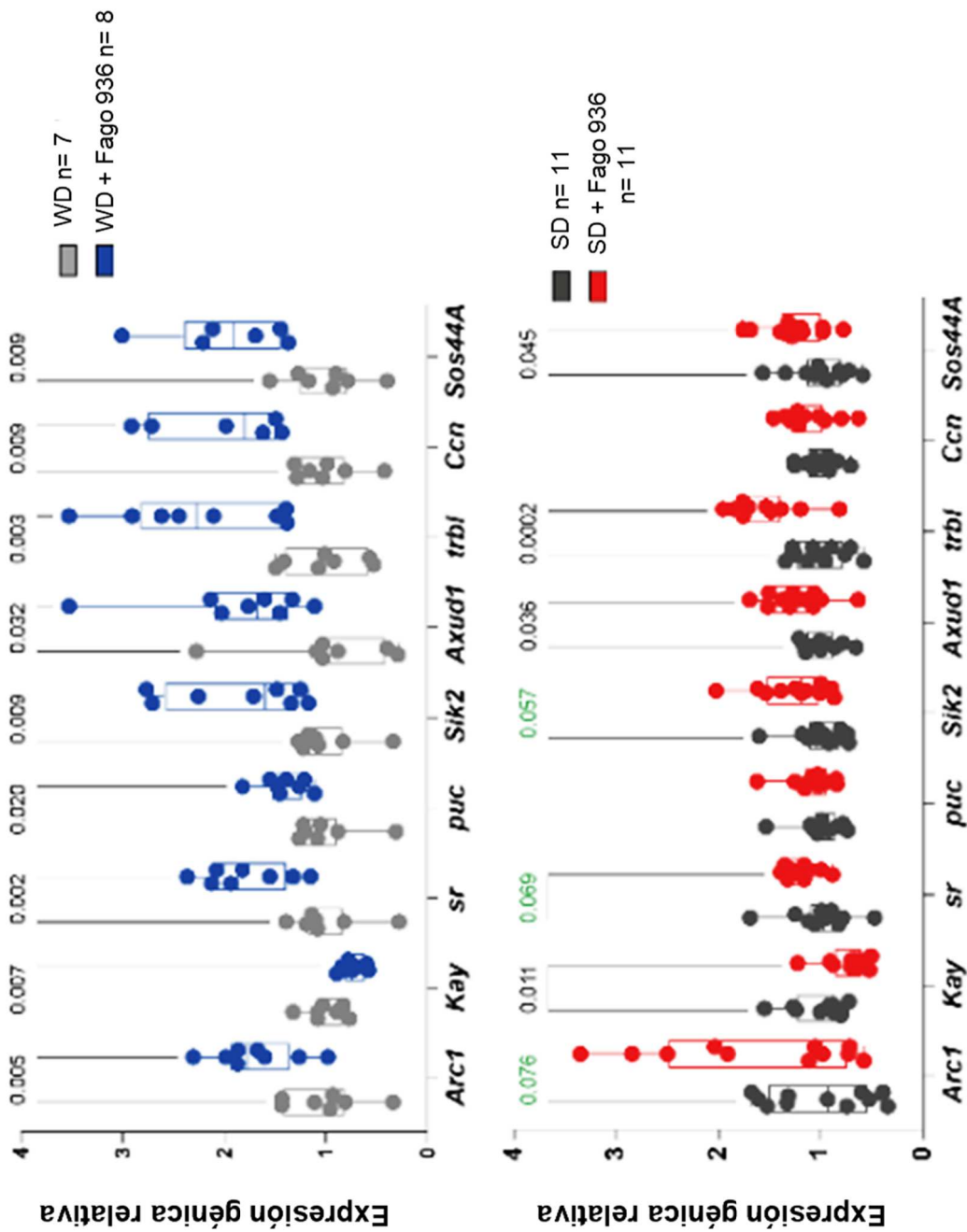


FIG. 10



- ②① N.º solicitud: 202130786
②② Fecha de presentación de la solicitud: 11.08.2021
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. cl.: **A61K35/76** (2015.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	MAHONY, J. et al., "Investigation of the Relationship between Lactococcal Host Cell Wall Polysaccharide Genotype and 936 Phage Receptor Binding Protein Phylogeny", Applied and Environmental Microbiology, JUL 2013, Vol. 79, Páginas 4385-4392, ISSN 0099-2240(print) ISSN 1098-5336(electronic), <DOI: doi:10.1128/AEM.00653-13>. Materiales y métodos.	1-17
A	WO 2014078911 A1 (BORODY THOMAS J) 30/05/2014, todo el documento.	1-17
A	WO 2019231712 A1 (STC UNM et al.) 05/12/2019, todo el documento.	1-17
A	SHKOPOROV, A. N. et al., "The Human Gut Virome Is Highly Diverse, Stable, and Individual Specific", Cell Host and Microbe, Cell Press USA, 09/10/2019, Vol. 26, Páginas 527-541.e5, ISSN 1931-3128 (print) ISSN 1934-6069 (electronic), <DOI: doi: 10.1016/j.chom.2019.09.009 pubmed:31600503>. todo el documento.	1-17
A	LIANG GUANXIANG et al., "The human virome: assembly, composition and host interactions", Nature reviews. Microbiology England, AUG 2021, Vol. 19, Páginas 514-527, ISSN 1740-1534 (Electronic), <DOI: doi:10.1038/s41579-021-00536-5 pubmed:33785903>. todo el documento.	1-17
A	AGGARWALA, V. et al., "Viral communities of the human gut: metagenomic analysis of composition and dynamics", Mobile DNA, OCT 2017, Vol. 8, Páginas Article No.: 12, ISSN 1759-8753(print) ISSN 1759-8753(electronic), <DOI: doi:10.1186/s13100-017-0095-y>. todo el documento.	1-17

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
07.04.2022

Examinador
J. L. Vizán Arroyo

Página
1/2

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, INSPEC, NPL, EMBL-EBI, INTERNET