



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

Universitat Politècnica de València (UPV)

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural (ETSIAMN)

Entidad Colaboradora: Instituto de Investigación Sanitaria La Fe

Grado en Biotecnología

ESTUDIO DEL EFECTO DE LA DIETA SOBRE EL PERFIL METABOLÓMICO DE LA MICROBIOTA INTESTINAL

Trabajo de Fin de Grado

Curso académico 2019/2020

Autora: Ángela Motilla Peñarrubia

Tutora Académica: María José Bañuls Polo

Tutora entidad colaboradora: Leonor Puchades Carrasco

Valencia, julio 2020

Reserva de todos los derechos

Título: Estudio del efecto de la dieta sobre el perfil metabólico de la microbiota intestinal.

Resumen: Con este proyecto se pretende estudiar cuál es el efecto de la dieta occidental (WD) en el perfil metabólico de muestras del contenido fecal de colon y ciego en ratones. En concreto, se pretende determinar el efecto sobre los niveles de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) y ácido láctico en este tipo de muestras. La WD consiste en una dieta con alto contenido en grasas y baja en fibra. Numerosos estudios indican que la microbiota se ve afectada cuando se sigue una dieta de este tipo, por lo que conocer el metabolismo de los alimentos a través del intestino y la microbiota es clave para la identificación de los vínculos entre dieta y salud. Así pues, el objetivo de este estudio es la caracterización del perfil metabólico de este tipo de muestras por resonancia magnética nuclear (RMN) de muestras biológicas, particularmente enfocado al estudio de las diferencias en niveles de ácidos grasos de cadena corta en muestras obtenidas de ratones alimentados con WD y dieta control.

Palabras clave: dieta occidental, microbiota intestinal, metabólica, RMN, metabolitos.

Title: Study of the effect of diet on the metabolomic profile of the intestinal microbiota.

Abstract: In this project we pretend to study what is the effect of the western diet (WD) on the metabolomic profile in samples of the fecal content of colon and cecum in mice. More specifically, the purpose is to determine the effect on the levels of short-chain fatty acids (SCFA) and lactic acid in this type of samples. The WD consists of a high-fat, low-fibre diet. Numerous studies indicate that the microbiota is affected when a diet of this type is followed, so knowing the metabolism of food through the intestine and the microbiota is crucial for identifying the connection between diet and health. Therefore, the aim of this study is the characterization of the metabolomic profile of this type of samples by nuclear magnetic resonance (NMR) of biological samples, particularly focused on the study of the differences in levels of short chain fatty acids in samples obtained from mice fed with WD and control diet.

Key words: Western Diet, intestinal microbiota, metabolomic, NMR, metabolites.

Alumna: Dña. Ángela Motilla Peñarrubia

Localidad y fecha: Valencia, julio 2020

Tutora Académica: Prof. Dña. María José Bañuls Polo

Tutora entidad colaboradora: Dña. Leonor Puchades Carrasco

AGRADECIMIENTOS

A todas las personas que me han acompañado a lo largo de esta etapa.

A mi tutora externa Leonor por haberme brindado la oportunidad de realizar mi Trabajo de Fin de Grado en su laboratorio y formar parte de su equipo. Gracias especialmente a Ayelén por haberme guiado a lo largo de todo el proyecto, por enseñarme, aconsejarme y ayudarme a crecer profesionalmente, y sobre todo por su paciencia conmigo. Gracias también a todas las compañeras del laboratorio por su ayuda desinteresada.

A María José por acceder a ser mi tutora UPV, por el interés mostrado con mi trabajo y por ser tan comprensiva en todo momento.

A María, Belén, Violeta, Laura y Alba por hacer mi día a día en la universidad mucho más fácil. Gracias por la infinidad de momentos que hemos compartido juntas y por convertirnos en más que compañeras de carrera.

Por último, a mi familia y amigos, que han confiado en mí, me han animado a lo largo de esta etapa y me han apoyado en todas mis decisiones, gracias. Sin vosotros no habría sido lo mismo.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. METABOLÓMICA	1
1.1.1. Plataformas tecnológicas en metabolómica	1
1.1.2. Aplicaciones de la metabolómica en biomedicina	4
1.2. MICROBIOTA HUMANA	5
1.2.1. Relación microbiota-enfermedad	6
1.2.2. Relación microbiota-metabolismo	7
1.3. OBJETIVOS	11
2. MATERIAL Y MÉTODOS	12
2.1. Diseño del estudio	12
2.2. Preparación de muestras	12
2.2.1. Muestras de medio condicionado	12
2.2.2. Muestras de contenido fecal	13
2.2.3. Compuestos patrón AGCC y Ácido láctico	13
2.3. Adquisición de los espectros	13
2.4. Procesado	14
2.5. Identificación de metabolitos	14
2.6. Integración	14
2.7. Cálculo de las concentraciones de los metabolitos de interés	15
2.8. Análisis estadístico	15
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	16
3.1. Análisis por RMN	16
3.2. Selección de las señales de interés	17
3.3. Procesado datos RMN	19
3.4. Evaluación del efecto de la WD	21
3.4.1. Medio condicionado	21
3.4.2. Muestras de contenido fecal	22
3.4.3. Cálculo de las concentraciones absolutas	26
4. CONCLUSIONES	29
5. BIBLIOGRAFÍA	30

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de un espectrómetro de masas clásico.....	2
Figura 2. Diferencia de energía entre los dos estados de espín	3
Figura 3. Figura resumen de las aplicaciones de la metabolómica en biomedicina	4
Figura 4. Esquema general del tratamiento de muestras en este estudio.....	12
Figura 5. Espectros obtenidos por ¹ H-RMN de tipo NOESY	16
Figura 6. Espectros de las muestras de contenido fecal superpuestos con espectros de tres de los cuatro metabolitos de interés.....	17
Figura 7. Señal seleccionada para la cuantificación del ácido acético	18
Figura 8. Señal seleccionada para la cuantificación del ácido butírico	18
Figura 9. Señal seleccionada para la cuantificación del ácido propiónico.....	19
Figura 10. Señal seleccionada para la cuantificación del ácido láctico	19
Figura 11. Espectros muestras sin corrección de línea base (A) y con corrección de línea base mediante Whittaker smoother (B).	20
Figura 12. Espectros muestras datos crudos (A) y normalizados respecto a la señal del TSP (B).....	20
Figura 13 Señal deconvolucionada.	21
Figura 14. Superposición de espectros de las muestras de medio condicionado.	21
Figura 15. Diagramas de cajas o boxplots de los niveles de ácido acético, butírico y propiónico del grupo de muestras de medio condicionado.....	22
Figura 16. Diagramas de cajas o boxplots de los niveles de ácido acético de los distintos grupos de muestras de contenido fecal incluidas en el estudio	23
Figura 17. Diagramas de cajas o boxplots de los niveles de ácido butírico de los distintos grupos de muestras de contenido fecal incluidas en el estudio	24
Figura 18. Diagramas de cajas o boxplots de los niveles de ácido propiónico de los distintos grupos de muestras de contenido fecal incluidas en el estudio	24
Figura 19. Diagramas de cajas o boxplots de los niveles de ácido láctico de los distintos grupos de muestras de contenido fecal incluidas en el estudio	25
Figura 20. Gráficas que muestran la cuantificación absoluta de los metabolitos del grupo de contenido fecal de colon alimentados con WD y CD durante una semana.....	26

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Rango de concentraciones para el cálculo de las rectas patrón.....	13
Tabla 2. Parámetros específicos para la adquisición de los espectros.	14
Tabla 3. Multiplicidad y desplazamiento químico de las señales de los metabolitos	17
Tabla 4. Regiones integradas en las muestras de medio condicionado y contenido fecal ..	18
Tabla 5. Resumen de la cuantificación relativa.....	25
Tabla 6. Valores de la cuantificación absoluta	26

ABREVIATURAS

1D: monodimensional

1D-NOESY: *Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy*

¹H-RMN: resonancia magnética nuclear de protón

2D: bidimensionales

AGCC: ácidos grasos de cadena corta

CCR: carcinoma colorrectal

CD: *Control Diet*, dieta control

CPMG: *Carr Purcell Meiboom Gill*

cTreg: células T colónicas reguladoras

DS: N° de *Dummy Scans*

EII: enfermedades inflamatorias intestinales

EM: espectrometría de masas

FIAF: factor adiposo inducido por el ayuno

FID: *Free Induction Decay*

GC: cromatografía de gases

GSD: *Global Spectral Deconvolution*

HMDB1: *Human Metabolome Database*

LC: cromatografía de líquidos

LPS: lipopolisacárido bacteriano

NS: N° de *Scans*

RG: ganancia del receptor

RMN: resonancia magnética nuclear

SW: anchura espectral

TD: *Time Domain*

TSP: 3-trimetilsilil propionato

WD: *Western Diet*, dieta occidental

1. INTRODUCCIÓN

1.1. METABOLÓMICA

La metabolómica es la disciplina enfocada al estudio global de los metabolitos presentes en las células, tejidos y fluidos biológicos bajo unas condiciones específicas. Permite obtener perfiles correspondientes a numerosas concentraciones de metabolitos y sus cambios en respuesta a factores como la dieta, el estilo de vida, el ambiente y los fármacos, entre otros, permitiendo caracterizar los efectos favorables y desfavorables de esas interacciones (Puchades-Carrasco, 2013). Los metabolitos son los productos de múltiples reacciones enzimáticas, por lo que se consideran los indicadores más informativos de la actividad bioquímica de un organismo (Alonso *et.al.*, 2015). De este modo, a través del análisis metabolómico podemos obtener una descripción minuciosa del fenotipo bioquímico de un sistema biológico, que proporcionará información sobre su estado patológico (Beger *et.al.*, 2016).

La metabolómica es un campo de investigación que evoluciona rápidamente, y está en constante expansión ya que presenta múltiples aplicaciones biológicas. Entre estas, la caracterización de las interacciones entre intestino y microbiota es una de las aplicaciones en las que esta aproximación experimental ha demostrado tener un gran potencial (Alonso *et.al.*, 2015). Estos estudios se basan en la caracterización de perfiles metabolómicos, y su relación con determinados estados patológicos, con el fin de obtener información sobre las vías metabólicas alteradas. En este sentido, en base a la interacción existente entre el metabolismo de la microbiota intestinal y distintas condiciones fisiológicas o patológicas, el estudio de su composición permite profundizar en el conocimiento de los mecanismos biológicos implicados en esta interacción. Al mismo tiempo, estos estudios pueden aportar información sobre los vínculos existentes entre la dieta y el desarrollo de enfermedades.

1.1.1. Plataformas tecnológicas en metabolómica

La elección de la plataforma tecnológica para analizar las muestras es uno de los elementos claves en los estudios de metabolómica. Esta elección dependerá principalmente del tipo de muestra a analizar y de los objetivos del estudio (Puchades-Carrasco, 2013).

Las tecnologías analíticas que se emplean en metabolómica incluyen: la cromatografía líquida y gaseosa, la electroforesis capilar, la espectrometría de masas (EM) y la espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN), siendo estas dos últimas, RMN y EM, las más empleadas para la generación de datos metabólicos, pues proporcionan una información estructural y conformacional amplia sobre numerosas clases químicas en un único procedimiento analítico. Además, los dos métodos proporcionan información sobre un conjunto de metabolitos sin necesidad de preseleccionar qué analitos deben ser detectados y ambos pueden utilizarse para medir las concentraciones relativas y absolutas (Alonso *et.al.*, 2015; Puchades-Carrasco y Pineda-Lucena, 2017).

La RMN es una técnica no destructiva, que no daña los analitos y no modifica el equilibrio biológico, por lo que se puede emplear en el estudio de los niveles de metabolitos en tejidos intactos, como los obtenidos mediante biopsias, sin destruirlos. Sin embargo, la EM sí es destructiva y la muestra requiere un pretratamiento. Aunque destructiva, la EM permite un análisis rápido de los metabolitos y puede proporcionar una cobertura del metaboloma más amplia comparado con la RMN (Clendinen *et.al.*, 2017).

La RMN supera en reproducibilidad a la EM y permite la detección simultánea de un gran número de metabolitos estructuralmente diversos, pero también presenta una serie de desventajas, siendo la EM generalmente más sensible que la RMN y presentando menor resolución en muestras complejas debido a la superposición de las señales.

1.1.1.1. Espectrometría de Masas

La EM es una técnica analítica tanto cualitativa como cuantitativa basada en la obtención de iones a partir de moléculas orgánicas en fase gaseosa. Una vez obtenidos estos iones, se separan en función de la relación masa/carga, y por último se detectan los iones formados mediante un dispositivo adecuado. Por tanto, el primer paso para que el espectrómetro genere las señales de los picos para cada metabolito es ionizar la muestra biológica. Los compuestos ionizados obtenidos de cada molécula originarán diferentes señales, definiendo así la huella digital de la molécula original (Alonso *et.al.*, 2015).

Para que el espectrómetro pueda cumplir dichas funciones deberá constar de cuatro partes más o menos independientes: el sistema de introducción de muestras, la fuente de iones, el analizador para separar los iones, y el sistema detector y registrador. El esquema de un espectrómetro de masas clásico, de separación magnética, se muestra en la Figura 1.

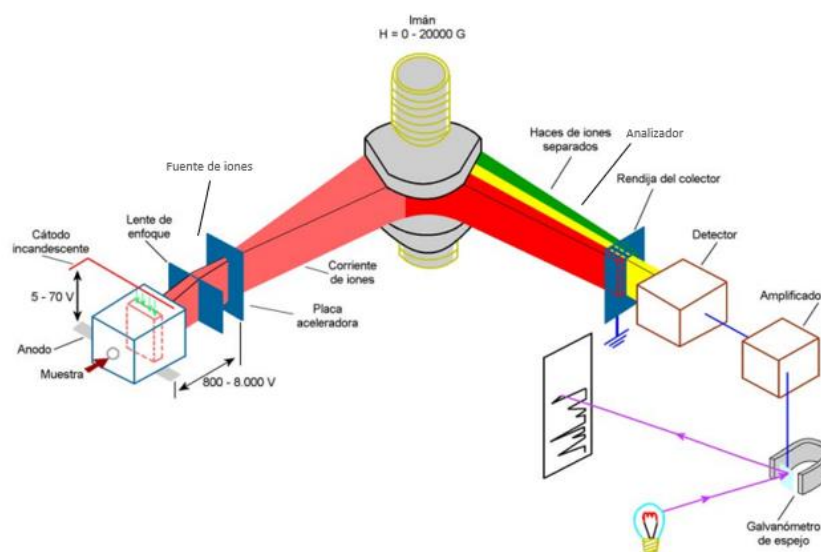


Figura 1. Esquema de un espectrómetro de masas clásico donde se indican las partes que lo componen.

En la EM, durante la adquisición del espectro tienen lugar procesos químicos, de modo que la muestra empleada se destruye y no puede recuperarse. Sin embargo, la cantidad de muestra que se necesita para la obtención de un espectro de masas es del orden de μg .

Hoy en día existe una amplia gama de variantes instrumentales dentro de la EM, las cuales se caracterizan fundamentalmente por diferentes métodos de ionización y selección de masa. En metabolómica, la EM por lo general requiere pasos previos de preparación y separación de la muestra, reduciendo así la alta complejidad de ésta y permitiendo el análisis de EM de diferentes conjuntos de moléculas en diferentes momentos. Las técnicas de separación más utilizadas son las columnas de cromatografía de líquidos (LC) y gases (GC), las cuales se basan en la interacción de los diferentes metabolitos en la muestra con los materiales adsorbentes dentro de la columna cromatográfica. Así, los metabolitos con propiedades químicas diferentes requerirán cantidades de tiempo diferentes para atravesar la columna. El tiempo que cada metabolito necesita se denomina tiempo de retención (Alonso *et.al.*, 2015).

1.1.1.2. Resonancia Magnética Nuclear

Dada la versatilidad de la RMN en el análisis de muestras biológicas es una de las plataformas tecnológicas más empleadas en metabolómica. Se trata de una técnica espectroscópica que puede emplear ciertos números atómicos con un número impar de protones o neutrones, como ocurre con el ^1H , ^{13}C , ^{19}F y ^{31}P . Estos núcleos atómicos presentan un momento magnético, determinado por su número de espín (I), que hace que se comporten como pequeños imanes sensibles a la presencia de campos magnéticos externos.

El modelo mecano-cuántico de la RMN establece que cada núcleo posee $2I+1$ estados de espín (m). En ausencia de campo magnético, los espines nucleares se orientan al azar. En cambio, en presencia de un campo magnético externo, los núcleos activos en resonancia se orientan en la misma dirección del campo en un estado de mínima energía o reposo (Figura 2). La fuerza del campo magnético determina la diferencia de energía entre los dos estados de espín.

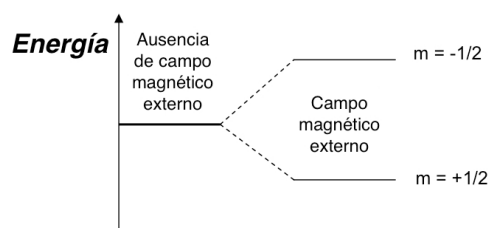


Figura 2. Diferencia de energía entre los dos estados de espín. El estado más estable y de menor energía corresponde al de $+1/2$ y el menos estable y de mayor energía al de $-1/2$. Adaptada de (Edwards y Ph, 1946).

Cuando se irradia con un pulso de radiofrecuencia una muestra que presenta un compuesto orgánico, los núcleos del espín de menor energía se excitan a un estado de espín de mayor energía. Esta frecuencia se conoce como frecuencia de *Larmor* y es característica para cada núcleo. Cuando desaparece el pulso de radiofrecuencia, los núcleos vuelven a su estado de equilibrio o relajación y emiten señales cuya liberación de energía depende de los estados de espín. Los datos que se obtienen se conocen como *Free Induction Decay (FID)*, una señal eléctrica compleja que se representa en función del tiempo. Pero una vez se obtiene la FID, se aplica la *transformada de Fourier* para convertirla en un espectro de RMN, ya que permite transformar las funciones del tiempo en frecuencia. El espectro resultante poseerá picos de distintas formas y tamaños, colocados a lo largo del eje de las frecuencias, en función de su desplazamiento químico (δ). Las unidades del desplazamiento químico son partes por millón (ppm). Además, el área de cada pico es proporcional al número de protones que contribuye a dicha señal, de modo que los valores de la intensidad de las señales se pueden utilizar para fines cuantitativos (Puchades-Carrasco, 2013).

Esta forma de representar la frecuencia de RMN es comúnmente empleada para el estudio de la estructura química y las dinámicas moleculares a través de técnicas unidimensionales (1D) y de otro tipo de técnicas conocidas como bidimensionales (2D), las cuales proporcionan mayor información para el análisis de estructuras moleculares de mayor complejidad (Alonso *et.al.*, 2015).

1.1.2. Aplicaciones de la metabolómica en biomedicina

Hoy en día la metabolómica está aplicándose con éxito en casi todo el proceso de descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos, concretamente en la detección de nuevas sustancias activas, tanto de origen natural como sintetizadas químicamente, en el estudio de cambios metabólicos en modelos animales o en humanos, en la medida de la toxicidad del fármaco y en la comprobación de los efectos del medicamento en poblaciones (Puchades-Carrasco y Pineda-Lucena, 2015).

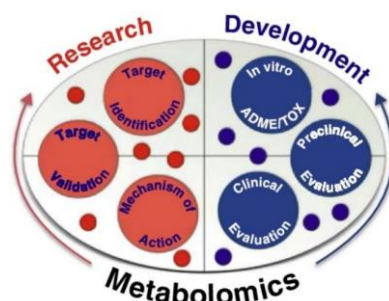


Figura 3. Figura resumen de las aplicaciones de la metabolómica en biomedicina. Adaptada de (Puchades-Carrasco y Pineda-Lucena, 2015).

El diagnóstico de enfermedades es uno de los ámbitos de aplicación emergente, concretamente en cáncer, enfermedades neurológicas y metabólicas. Las enfermedades

causan cambios en el estado fisiopatológico del organismo, de modo que también provocan los cambios correspondientes en los metabolitos. Al realizar el análisis de ciertos metabolitos y compararlos con los normales, se buscan los biomarcadores de la enfermedad. Los biomarcadores tienen un gran número de usos en los procesos de investigación, entre los que destacan su empleo en el diagnóstico de enfermedades, para evaluar la progresión de la enfermedad o para la evaluación de nuevos fármacos.

Cabe destacar que la oncología es un área terapéutica donde la metabolómica desempeña un papel muy importante (Yang *et.al.*, 2019). Los enfoques de la metabolómica podrían aportar una mejor comprensión de la enfermedad, caracterizada por alteraciones significativas en el metabolismo. Estos enfoques permiten identificar nuevos biomarcadores de diagnóstico temprano, así como biomarcadores asociados al pronóstico, a la monitorización de la respuesta a un tratamiento, o a reacciones adversas en distintos procesos patológicos (Puchades-Carrasco y Pineda-Lucena, 2017; Puchades-Carrasco, 2013).

La metabolómica también juega un papel importante en el campo de la nutrición. Es lo que se conoce como metabolómica nutricional, y se refiere al estudio de la interacción entre la dieta y el metabolismo del organismo. Se trata de monitorizar intervenciones nutricionales a partir de la medida del cambio producido por un alimento sobre determinados grupos de metabolitos. Enfermedades metabólicas nutricionales como la obesidad, la diabetes y la presión arterial alta son graves amenazas para la salud. Numerosos estudios han comprobado que las dietas personalizadas pueden cambiar el metabolismo de los organismos vivos, lo que afecta a su vez la salud de éstos (Yang *et.al.*, 2019).

Por otro lado, la metabolómica ha demostrado tener un gran potencial en el campo de la medicina personalizada, cuya idea principal es adaptar la terapia farmacológica a las características individuales de cada paciente. En la actualidad, cuando seleccionamos un tratamiento para un paciente, el conocimiento sobre su fenotipo y sobre las posibles reacciones frente al tratamiento es escaso. Conocer las variables metabolómicas podría ayudar a predecir la reacción del paciente a la administración del fármaco, de modo que el tratamiento podría particularizarse para cada individuo, eligiendo el principio activo más adecuado y la dosis más efectiva.

Finalmente, la metabolómica desempeña un papel importante es en la detección de factores de riesgo en poblaciones. Mediante un análisis de orina somos capaces de conocer, para un determinado individuo, los factores de riesgo que presenta, el tipo de enfermedades a las que está predispuesto, y la probabilidad que tiene de desarrollarlas.

1.2. MICROBIOTA HUMANA

La microbiota intestinal está formada por miles de especies bacterianas presentes en el tracto intestinal. Su composición se puede ver alterada debido a una serie de factores externos, tales como las condiciones de nacimiento, la dieta, el entorno, las alergias, el lugar geográfico o el empleo de antibióticos. Entre las diversas funciones de la microbiota

intestinal cabe destacar que es fundamental para el desarrollo del tracto intestinal. Además, interactúa con el sistema inmune, promoviendo la maduración de las células inmunes y el desarrollo normal de las funciones inmunes. Al mismo tiempo, está involucrada en la recolección y almacenamiento de energía permitiendo, a través de la descomposición de los alimentos, la absorción de sustancias simples (Clemente *et.al.*, 2012).

A las alteraciones de la microbiota intestinal que producen un desequilibrio de la flora intestinal se le denomina *disbiosis*. Las principales causas de la *disbiosis* son: el uso de antibióticos, una alimentación alta en proteína de origen animal, una baja ingesta de frutas, verduras y fibra, la quimioterapia y radioterapia, el estrés e incluso factores ambientales. Este desequilibrio supone una reducción de la diversidad microbiana, desencadenando un incremento incontrolado de otras cepas patógenas, lo que puede promover trastornos graves tales como diabetes, obesidad, enfermedades inflamatorias del intestino, enfermedades reumáticas, enfermedades hepáticas, y cáncer, entre otras, que son peligrosas para la salud (Weiss y Hennet, 2017; Icaza, 2013).

Se ha demostrado que los cambios en la dieta producen efectos significativos sobre la microbiota, correlacionándose con distintos subgrupos, denominados enterotipos. Se conoce como enterotipos a los tres grandes grupos en los que se pueden dividir las bacterias del intestino humano. Cada persona tiene, de forma predominante, un determinado tipo de bacterias en su microbiota, que es lo que determina su enterotipo. Numerosos estudios muestran que curiosamente la dieta también está correlacionada con el enterotipo, puesto que aquellas personas con una dieta rica en grasas animales poseen el enterotipo Bacteroides, mientras que aquellas con una dieta rica en carbohidratos se asocia con el enterotipo Prevotella. Por otra parte, aquellas poblaciones que siguen una dieta occidental, alta en grasas y azúcares y baja en fibras, la obesidad se ha convertido en un importante problema de salud y está estrechamente relacionado con la microbiota. En modelos animales de obesidad se observan cambios en su composición microbiana, donde la interacción entre los filos intestinales dominantes, Bacteroidetes y Firmicutes, se modifica con una reducción significativa de los primeros y un aumento de los segundos (Clemente *et.al.*, 2012).

1.2.1. Relación microbiota-enfermedad

Caracterizar los cambios que llevan a la disbiosis intestinal e identificar los taxones microbianos que contribuyen al desarrollo de distintas patologías son requisitos previos necesarios para una mejor comprensión del impacto de la microbiota en la salud y la enfermedad en humanos, ya que desempeña un papel muy importante (Weiss y Hennet, 2017). Conocemos que los humanos están colonizados por un gran número de virus, eucariotas y bacterias. En los últimos años, estamos comenzando a apreciar el hecho de que algunas enfermedades podrían ser resultado de los desequilibrios presentes en la composición de la microbiota en lugar de por la presencia de un único microbio (Clemente *et.al.*, 2012).

Son numerosas las enfermedades cuya disbiosis intestinal influye en el desarrollo y la gravedad de la enfermedad. Entre la lista de enfermedades no infecciosas se encuentran las enfermedades inflamatorias intestinales (EII) como la enfermedad de Crohn y la colitis

ulcerosa. Se trata de enfermedades multifactoriales donde cabe destacar el importante papel para las bacterias. Numerosos estudios han mostrado en ambas enfermedades la presencia de *disbiosis*, la cual es más pronunciada cuando la inflamación está activa (Icaza, 2013; Biedermann y Rogler, 2015).

También encontramos enfermedades metabólicas como la diabetes, el síndrome metabólico, la esteatohepatitis no alcohólica y la obesidad, y otras como el síndrome del intestino irritable y el carcinoma colorrectal (CCR). De este último se cree que los componentes de la microbiota generan estrés genotóxico para promover la acumulación gradual de alteraciones genéticas y epigenéticas en las células epiteliales intestinales que conducen al cáncer (Irrazábal *et.al.*, 2014). Curiosamente también se ha visto que los factores de estilo de vida y ambientales tienen un impacto en la composición microbiana.

Cada vez hay más evidencias de que la flora bacteriana puede contribuir a la aparición de enfermedades reumáticas, donde además, una interacción entre factores de riesgo genéticos y ambientales parece ser fisiopatológicamente relevante (Biedermann y Rogler, 2015).

También, enfermedades autoinmunes, alergias y enfermedades atópicas e incluso enfermedades psiquiátricas se han asociado con una *disbiosis* de la composición microbiana. En este sentido, cabe destacar que la depresión está asociada a una serie de cambios en el comportamiento, como la dieta y la actividad física, que pueden influir en la composición de la microbiota intestinal.

Por tanto, para finalmente obtener nuevas terapias para tratar estas enfermedades crónicas será necesaria una comprensión más profunda de su relación con los cambios en la microbiota (Biedermann y Rogler, 2015).

1.2.2. Relación microbiota-metabolismo

La obesidad se asocia con un conjunto de trastornos metabólicos y sistémicos, tales como diabetes tipo 2, resistencia a la insulina, hígado graso no alcohólico, aterosclerosis e hipertensión. En la actualidad, son los principales problemas de salud pública (Devaraj *et.al.*, 2013). La principal causa de la obesidad es un aumento en la ingesta de alimentos ricos en azúcares, grasas saturadas y energía, pero parece que el simple aumento en el consumo de calorías no explica esta epidemia (Icaza, 2013). El interés relacionado con el papel de la microbiota intestinal como contribuyente al incremento de la prevalencia de estos trastornos ha aumentado notablemente.

La microbiota humana de “tipo obeso”, ligada a un exceso de peso y al síndrome metabólico, presenta un aumento de la razón Firmicutes/Bacteroidetes. Estudios apuntan que la microbiota intestinal de individuos obesos puede ser más eficiente en la degradación de hidratos de carbono no digeribles de la dieta y por tanto, en la extracción de energía, que la de individuos delgados. Demostraron que los ratones genéticamente obesos presentan una reducción significativa de Bacteroidetes y un aumento de Firmicutes, que la microbiota

de los obesos liberaba durante la digestión más calorías y que este rasgo puede transmitirse (Turnbaugh *et.al.*, 2006).

Por tanto, todas estas evidencias sugieren que la microbiota intestinal afecta a la toma de nutrientes, al almacenamiento de energía y a un gran número de vías metabólicas del huésped (Devaraj *et.al.*,2013).

Son muchos los mecanismos metabólicos que asocian la microbiota con la obesidad y sus trastornos, entre los que podemos destacar:

- La fermentación por parte de las bacterias de los polisacáridos que no pueden ser digeridos de la dieta, con el resultado de la producción de monosacáridos y ácidos grasos de cadena corta (AGCC).
- Los AGCC estimulan la secreción del péptido YY (Devara *et.al.*, 2013), encargado de retrasar el tránsito intestinal al incrementar la absorción de nutrientes (Delzenne y Cani, 2011), al mismo tiempo que aumenta los niveles de leptina (Xiong *et.al.*, 2004).
- El almacenamiento de lípidos en los adipocitos es promovido por la regulación microbiana de algunos genes del huésped (Bäckhed *et.al.*, 2004).
- La supresión del factor adiposo inducido por el ayuno (FIAF) por parte de las bacterias intestinales, el cual es un inhibidor de la lipasa lipoproteica y por tanto ayuda a la captura de los ácidos grasos. FIAF podría ser un intermediario de la regulación microbiana del depósito de grasa periférico (Machado y Cortez, 2012).
- El aumento de la absorción de monosacáridos desde el intestino activa factores transcripcionales que regulan la lipogénesis hepática (Devaraj *et.al.*, 2013).
- La microbiota aumenta la vascularización estimulada por el flujo sanguíneo de la mucosa y por la inflamación, incrementando así la absorción de nutrientes (Ding *et.al.*, 2010).
- Las alteraciones en la microbiota intestinal, el incremento en la permeabilidad intestinal y la endotoxemia metabólica, caracterizado por un estado de inflamación sistémica de bajo grado, resistencia a la insulina y riesgo cardiovascular debido a la exposición del lipopolisacárido bacteriano (LPS), contribuyen al desarrollo de la obesidad y de enfermedades metabólicas crónicas (Creely *et.al.*, 2007).
- La grasa visceral produce alrededor de 250 proteínas, todas ellas implicadas en el proceso de inflamación, de modo que se plantea que la obesidad y sus enfermedades metabólicas relacionadas podrían tener un componente microbiano considerable (Ruiz *et.al.*, 2010).

Es por eso que una posible estrategia terapéutica para la regulación del equilibrio energético en personas con obesidad, diabetes o síndrome metabólico podría ser la manipulación de la microbiota intestinal.

1.2.2.1. Ácidos Grasos de Cadena Corta y ácido láctico

Los nutrientes no digeridos en el intestino delgado, en su mayoría carbohidratos, constituyen el sustrato para la proliferación microbiana y su fermentación, dando lugar a la formación de AGCC: ácido acético, propiónico y butírico. Los AGCC son los principales productos metabólicos de la fermentación anaeróbica por parte de las comunidades microbianas presentes en el intestino de los mamíferos, y juegan un importante papel fisiológico. Otra sustancia producida es el ácido láctico, que contribuye a acidificar el colon proximal y el ciego. Estos compuestos producen importantes impactos sobre la fisiología del huésped como fuentes de energía, como reguladores de la expresión genética y como moléculas de señalización que son reconocidas por receptores específicos (Louis y Flint, 2017). En estudios anteriores se ha demostrado que los AGCC y el ácido láctico pueden afectar a los procesos de transporte de las células epiteliales del colon, al metabolismo energético, al crecimiento y a la diferenciación celular (Pan *et.al.*, 2009), y además reducen la inflamación y la carcinogénesis y poseen cierto efecto protector (Watson, 2020).

El acetato, el butirato y el propionato son los tres metabolitos microbianos más importantes y difieren en sus efectos potenciales sobre la fisiología del huésped. El butirato lleva a cabo las principales funciones inmunológicas del intestino, se usa como fuente de energía en la mucosa intestinal y proporciona protección contra el CCR, una de las principales causas de muerte relacionada con el cáncer en todo el mundo (Watson, 2020). El propionato contribuye a la gluconeogénesis en el hígado y reduce el colesterol, mientras que el ácido acético es el único AGCC presente en toda la circulación. Además, el acetato juega un papel muy importante en las células cancerosas, puesto que sirve como fuente de nutrición para la biosíntesis de lípidos y participa en la inhibición de las desacetilasas de histonas dando lugar a la hiperacetilación de las histonas, que conduce a una regulación negativa de las citocinas proinflamatorias. También puede alterar las funciones de las proteínas al dar lugar a una modificación postraduccional (Parida y Sharma, 2020). También se ha demostrado que el butirato y el propionato inducen la diferenciación de las células T colónicas reguladoras (cTreg) y aumentan la expresión del factor de transcripción FOXP3, disminuyendo la inflamación.

Por otro lado, cambios en las concentraciones de estos compuestos, han demostrado tener un impacto sobre la capacidad de colonización de determinadas bacterias patógenas en el intestino (Feng *et.al.*, 2018). Estos AGCC, junto con el ácido láctico, pueden afectar a los procesos de transporte de las células epiteliales del colon, al metabolismo energético, al crecimiento y a la diferenciación celular. Sin embargo, el acetato, el butirato, el propionato y el lactato son producidos por distintos tipos de bacterias intestinales. Los Bacteroides producen acetato y propionato, mientras que los Firmicutes producen butirato y lactato. Los primeros son más eficientes en el metabolismo de los polisacáridos de la dieta. En cambio, los segundos son menos eficientes.

1.2.2.2. Efecto de la dieta occidental

En las últimas décadas ha incrementado el consumo de dietas de tipo occidental (Western Diet, WD) en las sociedades occidentalizadas, incluyendo la comida procesada,

los bocadillos y los refrescos azucarados, y dejando de lado la fibra, las vitaminas y los minerales.

La dieta occidental se caracteriza por ser rica en azúcares refinados, sal, carnes procesadas, grasas saturadas y aditivos alimentarios, y baja en fibras, vitaminas, minerales, frutas y verduras. Se trata de una dieta rica en energía pero pobre en nutrientes. Además, presenta altos índices glucémicos por lo que los niveles de glucosa en sangre aumentan rápidamente. Por tanto, supone una elevada absorción de calorías proveniente de carbohidratos refinados y picos de glucosa e insulina en plasma en cortos períodos de tiempo y termina con una absorción de nutrientes en el tejido adiposo, lo que conlleva un rápido aumento de peso (Christ *et.al.*, 2019).

Seguir una WD no solo supone un aumento de peso, también cambios patológicos en los lípidos, un metabolismo energético y una activación del sistema inmune. Como modifica cualitativa y cuantitativamente el ecosistema microbiano intestinal, y por tanto altera el equilibrio inmuno-metabólico, incrementa la tendencia a desarrollar trastornos metabólicos crónicos como la obesidad, la diabetes de tipo 2, enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas y autoinmunes, los cuales están asociados con inflamación sistémica de bajo grado atribuida a la endotoxemia (Statovci *et.al.*, 2017; Christ *et.al.*, 2019).

Las características de la WD y los factores genéticos son factores que contribuyen en el dominio de unos microorganismos sobre otros. Estudios han demostrado que después del suministro de WD un único día, se observaba en los ratones variaciones en su composición microbiana, así como en sus vías metabólicas, y a lo largo de dos semanas presentan más adiposidad (Clemente *et.al.*, 2012). Además, la relación entre Bacteroidetes y Firmicutes se ve alterada con un descenso de los primeros y un incremento de los segundos (Clemente *et.al.*, 2012). Pero no solo eso, una dieta de este tipo podría derivar en la pérdida permanente de bacterias que desempeñan un papel importante en la función del microbioma y por tanto, podría inducir cambios metabólicos hereditarios mediante el epigenoma (Zinöcker y Lindseth, 2018).

En este contexto, la caracterización de los cambios metabólicos generados por este tipo de dieta en la microbiota, podría ser la vía para el desarrollo de nuevas estrategias de prevención de determinadas enfermedades.

1.3. OBJETIVOS

1. Estudiar, mediante RMN, las diferencias en los niveles de AGCC y lactato en medio condicionado a partir de muestras de contenido fecal de colon de ratones alimentados con WD y dieta control (CD).
2. Estudiar, mediante RMN, las diferencias en los niveles de AGCC y lactato en muestras de colon y ciego de ratones alimentados con WD y CD.
3. Cuantificar magnitud de las variaciones observadas en las concentraciones de los metabolitos de interés entre los grupos de muestras analizados.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Diseño del estudio

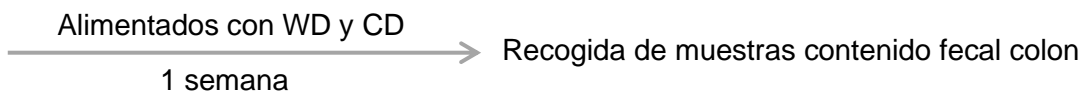
Los experimentos se realizaron a partir del contenido fecal del ciego y del colon de ratones. Los grupos de estudio incluyen (Figura 4):

- Ratones alimentados con WD y CD durante **1 semana**: Se recogieron las muestras de contenido fecal del colon (n=10) y medio condicionado (n=10), respectivamente.
- Ratones alimentados con WD y CD durante **8 semanas**. Se recogieron las muestras de contenido fecal del colon (n=10) y ciego (n=10), respectivamente.

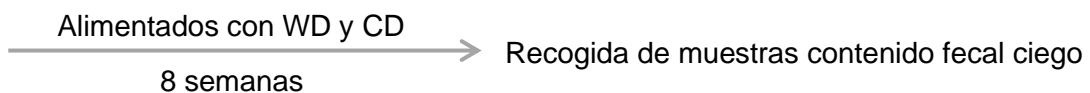
10 ratones:



10 ratones:



10 ratones:



10 ratones:

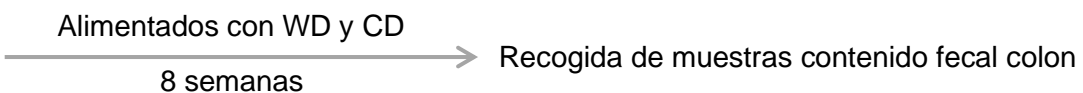


Figura 4. Esquema general del tratamiento de muestras en este estudio.

2.2. Preparación de muestras

2.2.1. Muestras de medio condicionado

Las muestras de medio condicionado a partir de muestras de contenido fecal de colon de ratones alimentados con WD y CD durante una semana se obtuvieron tras la incubación de 250 mg del contenido intestinal en 1 mL de agua. Tras 36h de incubación, a 37 °C, se centrifugaron las muestras (11000 g, 20 min) y se filtró el sobrenadante a través de filtros de tamaño de poro de 0.2 µm. Las muestras se almacenaron a -80 °C hasta su

análisis por RMN. Para su análisis por RMN, se añadió al volumen de las muestras (7-33 μL) el volumen correspondiente de tampón de RMN (100 mM Na_2HPO_4 , pH 7.4, 50 μM TSP, 100% D_2O) hasta completar un volumen de 450 μL . Finalmente, se transfirieron los 450 μL de muestra a un tubo de RMN de 5mm para la adquisición de los espectros.

2.2.2. Muestras de contenido fecal

Las muestras de contenido fecal de colon y ciego se almacenaron a $-80\text{ }^\circ\text{C}$ hasta su análisis por RMN. Para el análisis por RMN de las muestras, se prepararon diluciones 1:50 de cada muestra, en tampón de RMN (100 mM Na_2HPO_4 , pH 7.4, 50 μM TSP, 100% D_2O). Posteriormente, las muestras se homogeneizaron, centrifugaron (11000 g, 4°C , 20 min) y se filtró el sobrenadante a través de filtros de tamaño de poro de 0.2 μm . Finalmente, se transfirieron 450 μL de cada muestra a un tubo de RMN de 5mm para la adquisición de los espectros.

2.2.3. Compuestos patrón AGCC y Ácido láctico

Para la cuantificación absoluta de las concentraciones de AGCC y ácido láctico en las muestras de interés, se prepararon muestras con concentraciones conocidas de los correspondientes compuestos patrón. Para ello, se prepararon distintas diluciones de los patrones en tampón de RMN (100 mM Na_2HPO_4 , pH 7.4, 50 μM TSP, 100% D_2O).

En la Tabla 1 se indica las concentraciones de las muestras utilizadas para cada compuesto.

Tabla 1. Rango de concentraciones utilizado para el cálculo de las rectas patrón de cada compuesto.

[Ácido acético] (mM)	[Ácido butírico] (mM)	[Ácido propiónico] (mM)	[Ácido láctico] (mM)
3.00	1.00	0.50	1.00
2.00	0.75	0.40	0.60
1.00	0.50	0.30	0.40
0.50	0.25	0.20	0.20
0.10	0.05	0.10	0.05
		0.05	0.03

2.3. Adquisición de los espectros

La adquisición de los espectros de RMN se realizó en un espectrómetro Bruker Avance-TM 600 MHz equipado con una sonda BBI de 5 mm. Mediante el software TOPSPIN 3.6.2 (Bruker, Alemania) se llevó a cabo el procesado de los datos de RMN. Los experimentos se obtuvieron a 310 K. Inicialmente, se adquirieron dos tipos de experimentos de RMN: CPMG (*Carr-Purcell-Meiboom-Gill*) y 1D-NOESY (*Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy*). Finalmente, la secuencia de pulsos utilizada para la adquisición de las muestras del estudio fue 1D-NOESY.

Previo a la adquisición de los espectros se calibró la temperatura. Para cada muestra, se llevó a cabo el ajuste y calibrado de elementos del espectrofotómetro como la sintonía de la sonda (*wobb*), la estabilidad del campo magnético (*lock*) y la homogeneidad del campo magnético (*shimming*), y el pulso de radiofrecuencia. Otros parámetros del experimento, como el TD (*Time Domain*), el NS (Nº de *Scans*) y el DS (Nº de *Dummy Scans*) se mantuvieron constantes en todos los experimentos (Vicente-Muñoz; 2017).

Los parámetros específicos para la adquisición de los experimentos 1D-NOESY fueron (Tabla 2):

Tabla 2. Parámetros específicos para la adquisición de los espectros. TD: Dominio tiempo; NS: número de scans; SW: anchura espectral; d1: periodo de relajación del experimento; RG: ganancia del receptor.

Secuencia de pulso: noesygppr1d	AUNM: au_prof1d
AUNMP: proc_prof1d	TD (¹ H): 98304
NS: 512	SW: 30.0184 ppm
d1: 4 s	RG: 90.5

2.4. Procesado

El procesado de los datos de RMN se realizó utilizando el comando “apk0.noe” del software TOPSPIN 3.6.2 (Bruker, Alemania) para la corrección de fase de manera automática. Posteriormente, con el programa MestReNOVA se corrigió la línea base mediante *Whittaker smoother*. La normalización de la intensidad de las señales del espectro se realizó respecto a la señal del TSP (patrón interno de concentración constante en todas las muestras).

En el caso de las muestras del medio condicionado, como presentaban un volumen variable, también fue necesario realizar la normalización de las intensidades del espectro. Para obtener los datos de las áreas normalizadas, el área resultante de cada región de interés se dividió por el volumen de cada muestra.

2.5. Identificación de metabolitos

Para la identificación de los metabolitos de interés se utilizaron varias bases de datos como *Human Metabolome Database* (HMDB) y *Chenomix*. A su vez se emplearon patrones de proyectos anteriores correspondientes a los metabolitos que se querían identificar en las muestras.

2.6. Integración

Una vez se identificaron las señales correspondientes a los metabolitos de interés en los espectros se integraron para obtener las áreas correspondientes, proporcionales a la concentración de ese metabolito en las muestras. Las integrales de las señales se obtuvieron utilizando el programa MestReNOVA. En los grupos de muestras en los que la señal de interés estaba solapada con otras señales presentes en el espectro, se procedió a la deconvolución de las señales para su integración de manera separada. Así pues, en las muestras de contenido fecal de colon y ciego de ratones alimentados con WD y CD durante

una semana y ocho semanas los espectros se deconvolucionaron. Se empleó el *Global Spectral Deconvolution* (GSD) como método de integración. Para ello, se fijaron a 1 el nivel de refinado (*Refinement Level*) y de resolución (*Resolution*). Una vez deconvolucionados todos los espectros, se integraron de forma manual las señales, pudiendo delimitar así únicamente la región de interés.

2.7. Cálculo de las concentraciones de los metabolitos de interés

A partir de los valores de las áreas obtenidas tras la integración de muestras de compuestos patrón descritas anteriormente (Tabla 1), se calcularon las ecuaciones de recta correspondientes: $y=mx+n$, siendo 'y' el valor del área de integración del metabolito en cada muestra, 'm' la pendiente y 'n' la intersección. Así, despejando 'x' de la ecuación es posible calcular la concentración en mM del metabolito correspondiente en las muestras del estudio, de concentración desconocida. Únicamente se calcularon las concentraciones de los AGCC y ácido láctico en las muestras de RMN correspondientes a los ratones alimentados con WD y CD durante una semana. Una vez calculadas las concentraciones de las muestras de RMN, para obtener la concentración en unidades de μmol de compuesto/g de muestra se multiplicó los valores de concentración de las muestras de RMN, en mM, por el volumen en μL en el que se disolvió inicialmente 1 mg de muestra (50 μL para las muestras de contenido fecal del colon).

2.8. Análisis estadístico

Se utilizó la prueba paramétrica de *t* de *Student*, a través del programa RStudio, para evaluar las diferencias entre las medias de las concentraciones de los grupos WD y CD, considerándose un valor de $p < 0.05$ como estadísticamente significativo.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Análisis por RMN

Durante la optimización de los experimentos de RMN, inicialmente se adquirieron dos tipos de experimentos de RMN: CPMG y 1D-NOESY. Estos tipos de experimento son los más utilizados en los estudios de metabolómica, dirigidos al análisis de muestras biológicas (células, tejidos, biofluidos, etc). La secuencia de pulsos CPMG se suelen emplear en muestras biológicas como el plasma sanguíneo o el suero, con un alto contenido en proteínas. En esta secuencia, se aplica un filtro de relajación que permite observar selectivamente las señales correspondientes a moléculas de pequeño tamaño, entre las que se encuentran los metabolitos. Por otro lado, la técnica de “noesy-presat” presenta ventajas en relación a la supresión de agua, convirtiéndose así en un método simple, reproducible y robusto para la adquisición de espectros de RMN de alta calidad en soluciones acuosas. Tras evaluar los resultados obtenidos con ambas secuencias, se decidió utilizar la secuencia de pulsos 1D-NOESY para la adquisición de los espectros correspondientes a las muestras incluidas en el estudio (Figura 5).

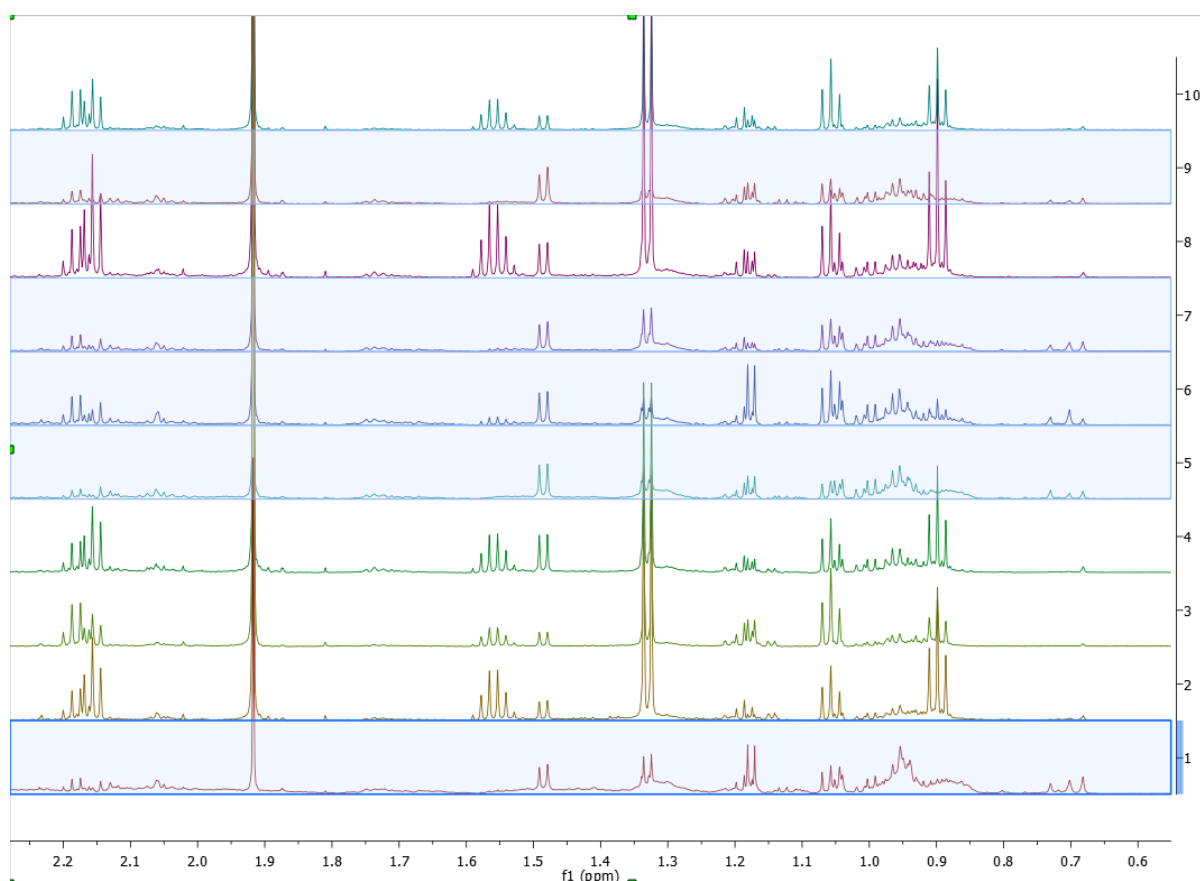


Figura 5. Espectros obtenidos por ^1H -RMN de tipo NOESY. En concreto, se trata de las muestras de contenido fecal de colon de ratones alimentados con WD y CD durante una semana.

3.2. Selección de las señales de interés

Con el fin de identificar las señales correspondientes a los compuestos de interés, se compararon los espectros de las muestras incluidas en el estudio con espectros de los compuestos patrón (Figura 6).

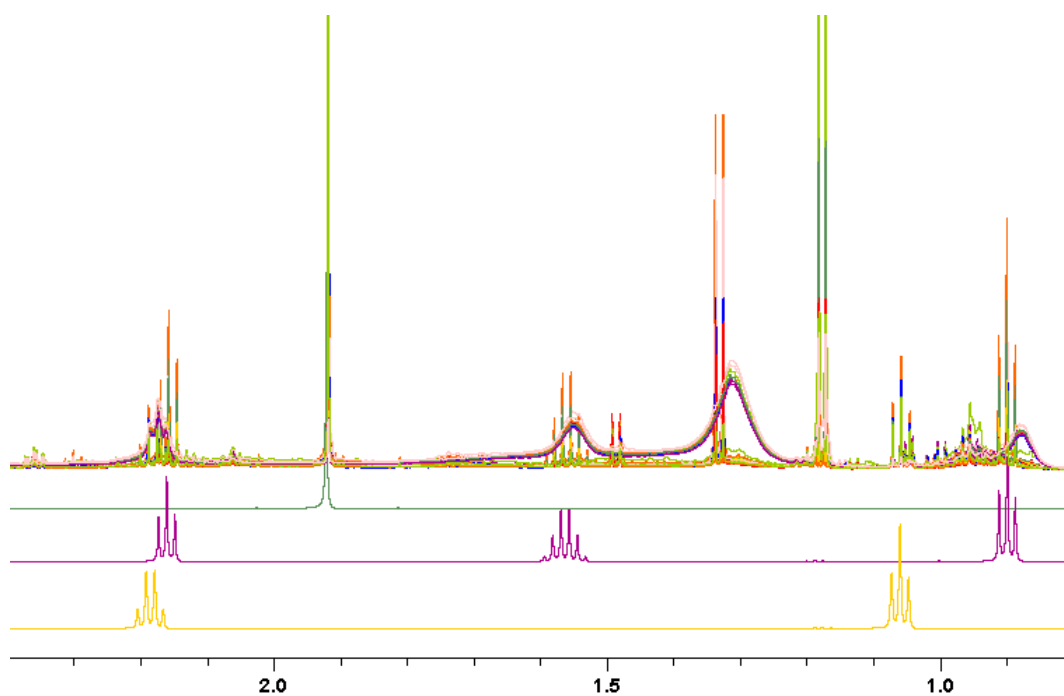


Figura 6. Espectros de las muestras de contenido fecal superpuestos con espectros de tres de los cuatro metabolitos de interés. El patrón del ácido acético se muestra de color verde, el de ácido butírico de morado y el de ácido propiónico de amarillo.

En base a la información de los espectros patrón, las señales que se consideraron para cada uno de metabolitos de interés se describen en la Tabla 3.

Tabla 3. Multiplicidad y desplazamiento químico de las señales de los metabolitos de interés en el estudio.

Ácido acético	Ácido butírico	Ácido propiónico	Ácido láctico
Singulete 1.9 ppm	Triplete 2.1 ppm	Cuadruplete 2.1 ppm	Cuadruplete 4.1 ppm
	Multiplete 1.5 ppm	Triplete 1.0 ppm	Dobleto 1.3 ppm
	Triplete 0.8 ppm		

En base a esta información, se evaluaron todas las señales en los espectros de las muestras incluidas en el estudio y se seleccionó, para cada compuesto, la señal mejor definida en las muestras del estudio. Esta selección se basó principalmente en la ausencia de solapamiento con otras señales del espectro que pudieran interferir en la cuantificación de las señales.

Finalmente, las señales se integraron de forma manual, delimitando las regiones específicas que se integraron para cada metabolito en los distintos tipos de muestras incluidas en el estudio (Tabla 4).

Tabla 4. Regiones integradas en las muestras del medio condicionado y de contenido fecal. Entre paréntesis se especifica la multiplicidad de la señal, donde 's' corresponde a singulete, 'd' a doblete, 't' a triplete, 'q' a cuadruplete y 'm' a multiplete.

	Muestras del medio condicionado	Muestras de contenido fecal
Ácido acético	1.9094-1.9289 ppm (s)	1.9034-1.9309 ppm (s)
Ácido butírico	1.5468-1.5982 ppm (m)	0.8823-0.9129 ppm (t)
Ácido propiónico	2.1961-2.2038 ppm (q)	1.0419-1.0725 ppm (t)
Ácido láctico	-	1.3101-1.3622 ppm (d)

A continuación, se muestran las imágenes de las señales seleccionadas para la cuantificación del ácido acético (Figura 7), butírico (Figura 8), propiónico (Figura 9) y láctico (Figura 10) en cada uno de los grupos de muestras incluidos en el estudio.

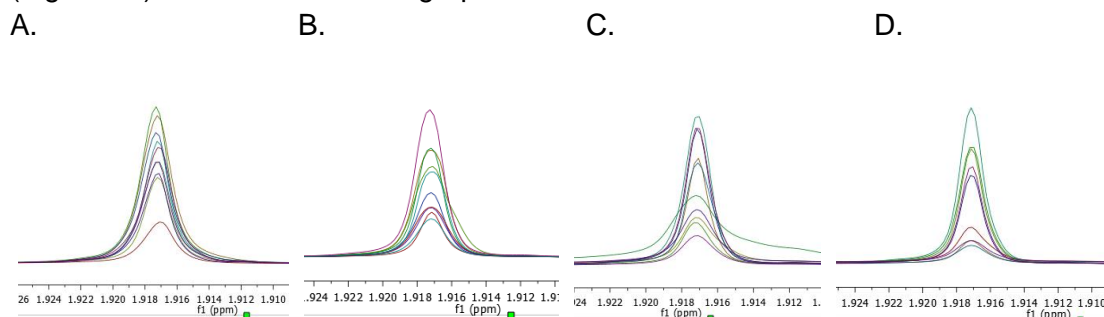


Figura 7. Señal seleccionada para la cuantificación del ácido acético en las muestras del medio condicionado (A) y en las muestras de contenido fecal de colon de ratones alimentados con WD y CD durante una semana (B) o procedentes del ciego (C) o del colon (D) de ratones alimentados durante ocho semanas con WD y CD.

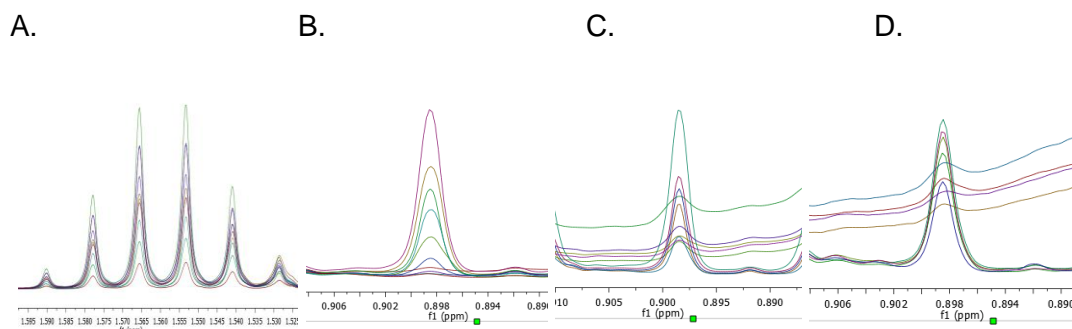


Figura 8. Señal seleccionada para la cuantificación del ácido butírico en las muestras del medio condicionado (A) y en las muestras de contenido fecal de colon de ratones

alimentados con WD y CD durante una semana (B) o procedentes del ciego (C) o del colon (D) de ratones alimentados durante ocho semanas con WD y CD.

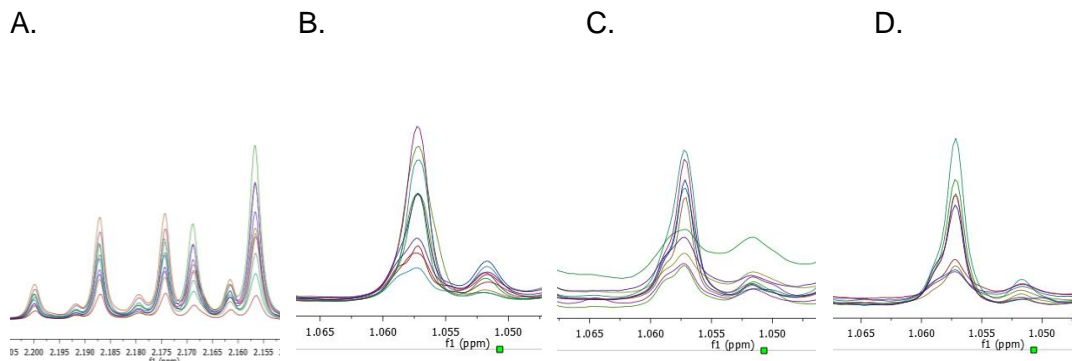


Figura 9. Señal seleccionada para la cuantificación del ácido propiónico en las muestras del medio condicionado (A) y en las muestras de contenido fecal de colon de ratones alimentados con WD y CD durante una semana (B) o procedentes del ciego (C) o del colon (D) de ratones alimentados durante ocho semanas con WD y CD.

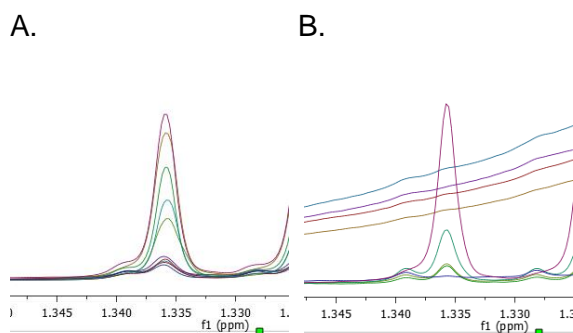


Figura 10. Señal seleccionada para la cuantificación del ácido láctico en las muestras de contenido fecal de colon de ratones alimentados con WD y CD durante una semana (A) o procedentes del colon del grupo control de ratones tratados durante ocho semanas (B).

3.3. Procesado datos RMN

Tal y como se ha indicado en la sección “Materiales y Métodos”, antes de la integración de las señales, se llevó a cabo la corrección de la línea base de los espectros mediante el método de *Whittaker smoother*. En la Figura 11 puede observarse la mejor de la línea base de los espectros tras la corrección.

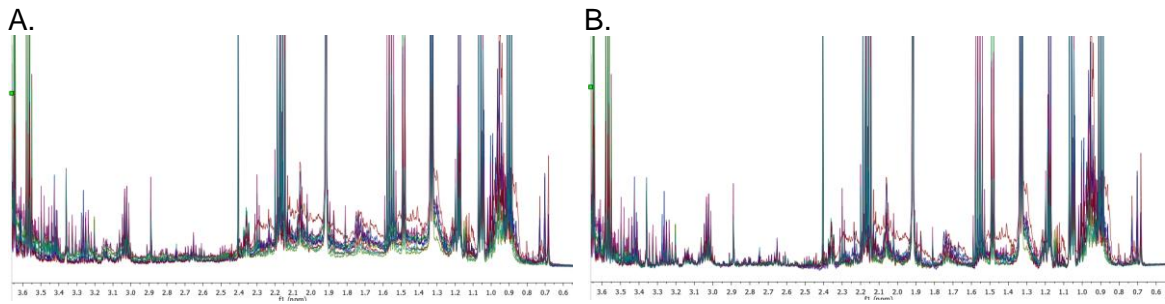


Figura 11. Espectros muestras de contenido fecal de colon de ratones alimentados con WD y CD durante una semana sin corrección de línea base (A) y con corrección de línea base mediante *Whittaker smoother* (B).

Dado que la concentración de TSP (patrón interno) sí era constante en todas las muestras del estudio, se utilizó el área de la señal de 0.0 ppm correspondiente al TSP como referencia para normalizar las áreas de los espectros (Figura 12).

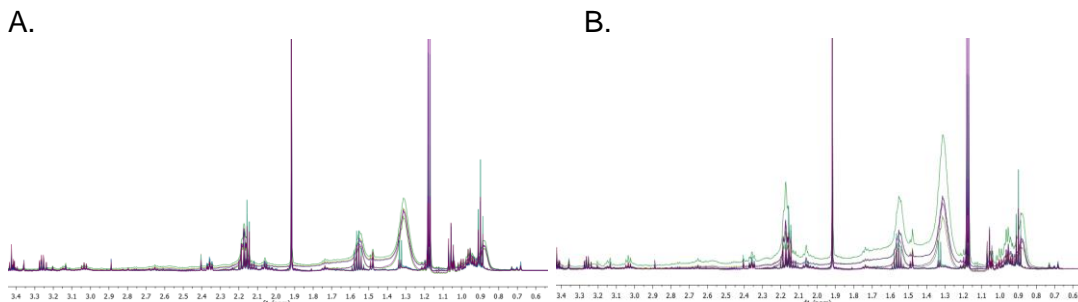


Figura 12. Espectros representativos de las muestras de contenido fecal de ciego de ratones alimentados con WD y CD durante ocho semanas: datos crudos (A) y normalizados respecto a la señal del TSP (B).

Además, en el caso de las muestras del medio condicionado, debido a que presentaban un volumen variable, fue necesario normalizar las intensidades del espectro.

En lo que respecta a la integración de las señales de interés, únicamente fue necesario deconvolucionar las señales de interés en las muestras de colon y ciego de ratones alimentados con WD y CD (Figura 13). El método de detección GSD es el recomendado en este tipo de espectros, ya que aplica automáticamente una deconvolución del espectro completo en pocos segundos. Existen diferentes niveles de funcionamiento, puede aplicarse una deconvolución rápida pero imprecisa, o bien una más lenta pero precisa. El nivel de refinado es el número de ciclos de GSD que se usarán para ajustar los picos del espectro, por tanto, a más ciclos, el área de los picos generados se ajusta mejor al espectro deconvolucionado. Por otro lado, a mayor resolución, el algoritmo mejor intentará identificar cada uno de los picos que detecte ya que GSD es sensible a la anchura de las señales (MESTRELAB RESEARCH, 2016). Teniendo en cuenta todas estas variables, se optimizaron las condiciones para la integración mediante GSD en los espectros de las muestras del estudio.

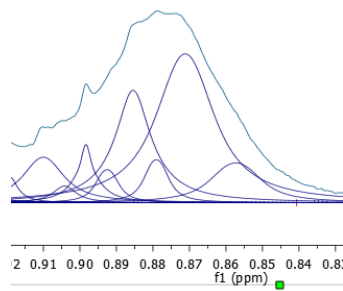


Figura 13 Señal deconvolucionada correspondiente al ácido butírico en una muestra WD de las muestras de contenido fecal del colon de ratones alimentados con WD y CD durante 8 semanas, con un nivel de refinado y de resolución de 1.

3.4. Evaluación del efecto de la WD

3.4.1. Medio condicionado

De las muestras de medio condicionado a partir de muestras de contenido fecal de colon, únicamente se analizaron dos grupos de muestras: obtenido a partir de ratones alimentados con WD y CD. En la Figura 14 se muestra la superposición de los espectros obtenidos para las muestras de medio condicionado a partir de muestras de contenido fecal de colon de ratones alimentados con WD y CD,

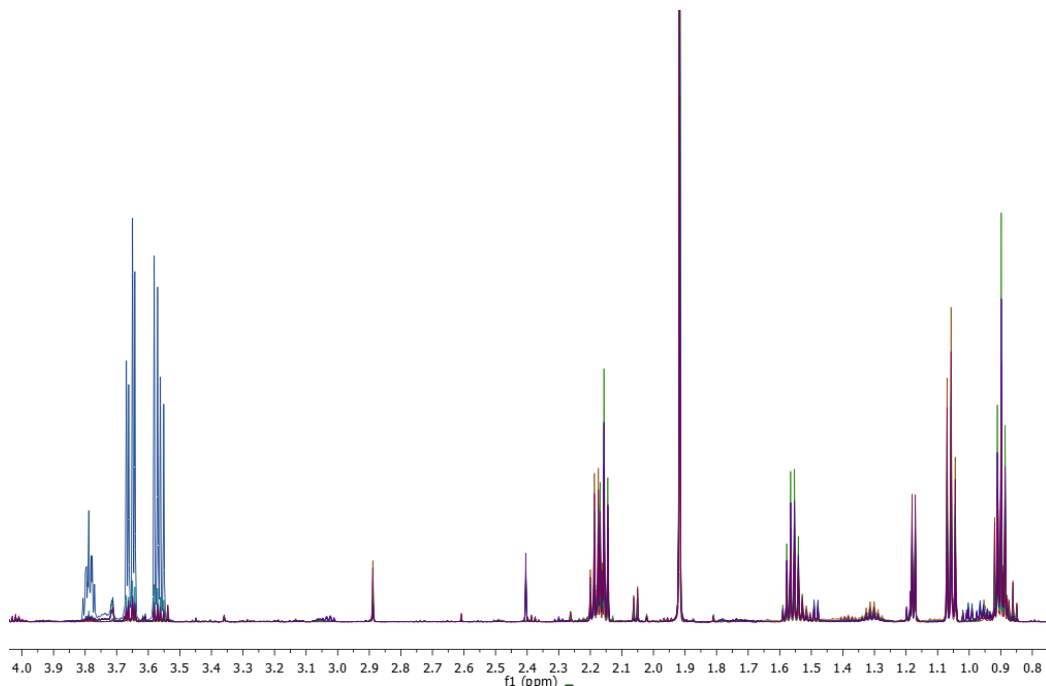


Figura 14. Superposición de espectros de los grupos WD y CD de las muestras de medio condicionado a partir de muestras de contenido fecal de colon de ratones alimentados con WD y CD durante una semana.

Tras la cuantificación de las señales de los metabolitos de interés, se observó que no existían diferencias significativas en los niveles de ácido acético entre los grupos del estudio: CD y WD. En cambio, el ácido butírico y propiónico sí presentaron diferencias significativas. En comparación con los ratones del grupo CD, la concentración de ácido butírico fue menor ($p < 0.05$) en los ratones alimentados con WD. Sin embargo, la concentración de ácido propiónico fue mayor ($p < 0.05$) en los ratones alimentados con WD en comparación con los ratones controles (Figura 15).

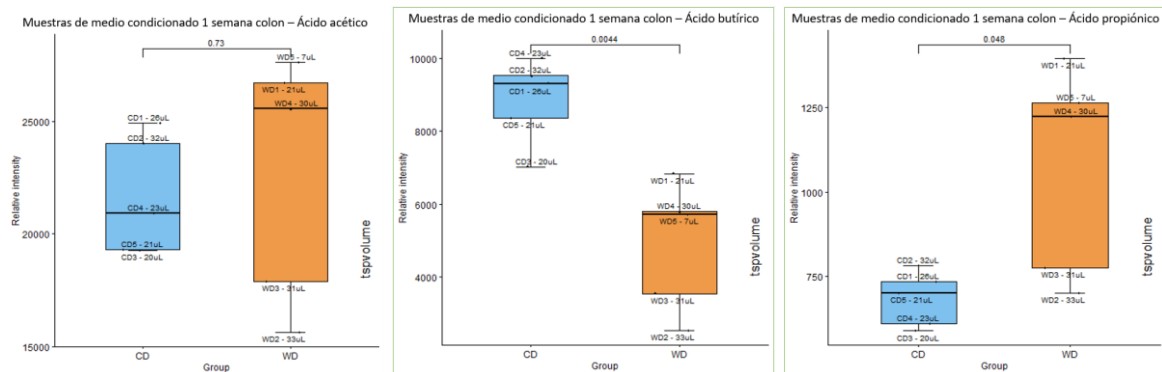


Figura 15. Diagramas de cajas o *boxplots* de los niveles de ácido acético, butírico y propiónico del grupo de muestras de medio condicionado a partir de muestras de contenido fecal de colon de ratones alimentados con WD y CD durante una semana. Las cajas incluyen el 50% de los casos de cada grupo, la línea que divide la caja en dos partes indica la mediana del grupo, y los extremos de las líneas o bigotes indican los límites del intervalo de confianza del 95%. Las muestras fuera de los límites representan los *outliers*. Diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

Finalmente, en ninguna de las muestras de medio condicionado incluidas en el estudio fue posible cuantificar la señal del ácido láctico debido o bien a la ausencia de este metabolito en las muestras o a que los niveles de este metabolito en las muestras analizadas eran inferiores al límite de detección de la técnica empleada.

3.4.2. Muestras de contenido fecal

Para las muestras de contenido fecal, se analizaron distintos grupos de ratones obtenidos a partir de:

- muestras de colon de ratones alimentados con WD y CD durante una semana
- muestras de ciego de ratones alimentados con WD y CD durante ocho semanas
- muestras de colon de ratones alimentados con WD y CD durante ocho semanas

Cabe destacar que, entre todas las muestras analizadas en el estudio, únicamente una de ellas en el grupo muestral de contenido fecal de ciego de ratones alimentados con WD durante ocho semanas (la muestra WD4) mostró un comportamiento distinto al resto de muestras de su grupo. En base a estas diferencias, probablemente debidas a un problema en la preparación de la dilución de la muestra, la muestra fue clasificada como *outlier* y excluida del análisis.

Por tanto, en los siguientes apartados se muestran los resultados obtenidos para cada compuesto analizado en los distintos grupos de estudio, excluyendo la muestra clasificada como *outlier*.

Ácido acético

El ácido acético mostró concentraciones significativamente más bajas en los grupos de ratones alimentados con WD, en los tres tipos de muestras analizadas (Figura 16).

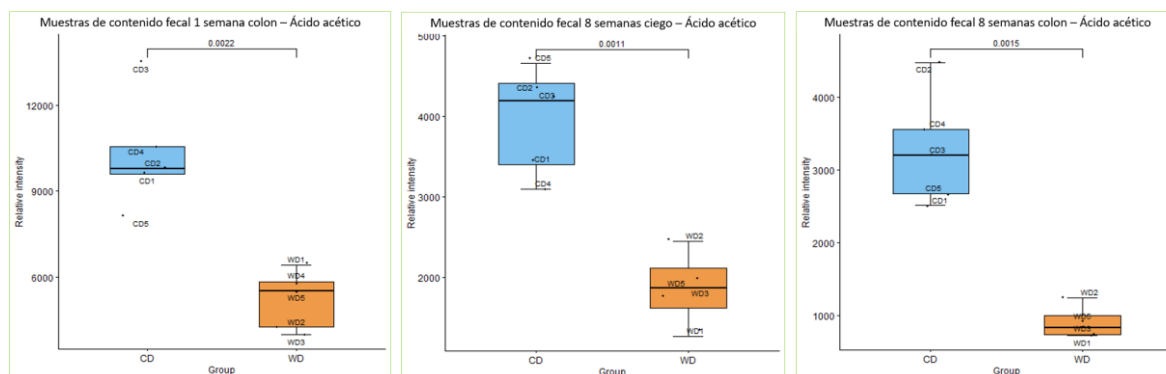


Figura 16. Diagramas de cajas o *boxplots* de los niveles de ácido acético de los distintos grupos de muestras de contenido fecal incluidas en el estudio. Las cajas incluyen el 50% de los casos de cada grupo, la línea que divide la caja en dos partes indica la mediana del grupo, y los extremos de las líneas o bigotes indican los límites del intervalo de confianza del 95%. Las muestras fuera de los límites representan los *outliers*. Diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

Ácido butírico

Respecto al ácido butírico, en las comparaciones de las muestras obtenidas a partir del contenido fecal de colon tras una semana de dieta y ciego tras ocho, presentó niveles más bajos en los ratones alimentados con WD, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) únicamente en las muestras de colon (Figura 17).

Adicionalmente, en las muestras de contenido fecal de colon de ratones alimentados con WD y CD durante ocho semanas no fue posible cuantificar el ácido butírico en las muestras del grupo WD, pues la señal de este metabolito se encontraba solapada con otras señales anchas en el espectro, correspondientes a lípidos cuyos niveles se ven elevados, probablemente debido a la WD.

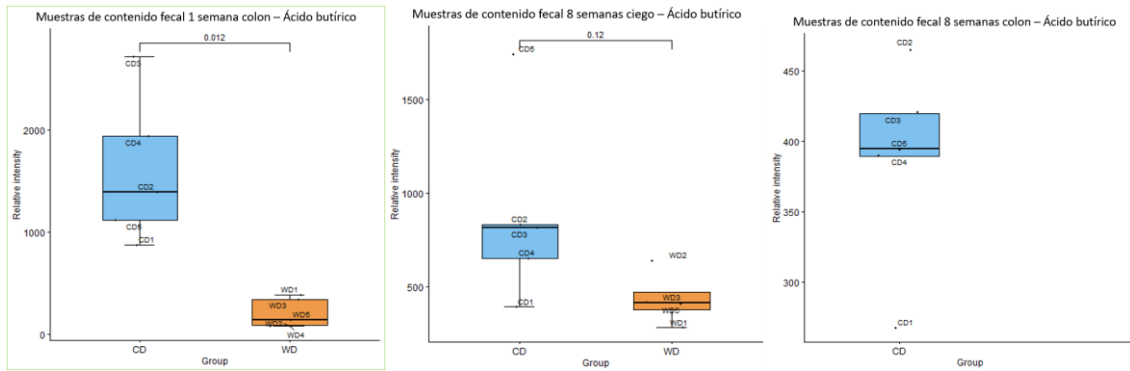


Figura 17. Diagramas de cajas o *boxplots* de los niveles de ácido butírico de los distintos grupos de muestras de contenido fecal incluidas en el estudio. Las cajas incluyen el 50% de los casos de cada grupo, la línea que divide la caja en dos partes indica la mediana del grupo, y los extremos de las líneas o bigotes indican los límites del intervalo de confianza del 95%. Las muestras fuera de los límites representan los *outliers*. Diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

Ácido propiónico

Para el ácido propiónico, en las comparaciones de las muestras obtenidas a partir del contenido fecal de colon tras una semana de dieta, y de ciego y colon tras ocho semanas, presentó niveles más bajos en los ratones alimentados con WD, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) en los tres tipos de muestras analizados (Figura 18).

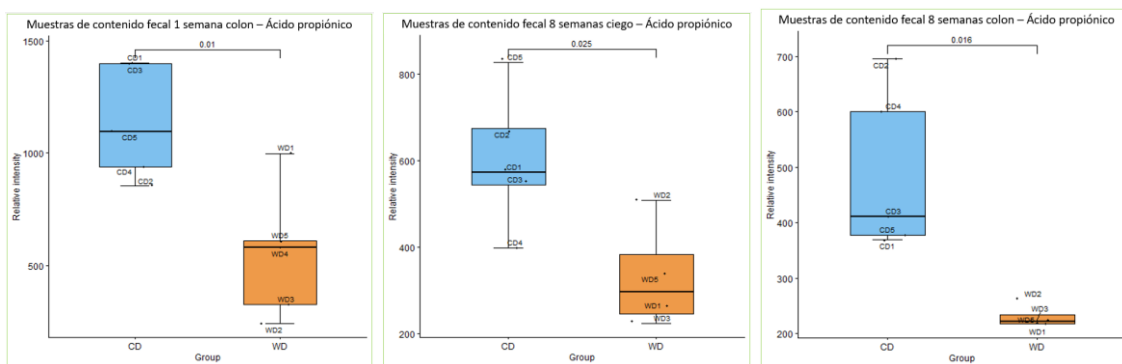


Figura 18. Diagramas de cajas o *boxplots* de los niveles de ácido propiónico de los distintos grupos de muestras de contenido fecal incluidas en el estudio. Las cajas incluyen el 50% de los casos de cada grupo, la línea que divide la caja en dos partes indica la mediana del grupo, y los extremos de las líneas o bigotes indican los límites del intervalo de confianza del 95%. Las muestras fuera de los límites representan los *outliers*. Diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

Ácido láctico

Por último, para el ácido láctico, en las comparaciones de las muestras obtenidas a partir del contenido fecal de colon tras una semana de dieta presentó niveles más bajos en

los ratones alimentados con WD, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) (Figura 19).

En cambio, en las muestras de contenido fecal de colon de ratones alimentados con WD y CD durante ocho semanas solo fue posible cuantificar el ácido láctico en las muestras del grupo CD, pues las WD no presentaban señal para este metabolito.

Con respecto a las muestras de contenido fecal de ciego de ratones alimentados con WD y CD durante ocho semanas, no fue posible cuantificar este metabolito, pues únicamente una muestra del grupo CD (la muestra CD5) presentaba señal de lactato.

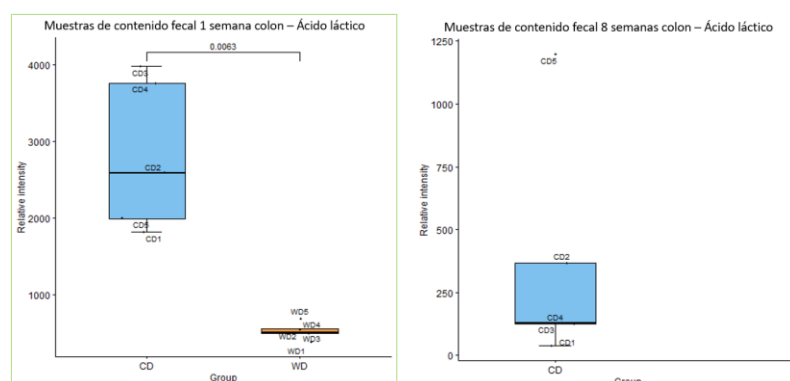


Figura 19. Diagramas de cajas o *boxplots* de los niveles de ácido láctico de los distintos grupos de muestras de contenido fecal incluidas en el estudio. Las cajas incluyen el 50% de los casos de cada grupo, la línea que divide la caja en dos partes indica la mediana del grupo, y los extremos de las líneas o bigotes indican los límites del intervalo de confianza del 95%. Las muestras fuera de los límites representan los *outliers*. Diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

Finalmente, en la Tabla 5, se resumen los resultados analizados para cada compuesto de interés en las distintas comparaciones entre los grupos de muestras incluidos en el estudio.

Tabla 5. Resumen de la cuantificación relativa indicando qué grupo presenta mayor concentración del metabolito y el p-valor. El asterisco (*) indica que el p-valor es estadísticamente significativo.

	Medio condicionado	Contenido fecal 1s Colon	Contenido fecal 8s Ciego (sin WD4)	Contenido fecal 8s Colon
Ácido acético	CD < WD (p value 0.73)	CD > WD (p value 0.0022)*	CD > WD (p value 0.0011)*	CD > WD (p value 0.0015)*
Ácido butírico	CD > WD (p value 0.0044)*	CD > WD (p value 0.012)*	CD > WD (p value 0.12)	-
Ácido propiónico	CD < WD (p value 0.048)*	CD > WD (p value 0.01)*	CD > WD (p value 0.025)*	CD > WD (p value 0.016)*
Ácido láctico	-	CD > WD (p value 0.0063)*	-	-

3.4.3. Cálculo de las concentraciones absolutas

Adicionalmente, en las muestras de contenido fecal de colon de ratones alimentados con WD y CD durante una semana, se cuantificó de manera absoluta la concentración de los metabolitos de interés. La elección de este grupo se basó principalmente en la presencia de todos los metabolitos en ambos grupos de estudio y en la ausencia de lípidos solapadas con las señales de interés, de modo que nos permitía cuantificar los cuatro metabolitos en ambos grupos, tanto en los grupos WD como en los CD.

En la Tabla 6 se recogen los valores medios de concentración de cada metabolito de interés en los grupos de estudio analizados, así como el análisis estadístico de la comparación entre los grupos del estudio. Cabe destacar que las diferencias encontradas fueron estadísticamente significativas en todos los casos ($p < 0.05$). La direccionalidad de los cambios observados también fue la misma en los cuatro compuestos analizados: los cuatro metabolitos sufrieron un descenso de la concentración en los ratones alimentados con dieta occidental durante una semana en comparación con los grupos alimentados con dieta control (Figura 20).

Tabla 6. Valores medios de la cuantificación absoluta de los metabolitos de las muestras de contenido fecal de colon alimentados con WD y CD durante una semana y sus p-valores.

	[Ácido acético] ($\mu\text{mol/g}$)	[Ácido butírico] ($\mu\text{mol/g}$)	[Ácido propiónico] ($\mu\text{mol/g}$)	[Ácido láctico] ($\mu\text{mol/g}$)
Media CD	103.70	18.24	16.66	24.06
Media WD	52.80	0.4565	8.534	1.699
p-valor	0.0009	0.0044	0.0099	0.0009

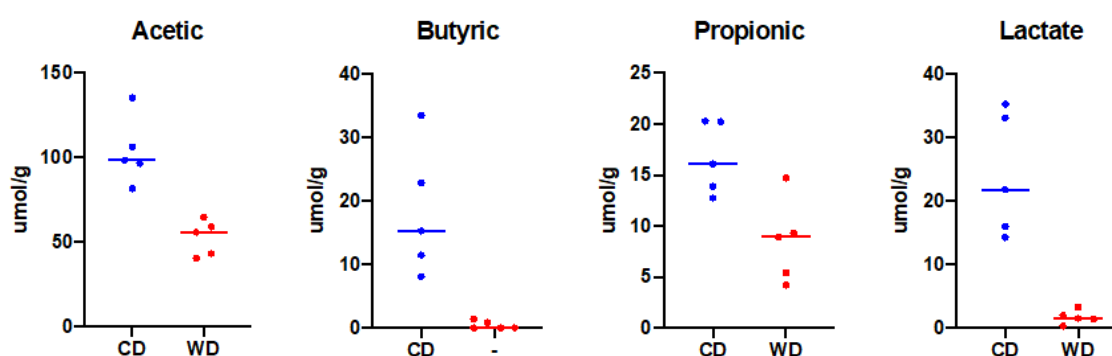


Figura 20. Gráficas que muestran la cuantificación absoluta de los metabolitos del grupo de contenido fecal de colon alimentados con WD y CD durante una semana. En azul se indican los grupos control (CD) y en rojo los alimentados con dieta occidental (WD). La raya en horizontal indica la media de los valores de cada grupo. La concentración se representa en unidades de $\mu\text{mol/g}$.

El propósito de este proyecto era estudiar el efecto de la dieta occidental sobre los niveles de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) y ácido láctico en muestras del contenido de ciego y colon en ratones, puesto que se trata de un modelo que permite la accesibilidad a estos contenidos. En humanos, la concentración de AGCC solo puede medirse en las

heces, de manera que refleja los cambios en la fermentación que tiene lugar en la parte proximal del intestino grueso.

Los principales productos finales de la fermentación bacteriana en el intestino grueso son los AGCC, concretamente el ácido acético, butírico y propiónico. En estudios anteriores se ha demostrado que los AGCC y el ácido láctico pueden afectar a los procesos de transporte de las células epiteliales del colon, al metabolismo energético, al crecimiento y a la diferenciación celular (Pan *et.al.*, 2009). En este estudio se observó cómo los niveles de estos cuatro metabolitos se vieron alterados al suministrar una dieta occidental a ratones durante un periodo de tiempo.

Las variaciones en los niveles de acetato, butirato, propionato y lactato provocadas por la dieta occidental demuestran una vez más cómo la dieta puede influir en la microbiota intestinal. Al alterar la ecología microbiana del intestino, es decir, las bacterias encargadas de la fermentación de los carbohidratos responsables de la producción de los AGCC, así como de las bacterias encargadas de generar ácido láctico, los procesos no se llevan a cabo con la misma eficacia, de modo que los niveles de los AGCC y de lactato disminuyen drásticamente.

Estos cuatro metabolitos son producidos por los tres filos bacterianos intestinales dominantes: los Firmicutes, los Bacteroidetes y las Actinobacterias. Los Firmicutes, generalmente cocos grampositivos, son los responsables de la producción de ácido butírico. Los Firmicutes incluyen los grupos de *Clostridium IV y XIV*, y los *Lactobacillus*, estos últimos encargados de la obtención de ácido láctico. La especie *Bifidobacterium*, del filo Actinobacteria, también es productora de lactato. Por otro lado, los Bacteroidetes, bacilos gramnegativos, son conocidos por el género anaerobio obligado *Bacteroides*, responsables de la producción de ácido acético y propiónico (Watson, 2020).

En la mayoría de los estudios relacionados con la obesidad se han observado niveles más bajos de *Lactobacillus casei / paracasei* y *Lactobacillus plantarum* (Parida y Sharma, 2020). Un estudio sobre las enfermedades inflamatorias intestinales (EII) mostró cómo los pacientes que presentaban la enfermedad estaban correlacionados con niveles más bajos de AGCC en las heces, en comparación con los pacientes sanos. Explicaron que la reducción de los AGCC se debió a la disminución de los grupos de *Clostridium* en muestras fecales de pacientes con EII (Li *et.al.*, 2019).

En los tres grupos de muestras de contenido fecal incluidas en el estudio se observó el mismo patrón: los niveles de los cuatro metabolitos de interés disminuyeron en los ratones alimentados con WD en comparación con los alimentados con CD. Este comportamiento podría explicarse con el descenso de Bacteroidetes, bacterias productoras de acetato y propionato, suceso descrito en la bibliografía (Parida y Sharma, 2020; Clemente *et.al.*, 2012). Aunque por lo general los niveles de Firmicutes, incluyendo lactobacilos, aumenten en estado obeso, la reducción tan drástica de los niveles de butirato y lactato se explicarían con una carencia de estas bacterias. Otra explicación podría deberse al descenso de bifidobacterias, las cuales son productoras de ácido láctico. Las bifidobacterias, junto con algunas especies de lactobacilos juegan un papel muy importante en la ecofisiología de la microbiota intestinal. Por otra parte, la disminución de los AGCC podría deberse a una reducción de los grupos de *Clostridium* en las muestras fecales.

En cambio, en las muestras de medio condicionado no se observó el mismo comportamiento que en las de contenido fecal. Los niveles de acetato y propionato aumentaron en las muestras de ratones alimentados con WD en comparación con los alimentados con CD. Este suceso podría deberse al modo en el que se obtuvieron estas muestras, puesto que dejaron crecer las bacterias presentes en estas muestras durante 36h “ex vivo” en lugar de realizar una extracción.

La cuantificación absoluta de las concentraciones de estos compuestos en las muestras analizadas será crucial para poder planificar futuros experimentos que permitirán observar el efecto de distintas concentraciones de estos metabolitos en el crecimiento de bacterias específicas.

En conclusión, los AGCC y el ácido láctico del ciego y del colon en ratones disminuyeron con la ingesta de una dieta occidental, debido a las variaciones en su composición microbiana al cambiar la dieta. Por tanto, estas alteraciones pueden ser responsables de problemas gastrointestinales, entre otros. Se ha demostrado una vez más que los cambios en la dieta es la manera más obvia de alterar la microbiota, además de que la dieta occidental es responsable de modificaciones de la microbiota intestinal, pudiendo desarrollar enfermedades. De modo que la modificación de la dieta puede convertirse en un objetivo potencial como terapia para estas enfermedades, como por ejemplo, para disminuir el desarrollo de CCR e inducir adaptaciones saludables en el colon. Otra estrategia alternativa es el uso de probióticos, los cuales se ha demostrado que cambian la microbiota. (Watson, 2020). Concretamente, aquellos basados en cepas de lactobacilos han demostrado ser efectivos en la prevención de toxicidades en el CCR (Parida y Sharma, 2020).

4. CONCLUSIONES

1. La Resonancia Magnética Nuclear es capaz de caracterizar el perfil metabólico de la microbiota intestinal mediante el análisis del contenido fecal de ratones al tratarlos con dieta occidental.
2. Al analizar los perfiles metabólicos se observó que los ratones alimentados con dieta occidental presentan una firma metabólica distinta en comparación con los ratones control. Este hecho demuestra el efecto de la dieta occidental sobre la microbiota intestinal.
3. El análisis estadístico permitió cuantificar los cuatro metabolitos de interés: el ácido acético, butírico, propiónico y láctico. El tratamiento con dieta occidental induce cambios metabólicos que producen por lo general un descenso de los niveles de estos AGCC y lactato. De este modo hemos podido observar el efecto de la dieta occidental estudiando las diferencias entre los ratones alimentados con dieta occidental y los control.

5. BIBLIOGRAFÍA

Alonso, A., Marsal, S., & Julià, A. (2015). Analytical methods in untargeted metabolomics: state of the art in 2015. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 3, 23. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2015.00023>

Bäckhed, F., Ding, H., Wang, T., Hooper, L. V, Gou, Y. K., Nagy, A., Semenkovich, C. F., & Gordon, J. I. (2004). The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(44), 15718–15723. <https://doi.org/10.1073/pnas.0407076101>

Beger, R. D., Dunn, W., Schmidt, M. A., Gross, S. S., Kirwan, J. A., Cascante, M., Brennan, L., Wishart, D. S., Oresic, M., Hankemeier, T., Broadhurst, D. I., Lane, A. N., Suhre, K., Kastenmüller, G., Sumner, S. J., Thiele, I., Fiehn, O., Kaddurah-Daouk, R., & Initiative, for “Precision M. and P. T. G.-M. S. (2016). Metabolomics enables precision medicine: “A White Paper, Community Perspective.” *Metabolomics*, 12(9), 149. <https://doi.org/10.1007/s11306-016-1094-6>

Biedermann, L., & Rogler, G. (2015). The intestinal microbiota: its role in health and disease. *European Journal of Pediatrics*, 174(2), 151–167. <https://doi.org/10.1007/s00431-014-2476-2>

Christ, A., Lauterbach, M., & Latz, E. (2019). Western Diet and the Immune System: An Inflammatory Connection. *Immunity*, 51(5), 794–811. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.09.020>

Clemente, J. C., Ursell, L. K., Parfrey, L. W., & Knight, R. (2012). The Impact of the Gut Microbiota on Human Health: An Integrative View. *Cell*, 148(6), 1258–1270. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.01.035>

Clendinen, C. S., Monge, M. E., & Fernández, F. M. (2017). Ambient mass spectrometry in metabolomics. *Analyst*, 142(17), 3101–3117. <https://doi.org/10.1039/C7AN00700K>

Creely, S. J., McTernan, P. G., Kusminski, C. M., Fisher, ff. M., Da Silva, N. F., Khanolkar, M., Evans, M., Harte, A. L., & Kumar, S. (2007). Lipopolysaccharide activates an innate immune system response in human adipose tissue in obesity and type 2 diabetes. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 292(3), E740–E747. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00302.2006>

Delzenne, N. M., & Cani, P. D. (2011). Interaction Between Obesity and the Gut Microbiota: Relevance in Nutrition. *Annual Review of Nutrition*, 31(1), 15–31. <https://doi.org/10.1146/annurev-nutr-072610-145146>

Devaraj, Sridevi, & Hemarajata, Peera, & Versalovic, James (2013). La microbiota intestinal humana y el metabolismo corporal: Implicaciones con la obesidad y la diabetes. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 47(2),421-434.[fecha de Consulta 24 de Mayo de

Ding S, Chi MM, Scull BP, Rigby R, Schwerbrock NMJ, Magness S, et al. (2010). High-Fat Diet: Bacteria Interactions Promote Intestinal Inflammation Which Precedes and Correlates with Obesity and Insulin Resistance in Mouse. *PLoS ONE* 5(8): e12191. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012191>

Edwards, B. J. C., & Ph, D. (1946). Principles of NMR. In *Process NMR Associates*, 1–51.

Feng, W., Ao, H., & Peng, C. (2018). Gut Microbiota, Short-Chain Fatty Acids, and Herbal Medicines. *Frontiers in pharmacology*, 9, 1354. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01354>

Icaza-Chávez, M. E. (2013). Microbiota intestinal en la salud y la enfermedad. *Revista de Gastroenterología de México*, 78(4), 240–248. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.rgmx.2013.04.004>

Irrazábal, T., Belcheva, A., Girardin, S. E., Martin, A., & Philpott, D. J. (2014). The Multifaceted Role of the Intestinal Microbiota in Colon Cancer. *Molecular Cell*, 54(2), 309–320. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.03.039>

Li, L., Huang, D., Nevin, A., Fei, P., & Guo, L. (2019). Fecal microbiota, lactic acid and short chain fatty levels of infants following rotavirus infection revealed by illumina miseq high-throughput sequencing and HPLC method. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 12(6). <https://doi.org/10.5812/jjm.68389>

Machado, M. V., & Cortez-Pinto, H. (2012). Gut microbiota and nonalcoholic fatty liver disease. *Annals of Hepatology*, 11(4), 440–449. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1665-2681\(19\)31457-7](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1665-2681(19)31457-7)

MESTRELAB RESEARCH. (2016). *MestreNova Manual* [archivo PDF]. Recuperado de: https://mnova.pl/files/download/MestReNova-11-0-0_Manual.pdf

Pan, X. D., Chen, F. Q., Wu, T. X., Tang, H. G., & Zhao, Z. Y. (2009). Prebiotic oligosaccharides change the concentrations of short-chain fatty acids and the microbial population of mouse bowel. *Journal of Zhejiang University: Science B*, 10(4), 258–263. <https://doi.org/10.1631/jzus.B0820261>

Parida, S., & Sharma, D. (2020). Microbial Alterations and Risk Factors of Breast Cancer: Connections and Mechanistic Insights. *Cells*, 9(5), 1091. <https://doi.org/10.3390/cells9051091>

Puchades-Carrasco, L., & Pineda-Lucena, A. (2015). Metabolomics in pharmaceutical research and development. *Current Opinion in Biotechnology*, 35, 73–77. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.copbio.2015.04.004>

Puchades-Carrasco L. (2013). APLICACIONES DE LA RMN A LA IDENTIFICACIÓN DE NUEVOS BIOMARCADORES DE UTILIDAD CLÍNICA EN ONCOLOGÍA [Doctorado]. Universidad de Valencia.

Puchades-Carrasco, L., & Pineda-Lucena, A. (2017). Metabolomics Applications in Precision Medicine: An Oncological Perspective. *Current topics in medicinal chemistry*, 17(24), 2740–2751. <https://doi.org/10.2174/1568026617666170707120034>

Ruiz Álvarez, Vladimir, Puig Peña, Yamila, & Rodríguez Acosta, Mireida. (2010). Microbiota intestinal, sistema inmune y obesidad. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 29(3), 364-397. Recuperado en 25 de mayo de 2020, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03002010000300007&lng=es&tlng=pt.

Statovci D, Aguilera M, MacSharry J and Melgar S. (2017). The Impact of Western Diet and Nutrients on the Microbiota and Immune Response at Mucosal Interfaces. *Front. Immunol.* 8:838. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00838>

Turnbaugh, P. J., Ley, R. E., Mahowald, M. A., Magrini, V., Mardis, E. R., & Gordon, J. I. (2006). An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*, 444(7122), 1027–1031. <https://doi.org/10.1038/nature05414>

Vicente Muñoz S. (2017). Identificación No Invasiva De Biomarcadores De Endometriosis Mediante metabolómica Por Rmn [Doctorado]. Universidad de Valencia.

Watson, K. (2020). Understanding the microbiome: a primer on the role of the microbiome in colorectal neoplasia. *Annals of Gastroenterology*, 223–236. <https://doi.org/10.20524/aog.2020.0467>

Weiss, G. A., & Henet, T. (2017). Mechanisms and consequences of intestinal dysbiosis. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 74(16), 2959–2977. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2509-x>

Xiong, Y., Miyamoto, N., Shibata, K., Valasek, M. A., Motoike, T., Kedzierski, R. M., & Yanagisawa, M. (2004). Short-chain fatty acids stimulate leptin production in adipocytes through the G protein-coupled receptor GPR41. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(4), 1045–1050. <https://doi.org/10.1073/pnas.2637002100>

Yang, Q., Zhang, A., Miao, J., Sun, H., Han, Y., Yan, G., Wu, F., & Wang, X. (2019). Metabolomics biotechnology, applications, and future trends: a systematic review. *RSC Advances*, 9(64), 37245–37257. <https://doi.org/10.1039/C9RA06697G>

Zinöcker, M.K. and Lindseth, I.A. (2018). The Western Diet–Microbiome–Host Interaction and Its Role in Metabolic Disease. *Nutrients*, 10(3), 365. <https://doi.org/10.3390/nu10030365>