



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



INSTITUTO DE INGENIERÍA DE  
ALIMENTOS PARA EL DESARROLLO

# UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

## *MODELOS DE SIMULACIÓN IN VITRO DE LA DIGESTIÓN COLÓNICA DE ALIMENTOS*

TRABAJO FIN DE MÁSTER UNIVERSITARIO EN  
CIENCIA E INGENIERÍA DE LOS ALIMENTOS

**ALUMNA:** Elena Veintimilla Gozalbo

**DIRECTORAS ACADÉMICAS:** Ana María Andrés Grau  
Ana Belén Heredia Gutiérrez

**TUTORES:** Joaquim Calvo Lerma  
Andrea Asensio Grau

*Curso Académico: 2019-2020*

**VALENCIA, 11 de septiembre 2020**

# MODELOS DE SIMULACIÓN *IN VITRO* DE LA DIGESTIÓN COLÓNICA DE DIGESTIÓN DE ALIMENTOS

Veintimilla-Gozalbo, E.<sup>1</sup>, Asensio-Grau, A.<sup>1</sup>, Calvo-Lerma, J.<sup>1</sup>, Heredia, A.<sup>1</sup>, Andrés, A.<sup>1</sup>

## Resumen

La microbiota colónica humana interviene en el proceso de digestión de los alimentos jugando un papel determinante en la salud humana. Esta comunidad de microorganismos varía entre personas, ya que existen numerosos factores que la modulan. Entre ellos, la dieta es uno de los principales que, a su vez, se ve afectada por consideraciones ambientales, económicas y culturales. Estas evidencias han motivado el estudio del impacto de la dieta sobre la microbiota colónica y el desarrollo de metodologías que permitan la simulación *in vitro* de esta etapa de la digestión de alimentos. Esta revisión bibliográfica recopila las certezas actuales acerca del diseño de estos experimentos atendiendo a la fisiología, la metodología, las variables de proceso y las determinaciones analíticas adyacentes. Así pues, en primer lugar, se resume la composición en géneros y filos de la microbiota y su relación con la alimentación, entre otros factores. Seguidamente, se presentan las distintas metodologías utilizadas en los estudios *in vitro* de digestión colónica, ya sean en estático, dinámico y con uno o varios compartimentos. Finalmente, la revisión hace un repaso a las técnicas analíticas para la identificación de colonias de especies y para la cuantificación de metabolitos. Pese a los avances en los sistemas de simulación de la digestión y el refinamiento en las técnicas analíticas, todavía existen desafíos por resolver en lo que concierne a este tipo de ensayos, entre los que destacan la simulación de la variabilidad de la composición de la microbiota colónica en distintos contextos y el desarrollo de las técnicas analíticas de más moderna aplicación.

**PALABRAS CLAVE:** microbiota colónica humana; alimentación; fermentación colónica; digestión *in vitro*; modelos de digestión *in vitro* dinámicos; inóculo fecal.

## Abstract

The colonic human microbiota takes part in the food digestion process and it has a key role in the maintenance of human health. This community of microbes is different inter-individually due to several factors that modulate its composition. Among them, diet is one of the most relevant, which in turn, it is affected by environmental, economic, and cultural considerations. These evidences have promoted the study of the diet influence on gut microbiota and

---

<sup>1</sup>Instituto Universitario de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo (IU-IAD). Universitat Politècnica de València, Camino de Vera s/n, 46022 Valencia.

the development of methodologies which simulate *in vitro* the colonic digestion of food. The review compiles the current evidence about the design of these experiments according to physiology, methodology, process variables and analytical determinations. In first place, it sums up the microbiological composition and its relationship with food. Next, it presents the different methodologies used in *in vitro* colonic digestion studies, either static or dynamic, with one or several compartments. Finally, it revises the analytical methodologies in the microbiology identification and the metabolite quantification. Despite the progress in the digestive simulation and analytical techniques, there are still challenges, highlighting the simulation of the microbiological variability that harbours the colon in different situations and the development of modern analytical techniques.

**KEY WORDS:** human colonic microbiota; food; colonic fermentation; *in vitro* digestion process; *in vitro* dynamic digestion models; fecal inoculum.

## **Resum**

La microbiota colònica humana intervé en el procés de digestió dels aliments, tenint un paper determinant en la salut humana. Esta comunitat de microorganismes varia entre persones, ja que existeixen nombrosos factors que la modulen. Entre ells, la dieta és un dels principals, la qual, a la seua vegada, es veu afectada per consideracions ambientals, econòmiques y culturals. Estes evidències han motivat l'estudi de l'impacte de la dieta sobre la microbiota colònica i el desenvolupament de metodologies que permeten la simulació *in vitro* d'esta etapa de la digestió dels aliments. Esta revisió bibliogràfica recopila les evidències actuals sobre el disseny d'estos experiments atenent a la fisiologia, la metodologia, les variables del procés i les determinacions analítiques adjacents. Per tant, en primer lloc es resumeix la composició en gèneres de la microbiota i la seua relació amb l'alimentació, entre altres factors. Tot seguit, es presenten les distintes metodologies utilitzades en els estudis *in vitro* de digestió colònica, bé siguen en estàtic, dinàmic, o amb un o diversos compartiments. Finalment, la revisió fa un repàs a les tècniques analítiques per a la identificació de colònies d'espècies i per a la quantificació de metabòlits. Malgrat els avanços en els sistemes de simulació de la digestió i el refinament en les tècniques analítiques, encara existeixen desafiaments per resoldre pel que fa a estos assajos, destacant la simulació de la variabilitat de la composició de la microbiota colònica en distints contextos i el desenvolupament de les tècniques analítiques de més recent aplicació.

**PARAULES CLAU:** microbiota colònica humana; alimentació; fermentació colònica; digestió *in vitro*; models de digestió *in vitro* dinàmics; inòcul fecal.

## 1. INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas, se ha consolidado la evidencia de la influencia de la alimentación en la salud humana y se han realizado numerosos estudios cubriendo un rango de disciplinas relacionadas, tales como aspectos culturales, gastronómicos, fisiológicos, digestivos y nutricionales. Para entender esta relación, es necesario considerar tanto el proceso de digestión de los alimentos, como el sistema digestivo, dado que este último es la interfase a través del cual los alimentos interactúan con el organismo y se transforman para poder ser utilizados por el mismo y ejercer su función última (Bhagavan & Ha, 2015).

Durante la digestión, tiene lugar un conjunto de reacciones químicas, físicas y enzimáticas que transforman las matrices alimentarias y sus principales macronutrientes (lípidos, carbohidratos y proteínas) en compuestos más simples con capacidad de ser absorbidos e incorporados al torrente sanguíneo (Bhagavan & Ha, 2015). Asimismo, otros componentes como vitaminas, minerales y compuestos bioactivos son susceptibles a cambios químicos como consecuencia del proceso de digestión. El proceso digestivo se divide en cuatro principales etapas: oral (boca), gástrica (estómago), intestinal (duodeno, íleon y yeyuno) y colónica (colon). La digestión comienza en la boca, donde la masticación junto con la secreción salivar da lugar a la formación del bolo; asimismo, las lipasas y amilasas presentes en la saliva inician la hidrólisis de lípidos y carbohidratos. En el estómago continúa la digestión, pero el fenómeno que gobierna esta etapa es la digestión de las proteínas (proteólisis), gracias a la pepsina gástrica y el pH ácido de este compartimento. A continuación, el alimento parcialmente digerido pasa al intestino delgado, una de las partes del tracto digestivo con mayor relevancia en cuanto a la digestión y absorción de nutrientes. En el duodeno, primera parte del intestino delgado, el páncreas y la vesícula biliar secretan respectivamente la pancreatina y las sales biliares, teniendo ambas un papel clave en la hidrólisis de los macronutrientes. La pancreatina incluye proteasas (tripsina, quimotripsina, elastasa y carboxipeptidasas) que hidrolizan los oligopéptidos a péptidos de menor tamaño molecular, también amilasas, que degradan los carbohidratos digeribles (sobre todo almidón) a oligosacáridos, y lipasas, que hidrolizan las grasas. En este último caso, las sales biliares emulsionan las grasas aumentando su área superficial y permitiendo que las lipasas, con ayuda de las colipasas, hidrolicen los triglicéridos a monoglicéridos y ácidos grasos libres. La mucosa del intestino delgado también interviene en la hidrólisis de los macronutrientes, ya que las células de las paredes del intestino (enterocitos) presentan enzimas de membrana, conocidas como “enzimas de borde de cepillo”, que hidrolizan, en concreto, oligopéptidos a péptidos de 2-3 aminoácidos o a aminoácidos libres, y oligosacáridos y disacáridos a sus monómeros correspondientes. Posteriormente, los productos de hidrólisis son absorbidos por las células de

las paredes del intestino (Engelking, 2015 a; Engelking, 2015 b; Bhutia & Ganapathy, 2018). Al término de la etapa intestinal, ya se ha producido la hidrólisis y absorción de la mayor parte de los nutrientes de los alimentos, quedando tan solo aquellos que por su naturaleza química escapan a las enzimas digestivas y/o a los enterocitos.

La parte final del tracto digestivo es el intestino grueso o colon, en el que las condiciones son de anaerobiosis y el pH se encuentra entre 7 y 8. A este tramo llegan aquellos nutrientes o fragmentos de estos que no han sido digeridos o absorbidos en etapas previas del tracto digestivo. Este ambiente es idóneo para el desarrollo de la población de microorganismos que conforman la microbiota colónica, la cual metaboliza los nutrientes presentes en esta última etapa. La fermentación de estos nutrientes produce una serie de metabolitos que las bacterias del colon utilizan como fuente de energía y de carbono (Wang *et al.*, 2019). Los principales sustratos de la microbiota del colon son los carbohidratos no digeribles entre los que se encuentran la fibra, celulosa, hemicelulosa, pectinas, gomas y alginatos. La fermentación de estas macromoléculas produce ácidos grasos de cadena corta, conocido comúnmente en inglés como “short chain fatty acid (SCFA)”, mayoritariamente acetato, butirato y propionato; y gases, como el hidrógeno y el dióxido de carbono (Koh *et al.*, 2016). Cuando existe limitación de carbohidratos, la microbiota fermenta sustratos proteicos que producen compuestos sulfurados, compuestos n-nitrosos, amoníaco, aminas heterocíclicas y ácidos grasos de cadena ramificada (“branched-chain fatty acids” o BCFA). Por último, la mayoría las grasas suelen ser hidrolizadas y absorbidas en el intestino delgado sin llegar a alcanzar la región del colon. No obstante, cuando el consumo de grasa es elevado, la secreción de sales biliares también lo es, y parte de estas pueden llegar al colon y ser metabolizadas por la microbiota a sales biliares secundarias (Louis *et al.*, 2014). De los metabolitos principales generados por la microbiota, los SCFA parecen estar relacionados positivamente con la salud humana, mientras que los compuestos sulfurados y las sales biliares secundarias parecen tener un efecto nocivo en la salud del individuo (Louis *et al.*, 2014; Koh *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2019).

Pese a la reconocida importancia que tiene la composición y actividad de la microbiota del colon en términos de salud humana, existen limitaciones a la hora de estudiar la influencia de la alimentación sobre la microbiota, y de la microbiota sobre los alimentos consumidos. Como se ha explicado anteriormente, la digestión es un proceso complejo en el que intervienen diversos factores fisiológicos, como secreciones de fluidos (saliva, fluido gástrico, pancreatina, bilis), movimientos peristálticos (que promueven la desintegración del alimento), o la acción metabólica de la microbiota, entre otros (McDonald, 2013). A esta complejidad, se suma la difícil accesibilidad *in vivo* al aparato digestivo para estudiar el proceso de digestión *in situ*. Adicionalmente, los estudios clínicos en humanos implican restricciones éticas y no siempre permiten controlar las variables del proceso (Macfarlane &

Macfarlane, 2007). Por estas razones, se han desarrollado metodologías alternativas para abordar la digestión de los alimentos. Entre ellas, destacan los modelos de digestión *in vitro*, que permiten reproducir en el laboratorio las condiciones fisiológicas del proceso de digestión, y simular la digestión de diversos alimentos (Venema *et al.*, 2013). Los modelos de digestión *in vitro* permiten el abordaje de muy diversos objetivos de investigación, tales como digestibilidad de macronutrientes, bioaccesibilidad de compuestos bioactivos, interacciones fármaco-nutriente o nutriente-nutriente, liberación de metabolitos microbianos o el efecto de las condiciones gastrointestinales en la digestibilidad. En función de estos objetivos, se selecciona el modelo de estudio a emplear y se definen las variables de proceso (Macfarlane & Macfarlane, 2007). Además, estas últimas deberán adaptarse según el contexto *in vivo* que se plantee simular, ya sean las condiciones estándares de un individuo sano, o las distintas adaptaciones a contextos específicos, como, por ejemplo, enfermedades crónicas o agudas (insuficiencia pancreática, celiacía, infecciones etc.), estados fisiológicos (embarazo) o momentos vitales concretos (infancia, niñez, vejez). Algunos ejemplos de las variables clave que se deben tener en cuenta, por su demostrado papel determinante en la digestión, incluyen el pH, la duración de cada etapa, la composición de los fluidos digestivos, la simulación en estático o en dinámico y la composición de la microbiota. Si bien existen numerosos estudios de digestibilidad de nutrientes en modelos de digestión *in vitro* que simulan las etapas oral, gástrica y duodenal (Minekus *et al.*, 1995), aquellos que incorporan la simulación de la fase colónica son relativamente emergentes (Barroso *et al.*, 2015), además de no permitir la fácil comparación de resultados por la diversidad de metodologías y equipos de digestión colónica empleados.

Así pues, el objetivo de esta revisión es recopilar y contrastar las metodologías utilizadas en estudios previos de digestión colónica de alimentos, prestando especial atención a los protocolos y técnicas para la simulación de la microbiota y para la detección y seguimiento de los metabolitos generados. El fin último es proporcionar soporte a la hora de plantear estudios *in vitro* de digestión colónica.

## **2. COMPOSICIÓN Y DIVERSIDAD DE LA MICROBIOTA COLÓNICA**

Como se ha anticipado, el papel de la microbiota del colon es determinante en la modulación de la digestión colónica de los alimentos y la eventual función biológica de sus componentes.

La microbiota colónica alberga microorganismos representativos de todos los dominios taxonómicos: bacterias (que son las más predominantes), arqueas y eucariotas (por ejemplo las levaduras). En concreto, la mayoría de

las bacterias de la microbiota colónica pertenecen a cinco filos: Bacteroidetes, Firmicutes, Proteobacterias, Actinobacterias y Verrucomicrobia, de entre los cuales, los dos primeros son los más abundantes (Flint, 2020) (**Tabla 1**). Los Bacteroidetes son bacterias anaerobias estrictas que se encuentran en gran proporción en el colon (10 – 40%), entre las que destacan los géneros *Bacteroides*, *Prevotella*, *Alistipes* y *Parabacteroides*, entre otros (Gibiino *et al.*, 2018). Sus funciones metabólicas incluyen la degradación de carbohidratos, ya que presentan genes que codifican la síntesis de enzimas para la hidrólisis de una gran cantidad de carbohidratos presentes en la pared de células vegetales. Además, se les relaciona con la modulación del sistema inmune y la regulación de la relación cerebro-colon, ya que producen hormonas o neurotransmisores. Por otro lado, los Firmicutes son bacterias anaerobias obligadas abundantes en el colon (20 – 70%). También hay evidencias de que las bacterias de este filo tienen capacidad para degradar carbohidratos, siendo algunas de ellas específicas para la hidrólisis de carbohidratos concretos (*Ruminococcus bicirculans* es degradadora de  $\beta$ -glucanos o *Ruminococcus champanellensis*, de celulosa). Además, las pertenecientes a los géneros *Faecalibacterium prausnitzii*, *Roseburia* spp., *Eubacterium rectale*, *Anaerostipes* spp. y *Ruminococcus* spp. destacan por ser productoras de butirato (Sheridan *et al.*, 2016), mientras que *Lactobacillus* spp. y otras bacterias ácido-lácticas lo son de ácido láctico. Sin embargo, ambos filos incluyen bacterias reconocidas como patógenas, como es el caso de *Bacteroides fragilis* en el filo Bacteroidetes y *Streptococcus*, *Enterococcus* y *Clostridium* en el filo Firmicutes, que se encuentran presentes en la microbiota de los individuos sanos, pero a concentraciones bajas (Flint, 2020).

Si hubiera cambios en el ecosistema, debidos por ejemplo al consumo de antibióticos, estos podrían derivar en un desequilibrio en la composición, diversidad y cantidad de bacterias colónicas, estado que se conoce como disbiosis. En ese caso, las bacterias patógenas poco representadas podrían proliferar. Cuando esto ocurre, es frecuente observar un aumento en la predominancia del filo Proteobacterias (como *Samonella typhimuriumy*, *Shigella dysenteriae* y *Escherichia coli*), bacterias anaerobias facultativas que en el colon de los individuos sanos representan entre el 1 y el 5 % del total. Su presencia elevada tiene consecuencias negativas para el huésped, ya que se asocia a ciertas enfermedades, como la inflamación del intestino o el cáncer colorrectal (Litvak *et al.*, 2017). Por último, las Actinobacterias y Verrucomicrobias son bacterias anaerobias, muy poco abundantes en el colon humano (< 1 – 5 %) (Flint, 2020). Pese a su escasa presencia, tienen implicaciones positivas en la salud. En concreto, en las Actinobacterias destaca, sobre todo en niños, el género *Bifidobacterium*. Son productoras de SCFA (acetato) y de lactato, que posteriormente es metabolizado por bacterias ácido-lácticas (por ejemplo, *Lactobacillus* spp.) a butirato. Estos compuestos se relacionan con la expresión de genes que contribuyen al mantenimiento del buen estado de la pared intestinal. También se les atribuye

relación con el desarrollo de la función inmunitaria, el metabolismo y el eje cerebro-colon (Binda *et al.*, 2018). En el caso de Verrucomicrobia, la única especie que representa este filo en el colon humano es *Akkermansia muciniphila* y por ello, seguramente exprese proteínas únicas en el ecosistema colónico. Esta especie destaca por ser degradadora de mucina (glucoproteínas de alto peso molecular que forman el moco que recubre el epitelio intestinal) liberando productos que pueden ser metabolizados por otras bacterias. Por ello, en ausencia de carbohidratos derivados de la dieta, las mucinas pueden ser una fuente constante de nutrientes. Además, también se les atribuyen propiedades antiinflamatorias (Derrien *et al.*, 2017).

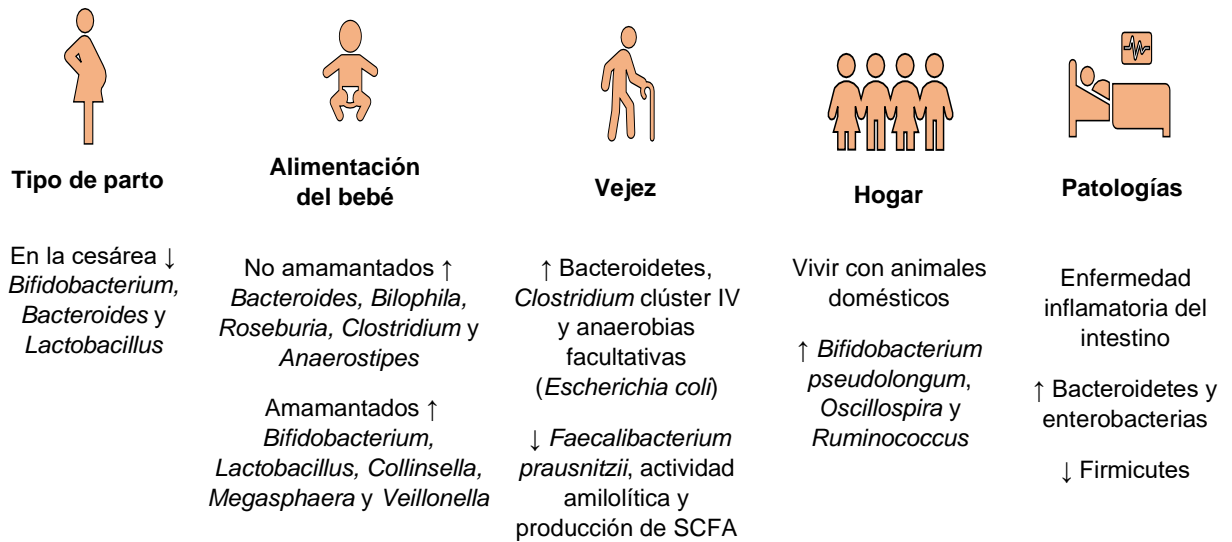
**TABLA 1.** Principales filios de bacterias presentes en el colon humano

	<b>Función principal</b>	<b>Ejemplos</b>	<b>Referencias</b>
<b>Bacteroidetes</b> 10 – 40%	Hidrólisis de carbohidratos complejos derivados de plantas. Modulación del sistema inmune y de la relación cerebro-colon (productoras de hormonas y neurotransmisores).	<i>Bacteroides</i> , <i>Prevotella</i> , <i>Alistipes</i> y <i>Parabacteroides</i>	Gibiino <i>et al.</i> , 2018 Flint, 2020
	Cierta patogenicidad	<i>Bacteroides fragilis</i> (su toxina está relacionada con la carcinogénesis colorrectal)	
<b>Firmicutes</b> 20 – 70%	Hidrólisis de carbohidratos complejos derivados de plantas	<i>Ruminococcus bicirculans</i> (degradadora de $\beta$ -glucanos) y <i>Ruminococcus champanellensis</i> (degradadora de celulosa)	Steck <i>et al.</i> , 2011 Sheridan <i>et al.</i> , 2016 Flint, 2020
	Cierta patogenicidad	<i>Enterococcus faecalis</i> (contribuye a la inflamación crónica del intestino)	
<b>Proteobacteria</b> 1 – 5%	Patógenas (aumentan en ciertas enfermedades como la inflamación del intestino o el cáncer colorrectal)	<i>Samonella typhimuriumy</i> , <i>Shigella dysenteriae</i> y <i>Escherichia coli</i>	Litvak <i>et al.</i> , 2017 Flint, 2020
<b>Actinobacteria</b> < 1 – 5%	Mantenimiento del buen estado de la pared intestinal (regulación de la síntesis de mucina y la expresión de las uniones estrechas del epitelio). Desarrollo de la función inmunitaria y la relación cerebro-colon.	<i>Bifidobacterium</i>	Binda <i>et al.</i> , 2018 Flint, 2020
<b>Verrucomicrobia</b> <1 – 5%	Degradadora de mucina. Propiedades antiinflamatorias mediante la regulación del sistema inmune.	<i>Akkermansia muciniphila</i>	Derrien <i>et al.</i> , 2017 Flint, 2020

A pesar de que la caracterización de especies que conforman la microbiota se asienta sobre la evidencia científica, y se pueden establecer generalidades, existe una gran diversidad de factores que hacen que el perfil de la microbiota de cada individuo sea específico (Thursby & Juge, 2017) (**Figura 1**). En ocasiones, la microbiota es resistente a los factores alterantes y no sufre



variaciones. Sin embargo, la microbiota puede ser sensible a las perturbaciones y experimentar cambios composicionales debidos a éstas (disbiosis). Aun así, estos cambios no siempre desencadenan un estado de disbiosis, ya que la microbiota presenta redundancia funcional, es decir, existen diversos microorganismos capaces de desarrollar la misma función. Es por ello que el perfil de los individuos sanos es específico y variable (Sommer *et al.*, 2017).



**FIGURA 1.** Factores que afectan a la diversidad relativa de la microbiota del colon

Por un lado, la microbiota del colon puede experimentar cambios debido a factores intrínsecos al individuo. Por ejemplo, la edad (Jeffery, *et al.*, 2016), el estado fisiológico (Koren *et al.*, 2012) o la presencia de patologías (Carding *et al.*, 2015), entre otros. En referencia a la edad, los ancianos presentan un mayor riesgo de sufrir alteraciones en el tracto gastrointestinal. Especialmente porque se produce la reducción de la dentición, el empeoramiento de la habilidad para masticar y la disminución del tiempo de tránsito intestinal, que junto con las variaciones en la dieta suponen un cambio en la microbiota del colon (Jeffery, *et al.*, 2016). A su vez, ciertos estados fisiológicos, como el embarazo (Koren *et al.*, 2012), y los estados patológicos, como la enfermedad inflamatoria del intestino (Carding *et al.*, 2015), también son factores que determinan la composición, funcionalidad y estabilidad de la microbiota. Por otro lado, existen factores extrínsecos al individuo que provocan alteraciones en la microbiota del colon. Estos también se conocen como ambientales o relacionados con el entorno. Por ejemplo, el tipo de parto (Bäckhed *et al.*, 2015) o la presencia de mascotas en el hogar (Kim *et al.*, 2019). En ese caso, es el ecosistema de cada individuo sano el que modula su composición microbiana y provoca su variabilidad. La microbiota viene determinada

prácticamente desde el nacimiento. En el parto, parte de esta es transferida de la madre al hijo, aunque recientemente hay estudios que sugieren que la colonización empieza incluso antes del nacimiento, cuando el bebé está todavía en la placenta del útero materno (Walker *et al.*, 2017). Así pues, el tipo de parto es uno de los principales factores que determinan de forma temprana la composición de la microbiota, ya que la exposición a las bacterias de la vagina de la madre difiere de la del ambiente a la que se exponen los recién nacidos por cesárea (Bäckhed *et al.*, 2015). Además, el tipo de alimentación del neonato, amantado o alimentado con leches comerciales, sigue determinando la composición de la microbiota, ya que la leche materna contiene bacterias como *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, y oligosacáridos que crean un ambiente complejo que puede ser más efectivo para el desarrollo del colon del bebé que las leches comerciales (Kim *et al.*, 2019). Después de que en los primeros meses de vida se hayan asentado las colonias de microorganismos que prevalecerán en el colon de cada individuo, existen otros factores ambientales que pueden modular esa microbiota, como son el estilo de vida (actividad física, alimentación, hábitos) y el hábitat de este. De hecho, según estudios previos, es posible encontrar más similitudes entre personas no emparentadas que comparten un hogar, que entre personas sí emparentadas y que viven en lugares diferentes (Rothschild *et al.*, 2018).

De entre los citados factores ambientales, la alimentación (o el tipo de dieta) es uno de los de mayor impacto sobre la microbiota colónica (Scott *et al.*, 2013), y además, a diferencia del tipo de parto u otros factores, puede modificarse, y utilizarse como herramienta para modular la composición de la microbiota. Por ello, el efecto de la alimentación a largo plazo sobre las poblaciones de microorganismos que conforman la microbiota y su respuesta resulta de gran interés. Mientras que se conoce que una dieta rica en fibra favorece el crecimiento de bacterias beneficiosas como los lactobacilos (Carvalho-Wells *et al.*, 2010), son innumerables las interacciones alimento-microbiota que quedan por describir. De esta manera, se justifican los numerosos estudios actuales encaminados a generar conocimiento en este campo.

### **3. DIETA Y MICROBIOTA**

Como se ha explicado en el apartado anterior, la dieta es uno de los factores ambientales más importantes y que más influye en la composición de la microbiota colónica. Los alimentos que conforman la dieta determinan los sustratos que alcanzan el colon y que son metabolizados preferentemente por ciertos grupos poblacionales de bacterias (Scott *et al.*, 2013). Por ello, la presente sección recopila las evidencias científicas más recientes en relación al binomio dieta-microbiota.

El efecto de los carbohidratos ha sido ampliamente estudiado, pues son la principal fuente de carbono y energía de la dieta tanto para las funciones fisiológicas individuo como para su microbiota (Singh *et al.*, 2017), si bien es necesario diferenciar entre los que utiliza el huésped y los que sirven de sustrato para el mantenimiento y crecimiento de la microbiota. Así, se denominan carbohidratos no digeribles a aquellos que, no siendo hidrolizados por las enzimas digestivas, alcanzan el colon en su forma nativa. Estos son metabolizados por la microbiota promoviendo su propio crecimiento y actividad y dando lugar a compuestos con efectos beneficiosos para la salud (Pandey *et al.*, 2015). Por esta razón, a los carbohidratos no digeribles se les atribuye la condición de prebióticos y, su consumo ha descrito un aumento en la cantidad de bifidobacterias o bacterias ácido-lácticas (Carvalho-Wells *et al.*, 2010). En cambio, los carbohidratos digeribles se hidrolizan antes de llegar al colon, generando como producto mono o disacáridos como la glucosa, fructosa, que se absorben en el intestino delgado. La naturaleza de estos azúcares provoca cambios diferentes en la composición de la microbiota. Por ejemplo, los azúcares de la fruta conllevan a un aumento de las bifidobacterias y una reducción de *Bacteroides* (Eid *et al.*, 2014), mientras que los edulcorantes artificiales no calóricos aumentan los *Bacteroides* (Suez *et al.*, 2014). Además, las dietas altas en carbohidratos digeribles, en general, suponen una pérdida en la diversidad de la microbiota del colon. En primer lugar, porque los carbohidratos digeribles son absorbidos en el intestino delgado, suponiendo un detrimento para las bacterias colónicas por la ausencia de sus sustratos (fibra dietética). En segundo lugar, una muy elevada presencia de carbohidratos digeribles en la dieta podría exceder la capacidad de absorción del intestino delgado, de forma que los carbohidratos digeribles alcanzarían el colon generando cambios composicionales, sobre todo el aumento de las bacterias sacarolíticas, no presentes habitualmente en la microbiota del colon (Jamar *et al.*, 2020).

De forma similar, el tipo de proteína y su procedencia puede afectar de distinto modo a la microbiota del colon. Las proteínas de origen animal no presentan la misma estructura ni composición que las de origen vegetal. Mientras que la proteína animal tiene un elevado contenido de aminoácidos esenciales, las legumbres, pese a que son abundantes en algunos aminoácidos esenciales (lisina o treonina), no incluyen los sulfurados (metionina, cisteína y triptófano) (Havemeier *et al.*, 2017). El consumo de una dieta alta en proteínas de origen animal y baja en carbohidratos parece estar asociada con el aumento en la producción de BCFA, (como el isobutirato, isovalerato y el ácido fenilacético) y compuestos n-nitroso, todos ellos metabolitos que aumentan el riesgo de sufrir enfermedades colorrectales (Russell *et al.*, 2011). Por ello, cabe esperar que también haya diferencias que sigan esta tendencia cuando se compara la microbiota de zonas urbanas de Europa y Estados Unidos con zonas rurales de África, ya que en las primeras se consume más proteína de origen animal (De Filippo *et al.*, 2010). De igual

forma, la composición en ácidos grasos de los triglicéridos también presenta implicaciones concretas. Así, el consumo de dietas con elevado aporte de grasas saturadas parece estar asociado con el aumento de *Alistipes* y *Bacteroides* y la disminución de *Faecalibacterium* y de la concentración total de SCFA producidos (Wan *et al.*, 2019). Sin embargo, el elevado consumo de grasas mono y poliinsaturadas no parece alterar la composición del microbioma intestinal (Urwin *et al.*, 2014). No obstante, es difícil determinar cuál es el efecto de un macronutriente determinado sobre la microbiota, ya que en la mayoría de casos las dietas ricas en proteínas presentan, por lo general, un elevado contenido en grasas saturadas y bajo en fibra (Singh *et al.*, 2017). Asimismo, el consumo de alcohol también parece estar implicado en cambios de la composición y la funcionalidad de la microbiota. De hecho, se relaciona con un aumento de las Proteobacterias y una disminución del género *Faecalibacterium* y de la producción de ácido butírico, todo ello ligado con una respuesta proinflamatoria (Bjørkhaug *et al.*, 2019).

Existe una gran diversidad en cuanto a los distintos tipos de dieta, bien sea por motivos culturales, económicos o agronómicos. Así, se ha visto incrementada la adherencia a las dietas en las que se suprime algún alimento, como es el caso de las vegetarianas (no incluye el consumo de carne y pescado) y las veganas (no incluye ningún alimento de origen animal como los lácteos, la miel y los huevos) (Phillips, 2005). Además, las dietas restrictivas son comunes como tratamiento de ciertas enfermedades, como la dieta sin gluten en la celiaquía (excluidos derivados del trigo y otros cereales) o la dieta sin lactosa (se excluyen leche, yogur, y derivados lácteos) o fructosa (fruta) en caso de trastornos en el metabolismo de carbohidratos (Singh *et al.*, 2017). Por otro lado, las condiciones agroclimáticas y la cultura de la región son dos factores clave que contribuyen al tipo de dieta que se sigue en un determinado territorio. Por ejemplo, la dieta occidental es alta en proteína y grasa animal pero baja en fibra; la dieta oriental, está basada principalmente en alimentos procedentes del mar (pescado y algas) y arroz (Singh *et al.*, 2017; Senghor *et al.*, 2018); y la mediterránea, propia de los países circundantes al Mar Mediterráneo, aporta proteínas de alto valor biológico de origen animal y vegetal (carne, pescado y legumbres), es alta en fibra (frutas y verduras) y en ácidos grasos mono y poliinsaturados (frutos secos) (Lopez-Legarrea *et al.*, 2014). Estas diferencias en el tipo de dieta consumida por distintos grupos poblacionales de dispares regiones geográficas se traducen en perfiles de composición de microbiota distintos según regiones (**Tabla 2**). Por otra parte, preocupa que el estilo de vida de las zonas urbanas e industrializadas provoque la disminución en la composición, diversidad y funcionalidad de la microbiota colónica. Parece que éstas, en comparación con los de las zonas no urbanizadas, tienen una mayor capacidad para degradar xenobióticos (procedentes de contaminantes ambientales), como por ejemplo el naftaleno, pero una menor capacidad de degradación de fibras

vegetales, lo que se relaciona con la disminución de las bacterias de ciertos géneros, como *Prevotella* y *Treponema* (Segata, 2015).

**TABLA 2.** El efecto de distintas dietas sobre la microbiota

Tipo de dieta y características	Regiones	Composición microbiana	Bibliografía
Dieta <b>occidental</b> ↑ Azúcares simples, proteína animal (carne) y grasas saturadas. ↓ Carbohidratos complejos y fibra.	Países desarrollados y zonas urbanas de Estados Unidos y Canadá	↑ Firmicutes, Proteobacteria <i>Lactobacillus</i> , <i>Faecalibacterium</i> y <i>Clostridium</i> clúster IV. ↓ Bacteroidetes, Verrucomicrobia <i>Bifidobacterium</i> , <i>Roseburia</i> <i>Eubacterium rectale</i> y <i>Bacteroides</i> .	Leo & Campos, 2020 Lee, 2013
Dieta <b>mediterránea</b> ↑ Carbohidratos complejos y fibra (vegetales, fruta, cereales), proteína de origen animal (pescado, lácteos, carne), vegetal (legumbres y algunos cereales) y ácidos grasos monoinsaturados (nueces). ↓ Grasas saturadas.	Países circundantes al mar mediterráneo. Otros países que han adaptado patrones dietéticos similares, como los países nórdicos.	↑ Bacteroidetes, <i>Bifidobacterium</i> , <i>Faecalibacterium prausnitzii</i> , <i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> y <i>Parabacteroides distasonis</i> . ↓ Firmicutes y <i>Escherichia coli</i> .	Krznaric <i>et al.</i> , 2019 Gutiérrez-Díaz <i>et al.</i> , 2016
Dietas basadas en prácticas <b>tradicionales</b> como la agricultura y la recolección ↑ Carbohidratos complejos y fibra (cereales autóctonos, vegetales, frutas) ↓ Azúcares simples, grasas, proteína animal	Sociedades africanas, rurales y no industrializadas.	↑ Bacteroidetes, <i>Prevotella</i> , <i>Treponema</i> , <i>Succinivibrio</i> y <i>Weissella</i> . ↓ Firmicutes, <i>Roseburia</i> , <i>Dorea</i> , <i>Bacteroides</i> , <i>Bifidobacterium</i> y <i>Alistipes</i> .	De Filippo <i>et al.</i> , 2017 De Filippo <i>et al.</i> , 2010
Dieta <b>oriental</b> ↑ Carbohidratos digeribles (arroz) y proteína animal (carne y pescado). ↓ Grasas saturadas	Países desarrollados y zonas urbanas de Asia.	↑ <i>Bacteroides</i> , <i>Prevotella</i> , <i>Bifidobacterium adolescentes</i> , <i>Butyrivibrio</i> , <i>Clostridium perfringens</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> .	Senghor <i>et al.</i> , 2018 Nam <i>et al.</i> , 2011

En general, la dieta es un factor clave para la modulación de la microbiota del colon y está muy implicada en el mantenimiento de un buen estado de salud. Cada vez son más las evidencias científicas que relacionan, tanto los desequilibrios en la microbiota colónica (disbiosis) como los metabolitos producidos por la misma, con diversas enfermedades (Carding *et al.*, 2015). Por un lado, se observa que los estados de disbiosis están relacionados con enfermedades inflamatorias del intestino, como es el caso de la enfermedad de Crohn o la colitis ulcerosa. Aunque todavía se desconoce si la disbiosis es causa directa o indirecta del desarrollo de la patología, los pacientes que sufren estas enfermedades presentan un desequilibrio en la estabilidad y funcionalidad de la microbiota. Esto se traduce en una disminución de *Firmicutes* y un aumento de bacterias anaerobias facultativas (Matsuoka & Kanai, 2015). También se ha observado disbiosis en otras enfermedades, como la celiaquía o el cáncer colorrectal, pero los cambios son menos consistentes (Carding *et al.*, 2015). Por otro lado, parece que la disbiosis también está relacionada con desordenes metabólicos como la obesidad o la diabetes de tipo 2 (Gurung *et al.*, 2020), ya que la microbiota colónica juega un papel importante en la obtención de energía desde la dieta, el almacenamiento de la grasa y la sensación de saciedad. Por último,

actualmente también hay evidencias de que la disbiosis está vinculada con anomalías externas al tracto gastrointestinal. En concreto, con el eje cerebro-colon que afecta al sistema nervioso central, al comportamiento y a la función cognitiva, causando ansiedad, depresión o autismo (Yarandi *et al.*, 2016).

Por tanto, las evidencias de que la alimentación modula la microbiota del colon y que, a su vez, esta está implicada en el buen estado de salud de los individuos, revela la necesidad de profundizar en el estudio de la alimentación sobre la microbiota del colon y desarrollar estrategias concretas y orientadas a una alimentación personalizada.

#### **4. MODELOS DE DIGESTIÓN COLÓNICA**

Para estudiar la relación entre el tipo de dieta y la microbiota del colon en el contexto de la digestión gastrointestinal, se pueden utilizar diversas metodologías. Si bien los estudios en humanos (*in vivo*) se presentan *a priori* como los más adecuados o representativos de la fisiología, estos van acompañados de numerosas limitaciones. Es por ello que los estudios de digestión *in vitro*, con sus múltiples ventajas, van ganando relevancia en el ámbito científico.

##### **4.1 Modelos de digestión *in vivo***

Los estudios de digestión *in vivo* son ensayos caros y largos, en los que se utilizan sujetos vivos (animales o humanos) sanos o que presentan ciertas patologías. Asimismo, estos estudios muestran una gran dificultad a la hora de la obtención de muestras, ya que estas se realizan durante la digestión gastrointestinal, siendo más dificultoso debido a su inaccesibilidad en cualquier punto del proceso, incluyendo la parte del colon. La aplicación de estudios *in vivo* también implica considerar ciertas restricciones éticas (Macfarlane & Macfarlane, 2007). Aun así, los modelos *in vivo* tienen una gran importancia biológica y fisiológica, pues involucran al huésped y, por tanto, tienen en cuenta la influencia del mismo sobre la microbiota. Pese a ello, en la mayoría de los casos la variabilidad individual presente en cada organismo dificulta la extracción de conclusiones, pues es complicado determinar si los cambios en la composición y funcionalidad de la microbiota son causa directa de la intervención, o es esta la que provoca alteraciones en el huésped que indirectamente repercuten en la microbiota (McDonald, 2013). En los estudios *in vivo* en humanos, se deben considerar ciertas pautas y restricciones durante los ensayos clínicos (Sousa *et al.*, 2008) y por ello, se limitan al análisis de muestras fecales. No obstante, cabe destacar que la microbiota presente en las muestras fecales únicamente es representativa de la parte distal del colon (descendente y sigmoide), por lo que no aporta información sobre el colon ascendente. La composición y la funcionalidad de microbiota

en las distintas partes del colon varía en función de la accesibilidad de nutrientes, el pH o el tiempo de retención (Macfarlane *et al.*, 1992). Las complicaciones que presentan los estudios *in vivo* en humanos, en cuanto a sus restricciones éticas y su dificultad para la toma de muestras, han llevado a realizar estudios *in vivo* en modelos animales, en los que comúnmente se han utilizado ratones, ratas o cerdos. Estos estudios también se pueden realizar en animales que presentan una microbiota en la que se han implantado microorganismos específicos (gnotobióticos) o la microbiota obtenida en muestras fecales humanas (microbiota asociada) (McDonald, 2013). Los ensayos con animales son largos y caros, ya que se requiere de una infraestructura adecuada para criarlos. Asimismo, cabe destacar que existen restricciones éticas que implica el uso de seres vivos para estudios de digestibilidad. La ventaja es que los experimentos son más controlados, pues se puede modificar el entorno del animal o su genética. Además, la toma de muestras se realiza de manera invasiva, e incluso se recurre al sacrificio para extraer muestras de distintas zonas del colon (Macfarlane & Macfarlane, 2007).

Pese a todas las ventajas que presentan los estudios *in vivo* en animales frente a humanos, los resultados obtenidos en los ensayos con animales podrían diferir de los obtenidos en humanos por distintas razones. En primer lugar, la fisiología del aparato digestivo y el sistema inmune de los animales es diferente de la de los humanos (Payne *et al.*, 2012). Por otro lado, la microbiota de los animales también es diferente a la de los humanos, incluso cuando se trabaja con animales gnotobióticos (a los que se les han implantado microorganismos específicos) o con microbiota humana asociada (Arrieta *et al.*, 2016). Además, hay factores ambientales que podrían alterar la microbiota de los animales como son la edad, el sexo, el sistema de cría, el estrés fisiológico o el tipo de alimentación (Hufeldt *et al.*, 2010).

#### **4.2 Modelos de digestión *in vitro***

Una alternativa al uso de los modelos de digestión *in vivo* son los modelos *in vitro*. Las metodologías de digestión *in vitro* se han desarrollado para tratar de minimizar las limitaciones y ofrecer ciertas ventajas frente a los modelos *in vivo*. Se trata de sistemas en los que se lleva a cabo la simulación del proceso gastrointestinal, incluyendo la fermentación colónica, fuera del huésped. Para la reproducción de la etapa de digestión colónica en el laboratorio, se utiliza una disolución fecal representativa de la microbiota colónica. Asimismo, y dependiendo del objetivo del estudio, también se pueden utilizar colonias de microorganismos aisladas. Por ejemplo, este es el caso en los estudios en los que se quiere evidenciar las propiedades probióticas de ciertas bacterias ácido lácticas. Además, los estudios *in vitro* son menos caros y más rápidos que estudios *in vivo* (Venema *et al.*, 2013). Estos sistemas no presentan implicaciones éticas por lo que se pueden utilizar para hacer cualquier tipo de

ensayo de digestión, con diferentes componentes dietéticos o fármacos, realizando muestreos en cualquier punto del proceso, y comprobando el efecto que tienen sobre la composición y la funcionalidad de la microbiota (Macfarlane & Macfarlane, 2007; Payne *et al.*, 2012).

Si bien los modelos de digestión *in vitro* han sido ampliamente utilizados en la última década para el estudio de digestibilidad de nutrientes, estos se han limitado a la simulación de las etapas oral, gástrica e intestinal (intestino delgado). El auge de esta metodología ha sido tal, que se estableció un protocolo internacionalmente consensuado que armoniza y sintetiza cuáles deben ser las condiciones estándar a reproducir cuando se lleva a cabo un estudio de digestión *in vitro* (Minekus *et al.*, 2014). Esta línea de actuación común permitió, por un lado, trabajar *in vitro* en condiciones sencillas, pero no simples, incluyendo los parámetros más relevantes, y por otro, comparar los resultados obtenidos en diferentes estudios gracias a la utilización de una metodología común. Recientemente, dicho protocolo se ha actualizado a las nuevas evidencias (Brodkorb *et al.*, 2019), y se ha adaptado para simular el proceso teniendo en cuenta ciertas consideraciones fisiológicas como por ejemplo el vaciado gástrico (Mulet-Cabero *et al.*, 2020). En el marco de estos protocolos numerosas líneas de investigación han adoptado estas metodologías. Sin embargo, la simulación de la etapa colónica en modelos de digestión *in vitro* sigue siendo un ámbito poco explorado y consensuado, posiblemente debido a la complejidad que implica reproducir una población microbiana.

En general, los sistemas de simulación de la digestión del colon *in vitro* se pueden diferenciar en estáticos y dinámicos. Los estáticos son los más simples, sencillos y baratos, pues no requieren de equipamiento específico. Para simular la digestión colónica, se hace servir un biorreactor en el que se introduce el inóculo fecal, el medio de cultivo y se lleva a cabo la fermentación en las condiciones adecuadas que simulan el colon humano. Trabajan en discontinuo, lo que quiere decir que nada entra ni sale del reactor mientras la fermentación está en marcha. Por tanto, como no hay entrada de medio de cultivo fresco, los sustratos se agotan y los productos y desechos se acumulan con el avance de la fermentación. Esto provoca un cambio en las condiciones ambientales de pH, temperatura y potencial de oxidación y reducción que, finalmente, repercute deteniendo el crecimiento y la actividad microbiana. Por tanto, el uso de estos sistemas se reduce a unas 4 horas y se utiliza únicamente para estudiar el metabolismo de la microbiota a tiempos cortos o bien para analizar la influencia del uso de distintas fuentes de carbono (Payne *et al.*, 2012; Venema *et al.*, 2013).

Los simuladores de la digestión del colon dinámicos son más complejos y caros que los estáticos y, además, trabajan en continuo por lo que la microbiota del inóculo fecal se adapta a las condiciones ambientales y alcanza el estado estacionario (Dupont *et al.*, 2019). Una vez se alcanza el estado



estacionario, los cambios observados en la composición y funcionalidad del microbioma conforme avanza el tiempo pueden atribuirse a los tratamientos aplicados y no a la adaptación a las condiciones ambientales. Esta característica hace que los modelos dinámicos sean más representativos de las condiciones en el huésped y más reproducibles. Por ello, es muy importante que la microbiota se aclimate y alcance el estado estacionario de crecimiento antes de someterla a cualquier estudio. Para poder alcanzar el estado estacionario, se introduce en el sistema aproximadamente un 25% de inóculo fecal y se añade medio de cultivo para permitir que el inóculo se adapte. Después, se deja en condiciones de inanición a la microbiota durante aproximadamente 2 horas para asegurar que no quedan carbohidratos que puedan ser fermentados en el interior del reactor. Pasado ese tiempo, ya se puede añadir el medio de cultivo para iniciar el experimento (Aguirre *et al.*, 2014; Aguirre *et al.*, 2015). Los medios de cultivo utilizados están formados generalmente por sustratos proteicos (caseína y peptona), carbohidratos complejos no digeribles (peptina, xilano, arabinogalactano y almidón resistente), sales biliares, minerales y vitaminas (Martínez-Cuesta *et al.*, 2019).

Hasta la fecha, se han desarrollado diferentes digestores *in vitro* que trabajan en dinámico (**Tabla 3**). Estos simuladores presentan distintos diseños, controlan las variables del proceso digestivo y pueden presentar un solo compartimento (monoetapa) o varios (multietapa) para la simulación de la fase colónica, simulando en cada uno de ellos las condiciones temporales y ambientales de las distintas regiones del colon (ascendente, transversal y descendente). En aquellos simuladores de la digestión que únicamente presentan un compartimento solo se simula una región del colon, que suele ser el colon proximal (ascendente y transversal) (Payne *et al.*, 2012), aunque también podría simularse la parte distal (descendente y sigmoide). Estos sistemas fueron descritos por primera vez por Miller y Wolin (1981) y se han ido adaptando y actualizando con el tiempo; estos son algunos ejemplos: TIM-2 (Minekus *et al.*, 1999), PolyFermS (Berner *et al.*, 2013), EnteroMix (Makivuokko *et al.*, 2005) o Lacroix (Cinquin *et al.*, 2006). En cambio, los simuladores dinámicos de varios compartimentos permiten simular varias partes del intestino grueso: el colon ascendente, trasverso y descendente. En cada uno de los compartimentos se simula un pH, un tiempo de retención y un volumen característico acorde con las condiciones de las distintas regiones del colon (Macfarlane *et al.*, 1992). La alineación de los tres compartimentos permite una alimentación secuencial, es decir, que el alimento pase en orden desde los primeros compartimentos a los últimos. Por ello, los dos primeros compartimentos presentan una mayor disponibilidad de sustratos y un pH más ácido (entre 5-6) y el último, una menor disponibilidad de sustratos y un pH más básico (entre 6-7), lo que es característico del colon proximal y distal respectivamente. En concreto, en el colon proximal, que incluye las regiones del colon ascendente y transversal, el género *Bacteroides* es el más

representativo ya que se caracteriza por ser capaz de metabolizar una amplia variedad de carbohidratos. En el distal, que incluye la región descendente del colon, predominan algunas de las bacterias productoras de butirato, como por ejemplo *Ruminococcus*, mientras que otras están presentes por igual en el colon proximal y distal, como es el caso de *Blautica coccooides* o *Eubacterium rectale* (Martínez-Cuesta *et al.*, 2019). El primer digestor dinámico multietapa de la parte colónica fue el desarrollado por Gibson, Cummings & Macfarlane (Gibson *et al.*, 1988), al que posteriormente se le han hecho ciertas adaptaciones. Además, algunos de los modelos *in vitro* incluyen, no solo la simulación dinámica de la digestión de colon, sino también la simulación del proceso gastrointestinal (digestión gástrica y duodenal) que tienen lugar antes de llegar al colon. Los simuladores que presentan estas características son: la combinación de TIM-1 y TIM-2 (Minekus *et al.*, 1995; Minekus *et al.*, 1999), el SHIME (Molly *et al.*, 1993) y el SIGMI (Barroso *et al.*, 2015). Asimismo, algunos de los simuladores contienen la opción de estudiar dos muestras en paralelo como es el caso de Twin-SHIME (McDonald, 2013).

Otra de las peculiaridades que incluyen algunos de los simuladores dinámicos es la utilización de una microbiota fecal inmovilizada. Como se ha comentado, en los simuladores colónicos se inocula una microbiota fecal que debe adaptarse para ser representativa de la microbiota colónica *in vivo*. Pero, cuando dicha microbiota fecal se inocula líquida las bacterias se encuentran libres y, por un lado, las menos competitivas puedan ser lavadas y eliminadas del sistema, lo que limita el tiempo del estudio a unas 4 semanas. Por otro, no se contemplan las bacterias que *in vivo* se encuentran asociadas a la mucosa (Payne *et al.*, 2012). Esas son las razones por las cuales algunos sistemas simulan la microbiota asociada a la mucosa, como el M-SHIME (Van den Abbeele *et al.*, 2012), el PolyFermS (Berner *et al.*, 2013) o el Lacroix (Cinquin *et al.*, 2006). Por ejemplo, en el M-SHIME se utilizan unas perlas de 1-2 mm de diámetro de un material poroso, como son la goma xantana o gella, que simulan la mucosa del colon y permiten crecer a una población de bacterias que se encuentra asociada a esta. De este modo, se evita que estas bacterias sean lavadas y permite su intervención durante todo el proceso de fermentación. Para la simulación de la mucosa del colon, las perlas con la microbiota asociada se transfieren al primer compartimento junto con medio de cultivo. Las bacterias crecen sobre todo en la periferia de las perlas, donde hay más concentración de sustratos, hasta que su densidad es suficientemente grande para que se desprendan y puedan pasar a los compartimentos siguientes. De esta forma el tiempo de ensayo se alarga hasta los 71 días (Cinquin *et al.*, 2004). Se han hecho diversos estudios para determinar la microbiota en los sistemas que simulan la mucosa intestinal y sus diferencias con los sistemas que únicamente simulan el ambiente luminal. Por ejemplo, en el estudio publicado por Van den Abbeele *et al.* (2012) en el que utilizaron el simulador M-SHIME, determinaron que el ambiente luminal de estos sistemas estaba enriquecido con Bacteroidetes y Proteobacterias

mientras que la mucina lo estaba con Firmicutes, en concreto el *Clostridium* clúster XIVa, con especies como *Roseburia intestinalis* y *Eubacterium rectale*. En cambio, Rajilic-Stojanovic *et al.* (2010) observaron en el sistema TIM-2, que carece de ambiente mucosal, un decrecimiento de algunos Firmicutes, entre los que se encontraba *Clostridium* clúster XIVa.

**TABLA 3.** Características del diseño y funcionamiento de los digestores colónicos *in vitro* dinámicos

	Tipo y compartimentos	Secreciones y agitación	pH y anaerobiosis	Inmovilización microbiota	Características específicas	Referencias
<b>TIM-2</b>	Monoetapa Colon proximal (CA/CT)	No hay secreciones. Agitación por movimientos peristálticos.	pH de 5.8 (CA/CT) Flujo de N <sub>2</sub>	No	Posibilidad de trabajar en paralelo.	Minekus <i>et al.</i> , 1999 Minekus, <i>et al.</i> , 1995
<b>PolyFermS</b>	Monoetapa Colon proximal (CA/CT)	No hay secreciones. Agitación n/a.	pH 5.7(CA/CT) Flujo de CO <sub>2</sub>	Sí	n/a	Berner <i>et al.</i> , 2013
<b>Lacroix</b>	Multietapa Tres: CA, CT y CD	No hay secreciones. Agitación magnética.	pH 5.9 CA, 6.2 CT y 6.6 CD. Flujo de CO <sub>2</sub>	No	Se utiliza para la simulación del colon de niños.	Cinquin <i>et al.</i> , 2006
<b>EnteroMix</b>	Multietapa Cuatro: CA, CT, CD y CDis	No hay secreciones. Agitación n/a.	pH 5.5 CA, 6 CT, 6.5 CD y 7 CDis Flujo de N <sub>2</sub>	No	Trabaja con volúmenes pequeños.	Makivuokko <i>et al.</i> , 2005
<b>SHIME</b>	Multietapa Cinco: 2ID (duodeno/yeyuno e íleon), CA, CT y CD	Secreciones pancreáticas y biliares en ID. Agitación magnética.	pH 5.5-6 CA, 6-6.4 CT, 6.4-6.8 CD. Flujo de N <sub>2</sub>	Sí (M-SHIME): permite simular y estudiar la adhesión de la microbiota a la mucina	Posibilidad de trabajar en paralelo	Molly <i>et al.</i> , 1993 Van den Abbeele <i>et al.</i> , 2012
<b>SIGMI</b>	Multietapa Cinco: E, ID, CA, CT, CD.	Secreciones gástricas y ácido en E y pancreáticas y biliares en ID. Agitación por movimientos peristálticos en E y magnética en el ID.	pH 5.6 CA, 6.3 CT y 6.8 CD (± 0.2) Flujo de N <sub>2</sub>	No	n/a	Barroso <i>et al.</i> , 2015

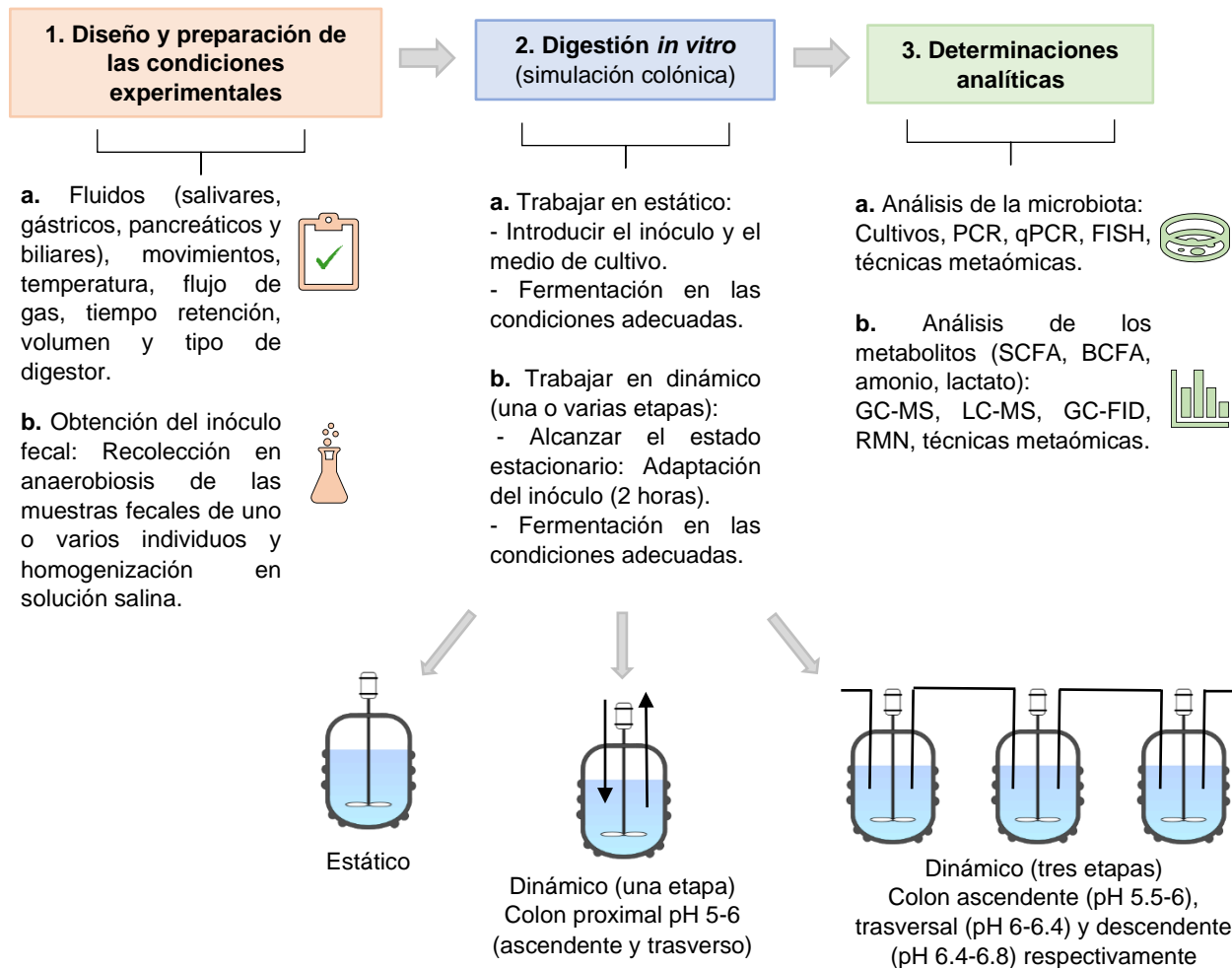
CA: Colon ascendente, CT: Colon transversal, CD: Colon descendente, CDis: Colon distal, E: Estómago, ID: Intestino delgado.

A pesar de todas las modificaciones que se han ido realizando para adaptar estos simuladores de la digestión lo máximo posible a la realidad, persisten ciertas limitaciones. Se debe tener presente que estos sistemas son una adaptación simplificada de los procesos fisiológicos *in vivo*, aunque se tengan en cuenta los factores más representativos y determinantes. En concreto, la principal desventaja de estos sistemas en comparación con los modelos *in vivo* es que carecen de un ambiente fisiológico, por lo que no se

evalúan las relevantes interacciones huésped-microbiota, por ejemplo, con las células intestinales o con el sistema inmunitario (Payne *et al.*, 2012). Asimismo, los parámetros de las condiciones fisiológicas utilizados para conseguir el crecimiento de las bacterias fecales corresponden a datos obtenidos en estudios realizados en personas sanas, pero estos podrían cambiar cuando se trate de personas que padezcan alguna patología. Por este motivo, es necesario optimizar las condiciones del ensayo y adaptarlas según el objeto de estudio, y a la situación fisiológica propia del contexto del estudio (Venema *et al.*, 2013). Por último, es importante que los modelos de simulación *in vitro* sean posteriormente validados *in vivo* para conseguir la máxima fiabilidad de los resultados obtenidos. En la mayoría de casos, no se llega a obtener la validación *in vivo*, en primer lugar, por las restricciones éticas y en segundo lugar por la baja probabilidad de encontrar una población de estudio cuya microbiota sea representativa de la simulada en el laboratorio. No obstante, esta validación es necesaria, para que los sistemas *in vitro* sean realmente útiles.

## 5. ABORDAJE DE LOS ESTUDIOS DE DIGESTIÓN COLÓNICA *IN VITRO*

Como se ha comentado, cuando se plantea el diseño experimental de una digestión *in vitro* colónica se deben tener en cuenta una serie de consideraciones intrínsecas al proceso. Por ejemplo, se debe planificar la preparación de los fluidos, los movimientos en el interior del reactor, el tiempo de retención en cada compartimento, su volumen, el flujo de gas, la temperatura o el tipo de digestor (con uno o varios compartimentos colónicos). Además, en el caso de simular la etapa colónica, es fundamental la recolección y el procesado de inóculo fecal. Por otro lado, tras llevar a cabo la digestión, las conclusiones se extraen en base a la caracterización y cuantificación de los componentes de las muestras recogidas a lo largo del proceso. Es necesario plantear si el objetivo del estudio es determinar cambios en la composición de la microbiota provocados por la ingesta/digestión de ciertos tipos de alimento y nutrientes, o si bien el estudio se centra en conocer productos derivados de la utilización de los nutrientes de la digestión por parte de la microbiota. Por ello, esta sección se centra en recopilar la información práctica y metodológica, convencional y moderna, que se deberá considerar para el abordaje de los estudios de digestión colónica *in vitro*; por un lado, para el análisis de la microbiota, y por otro, para la evaluación de los metabolitos producidos por parte de esta microbiota (**Figura 2**).



**Figura 2.** Esquema del proceso completo de simulación *in vitro* de la digestión colónica: diseño y preparación, digestión *in vitro* y determinación analítica de la microbiota y los metabolitos que produce. PCR: Reacción en cadena de la polimerasa, qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa, FISH: hibridación fluorescente *in situ*, SCFA: ácidos grasos de cadena corta, BCFA: ácidos grasos de cadena ramificada, GC-MS: cromatografía de gases - espectrometría de masas, LC-MS: cromatografía líquida - espectrometría de masas, GC-FID: cromatografía de gases - detector de ionización de llama, RMN: resonancia magnética nuclear.

## 5.1 Recolección y procesado del inóculo fecal

Para poder simular la digestión colónica *in vitro* es necesario recolectar una muestra fecal de un individuo o de una cohorte de estudio. Las muestras fecales procedentes de individuos voluntarios pueden utilizarse o bien de forma individual, o bien de forma combinada, es decir, una mezcla de las muestras fecales de varios individuos, lo que se conoce como “pool fecal” (Martínez-Cuesta *et al.*, 2019). A partir de la mezcla de heces se obtienen muestras estandarizadas, más abundantes y diversas en bacterias. Por tanto, se pueden utilizar en múltiples experimentos y que estos sean representativos de la población general (Aguirre *et al.*, 2014). En diversos estudios, se ha utilizado un inóculo fecal procedente de una única persona para estudiar un tipo de microbiota concreta (Martínez-Cuesta *et al.*, 2019). Sin embargo, es importante destacar que el uso de una mezcla fecal de varios individuos para

la realización del inóculo fecal presenta un importante inconveniente, y es que cada individuo posee un entorno intestinal con nichos específicos. Los nichos específicos son agrupaciones de bacterias que cumplen una función específica, por ejemplo, la degradación de la mucina. Al combinar muestras fecales de varios individuos, distintas especies procedentes de cada individuo ocuparán el mismo nicho, conduciendo a que haya diferencias interindividuales en la composición de la microbiota. Es decir, se podría considerar que el resultado de mezclar muestras de diez individuos sería como obtener una “muestra individual” de un onceavo individuo, que requeriría de tiempo para estabilizarse, ya que muchos microorganismos que ocupan un nicho similar estarán juntos compitiendo por ocupar el mismo nicho (Aguirre *et al.*, 2014).

En cualquier caso, a partir de la o las muestras fecales se ha de realizar una extracción de su microbiota, que será posteriormente utilizada en la digestión. Esta microbiota extraída es comúnmente conocida como inóculo fecal. Una vez adicionado el inóculo fecal al reactor y trabajando en condiciones adecuadas de pH, temperatura y en ausencia de oxígeno, se consigue desarrollar una microbiota representativa del colon humano. La idónea recolección y procesado de estas muestras de heces es esencial para que los inóculos sean de calidad y los ensayos se desarrollen adecuadamente. Por ello, estas se recogen y se introducen dentro de cajas herméticas con una atmósfera anaerobia. Pasada una hora de la recolección, las muestras fecales se homogenizan, también en condiciones anaerobias, con una disolución salina obteniendo así el inóculo fecal (Aguirre *et al.*, 2014; Aguirre *et al.*, 2015). Las muestras fecales recién recolectadas se conocen como muestras “frescas”. Es importante tener en cuenta que, para su utilización, el o los donantes tienen que estar disponibles en el momento de la extracción. Si esos mismos ensayos se repiten pasado un tiempo, se requiere de nuevo la disponibilidad de los donantes y, además, no se asegura que la microbiota extraída sea la misma que la vez anterior, ya que esta podría haberse alterado en ese tiempo, por ejemplo, debido a perturbaciones externas (Aguirre *et al.*, 2015; O'Donnell *et al.*, 2016).

Viéndose la relevancia de la correcta recolección y procesado de las muestras fecales para la preparación de inóculos adecuados, Aguirre *et al.* (2015) probaron diferentes tratamientos para conseguir un almacenamiento idóneo para los inóculos fecales, de forma que su composición y actividad fuera lo más similar posible a la del inóculo fresco. El tratamiento con más potencial consistió en resuspender la muestra fecal en solución salina con glicerol y congelarla a -80°C en nitrógeno líquido en condiciones de anaerobiosis. Tras la descongelación y el ensayo, se mantuvo la producción de SCFA y la composición de bacterias en valores similares al inóculo fresco. En otro estudio posterior, O'Donnell *et al.* (2016) propusieron introducir un paso adicional de centrifugación, previo a la resuspensión de la muestra, que mejoró la conservación de la composición del inóculo. Los inóculos fecales

adecuadamente estandarizados y criocongelados pueden tener una vida útil de hasta tres años. Según los estudios de Parkar *et al.* (2019), los inóculos fecales debidamente almacenados mantienen la producción de SCFA en cantidades similares a las del inóculo fresco. Este hecho no puede asegurar que toda la microbiota se mantenga durante los tres años, pero sí que se mantienen las principales bacterias productoras de SCFA. Hasta la fecha no se ha realizado ningún estudio más sobre la conservación de inóculos fecales, concretamente ninguno que establezca el tiempo máximo de vida útil que tienen los inóculos almacenados.

## **5.2 Análisis de los cambios de la microbiota y de su respuesta metabólica**

Como se ha comentado en los apartados anteriores, los digestores *in vitro* son útiles para estudiar cómo los distintos alimentos o dietas influyen en la composición y funcionalidad de las comunidades microbianas del colon. Una vez terminada la digestión, se recogen muestras en los distintos reactores y posteriormente, se analiza tanto su composición microbiológica como la producción de metabolitos. Debido a la gran diversidad microbiológica y metabólica existen distintas técnicas que se ajustan, en mayor o menor medida, al análisis de los componentes y a la extracción de las conclusiones pertinentes (Vernocchi *et al.*, 2016). Microbiológicamente, las detecciones se pueden hacer a niveles taxonómicos más o menos elevados, para detectar o cuantificar la presencia de un filo o una especie determinada. En cuanto a los metabolitos, se suele analizar la cantidad de SCFA (acetato, propionato y butirato) por ser los productos más comunes de la microbiota del colon. Pero, también se ensayan los metabolitos representativos del metabolismo proteolítico, como por ejemplo el amonio o los BCFA. Otros componentes que se estudian son las vitaminas, los ácidos biliares o los polifenoles (Vernocchi *et al.*, 2016; Martínez-Cuesta *et al.*, 2019).

### **5.2.1 MÉTODOS ANALÍTICOS CONVENCIONALES PARA LA CARACTERIZACIÓN DE LA MICROBIOTA**

Convencionalmente, la detección de microbiota se ha realizado mediante el crecimiento de colonias en cultivos selectivos llevados a cabo en el laboratorio en condiciones ambientales concretas. Sin embargo, en muchos casos no se alcanzan los requisitos necesarios para el crecimiento *ex vivo* de la microbiota (Fraher *et al.*, 2012). Los avances en microbiología han llevado al desarrollo de técnicas de detección microbiana independientes de cultivo, abriendo nuevas oportunidades a la identificación de microorganismos. Sin embargo, los cultivos continúan siendo un material de apoyo barato, aunque laborioso, para los análisis microbiológicos. Por ejemplo, en los ensayos de Van den Abbeele *et al.* (2016) trataron de estudiar con un modelo M-SHIME la adhesión de *Escherichia coli* a la mucosa del colon (que tiene relación con

la enfermedad de Crohn) y la posible utilización de los prebióticos y probióticos como forma de evitar esa adhesión. El análisis de las muestras en este estudio comienza con la utilización del cultivo agar MacConkey para la detección de *E. coli*, ya que este medio es específico para el aislamiento, la detección y el recuento de coliformes o patógenos intestinales (sobre todo bacterias entéricas).

A parte del cultivo bacteriano, la técnica más utilizada para la detección de la microbiota es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que permite identificar las bacterias conocidas en una muestra, aunque estas no sean cultivables. Para ello, se extrae el DNA de la muestra y, en las condiciones adecuadas, se permite que la polimerasa amplifique el material genético a partir de los cebadores que, debidamente diseñados, se unen específicamente al material genético de interés. Estos cebadores son regiones del rRNA 16S ya que, es material genético conservado, pero a la vez tiene regiones variables que permiten la identificación filogenética. Se diseñan en función de lo que se quiere detectar, desde filos hasta especies concretas (Fraher *et al.*, 2012). También cabría considerar que la PCR convencional únicamente lleva a cabo la amplificación del material genético. No obstante, para la separación del producto de la PCR se utiliza una electroforesis en gel de agarosa que permite su identificación y una estimación semicuantitativa (Muyzer *et al.*, 1993). Además de identificar los grupos de poblaciones bacterianas, la qPCR, también conocida como “PCR real time”, permite hacer cuantificaciones fiables del DNA presente en una muestra. Trabaja de la misma forma que lo hace la PCR convencional, pero dispone de fluoróforos que se unen a los productos de la PCR y emiten una señal proporcional a la cantidad de DNA de la muestra. Por ejemplo, en los ensayos realizados por Doo *et al.*, (2019) se estudió, utilizando el modelo PolyFermS, el potencial prebiótico de los fructooligosacáridos y el probiótico del extracto de levadura para mejorar la microbiota de los ancianos. En este caso, la qPCR cuantificó el número total de bacterias y de ciertas bacterias que se encuentran en la microbiota de los individuos sanos, como *Bacteroides*, *Prevotella*, *Lactobacillus*, *Roseburia* y *Clostridium* clúster IV, entre otros. Pese al gran avance que ha supuesto el desarrollo de la PCR y su amplia disponibilidad en los laboratorios, tiene algunas limitaciones. Por ejemplo, la extracción del material genético de la muestra (lo que requiere la lisis de las bacterias), el adecuado diseño de los cebadores o el tiempo de ensayo (Carey *et al.*, 2007; Fraher *et al.*, 2012).

Además de la PCR, también existen otras técnicas de identificación que se basan en la hibridación, como la hibridación fluorescente *in situ* (FISH). En este caso se utilizan secuencias de oligonucleótidos marcadas fluorescentemente que hibridan específicamente con el DNA de interés. Son técnicas rápidas y semicuantitativas, pero pueden producirse errores en la detección debido a reacciones cruzadas (Moter & Göbel, 2000). Por ejemplo,



Ashaolu *et al.* (2019) estudiaron como los hidrolizados de la proteína de soja afectan a la microbiota colónica utilizando un modelo de digestión estático. Después, realizaron una identificación bacteriana utilizando FISH, con cinco sondas marcadas fluorescentemente que hibridan con el total de bacterias, *Bacteroides*, *Clostridium* clúster I y II, *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*.

### 5.2.2 MÉTODOS ANALÍTICOS CONVENCIONALES DE DETERMINACIÓN DE METABOLITOS

Como se comenta previamente, los SCFA son los productos más representativos del metabolismo de las bacterias del colon y su utilización de los sustratos de la dieta. El análisis tradicional de estos metabolitos sigue un esquema común que incluye en primer lugar la recolección y, siempre que sea conveniente, el pretratamiento de la muestra. Después, el uso de técnicas cromatográficas para la separación de los metabolitos de la muestra y finalmente, la detección de dichos metabolitos, por ejemplo, con espectrometría de masas (MS) o resonancia magnética nuclear (RMN) (Chen *et al.*, 2019) (**Tabla 4**).

Uno de los análisis más comunes es la combinación de la cromatografía de gases y la espectrometría de masas (GC-MS) (Chen *et al.*, 2019). Esta combinación logra una buena separación e identificación de los metabolitos de la muestra y tiene una amplia sensibilidad y cobertura. La cromatografía de gases se ha utilizado en la separación de metabolitos volátiles y con estabilidad térmica, como es el caso de los alcoholes, ésteres, aldehídos o cetonas (Vernocchi *et al.*, 2016). Sin embargo, también puede ser utilizada para la identificación de compuestos semi-volátiles o incluso no volátiles como los aminoácidos, los ácidos orgánicos, las aminas, los compuestos fenólicos o los lípidos, si previamente se realiza una derivatización que aumente la volatilidad de estos. Por tanto, es una técnica que permite la identificación de productos del metabolismo amilolítico y proteolítico de las bacterias del colon (Karu *et al.*, 2018). Por ejemplo, Douny *et al.* (2019) desarrollaron un procedimiento de microextracción en fase sólida, cromatografía de gases y espectrometría de masas tanto para detectar ácido acético, propiónico y butírico (SCFA) como isobutírico, valérico e isovalérico (BCFA) producidos por el metabolismo bacteriano en las muestras del digestor SHIME. Por otro lado, otra de las técnicas más comúnmente utilizadas es la combinación de la cromatografía líquida con la espectrometría de masas (LC-MS), ya que permite detectar una amplia cantidad de metabolitos, hidrofóbicos o hidrofílicos, trabaja a temperaturas más bajas y no requiere que los compuestos sean volátiles (Chen *et al.*, 2019). Pese a ello, su aplicación es menos común que la GC-MS, ya que el rendimiento es menor y el procesamiento de los datos es más complejo debido a la gran cantidad de datos obtenidos. Además de la utilización de la MS, también existen otros detectores ampliamente utilizados en este tipo de estudios como son el

detector de ionización de llama (FID) (Bianchi *et al.*, 2019) y el de conductividad (Sáyago-Ayardi *et al.*, 2019).

**TABLA 4.** Ejemplo de ensayos de determinación de metabolitos

Modelo de digestión	Objetivo del estudio	Metabolito estudiado	Técnica analítica	Resultado	Referencia
SHIME	Estudiar el efecto probiótico de <i>Bifidobacterium longum</i> BB-46 y el prebiótico de las pectinas cítricas del limón sobre la microbiota del colon de un individuo sano	SCFA y amonio	SCFA → GC-FID Amonio → Medidor selectivo de iones	↑ la producción de SCFA ↓ la producción de amonio	Bianchi <i>et al.</i> , 2019
Estático	Estudiar el efecto prebiótico de FOs, XO y FA sobre la microbiota del colon de un individuo sano	SCFA y BCFA	GC-MS	↑ la producción de SCFA con FOs y XO ↓ la producción de BCFA con FOs y XO ↓ la producción de SCFA y BCFA con FA	Gong <i>et al.</i> , 2019
TIM-2	Estudiar el efecto prebiótico de la piel del mango ( <i>Mangifera indica</i> ), rica en polifenoles y fibra, sobre la microbiota del colon de un individuo sano	SCFA, BCFA y amonio	SCFA y BCFA → LC-conductividad Amonio → reacción enzimática de Berthelot	No se observaron diferencias significativas	Sáyago-Ayardi <i>et al.</i> , 2019
Estático	Estudiar el efecto probiótico de <i>Lactobacillus paracasei</i> JCM8130 y <i>Lactobacillus acidophilus</i> C8.1 y el prebiótico de un extracto de <i>Cucumis sativus</i> sobre la microbiota del colon de perros	SCFA y amonio	SCFA → GC-FID Amonio → Kit enzimático comercial.	↑ la producción de SCFA ↓ la producción de amonio (excepto cuando se ensaya <i>L. acidophilus</i> C8.1 en combinación con <i>C. sativus</i> )	Belà <i>et al.</i> , 2019
SHIME	Estudiar el efecto probiótico de bebidas fermentadas de leche de cabra y uva, con o sin pulpa de uva añadida, sobre la microbiota del colon humano.	SCFA, BCFA y amonio	SCFA y BCFA → GC-FID Amonio → Medidor selectivo de iones	↑ la producción de acetato, butirato en ambas formulaciones, pero ↓ la de propionato en la formulación “sin pulpa de uva” y ↑ en la “con pulpa” No se observaron diferencias significativas en la producción de BCFA en ambas formulaciones	Freire <i>et al.</i> , 2018
Estático	Estudiar el efecto de tres microalgas ( <i>Chlorella vulgaris</i> , <i>C. protothecoides</i> y <i>Schizochytrium sp.</i> ) comestibles sobre la microbiota del colon.	SCFA	GC-FID	↑ la producción de SCFA (sobre todo propionato) en presencia de las tres microalgas, en especial con <i>C. vulgaris</i> .	Jin <i>et al.</i> , 2020

FOs: Oligosacáridos feruloilados, XO: xilo-oligosacáridos, FA: ácido ferúlico, SCFA: ácidos grasos de cadena corta, BCFA: ácidos grasos de cadena ramificada, GC: Cromatografía de gases, FID: detector de ionización de llama, LC: cromatografía líquida, MS: Espectrometría de masas.

Por último, también cabe mencionar la identificación de metabolitos utilizando la resonancia magnética nuclear (RMN). Esta técnica presenta una serie de ventajas frente a la MS (ya sea GC-MS o LC-MS) ya que es de fácil automatización, identificación y reproducibilidad, además de que la derivatización es mínima y no es un método destructivo. Se utiliza, sobre todo,

para la detección de aminoácidos o sus derivados, pero también para la detección de SCFA, ácidos carboxílicos y sus derivados, azúcares y ácidos biliares. Por ejemplo, Jin *et al.* (2020) utilizaron RMN y la fermentación colónica *in vitro* para determinar el potencial prebiótico de distintas microalgas sobre la microbiota intestinal, ya que son fuente de fibra, proteínas, ácidos grasos y minerales. El problema del RMN es que es mucho menos sensible que el MS lo que lleva a una cobertura metabólica reducida (Karu *et al.*, 2018).

A parte de los SCFA, el lactato y el amonio son dos de los componentes que con frecuencia se miden en las muestras del colon y que son representativos de la actividad de la microbiota. En su caso, se puede utilizar la cromatografía de gases, previamente mencionada, para la separación de los compuestos de la muestra, seguida de una identificación con detectores de conductividad (Sáyago-Ayardi *et al.*, 2020) o colorimétricos (Brahma *et al.*, 2017) del lactato y el amonio, respectivamente. Sin embargo, también es frecuente utilizar kits comerciales para la detección específica de estos compuestos (Van den Abbeele *et al.*, 2018; Belà *et al.*, 2019). Por último, es habitual medir del pH de la muestra con un pH-metro, ya que su disminución se puede deber a la producción de SCFA durante el proceso digestivo.

### 5.2.3 LAS TÉCNICAS ÓMICAS

Las técnicas metaómicas fueron utilizadas por primera vez por Handelsman *et al.* (1998) para su aplicación en suelo. Sin embargo, son técnicas que han cobrado importancia para el estudio de otras muestras microbiológicas ya que, el prefijo “meta” hace referencia al estudio de toda una comunidad, ya sea del suelo, del agua o en este caso, de la microbiota del colon. La primera disciplina ómica que se desarrolló fue la metagenómica. Sin embargo, no fue hasta el 2003 cuando Breitbart *et al.* la utilizaron por primera vez para investigar el tracto gastrointestinal humano a partir de heces. La metagenómica es el estudio del genoma de toda una población microbiana. Estas técnicas hacen uso de la “next-generation sequencing” (NGS) que permite hacer una secuenciación masiva de alto rendimiento a partir de una muestra biológica. Se trata de una técnica cara, que requiere de una instrumentalización especializada y de un buen desarrollo informático para analizar la gran cantidad de datos generados. De hecho, para la identificación se hace una comparación con bases de datos de forma que, para que sea efectiva, la base de datos debe incluir la secuencia de esos genes. Algunas de las marcas comerciales para la realización de secuenciación NGS son Illumina®, SOLiD™ y 454 Pyrosequencing® (Fraher *et al.*, 2012; Sinragelo *et al.*, 2018). Actualmente, existen ya estudios metagenómicos que arrojan luz sobre la composición y la diversidad de la microbiota del colon e incluso, tratan de relacionar esta información con diversos estados de enfermedad. Por ejemplo, Karlsson *et al.* (2012) y Qin *et al.* (2012) utilizaron la metagenómica para identificar cambios en el colon de pacientes que sufrían aterosclerosis y diabetes de tipo 2, respectivamente, a partir de muestras fecales. En cambio,

Strain *et al.* (2020) usaron el análisis 454 Pyrosequencing® y la fermentación colónica en estático para probar el efecto de un extracto rico en polisacáridos derivado de un alga parda sobre la microbiota del colon. Pese a los avances que supone la introducción de las técnicas metagenómicas en la identificación de la microbiota del colon, no aportan suficiente información sobre la función de esta, ya que con ellas no se comprueba la expresión genética (Sinragelo *et al.*, 2018).

La falta de información acerca de la funcionalidad de la microbiota se soluciona utilizando la metatranscriptómica, ya que esta se basa en el estudio del mRNA de una comunidad microbiana, es decir, en la expresión genética de esta (Sinragelo *et al.*, 2018). Por ejemplo, Fehlbaum *et al.* (2019) utilizaron la metatranscriptómica para analizar las muestras de un fermentador PolyFermS con el fin de determinar el posible efecto probiótico de la cepa *Lactobacillus paracasei* sobre la microbiota de los ancianos. Pese a que sí permite identificar la expresión genética, tiene limitaciones técnicas que hacen que su utilización todavía esté en desarrollo. Entre ellas, es difícil conseguir mRNA de calidad y en buena cantidad, ya que este se degrada rápidamente y está en menor cantidad que otros RNA, como el rRNA. De hecho, también se plantea el estudio de la funcionalidad de la microbiota con otra de las técnicas ómicas, como es la proteómica, ya que, como su nombre indica, trata de estudiar la composición proteica de toda la comunidad y por tanto, su funcionalidad (Sinragelo *et al.*, 2018). Por ejemplo, Li *et al.* (2020) utilizaron un análisis metaproteómico y un cultivo en estático para estudiar el efecto de distintas fuentes de almidón resistente sobre la funcionalidad de la microbiota del colon. Como se ha comentado anteriormente, es una técnica con perspectivas de futuro, pero todavía con ciertas limitaciones, ya que es necesario establecer procedimientos estandarizados de extracción de las proteínas, mejoras computacionales y avances en el desarrollo de las bases de datos para poder analizar la gran diversidad y cantidad de proteínas presentes en el microbioma del colon. Por último, la metabolómica es la última de las técnicas ómicas con potencial aplicabilidad sobre la microbiota humana. Esta técnica permite detectar el conjunto de metabolitos producidos por una comunidad microbiana, siendo la cromatografía líquida y de gases las técnicas que separan los compuestos de la muestra, y la espectrometría de masas o la resonancia magnética nuclear, las técnicas que identifica y mide los compuestos. Por ejemplo, Fellah *et al.* (2020) estudiaron mediante el análisis con metabolómica el perfil de polifenoles de las partes no comestibles de la granada y comprobaron los cambios en la bioaccesibilidad de los polifenoles con una fermentación *in vitro* en estático. Pese a ello, tal y como ocurre con la metaproteómica, son técnicas con una gran cantidad de datos y es difícil la identificación de los metabolitos, ya que las bases de datos todavía son incompletas (Sinragelo *et al.*, 2018).

Por tanto, pese a las grandes expectativas que hay en cuanto al uso de las tecnologías metaómicas para el análisis de la composición y la funcionalidad de la microbiota del colon, todavía es necesario unificar los procesos de extracción en las muestras, abaratar los costes, reducir el tiempo de análisis, ampliar las bases de datos y mejorar los recursos informáticos para extraer el máximo potencial a estas técnicas analíticas y a su futura aplicación (Sinragelo *et al.*, 2018; Galloway-Peña & Hanson, 2020).

## 6. CONCLUSIONES

En el contexto del binomio microbiota-salud, la alimentación es uno de los factores que más influyen en su modulación. Es por ello que el estudio de la digestión de los alimentos, de las interacciones de los nutrientes con la microbiota y, en última estancia, el perfil metabólico derivado, se presentan como objetivos de estudio de gran interés.

Los modelos *in vitro* de digestión gastrointestinal son herramientas útiles que permiten obtener resultados bastante representativos del proceso fisiológico de digestión. Recientemente, se ha extendido el uso de modelos de digestión colónica *in vitro*. Dentro de las posibilidades actuales, la elección del digestor y las variables de proceso dependen del objetivo último del ensayo y del contexto concreto que se pretenda simular. Adicionalmente, también atienden a otras consideraciones como el coste o la disponibilidad. Los digestores colónicos dinámicos son más reproducibles y representativos de las condiciones fisiológicas, aunque también más caros, largos y específicos en los equipos utilizados que los digestores estáticos. Por otro lado, la inclusión de uno o varios reactores colónicos habilita la mimetización de una o varias de las regiones del colon, motivo por el cual ciertos parámetros (pH, tiempo de retención, volumen) deben ser debidamente ajustados. Incluso, algunos de los digestores actuales más completos incorporan la simulación del proceso gastrointestinal previo, la mimetización de la microbiota asociada a la mucosa o el ensayo en paralelo de varias condiciones experimentales. Pese a ello, la simulación *in vitro* de la digestibilidad de los alimentos no deja de ser una simplificación de las condiciones fisiológicas, por lo que los resultados obtenidos deben validarse en *in vivo*. Además, la variabilidad de esta microbiota colónica en distintos contextos dificulta la extrapolación de los resultados.

Por otro lado, el análisis de las muestras recogidas a lo largo del proceso es esencial para evaluar los cambios resultantes. Tanto a nivel microbiológico como metabólico existen métodos de análisis convencionales, como el crecimiento de cultivos en placa, las pruebas PCR y las FISH, o las cromatografías, la MS y la RMN, respectivamente. Estas siguen siendo ampliamente utilizadas y son complementarias al conocimiento obtenido con las metodologías modernas. En cambio, estas últimas, como es el caso de las

técnicas metaómicas, abren nuevas oportunidades a la detección de microorganismos y metabolitos. Sin embargo, pese a las grandes expectativas puestas en su uso, todavía es un desafío la mejora de los recursos informáticos y la ampliación de las bases de datos.

En conclusión, plantear estudios orientados a establecer correlaciones entre la dieta y los cambios en la microbiota resulta de elevada complejidad por los numerosos factores implicados. Los modelos de digestión *in vitro* se pueden considerar adecuados como etapa previa a los estudios *in vivo*, si bien la validez de los resultados dependerá de la capacidad tecnológica del método de aproximarse y reproducir los factores determinantes en el proceso. La información encontrada en la literatura evidencia la necesidad de armonizar y consensuar las metodologías para llevar a cabo los estudios de digestión colónica de alimentos, de la misma manera que se ha hecho para la simulación de las etapas de digestión anteriores al colon, y poder así comparar y validar los resultados de los distintos estudios.

## 7. AGRADECIMIENTOS

Les agradezco a mis tutores/as Ana María Andrés Grau, Ana Belén Heredia Gutiérrez, Joaquim Calvo Lerma y Andrea Asensio Grau la confianza y la ayuda que han mostrado por el trabajo a lo largo de todos estos meses, ya que, desde casa y pese a la situación, he podido recibir su apoyo e interés.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- Aguirre, M., Eck, A., Koenen, M. E., Savelkoul, P. H., Budding, A. E. & Venema, K.** (2015). Evaluation of an optimal preparation of human standardized fecal inocula for *in vitro* fermentation studies. *Journal of microbiological methods*, **117**, 78-84.
- Aguirre, M., Ramiro-Garcia, J., Koenen, M. E. & Venema, K.** (2014). To pool or not to pool? Impact of the use of individual and pooled fecal samples for *in vitro* fermentation studies. *Journal of microbiological methods*, **107**, 1-7.
- Arrieta, M. C., Walter, J. & Finlay, B. B.** (2016). Human microbiota-associated mice: a model with challenges. *Cell host & microbe*, **19**(5), 575-578.
- Ashaolu, T. J., Saibandith, B., Yupanqui, C. T. & Wichienchot, S.** (2019). Human colonic microbiota modulation and branched chain fatty acids production affected by soy protein hydrolysate. *International Journal of Food Science & Technology*, **54**(1), 141-148.
- Bäckhed, F., Roswall, J., Peng, Y., Feng, Q., Jia, H., Kovatcheva-Datchary, P., ... & Khan, M. T.** (2015). Dynamics and stabilization of the human gut microbiome during the first year of life. *Cell host & microbe*, **17**(5), 690-703.
- Barroso, E., Cueva, C., Peláez, C., Martínez-Cuesta, M. C. & Requena, T.** (2015). The computer-controlled multicompartmental dynamic model of the gastrointestinal system SIMGI. En: *The Impact of Food Bioactives on Health*, 319-327.

- Belà, B., Coman, M. M., Verdenelli, M. C., Bianchi, C., Pignataro, G., Fiorini, D. & Silvi, S.** (2019). *In vitro* fermentation of *Cucumis sativus* fructus extract by canine gut microbiota in combination with two probiotic strains. *Journal of Functional Foods*, **63**, 103585.
- Berner, A. Z., Fuentes, S., Dostal, A., Payne, A. N., Gutierrez, P. V., Chassard, C., ... & Lacroix, C.** (2013). Novel Polyfermentor intestinal model (PolyFermS) for controlled ecological studies: validation and effect of pH. *PLoS one*, **8**(10), e77772.
- Bhagavan, N. V. & Ha, C.** (2015). Gastrointestinal digestion and absorption. En: *Essentials of medical biochemistry*. Academic press, 137-164.
- Bhutia, Y. D. & Ganapathy, V.** (2018). Protein digestion and absorption. En: *Physiology of the Gastrointestinal Tract*. Academic Press, 1063-1086.
- Bianchi, F., Larsen, N., de Mello Tieghi, T., Adorno, M. A. T., Saad, S. M., Jespersen, L. & Sivieri, K.** (2019). *In vitro* modulation of human gut microbiota composition and metabolites by *Bifidobacterium longum* BB-46 and a citric pectin. *Food Research International*, **120**, 595-602.
- Binda, C., Lopetuso, L. R., Rizzatti, G., Gibiino, G., Cennamo, V. & Gasbarrini, A.** (2018). Actinobacteria: A relevant minority for the maintenance of gut homeostasis. *Digestive and Liver Disease*, **50**(5), 421-428.
- Bjørkhaug, S. T., Aanes, H., Neupane, S. P., Bramness, J. G., Malvik, S., Henriksen, C., ... & Valeur, J.** (2019). Characterization of gut microbiota composition and functions in patients with chronic alcohol overconsumption. *Gut microbes*, **10**(6), 663-675.
- Brahma, S., Martínez, I., Walter, J., Clarke, J., Gonzalez, T., Menon, R. & Rose, D. J.** (2017). Impact of dietary pattern of the fecal donor on *in vitro* fermentation properties of whole grains and brans. *Journal of Functional Foods*, **29**, 281-289.
- Breitbart, M., Hewson, I., Felts, B., Mahaffy, J. M., Nulton, J., Salamon, P. & Rohwer, F.** (2003). Metagenomic analyses of an uncultured viral community from human feces. *Journal of bacteriology*, **185**(20), 6220-6223.
- Brodkorb, A., Egger, L., Alminger, M., Alvito, P., Assunção, R., Ballance, S., ... & Clemente, A.** (2019). INFOGEST static *in vitro* simulation of gastrointestinal food digestion. *Nature protocols*, **14**(4), 991-1014
- Carding, S., Verbeke, K., Vipond, D. T., Corfe, B. M. & Owen, L. J.** (2015). Dysbiosis of the gut microbiota in disease. *Microbial ecology in health and disease*, **26**(1), 26191.
- Carey, C. M., Kirk, J. L., Ojha, S. & Kostrzynska, M.** (2007). Current and future uses of real-time polymerase chain reaction and microarrays in the study of intestinal microbiota, and probiotic use and effectiveness. *Canadian journal of microbiology*, **53**(5), 537-550.
- Carvalho-Wells, A. L., Helmolz, K., Nodet, C., Molzer, C., Leonard, C., McKeivith, B., Thielecke, F., Jackson, K. G. & Tuohy, K. M.** (2010). Determination of the *in vivo* prebiotic potential of a maize-based whole grain breakfast cereal: a human feeding study. *British journal of nutrition*, **104**(9), 1353-1356.
- Chen, M., Wnag, S., Kuo, C. & Tsai, I.** (2019). Metabolome analysis for investigating host-gut microbiota interactions. *Journal of the Formosan medical association*, **118**, 10-22.
- Cinquin, C., Le Blay, G., Fliss, I. & Lacroix, C.** (2006). New three-stage *in vitro* model for infant colonic fermentation with immobilized fecal microbiota. *FEMS microbiology ecology*, **57**(2), 324-336.

- Cinquin, C., Le Blay, G., Fliss, I. & Lacroix, C.** (2004). Immobilization of infant fecal microbiota and utilization in an *in vitro* colonic fermentation model. *Microbial ecology*, **48**(1), 128-138.
- De Filippo, C., Di Paola, M., Ramazzotti, M., Albanese, D., Pieraccini, G., Banci, E., ... & Lionetti, P.** (2017). Diet, environments, and gut microbiota. A preliminary investigation in children living in rural and urban Burkina Faso and Italy. *Frontiers in microbiology*, **8**, 1979.
- De Filippo, C., Cavalieri, D., Di Paola, M., Ramazzotti, M., Poullet, J. B., Massart, S., Collini, S., Pieraccini, G. & Lionetti, P.** (2010). Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **107**(33), 14691-14696.
- Derrien, M., Belzer, C. & de Vos, W. M.** (2017). *Akkermansia muciniphila* and its role in regulating host functions. *Microbial pathogenesis*, **106**, 171-181.
- Doo, E. H., Schwab, C., Chassard, C. & Lacroix, C.** (2019). Cumulative effect of yeast extract and fructooligosaccharide supplementation on composition and metabolic activity of elderly colonic microbiota *in vitro*. *Journal of Functional Foods*, **52**, 43-53.
- Douny, C., Dufourny, S., Brose, F., Verachtert, P., Rondia, P., Lebrun, S., ... & Scippo, M. L.** (2019). Development of an analytical method to detect short-chain fatty acids by SPME-GC-MS in samples coming from an *in vitro* gastrointestinal model. *Journal of Chromatography B*, **1124**, 188-196.
- Dupont, D., Alric, M., Blanquet-Diot, S., Bornhorst, G., Cueva, C., Deglaire, A., ... & Mackie, A. R.** (2019). Can dynamic *in vitro* digestion systems mimic the physiological reality?. *Critical reviews in food science and nutrition*, **59**(10), 1546-1562.
- Eid, N., Enani, S., Walton, G., Corona, G., Costabile, A., Gibson, G., Rowland, I. & Spencer, J. P.** (2014). The impact of date palm fruits and their component polyphenols, on gut microbial ecology, bacterial metabolites and colon cancer cell proliferation. *Journal of nutritional science*, **3**, 1-9.
- Engelking, L. R.** (a) (2015) Carbohydrate digestion. En: Textbook of veterinary physiological chemistry. Academic Press, 231-237.
- Engelking, L. R.** (b) (2015) Lipid digestion. En: Textbook of veterinary physiological chemistry. Academic Press, 384-389.
- Fehlbaum, S., Chassard, C., Schwab, C., Voolaid, M., Fourmestraux, C., Derrien, M. & Lacroix, C.** (2019). *In vitro* study of *Lactobacillus paracasei* CNCM I-1518 in healthy and *Clostridium difficile* colonized elderly gut microbiota. *Frontiers in nutrition*, **6**, 184.
- Fellah, B., Rocchetti, G., Senizza, B., Giuberti, G., Bannour, M., Ferchichi, A. & Lucini, L.** (2020). Untargeted metabolomics reveals changes in phenolic profile following *in vitro* large intestine fermentation of non-edible parts of *Punica granatum* L. *Food Research International*, **128**, 108807.
- Flint, H. J.** (2020). Who inhabits our gut?. En: Why Gut Microbes Matter. Springer, Cham, 47-61.
- Fraher, M. H., O'toole, P. W. & Quigley, E. M.** (2012). Techniques used to characterize the gut microbiota: a guide for the clinician. *Nature reviews Gastroenterology & Hepatology*, **9**(6), 312-322.



- Freire, F. C., Adorno, M. A. T., Sakamoto, I. K., Antoniassi, R., Chaves, A. C. S. D., Dos Santos, K. M. O. & Sivieri, K.** (2017). Impact of multi-functional fermented goat milk beverage on gut microbiota in a dynamic colon model. *Food Research International*, **99**, 315-327.
- Galloway-Peña, J. & Hanson, B.** (2020). Tools for analysis of the microbiome. *Digestive diseases and sciences*, **65**, 674-685.
- Gibiino, G., Lopetuso, L. R., Scaldaferri, F., Rizzatti, G., Binda, C. & Gasbarrini, A.** (2018). Exploring Bacteroidetes: Metabolic key points and immunological tricks of our gut commensals. *Digestive and Liver Disease*, **50**(7), 635-639.
- Gibson, G. R., Cummings, J. H. & Macfarlane, G. T.** (1988). Use of a three-stage continuous culture system to study the effect of mucin on dissimilatory sulfate reduction and methanogenesis by mixed populations of human gut bacteria. *Applied and environmental microbiology*, **54**(11), 2750-2755.
- Gong, L., Wang, H., Wang, T., Liu, Y., Wang, J. & Sun, B.** (2019). Feruloylated oligosaccharides modulate the gut microbiota *in vitro* via the combined actions of oligosaccharides and ferulic acid. *Journal of Functional Foods*, **60**, 103453.
- Gurung, M., Li, Z., You, H., Rodrigues, R., Jump, D. B., Morgun, A. & Shulzhenko, N.** (2020). Role of gut microbiota in type 2 diabetes pathophysiology. *EBioMedicine*, **51**, 102590.
- Gutiérrez-Díaz, I., Fernández-Navarro, T., Sánchez, B., Margolles, A. & González, S.** (2016). Mediterranean diet and faecal microbiota: a transversal study. *Food & function*, **7**(5), 2347-2356.
- Handelsman, J., Rondon, M. R., Brady, S. F., Clardy, J. & Goodman, R. M.** (1998). Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chemistry & biology*, **5**(10), 245-249.
- Havemeier, S., Erickson, J. & Slavin, J.** (2017). Dietary guidance for pulses: The challenge and opportunity to be part of both the vegetable and protein food groups. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **1392**(1), 58-66.
- Hufeldt, M. R., Nielsen, D. S., Vogensen, F. K., Midtvedt, T. & Hansen, A. K.** (2010). Variation in the gut microbiota of laboratory mice is related to both genetic and environmental factors. *Comparative medicine*, **60**(5), 336-347.
- Jamar, G., Ribeiro, D. A. & Pisani, L. P.** (2020). High-fat or high-sugar diets as trigger inflammation in the microbiota-gut-brain axis. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1-19.
- Jeffery, I. B., Lynch, D. B. & O'toole, P. W.** (2016). Composition and temporal stability of the gut microbiota in older persons. *The ISME journal*, **10**(1), 170-182.
- Jin, J. B., Cha, J. W., Shin, I. S., Jeon, J. Y., Cha, K. H. & Pan, C. H.** (2020). Supplementation with *Chlorella vulgaris*, *Chlorella protothecoides*, and *Schizochytrium* sp. increases propionate-producing bacteria in *in vitro* human gut fermentation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **100**(7), 2938-2945.
- Karlsson, F. H., Fåk, F., Nookaew, I., Tremaroli, V., Fagerberg, B., Petranovic, D., ... & Nielsen, J.** (2012). Symptomatic atherosclerosis is associated with an altered gut metagenome. *Nature communications*, **3**(1), 1-8.
- Karu, N., Deng, L., Slae, M., Guo, A. C., Sajed, T., Huynh, H., ... & Wishart, D. S.** (2018). A review on human fecal metabolomics: Methods, applications and the human fecal metabolome database. *Analytica chimica acta*, **1030**, 1-24.

- Kim, H., Sitarik, A. R., Woodcroft, K., Johnson, C. C. & Zoratti, E.** (2019). Birth mode, breastfeeding, pet exposure, and antibiotic use: associations with the gut microbiome and sensitization in children. *Current allergy and asthma reports*, **19**(4), 22.
- Koh, A., De Vadder, F., Kovatcheva-Datchary, P. & Bäckhed, F.** (2016). From dietary fiber to host physiology: short-chain fatty acids as key bacterial metabolites. *Cell*, **165**(6), 1332-1345.
- Koren, O., Goodrich, J. K., Cullender, T. C., Spor, A., Laitinen, K., Bäckhed, H. K., ... & Bäckhed, F.** (2012). Host remodeling of the gut microbiome and metabolic changes during pregnancy. *Cell*, **150**(3), 470-480.
- Krznaric, Ž., Bender, D. V. & Meštrovic, T.** (2019). The Mediterranean diet and its association with selected gut bacteria. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, **22**(5), 401-406.
- Lee, Y. K.** (2013). Effects of diet on gut microbiota profile and the implications for health and disease. *Bioscience of Microbiota, Food and Health*, **32**(1), 1-12.
- Leo, E. E. M. & Campos, M. R. S.** (2020). Effect of ultra-processed diet on gut microbiota and thus its role in neurodegenerative diseases. *Nutrition*, **71**, 110609.
- Li, L., Ryan, J., Ning, Z., Zhang, X., Mayne, J., Lavallée-Adam, M., ... & Figeys, D.** (2020). Metaproteomic responses of *in vitro* gut microbiomes to resistant starches: the role of resistant starch type and inter-individual variations. bioRxiv.
- Litvak, Y., Byndloss, M. X., Tsohis, R. M. & Bäumlér, A. J.** (2017). Dysbiotic Proteobacteria expansion: a microbial signature of epithelial dysfunction. *Current opinion in microbiology*, **39**, 1-6.
- Lopez-Legarrea, P., Fuller, N. R., Angeles Zulet, M., Martinez, J. A. & Caterson, I. D.** (2014). The influence of Mediterranean, carbohydrate and high protein diets on gut microbiota composition in the treatment of obesity and associated inflammatory state. *Asia Pacific journal of clinical nutrition*, **23**(3), 360-368.
- Louis, P., Hold, G. L. & Flint, H. J.** (2014). The gut microbiota, bacterial metabolites, and colorectal cancer. *Nature reviews microbiology*, **12**(10), 661-672.
- Macfarlane, G. T. & Macfarlane, S.** (2007). Models for intestinal fermentation: association between food components, delivery systems, bioavailability, and functional interactions in the gut. *Current opinion in biotechnology*, **18**(2), 156-162.
- Macfarlane, G. T., Gibson, G. R. & Cummings, J. H.** (1992). Comparison of fermentation reactions in different regions of the human colon. *Journal of Applied Bacteriology*, **72**(1), 57-64.
- Makivuokko, H., Nurmi, J., Nurminen, P., Stowell, J. & Rautonen, N.** (2005). *In vitro* effects on polydextrose by colonic bacteria and caco-2 cell cyclooxygenase gene expression. *Nutrition and cancer*, **52**(1), 94-104.
- Martínez-Cuesta, M. C., Peláez, C. & Requena, T.** (2019). Laboratory simulators of the colon microbiome. En: *Microbiome and metabolome in diagnosis, therapy, and other strategic applications*. Academic press ,61-67.
- Matsuoka, K. & Kanai, T.** (2015). The gut microbiota and inflammatory bowel disease. *Seminars in immunopathology*, **37**(1), 47-55.
- McDonald, J. A., Schroeter, K., Fuentes, S., Heikamp-deJong, I., Khursigara, C. M., de Vos, W. M. & Allen-Vercoe, E.** (2013). Evaluation of microbial community reproducibility, stability, and composition in a human distal gut chemostat model. *Journal of microbiological methods*, **95**(2), 167-174.

- Miller, T. L. & Wolin, M. J.** (1981). Fermentation by the human large intestine microbial community in an *in vitro* semicontinuous culture system. *Applied and environmental microbiology*, **42**(3), 400-407.
- Minekus, M., Alminger, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., ... & Dufour, C.** (2014). A standardised static *in vitro* digestion method suitable for food—an international consensus. *Food & function*, **5**(6), 1113-1124.
- Minekus, M., Smeets-Peeters, M., Bernalier, A., Marol-Bonnin, S., Havenaar, R., Marteau, P., ... & Fonty, G.** (1999). A computer-controlled system to simulate conditions of the large intestine with peristaltic mixing, water absorption and absorption of fermentation products. *Applied microbiology and biotechnology*, **53**(1), 108-114.
- Minekus, M., Marteau, P. & Havenaar, R.** (1995). Multicompartmental dynamic computer-controlled model simulating the stomach and small intestine. *Alternatives to laboratory animals: ATLA*, **23** (2), 197-209.
- Molly, K., Woestyne, M. V. & Verstraete, W.** (1993). Development of a 5-step multi-chamber reactor as a simulation of the human intestinal microbial ecosystem. *Applied microbiology and biotechnology*, **39**(2), 254-258.
- Moter, A. & Göbel, U. B.** (2000). Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. *Journal of microbiological methods*, **41**(2), 85-112.
- Mulet-Cabero, A. I., Egger, L., Portmann, R., Ménard, O., Marze, S., Minekus, M. ... & Golding, M.** (2020). A standardised semi-dynamic *in vitro* digestion method suitable for food—an international consensus. *Food & Function*, **11**(2), 1702-1720.
- Muyzer, G., De Waal, E. C. & Uitterlinden, A. G.** (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and environmental microbiology*, **59**(3), 695-700.
- Nam, Y. D., Jung, M. J., Roh, S. W., Kim, M. S. & Bae, J. W.** (2011). Comparative analysis of Korean human gut microbiota by barcoded pyrosequencing. *PloS one*, **6**(7), e22109.
- O'Donnell, M. M., Rea, M. C., O'Sullivan, Ó., Flynn, C., Jones, B., McQuaid, A., ... & Ross, R. P.** (2016). Preparation of a standardised faecal slurry for *ex-vivo* microbiota studies which reduces inter-individual donor bias. *Journal of microbiological methods*, **129**, 109-116.
- Pandey, K. R., Naik, S. R. & Vakil, B. V.** (2015). Probiotics, prebiotics, and synbiotics—a review. *Journal of food science and technology*, **52**(12), 7577-7587.
- Parkar, S. G., Davis, P., Trower, T. M., Hedderley, D. I., Sutton, K. H. & Ingram, J. R.** (2019). Factors affecting microbial metabolism in a human fecal fermentation model to evaluate prebiotics. *Journal of Nutrition & Intermediary Metabolism*, **15**, 55-57.
- Payne, A. N., Zihler, A., Chassard, C. & Lacroix, C.** (2012). Advances and perspectives in *in vitro* human gut fermentation modeling. *Trends in biotechnology*, **30**(1), 17-25.
- Phillips, F.** (2005). Vegetarian nutrition. *Nutrition Bulletin*, **30**(2), 132-167.
- Qin, J., Li, Y., Cai, Z., Li, S., Zhu, J., Zhang, F., ... & Peng, Y.** (2012). A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature*, **490**(7418), 55-60.
- Rajilić-Stojanović, M., Maathuis, A., Heilig, H. G., Venema, K., de Vos, W. M., & Smidt, H.** (2010). Evaluating the microbial diversity of an *in vitro* model of the human large intestine by phylogenetic microarray analysis. *Microbiology*, **156**(11), 3270-3281.
- Rothschild, D., Weissbrod, O., Barkan, E., Kurilshikov, A., Korem, T., Zeevi, D., ... & Shilo, S.** (2018). Environment dominates over host genetics in shaping human gut microbiota. *Nature*, **555**(7695), 210-215.

- Russell, W. R., Gratz, S. W., Duncan, S. H., Holtrop, G., Ince, J., Scobbie, L., ... & Duthie, G. G.** (2011). High-protein, reduced-carbohydrate weight-loss diets promote metabolite profiles likely to be detrimental to colonic health. *The American journal of clinical nutrition*, **93**(5), 1062-1072.
- Sáyago-Ayerdi, S. G., Zamora-Gasga, V. M. & Venema, K.** (2020). Changes in gut microbiota in predigested *Hibiscus sabdariffa L calyces* and Agave (*Agave tequilana weber*) fructans assessed in a dynamic *in vitro* model (TIM-2) of the human colon. *Food Research International*, **132**, 109036.
- Sáyago-Ayerdi, S. G., Zamora-Gasga, V. M. & Venema, K.** (2019). Prebiotic effect of predigested mango peel on gut microbiota assessed in a dynamic *in vitro* model of the human colon (TIM-2). *Food Research International*, **118**, 89-95.
- Scott, K. P., Gratz, S. W., Sheridan, P. O., Flint, H. J. & Duncan, S. H.** (2013). The influence of diet on the gut microbiota. *Pharmacological research*, **69**(1), 52-60.
- Segata, N.** (2015). Gut microbiome: westernization and the disappearance of intestinal diversity. *Current Biology*, **25**(14), 611-613.
- Senghor, B., Sokhna, C., Ruimy, R. & Lagier, J. C.** (2018). Gut microbiota diversity according to dietary habits and geographical provenance. *Human Microbiome Journal*, **7**, 1-9.
- Sheridan, P. O., Martin, J. C., Lawley, T. D., Browne, H. P., Harris, H. M., Bernalier-Donadille, A., Duncan, S. H., O'Toole, P. W., Scott, K. P. & Flint, H. J.** (2016). Polysaccharide utilization loci and nutritional specialization in a dominant group of butyrate-producing human colonic Firmicutes. *Microbial Genomics*, **2**(2).
- Singh, R. K., Chang, H. W., Yan, D., Lee, K. M., Ucmak, D., Wong, K., ... & Bhutani, T.** (2017). Influence of diet on the gut microbiome and implications for human health. *Journal of translational medicine*, **15**(1), 73.
- Sommer, F., Anderson, J. M., Bharti, R., Raes, J. & Rosenstiel, P.** (2017). The resilience of the intestinal microbiota influences health and disease. *Nature Reviews Microbiology*, **15**(10), 630-638.
- Sousa, T., Paterson, R., Moore, V., Carlsson, A., Abrahamsson, B. & Basit, A. W.** (2008). The gastrointestinal microbiota as a site for the biotransformation of drugs. *International journal of pharmaceutics*, **363**(1-2), 1-25.
- Steck, N., Hoffmann, M., Sava, I. G., Kim, S. C., Hahne, H., Tonkonogy, S. L., ... & Vogelmann, R.** (2011). *Enterococcus faecalis* metalloprotease compromises epithelial barrier and contributes to intestinal inflammation. *Gastroenterology*, **141**(3), 959-971.
- Strain, C. R., Collins, K. C., Naughton, V., McSorley, E. M., Stanton, C., Smyth, T. J., ... & Allsopp, P. J.** (2020). Effects of a polysaccharide-rich extract derived from Irish-sourced *Laminaria digitata* on the composition and metabolic activity of the human gut microbiota using an *in vitro* colonic model. *European journal of nutrition*, **59**(1), 309-325.
- Suez, J., Korem, T., Zeevi, D., Zilberman-Schapira, G., Thaiss, C. A., Maza, O., ... & Kuperman, Y.** (2014). Artificial sweeteners induce glucose intolerance by altering the gut microbiota. *Nature*, **514**(7521), 181-186.
- Thursby, E. & Juge, N.** (2017). Introduction to the human gut microbiota. *Biochemical Journal*, **474**(11), 1823-1836.
- Urwin, H. J., Miles, E. A., Noakes, P. S., Kremmyda, L. S., Vlachava, M., Diaper, N. D., Godfrey, K. M., Calder, P. C., Vulevic, J. & Yaqoob, P.** (2014). Effect of salmon

- consumption during pregnancy on maternal and infant faecal microbiota, secretory IgA and calprotectin. *British journal of nutrition*, **111**(5), 773-784.
- Van den Abbeele, P., Kamil, A., Fleige, L., Chung, Y., De Chavez, P. & Marzorati, M.** (2018). Different oat ingredients stimulate specific microbial metabolites in the gut microbiome of three human individuals *in vitro*. *ACS omega*, **3**(10), 12446-12456.
- Van den Abbeele, P., Marzorati, M., Derde, M., De Weirdt, R., Joan, V., Possemiers, S., & Van de Wiele, T.** (2016). Arabinoxylans, inulin and *Lactobacillus reuteri* 1063 repress the adherent-invasive *Escherichia coli* from mucus in a mucosa-comprising gut model. *Biofilms and Microbiomes*, **2**(1), 1-8.
- Van den Abbeele, P., Roos, S., Eeckhaut, V., MacKenzie, D. A., Derde, M., Verstraete, W., ... & Van de Wiele, T.** (2012). Incorporating a mucosal environment in a dynamic gut model results in a more representative colonization by lactobacilli. *Microbial biotechnology*, **5**(1), 106-115.
- Venema, K. & Van den Abbeele, P.** (2013). Experimental models of the gut microbiome. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, **27**(1), 115-126.
- Vernocchi, P., Del Chierico, F. & Putignani, L.** (2016). Gut microbiota profiling: metabolomics based approach to unravel compounds affecting human health. *Frontiers in microbiology*, **7**, 1144.
- Walker, R. W., Clemente, J. C., Peter, I. & Loos, R. J.** (2017). The prenatal gut microbiome: are we colonized with bacteria in utero?. *Pediatric obesity*, **12**, 3-17.
- Wan, Y., Wang, F., Yuan, J., Li, J., Jiang, D., Zhang, J., ... & Zheng, J.** (2019). Effects of dietary fat on gut microbiota and faecal metabolites, and their relationship with cardiometabolic risk factors: a 6-month randomised controlled-feeding trial. *Gut*, **68**(8), 1417-1429.
- Wang, T., Roest, D. I. M., Smidt, H. & Zoetendal, E. G.** (2019). "We are what we eat": How diet impacts the gut microbiota in adulthood. En: *How Fermented Foods Feed a Healthy Gut Microbiota*. Springer, Cham, 259-283.
- Yarandi, S. S., Peterson, D. A., Treisman, G. J., Moran, T. H. & Pasricha, P. J.** (2016). Modulatory effects of gut microbiota on the central nervous system: how gut could play a role in neuropsychiatric health and diseases. *Journal of neurogastroenterology and motility*, **22**(2), 201-212.