

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER

Máster en Microbiota, Probióticos y Prebióticos

EFFECTO DE UNA INTERVENCION INMUNONUTRICIONAL EN LA POBLACION DEL FILO BACTEROIDOTA IMPLICADA EN PATOLOGIAS METABOLICAS

Autora: María Victoria Espada Aguirre Mier.

Villaviciosa de Odón, Octubre, Noviembre 2023

Título del Trabajo: EFECTO DE UNA INTERVENCIÓN INMUNONUTRICIONAL EN LA POBLACIÓN DEL FILO BACTEROIDOTA IMPLICADA EN PATOLOGÍAS METABÓLICAS.

Tutor/es: Alfonso Clemente (Tutor académico) / Moisés Laparra Llopis (Tutor profesional).

Este trabajo ha sido realizado en Instituto Madrileño de Estudios Avanzados (IMDEA Alimentación).



IMDEA Alimentación es un instituto de investigación que se enfoca en el estudio de las bases científicas y mecanismos moleculares del cuerpo humano relacionados con la nutrición, alimentación y salud. Sus actividades se llevan a cabo a través de programas enfocados en la Nutrición de Precisión para prevenir y tratar las enfermedades crónicas más prevalentes en la población: Cáncer, envejecimiento, enfermedades cardiometabólicas, obesidad y obesidad infantil. Siendo su principal misión, llevar los avances de la investigación a la sociedad.

INDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVO	4
3. MATERIAL Y METODOS	4
3.1 <i>Sujetos de estudio y obtención de muestras</i>	4
3.2 <i>Intervención inmunonutricional</i>	5
3.3 <i>Análisis de poblaciones microbianas</i>	5
3.3.1 <i>Extracción de DNA de muestras de heces</i>	6
3.3.3 <i>Reacción en cadena de la polimerasa qPCR para detección de bacterias</i>	7
3.4 <i>Análisis del microbioma ('Microbiome Analyst'®)</i>	8
3.5 <i>Procesamiento y análisis estadístico de los datos</i>	9
4. RESULTADOS	9
4.1 <i>Valoración dietética y antropométrica de la población</i>	9
4.2 <i>Relación de filos en la microbiota Intestinal</i>	11
4.3 <i>Cambios inducidos en la microbiota intestinal</i>	12
4.4 <i>Estudio del microbioma</i>	13
5. DISCUSIÓN	16
6. CONCLUSIONES	19
7. RECOMENDACIONES	19
8. BIBLIOGRAFIA	20

RESUMEN

Introducción: En los últimos años se ha evidenciado la relación, si bien no causal, que existe entre las patologías (inmuno)metabólicas y la microbiota intestinal. En este sentido llaman la atención ciertas especies con capacidades “beneficiosas” del género *Bacteroides spp* debido a su influencia en el sistema inmune. Las intervenciones nutricionales tienen la capacidad de modular la composición de la microbiota, de la misma manera el sistema inmune tiene gran comunicación e influencia sobre el microbioma; en este sentido, las intervenciones inmunonutricionales han sido poco exploradas. **Objetivo:** Determinar, con una perspectiva de género, la influencia de una intervención inmunonutricional sobre la proporción de miembros del género *bacteroides* que están asociados positivamente con el control de patologías metabólicas. **Material y Métodos:** Se incluyeron dos grupos de voluntarios sanos (n=12/grupo), los cuales se sometieron a distintas intervenciones inmunonutricionales en paralelo. Se tomaron muestras fecales al inicio y al final del estudio; a partir de las cuales se realizó una extracción del DNA microbiano para posteriormente cuantificar los cambios en su microbiota intestinal mediante la técnica qPCR. **Resultados:** La intervención funcional no presenta efecto negativo en los microorganismos que componen la microbiota intestinal, mientras que, la intervención comercial reduce la composición de la microbiota en el género masculino. La relación *Bacillota/Bacteroidota* no se ve alterada en ninguno de los grupos de intervención. Al considerar la perspectiva de género, la población masculina se caracteriza por la pérdida del efecto positivo de la formulación funcional en la expansión del filo *Bacteroidota* y especies como *Bacteroides fragilis* (*B. fragilis*), la cual mostró un efecto positivo y significativo en la población femenina. **Conclusión:** La intervención mediante la formulación funcional genera cambios positivos incrementando la población del filo *Bacteroidota*, estos cambios presentan una orientación particular atendiendo a género y en función de especies determinadas.

Palabras clave: Microbiota intestinal, *Bacteroides spp.*, patologías metabólicas, inmunonutrición.

1. INTRODUCCIÓN

Datos de la OMS muestran que las Enfermedades No Transmisibles (ENT) tienen una elevada prevalencia y son responsables del 74% de las muertes a nivel mundial, entre las principales se encuentran las patologías cardiovasculares, accidentes cerebrovasculares, cáncer, enfermedades respiratorias crónicas y diabetes (OMS, 2022). Al mismo tiempo, el Síndrome Metabólico (SM), es una condición que también va en aumento, constituyéndose una verdadera epidemia. La Federación Internacional de Diabetes (IDF) estima que un cuarto de la población mundial tiene SM, esta condición aumenta en 2 veces el riesgo de desarrollar enfermedad cardiovascular (ECV) y en 5 veces el riesgo de padecer diabetes mellitus tipo 2 (DM2), además de otros desórdenes relacionados (Carvajal, 2018).

Las patologías metabólicas representan una carga importante de morbilidad a nivel global. En cuanto a la población Española, en 2016 las ENT fueron la principal causa de muerte (92,8%) (OCDE, 2021; Soriano et al., 2016). Respecto a su distribución por género se ha visto bastante variabilidad según la patología, el estudio de Higuera y colaboradores (2022), sobre la prevalencia del SM en el ámbito laboral concluye que los hombres presentan mayor riesgo de contraerlo; el estudio de Fernández-Bergés y colaboradores (2012), realizado en 10 comunidades autónomas encontró una prevalencia de 32% en hombres y de 29% en mujeres, predominando en el sexo masculino hasta los 55 años y en el femenino a partir de los 65. Por otro lado, el Departamento de Investigación “Statista”, menciona que en 2018, aproximadamente el 52% de la población Española diagnosticada con enfermedades metabólicas eran mujeres (Departamento de investigación “Statista”, 2018).

Las patologías metabólicas como la diabetes mellitus tipo 2, el síndrome metabólico, el hígado graso, hipertensión y la dislipidemia se caracterizan por alteraciones en el metabolismo glucolipídico, estados proinflamatorios y protrombóticos (Gallo et al., 2008; Laclaustra et al., 2005). El vínculo entre todas ellas se atribuye a la resistencia insulínica (asociada con una distribución abdominal de grasa), favorecida por el aumento de ácidos grasos libres, muchas veces relacionado con el sobrepeso. Este estado provoca trastornos en la utilización de glucosa celular, así como desregulación de su producción hepática (Gallo et al., 2008; Laclaustra et al.; 2005). El estado inflamatorio crónico se asocia con alteraciones tanto en la función del tejido adiposo como en las células inmunes que están presentes en este tejido.

En los últimos años se ha evidenciado la relación, si bien no causal, que existe entre las patologías metabólicas y la microbiota intestinal, la cual es el conjunto de diversos microorganismos (bacterias, virus, hongos, arqueas y protozoos) que habitan en el intestino (Hernandez J et al., 2021). Actualmente es considerada como un órgano, ya que participa activamente en procesos inmunológicos y metabólicos cumpliendo funciones vitales para el organismo. Los mecanismos por los que actúa la microbiota son mediante la regulación del balance energético, la producción de metabolitos beneficiosos, la interacción con receptores inmunológicos, la regulación del apetito y el metabolismo de los nutrientes (Valero et al., 2015). Dentro de las bacterias que habitan en el intestino, los filos predominantes son *Bacillota*, *Bacteroidota* y *Actinobacteria*; en menor proporción están las *Proteobacterias*, *Fusobacterias* y *Verrucomicrobia* junto con pocas especies del dominio Arquea. Algunas enfermedades crónicas no transmisibles (Síndrome metabólico, enfermedades inflamatorias, cáncer y algunos trastornos neurológicos) se asocian a disbiosis: pérdida de riqueza y/o diversidad de especies en la microbiota intestinal (Hernandez et al., 2021; Price et al., 2022).

Se han evidenciado cambios en la Microbiota intestinal en personas con patologías metabólicas respecto a individuos sanos (Hernández et al., 2021). Algunos estudios han encontrado asociación entre niveles mayores del filo *Bacillota* y *Actinobacteria* respecto al filo *Bacteroidota* en la obesidad y la DM2; si bien no es consistente entre los estudios, la mayor proporción de autores utilizan la relación *Bacillota/Bacteroidota* como estimador de posibles desbalances entre estos filos describiendo variaciones positivas del mismo. A nivel de género *Ruminococcus* y *Blautia* (del filo *Bacillota*) se vieron positivamente asociados con la DM2, mientras que *Bifidobacterias* y *Bacteroides spp.* parecen ser protectoras. Además, se encontró que una menor diversidad de bacterias intestinales, tanto dentro de la muestra (diversidad alfa) como dentro de las poblaciones (diversidad beta), también se asocia con una menor salud metabólica y resistencia a la insulina (Price et al., 2022).

La alteración de la composición de la microbiota intestinal puede contribuir a la inflamación crónica de bajo grado (a través de mecanismos inmunes y permeabilidad intestinal) y la resistencia a la insulina, lo que a su vez puede aumentar el riesgo de desarrollar patologías metabólicas (Zhang et al., 2013). Además, se ha demostrado que la microbiota intestinal de las personas obesas difiere de la de las personas delgadas, lo que sugiere que su composición puede influir en el metabolismo energético y el almacenamiento de grasa (Hemarajata et al., 2013); se ha observado que una mayor proporción del filo *Bacillota* está asociada con la recolección de más energía (Xu et al., 2023). Respecto al filo *Bacteroidota* (varios estudios los

señalan como los mayores productores de propionato en el intestino humano) (Ríos Covián, 2017), se conocen 2 géneros, *Prevotella* y *Bacteroides*, este último es uno de los géneros predominantes en el intestino humano, se caracterizan por ser bacterias gram negativas, anaerobias obligadas con un papel importante en el mantenimiento de la red alimentaria microbiana del intestino además de promover la estabilidad de un ecosistema intestinal sano (Zafar y Saier, 2021.; Yoshida et al., 2020) Como microorganismos mutualistas pueden proporcionar protección contra patógenos y suministrar nutrientes a otros residentes microbianos del intestino. Por otro lado, algunas especies pueden resultar patógenas según su ubicación en el cuerpo, generalmente cuando están fuera del intestino (Zafar y Saier, 2021). Asimismo, este género puede tener efectos beneficiosos para la salud a través de mecanismos metabólicos e inmunológicos. Se ha visto que ciertos metabolitos resultantes de procesos de interacción microbiana cruzada como los AGCC producidos por los *Bacteroides* tienen una importante función reguladora en la homeostasis de la glucosa y metabolismo de los lípidos, se considera que dichos metabolitos desempeñan un papel inmunometabólico central (Ríos Covian et al., 2017; Yoshida et al., 2020).

Se ha demostrado que la abundancia de ciertas especies de *Bacteroides* se “agotó” en pacientes con fenotipos metabólicos relacionados con la hiperlipidemia, lo que sugiere la necesidad de evaluar los roles mutualistas de *Bacteroides* en el síndrome metabólico (Xu et al., 2023). Estudios preclínicos mediante la administración oral de *B. vulgatus* Bv46, observaron que fue capaz de remodelar el microbioma intestinal desequilibrado por una dieta alta en grasas, con un aumento del filo *Bacteroidota* y disminución del *Bacillota*, junto con la reducción de la relación *Bacteroidota/Bacillota*, observada generalmente en individuos sanos sin obesidad o síndrome metabólico. De igual manera, se ha asociado la administración de *Bacteroides acidifaciens* (*B. acidifaciens*), *Bacteroides dorei* (*B. dorei*), *Bacteroides vulgatus* (*B. vulgatus*), *Bacteroides thetaiotaomicron* (*B. thetaiotaomicron*) y *Bacteroides uniformis* (*B. uniformis*) con mejoras en trastornos metabólicos como la adiposidad y la aterosclerosis (Xu et al., 2023). Los *Bacteroides* ejercen beneficios principalmente mediante el Polisacárido A (PSA) una molécula producida por bacterias comensales (Troy et al., 2010), a través de esta, *Bacteroides fragilis* (*B. fragilis*) y *B. vulgatus* tienen la capacidad de modular el sistema inmune y proporcionar efectos antiinflamatorios (Ríos Covian et al., 2017; Troy et al., 2010).

Se ha visto que uno de los factores que más influye en la composición de la microbiota intestinal es la dieta, esto sumado a factores como el estilo de vida, estrés, entorno geográfico, edad, tipo de parto entre otros van a hacer que cada persona tenga una microbiota única

(Hernández, 2021), en este contexto es clave identificar las principales bacterias implicadas en las patologías metabólicas. En este sentido, la nutrición de precisión es una estrategia tanto de prevención como de tratamiento; se ha demostrado que la respuesta metabólica a alimentos específicos es individual, dependiendo de la composición particular de la microbiota intestinal, la modulación de grupos bacterianos específicos mediante la alimentación puede devolver el equilibrio a la microbiota y contribuir a una microbiota con capacidad de pasar de estados de enfermedad a situaciones más saludables (Zmora, 2016). Dada la comunicación del sistema inmune con la microbiota, se han propuesto nuevas estrategias como la inmunonutrición (i.e. administración de agonistas inmunonutricionales) (Laparra, 2017).

Enfocándonos en el filo *Bacteroidota*, específicamente en el género *Bacteroides* y con el conocimiento de especies que pueden contribuir a mejorar las patologías metabólicas, se ha determinado el objetivo del estudio.

2. OBJETIVO

- Determinar, con una perspectiva de género dados los escasos datos en este sentido, la influencia de una intervención inmunonutricional sobre la proporción de miembros del género *Bacteroides* que están asociados positivamente con el control de patologías metabólicas.

La hipótesis de partida del trabajo es: La intervención inmunonutricional es capaz de aumentar la proporción y/o actividad de *Bacteroides* “protectores” contra patologías metabólicas.

Los objetivos específicos que se desprenden del objetivo general son los siguientes:

1. Realizar una revisión bibliográfica sobre el tema.
2. Cuantificar los cambios en la composición de los grupos microbianos (*Bacillota/Bacteroidota/B. fragilis*, *B. vulgatus*, *B. uniformis*) mediante la técnica q PCR.
3. Redactar la memoria.

3. MATERIAL Y METODOS

3.1 Sujetos de estudio y obtención de muestras

El estudio se llevó a cabo con voluntarios sanos (18-25 años) con índice de masa corporal entre 18-26, sin tratamiento farmacológico activo y sin ingesta de pre/probióticos durante, al menos, 15 días (comité de ética nº IMD PI-053, IMDEA Alimentación) conforme a los estándares

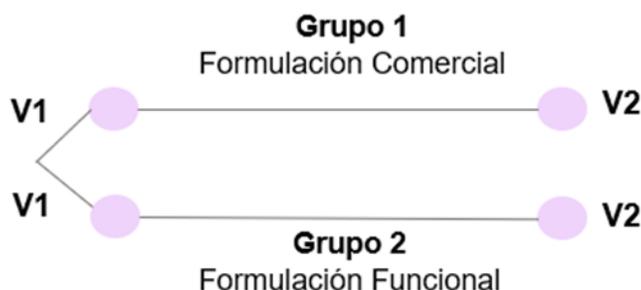
éticos de los comités institucionales responsables de la experimentación humana y de acuerdo con la Declaración de Helsinki de 1975 revisada en 1983.

3.2 Intervención inmunonutricional

Los voluntarios se aleatorizaron en dos grupos (n=12/grupo; n=6/grupo con perspectiva de género) quienes, tras recibir consejería nutricional, recibieron en forma de galleta dos formulaciones: Grupo 1, formulación comercial y Grupo 2, formulación funcional con ingredientes inmunonutricionales.

La administración de los productos se llevó a cabo con un diseño ‘doble ciego’ durante 12 días en una intervención en paralelo (**Figura nº1**). Se tomo muestra en ambas visitas (V1 y V2) de revisión de los voluntarios.

Figura nº1. Esquema del estudio de intervención con las formulaciones de ‘galleta’ comercial y funcional.



La obtención de muestras fue guiada con instrucciones precisas del modo de deposición y toma de alícuota por el equipo de la plataforma GENYAL de estudios clínicos en IMDEA Alimentación. Las muestras fueron conservadas en las instalaciones del Instituto Madrileño de Estudios Avanzados en Alimentación (IMDEA Alimentación) en un congelador a -80 °C hasta su análisis.

En el momento de toma de muestra se llevó a cabo el análisis antropométrico y de ingesta dietética de los voluntarios participantes, así como bioquímica general y de respuesta hepática.

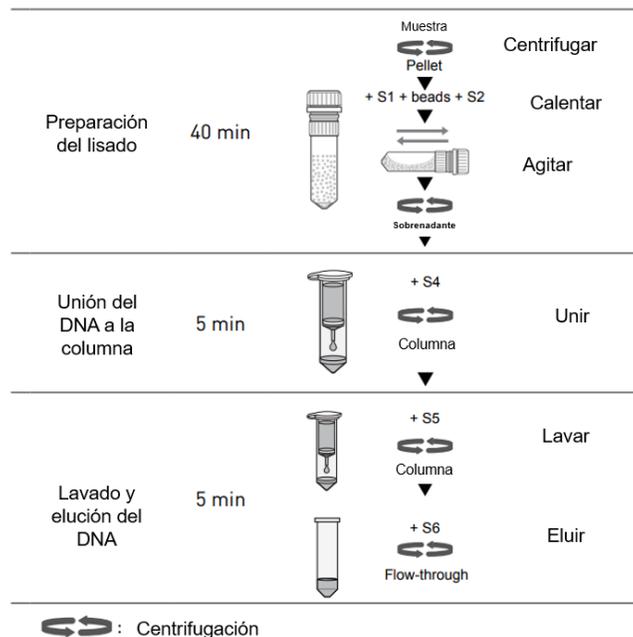
3.3 Análisis de poblaciones microbianas

El estudio de las poblaciones microbianas comenzó con la extracción de DNA a partir de las muestras de heces para posteriormente realizar la cuantificación bacteriana por RT-q PCR.

3.3.1 Extracción de DNA de muestras de heces

La extracción de DNA se realizó utilizando el *PureLink™ Microbiome DNA Purification Kit* (*Invitrogen Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, California USA, ref: A29789*) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se emplearon alícuotas (50 mg) de las muestras de contenido colónico se diluyeron en el reactivo facilitado en el kit y se homogeneizó completamente mediante agitación en vortex. La **figura nº2** muestra el flujo de trabajo para la obtención de DNA microbiano.

Figura nº 2. Flujo de trabajo para la extracción de DNA microbiano



Este Kit permite una purificación eficiente y de alta calidad de ADN microbiano y del huésped, mediante una combinación de técnicas de lisis térmica, química y mecánica (Los equipos utilizados para dichos procesos fueron *Thermo-shaker*, *Kisker-biotech* para la lisis térmica y el *Tissuelyser II*, *Qiagen para la lisis mecánica*), proporcionando una recuperación de ADN de alta pureza compatible con aplicaciones posteriores comunes, como qPCR.

3.3.2 Cuantificación del ADN microbiano

Una vez extraídas las muestras de ADN se realizó su cuantificación en el espectrofotómetro *NanoDrop 2000 de ThermoFisher Scientific* a partir de un volumen de muestra de 1.5 uL, midiendo los ratios de absorbancia entre 230/260 nm y 260/280 nm, los cuales

permiten evaluar la pureza del ADN cuantificado. La normalización de concentraciones entre las muestras se realizó con un ajuste de una concentración final de 50ng/μl.

3.3.3 Reacción en cadena de la polimerasa qPCR para detección de bacterias

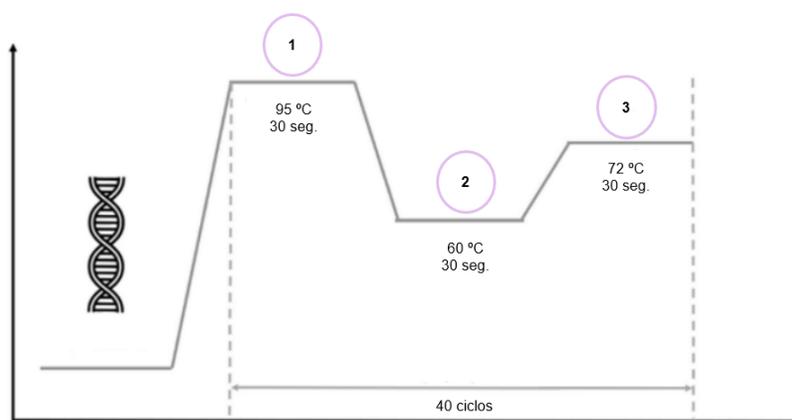
Se analizó la composición de la microbiota mediante qPCR en tiempo real (Jian et al., 2020). En el análisis se utilizaron cebadores específicos (**Tabla 1**) para cuantificar los diferentes grupos bacterianos de la microbiota intestinal, conforme a estudios previos (Laparra et al., 2012). Cada mezcla de reacción de PCR fue realizada en un volumen final de 10 uL. Los componentes empleados en la reacción se muestran en la siguiente tabla:

Tabla nº 1 Componentes empleados en la reacción de RT-qPCR

COMPONENTES	VOLUMEN
Primers Forward/Reverse	1 μL
SyBr Green PCR Master Mix-Applied Biosystems, Lithuania (x2)	5 μL
H2O libre de DNAsas	1.5 μL
DNA (20 ng/ μL)	2.5 μL

Posteriormente, la amplificación y cuantificación del contenido microbiano se realizó con el Termociclador: QuantStudio 12k Flex Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Reino Unido). El equipo se programó en una 1ª etapa de apertura, 95°C durante 30s; 2ª etapa de hibridación, 60 °C durante 30s y 3ª etapa de extensión, 72 °C durante 30s durante 40 ciclos (**Figura nº2**). La especificidad de la reacción fue determinada mediante las curvas de Melting al concluir la PCR.

Figura nº 3 Programación de tiempo y temperatura de las etapas de la RT -qPCR



El contenido microbiano se calculó conforme a la siguiente fórmula:

$$\text{Contenido (Log [número de copias])} = (\text{DNAreacc} * 6.022 \times 10^{23}) / (\text{LgthAmpl} * 1 \times 10^9 * 650)$$

siendo, DNAreacc = cantidad de DNA utilizada en la reacción y LgthAmpl= longitud del producto de amplificación de cada secuencia (<https://www.thermofisher.com/es/es/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/dna-copy-number-calculator.html>). El resultado final se expresó por gramo de muestra de heces.

Se utilizaron seis concentraciones estándar distintas para construir las curvas estándar utilizadas en la cuantificación de la microbiota (Laparra et al., 2012).

La identificación de las poblaciones bacterianas de interés se determinó mediante cebadores específicos **Tabla N° 2**.

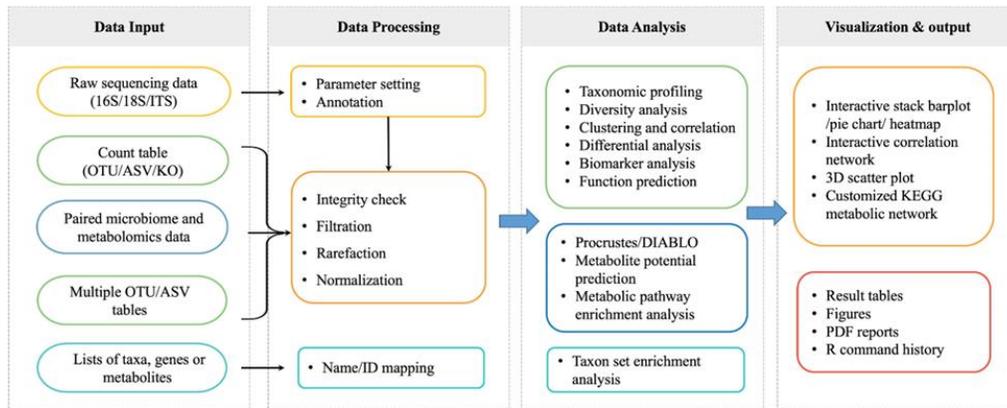
Tabla n° 2 Cebadores utilizados en la cuantificación de las poblaciones bacterianas

Grupo Diana	Cebador	Secuencia (5 a 3)	Producto (pb)	Annealing T (°C)	Referencia	
Bacterias Totales	HDA1	ATCCCTACGGGAGGCAGCAGT	200	59	Laparra et al., 2020.	
	HDA2	GTATTACCGCGGCTGCTGGCAC				
<i>Bacillota</i>	Firm 1	TGAAACTYAAAGGAATTGACG	149-157	60		
	Firm 2	ACCATGCACCACCTGTC				
<i>Bacteroidota</i>	Bact1060R	AGCTGACGACAACCATGCAG	126	60		Guo, 2008
	Bact 934 F	GGARCATGTGGTTTAATTCGATGAT				
<i>Bacteroides fragilis (grupo)</i>	Bfra531F	ATACGGAGGATCCGAGCGTTA	293	65	Vanhoutte et al., 2006	
	Bfra766R	CTGTTTGATACCCACACT				
<i>Bacteroides vulgatus</i>	BF VUL1	CGGGCTTAAATTGCAGATGA	147	63	Tong et al., 2011	
	BF VUL 2	CATGCAGCACCTTCACAGAT				
<i>Bacteroides uniformis</i>	B FUN 1	TCTCCGCATGGTAGAACTATTA	112	60		
	B FUN 2	ACCGTGTCTCAGTTCCAATGTG				

3.4 Análisis del microbioma ('Microbiome Analyst'®)

En el análisis del microbioma se utilizó el programa Microbiome Analyst® v2.0. El análisis de datos del microbioma es conceptualmente similar a otros flujos de trabajo de análisis de datos 'ómicos' y consta de tres etapas típicas: procesamiento de datos, análisis estadístico e interpretación funcional. (Lu et al., 2023) El flujo de trabajo consta de cuatro pasos principales (Figura n°4).

Figura nº 4 Flujo de trabajo Microbiome Analyst® v2.0



Esta herramienta en línea se encuentra disponible en: (<https://www.microbiomeanalyst.ca/MicrobiomeAnalyst/upload/OtuUploadView.xhtml>).

3.5 Procesamiento y análisis estadístico de los datos

Para el análisis de datos se calcularon las variaciones de los Log N° copias/gr. entre ambos grupos. El análisis de los resultados para las poblaciones microbianas se realizó mediante el empleo de la prueba T de Student. En todas las comparaciones se estableció el nivel de significancia estadística de $p < 0.05$. La representación gráfica de los resultados se realizó con el software Graph Pad Prims (GraphPad Prism versión 8.0.0 para Windows, GraphPad Software, San Diego, California USA).

4. RESULTADOS

4.1 Valoración dietética y antropométrica de la población

En el estudio realizado, la valoración antropométrica de los participantes pone de manifiesto características homogéneas entre ambos grupos (**Tabla nº3**). La valoración dietética indica un promedio de calorías y proteínas que se encuentra dentro de los valores normales recomendados por la OMS, la EFSA y la Fundación Española de la nutrición (European Food Safety Authority, 2019/ ANIBES, 2015); detectándose un ligero incremento en los lípidos y una disminución del aporte de carbohidratos (**Tabla nº4**).

Tabla nº3. Valoración antropométrica de la población

Formulación	Peso (Kg)	IMC (kg/m²)	%Grasa Total	%Masa Muscular	Cintura (cm)	Cadera (cm)
Comercial	64,31 ± 10,85	22,82 ± 2,94	26,89 ± 9,25	32,88 ± 7,39	73,31 ± 10,33	97,16 ± 5,27
Funcional	63,00 ± 8,07	22,29 ± 2,23	27,71 ± 10,16	32,07 ± 7,77	71,44 ± 5,70	97,82 ± 6,38

Los resultados se muestran como media ± SD (n=12/grupo, incluyendo ambos géneros).

Tabla nº 4. Valoración dietética de los participantes durante el estudio de intervención

	Grupo Comercial (GC)	Grupo Funcional (GF)
	Promedio ± SD	Promedio ± SD
Calorías (Kcal)	2057,32 ± 614,71	2016,69 ± 496,34
Carbohidratos (gr)	194,00 ± 79,36	176,44 ± 50,27
%HC/Valor calórico Total	39,35 ± 7,94	38,75 ± 6,63
Azúcares simples	70,26 ± 26,51	70,14 ± 24,92
Fibra (gr)	18,74 ± 6,84	20,97 ± 8,92
Proteínas (gr)	87,50 ± 30,57	83,74 ± 39,38
%Proteínas/ Valor calórico Total	17,02 ± 3,22	16,87 ± 3,32
Lípidos (gr)	91,71 ± 31,25	95,52 ± 30,28
%Lípidos/ Valor calórico Total	42,93 ± 6,53	43,75 ± 7,24
Ácidos grasos saturados	30,63 ± 12,19	29,39 ± 9,83
Ácidos grasos monoinsaturados	44,01 ± 13,83	40,87 ± 14,45
Ácidos grasos poliinsaturados	12,00 ± 4,43	13,12 ± 5,72
Omega 3/Omega 6	6,94 ± 2,66	8,90 ± 4,01
Índice glucémico	53,49 ± 6,26	47,95 ± 7,07

Los resultados se muestran como media ± SD (n=12/grupo, incluyendo ambos géneros).

4.2 Relación de filas en la microbiota Intestinal

Al cuantificar el contenido de microorganismos que componen la microbiota intestinal podemos observar que la intervención con la formulación funcional no presenta efecto negativo en la reducción de la misma (**Tabla nº 5**), si bien, la formulación comercial si tiene una influencia negativa y reduce la composición de la microbiota, si bien, solo para el género masculino. La variación se puede llegar a cuantificar en un 11.1% en el grupo 1 entre visitas V1-V2, mientras que resulta en un 9.3% con respecto al contenido en hombres cuantificado en la intervención con la formulación funcional (Grupo 2 en visita 2).

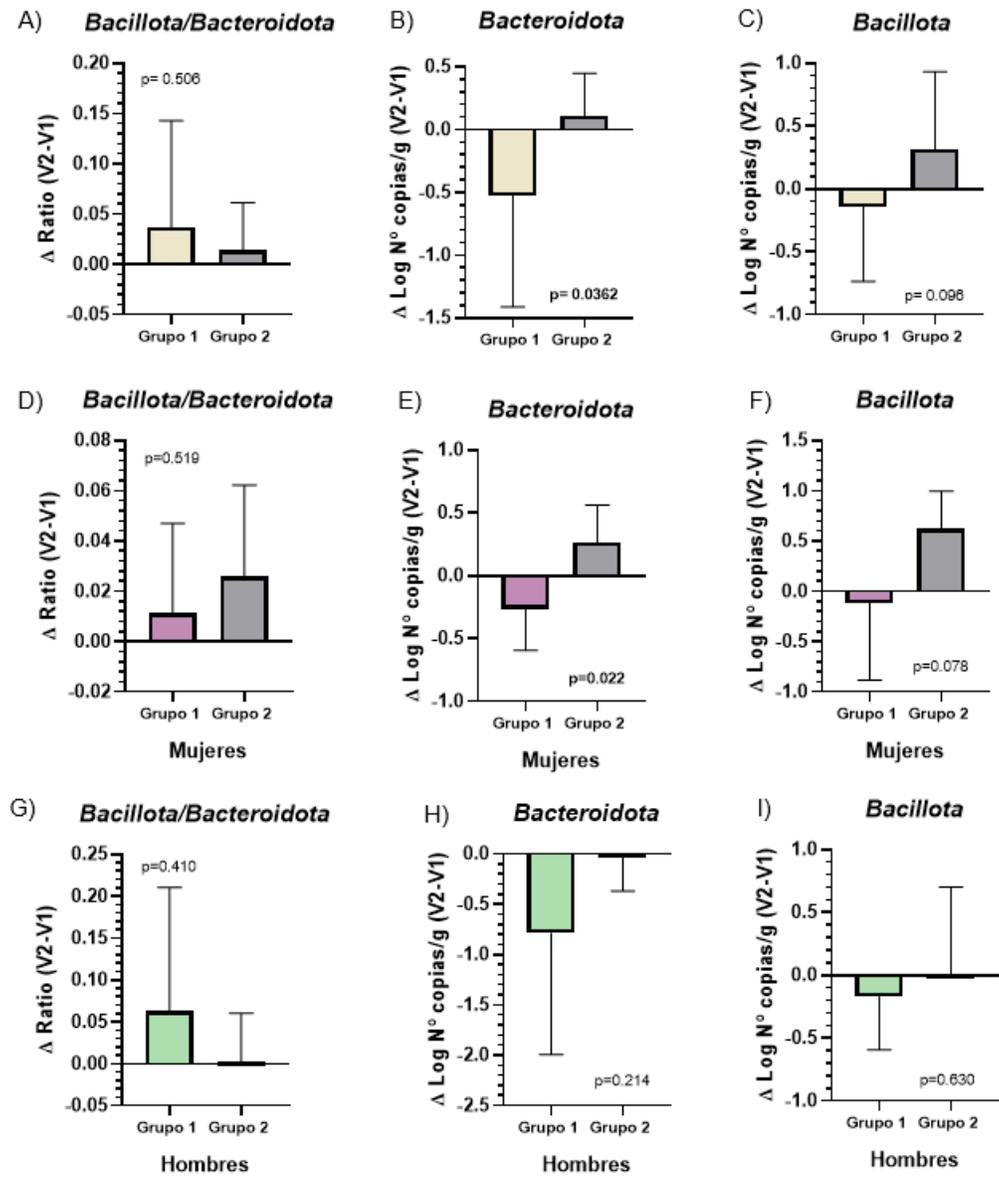
Tabla nº5. Contenido total de microorganismos en la población de voluntarios participantes en el estudio: perspectiva de género.

Grupo de Intervención	Contenido total de microorganismos			
	V1		V2	
	Mujeres	Hombres	Mujeres	Hombres
Grupo 1	13.69 ± 0.13 ^a	13.67 ± 0.13 ^a	13.32 ± 0.30 ^a	12.15 ± 1.49 ^{*,a}
Grupo 2	13.70 ± 0.29 ^a	13.52 ± 0.17 ^a	13.76 ± 0.28 ^a	13.39 ± 0.35 ^b

¹Contenido cuantificado mediante qPCR (Log N^o copias/muestra). Los valores se muestran como media ± SD (n=6). *Indica diferencias estadísticas (p<0.05) entre las visitas V1 y V2 para la misma categoría. ^{a,b} Indica diferencias estadísticas (p<0.05) entre la misma categoría para los distintos grupos de intervención.

Al considerar la variación de la microbiota entre visitas (**Figura nº5**), la relación entre los filas *Bacillota/Bacteroidota* no se ve alterada en ninguno de los grupos de intervención (Fig. 5A), si bien, el cálculo de las variaciones de los filas muestra variaciones con tendencias opuestas en ambos filas atendiendo al grupo de intervención considerado (Fig. 5 B y C). Estas observaciones nos permitirían hipotetizar un efecto positivo en la homeostasis metabólica de los voluntarios en la intervención con la formulación funcional. De modo similar, este perfil de variaciones en la microbiota se revelan, al considerar la perspectiva de género, en la población femenina (Fig. 5D-F). Sin embargo, la población masculina se caracteriza por la pérdida del efecto positivo de la formulación funcional en la expansión del filo *Bacteroidota* (Fig. 5G-I). Estos resultados sugieren que la intervención funcional podría tener un efecto favorable de tipo inmunonutricional derivado del mantenimiento de la población de *Bacteroides* spp.

Figura nº 5. Cambios en la microbiota en ambos grupos de intervención



A) Variación de población de Bacterias totales B) Variación de la relación entre filos *Bacillota/Bacteroidota*. C) Variación de población del filo *Bacteroidota*. D) Variación de población del filo *Bacillota*. Resultados expresados como la media \pm SEM (n=12/grupo en población total; n=6/grupo en población femenina y masculina). *Indica diferencias estadísticas (p= <0.05)

4.3 Cambios inducidos en la microbiota intestinal

El estudio se enfocó en valorar los cambios en especies concretas de microorganismos, específicamente sobre las especies del género *Bacteroides* - *B. fragilis*, *B. vulgatus* y *B. uniformis* - (Figura nº4). Estas especies presentan prevalencias del 100% en los voluntarios participantes

del estudio, independientemente del género e intervención a que se han sometido. En cuanto a la variación de las especies del género *Bacteroides* se cuantificó una variación significativa de carácter opuesto en el contenido de *B. fragilis* (Fig. 4A) en ambos grupos de intervención. La proporción de *B. vulgatus* (Fig. 4B) presenta un comportamiento opuesto en ambos grupos, mientras que la incidencia de *B. uniformis* (Fig. 4C) se ve incrementada independientemente de la intervención.

Al considerar la perspectiva de género en estos estudios, se revelan evidentes diferencias entre ambas intervenciones. En la población femenina, la formulación funcional presenta un efecto positivo sobre las especies de estudio alcanzando la significación estadística para *B. fragilis* y *B. vulgatus* (Fig. 4 D y E). Este efecto resulta opuesto en el grupo de intervención con la formulación comercial. Sin embargo, al considerar los voluntarios masculinos; las diferencias entre ambas formulaciones aparecen de un modo más coincidente entre ambas intervenciones atendiendo a *B. fragilis* y *B. uniformis*; mientras que *B. vulgatus* tiene la misma tendencia que en las mujeres (Fig. 4 G, H e I).

4.4 Estudio del microbioma

El estudio del microbioma en conjunto reveló la ausencia de variaciones significativas en la diversidad (índice de Shannon) microbiana en las distintas intervenciones (Fig. 5A). Sin embargo, al considerar la diversidad 'beta' si se identifican diferencias más marcadas entre las distintas intervenciones (Fig. 5B). En conjunto, los datos obtenidos nos permiten evidenciar que, si bien, la diversidad microbiana no sufre cambios muy significativos en función de la intervención llevada a cabo si pueden calcularse diferencias mínimas en la abundancia de las distintas especies en función de la visita de toma de muestra e intervención, tanto en los voluntarios en general (Fig. 5 C-E) como desde la perspectiva de género (Fig. 5 F-K) lo cual, sugiere cambios en los atributos genómicos y funcionales asociados con el género *Bacteroides*, los cuales, podrían explicar, al menos en parte los efectos a observar sobre los voluntarios.

Figura nº 4. Cambios de especies de *Bacteroides spp.* en ambos grupos

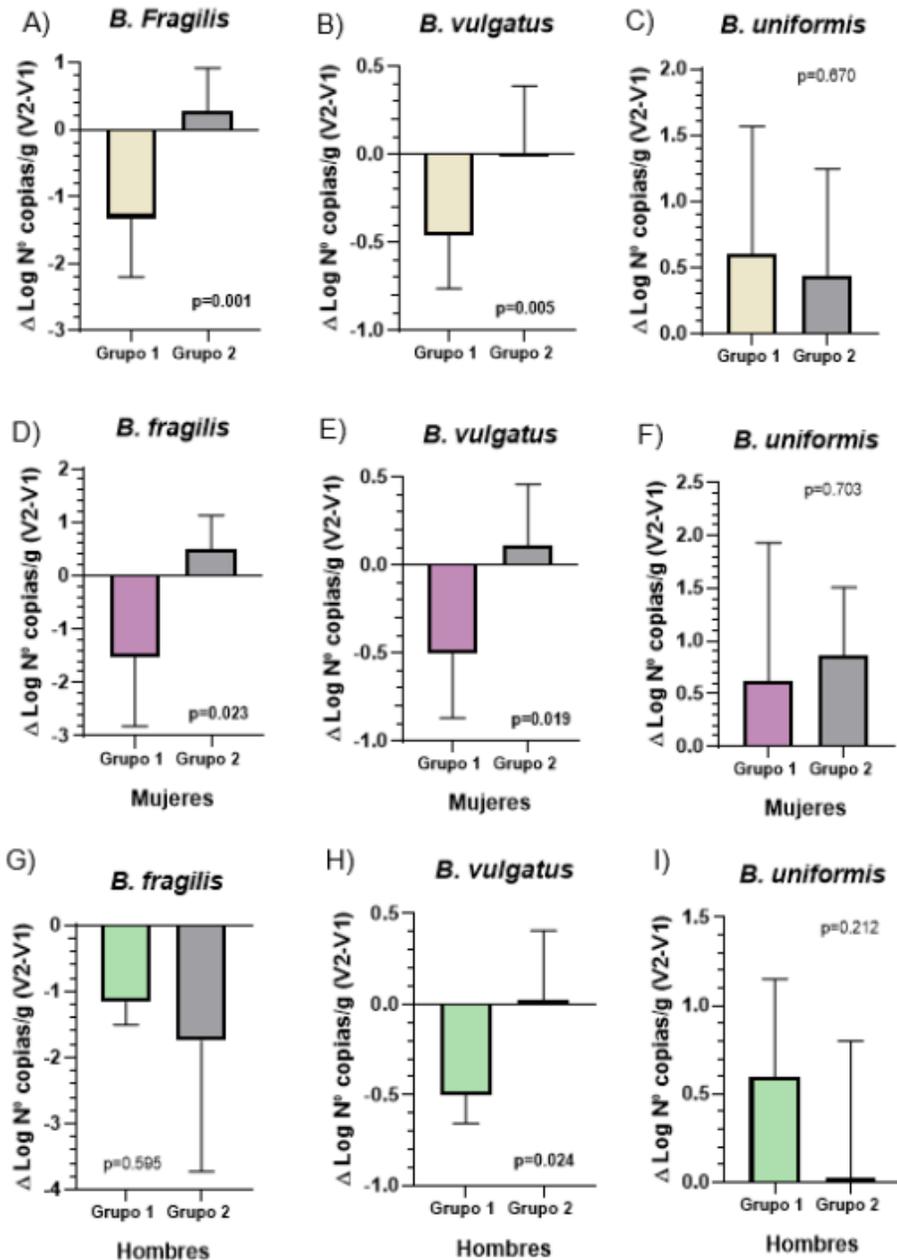
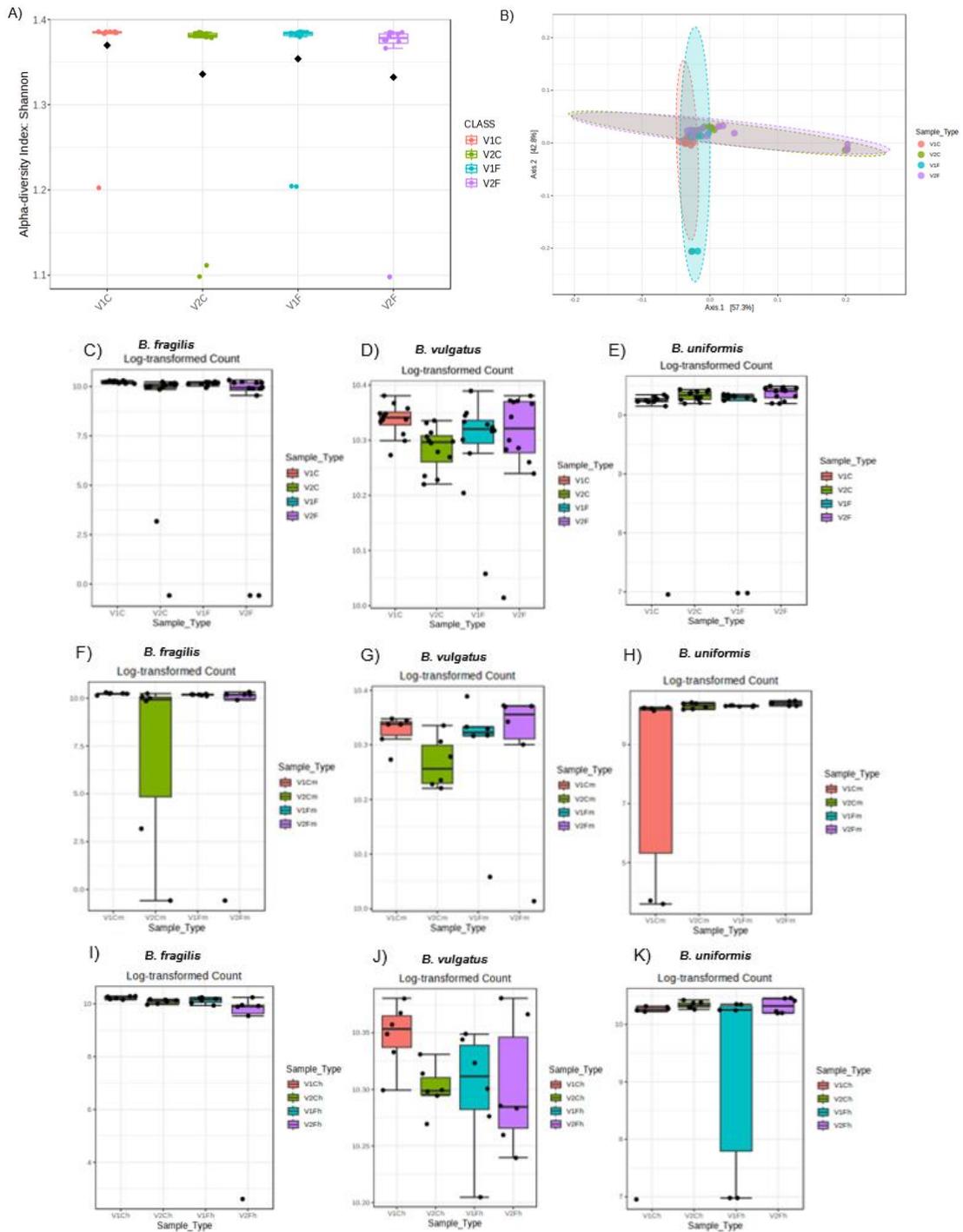


Figura nº4. A) Variación de *B. vulgatus* representada como $\Delta \text{V2-V1}$. B) Variación de *B. fragilis* representada como $\Delta \text{V2-V1}$. C) Variación de *B. fragilis* representada como $\Delta \text{V2-V1}$. D) Variación de *B. vulgatus* representada como $\Delta \text{V2-V1}$ en mujeres. E) Variación de *B. fragilis* representada como $\Delta \text{V2-V1}$ en mujeres. F) Variación de *B. fragilis* representada como $\Delta \text{V2-V1}$ en mujeres. D) Variación de *B. vulgatus* representada como $\Delta \text{V2-V1}$ en hombres. E) Variación de *B. fragilis* representada como $\Delta \text{V2-V1}$ en hombres. F) Variación de *B. fragilis* representada como $\Delta \text{V2-V1}$ en hombres. Resultados expresados como la media \pm SEM (n=12/grupo en población total; n=6/grupo en población femenina y masculina). Diferencias estadísticas (p= <0.05).

Figura nº5. Variación del microbioma en los distintos grupos de intervención

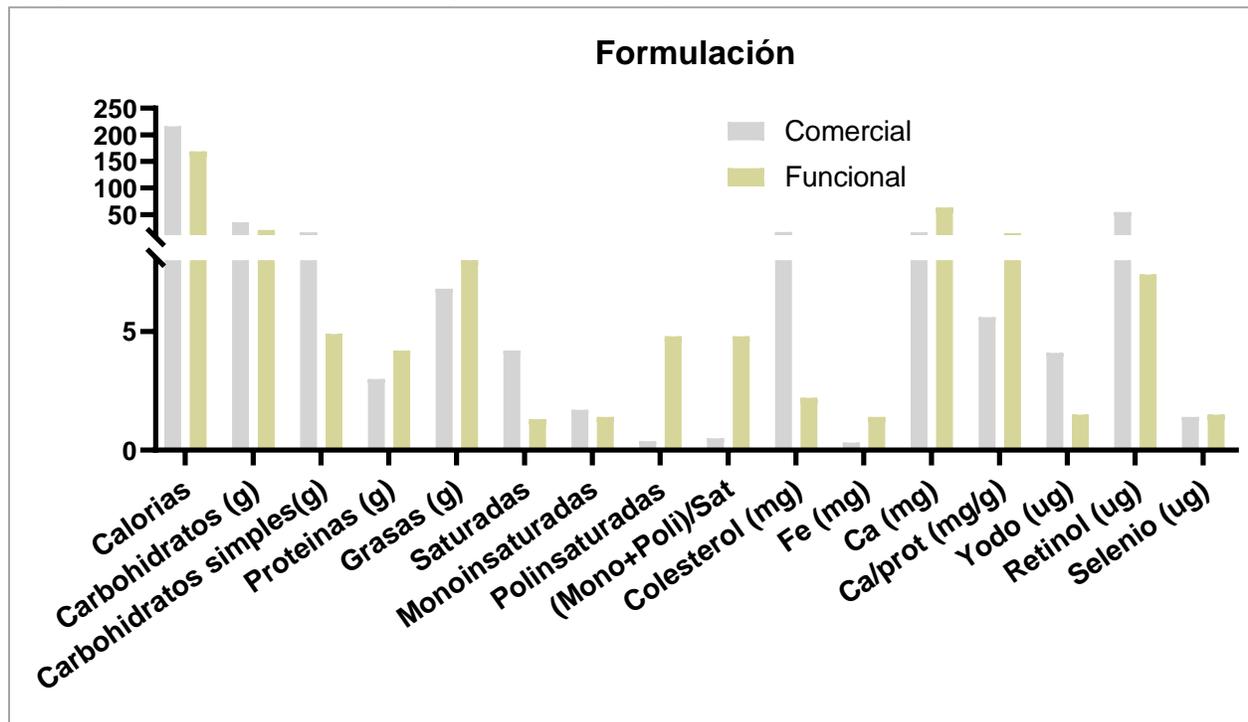


A) Diversidad “Alpha” (índice de Shannon). B) Diversidad “Beta”. C) Abundancia de *B. fragilis* D) Abundancia de *B. vulgatus*. E) Abundancia de *B. uniformis*. F-G-H) Abundancia de *B. fragilis*, *B. vulgatus* y *B. uniformis* en mujeres. I-J-K). Abundancia de *B. fragilis*, *B. vulgatus* y *B. uniformis* en hombres. I-J-K) Análisis calculados con el programa “Microbiome Analyst”. (n=12/grupo en población total; n=6/grupo en población femenina y masculina).

5. DISCUSIÓN

Este estudio demuestra la efectividad de una intervención inmunonutricional, basada en la administración de agonistas, principalmente el receptor inmunológico innato tipo ‘Toll’ (TLR)-4 intestinal (Selma-Gracia et al., 2020; Srdić et al., 2020), para promover cambios orientados y selectivos en el microbioma. La administración de la formulación funcional (**Figura nº5**) permite, sin modificar la relación de filos – *Bacillota/Bacteroidetes* – mantener y/o aumentar la proporción de algunos componentes del género *Bacteroides* spp. Estos cambios se han asociado a un mejor control de la trigliceridemia y producción de insulina en los voluntarios de la intervención (Laparra et al., 2023, solicitud de patente en curso).

Figura 8. Composición nutricional de las formulaciones administradas durante la intervención (Laparra et al., 2023, solicitud de patente en curso).



Los cambios en la microbiota intestinal están asociados con el estado de salud del huésped, con una participación activa en la promoción o desarrollo de diversas patologías metabólicas e inmunológicas (i.e., obesidad, diabetes tipo 2, NAFLD, etc). Generalmente, incrementos en la relación de filos *Bacillota/Bacteroidota* se asocian a patologías como la obesidad y diabetes tipo 2 entre otras (Magne et al., 2020), aunque, todavía existe un debate abierto sobre esta relación, ya que podemos encontrar estudios con resultados contradictorios (Schwiertz et al., 2010). En las intervenciones llevadas a cabo, la diversidad general de la microbiota no resultó modificada, aunque el estudio particular de especies del género *Bacteroides* revela que si existen cambios

significativos en la incidencia de algunas de ellas. Los estudios en humanos han generado resultados contradictorios y con elevada variabilidad, debido a la alta heterogeneidad interindividual en términos de dieta, edad y factores hormonales, y a la influencia en gran medida inexplorada del género. La uniformidad en la dieta de las poblaciones incorporadas en el estudio sugiere que “*a priori*” los beneficios no serían esperables alteraciones en la microbiota debido a diferencia calóricas y macro/micronutrientes dietéticos, lo que nos permite atribuir el efecto a los agonistas inmunonutricionales.

Las diferencias en la composición y/o actividad de la microbiota intestinal observada entre hombres y mujeres podría tener un papel dominante en la definición de las diferencias de género en la prevalencia de enfermedades inflamatorias intestinales y metabólicas. A este respecto, los escasos datos existentes ponen de manifiesto cambios ‘opuestos’ en la proporción de *Bacteroides spp*, tanto en personas obesas de género femenino y masculino, si atendemos al índice de masa corporal (IMC) (Haro et al., 2016); ↓ en mujeres con IMC <30, pero ↑ con IMC entre 30-33, pero vuelven a ↓ con IMC >33. Nuevamente, la ausencia de diferencias en el IMC entre la población de los grupos participantes en la intervención avala que los efectos sean debidos a los agonistas inmunonutricionales. Estudios previos han demostrado la menor abundancia del género *Bacteroides* en la población femenina (IMC, 25±4) (Dominianni et al., 2015). En este estudio, no se cuantificaron diferencias significativas ($p>0.05$) entre los contenidos de *Bacteroides spp* en la población femenina (Log N° copias/g, 13.2) en comparación con la masculina (Log N° copias/g, 12.79). Sin embargo, los datos obtenidos demuestran la efectividad de la intervención inmunonutricional para favorecer una mayor incidencia de este género bacteriano en la población femenina (Fig. 5 B y E). Esto podría tener un efecto significativo en el control de patologías como la obesidad ya que se ha asociado el incremento de la población de *Bacteroides spp*. con procesos favorables en la pérdida de peso (Luoto et al., 2011).

Además de funciones críticas en el sistema inmunológico por parte de los *Bacteroides spp*. (Zafar y Saier, 2021), la composición de especies en este género puede determinar cómo se almacena y utiliza la energía en el organismo (Haro et al., 2016). Un desequilibrio crónico entre la ingesta elevada y el gasto de energía disminuido constituye una de las principales causas de un almacenamiento excesivo de grasa, el cual, va a favorecer, entre otras, la pérdida de la función hepática y desarrollo de esteatosis hepática no alcohólica, síndrome metabólico y obesidad. En este contexto, las intervenciones conductuales y de estilo de vida tienen una eficacia limitada dada la participación de factores hormonales, así como inmunometabólicos con un papel determinante en el desarrollo de estas patologías. La microbiota intestinal tiene una función

importante en la regulación de la homeostasis del colesterol del huésped (Le Roy et al., 2019). Los *Bacteroides* se encuentran entre los componentes de la microbiota con un papel más relevante (~25%) en el metabolismo del colesterol (Le et al., 2022). Estos autores han identificado una sulfotransferasa sensible al colesterol en *Bacteroides* (enzima BT_0416) y han sugerido que este enzima responde a mecanismos dependientes de la dieta. Además, la participación de *Bacteroides* spp en el metabolismo del colesterol es mayor en comparación con la de otros microorganismos como *Bifidobacterias* spp (~7%) y *Lactobacillus* spp (~8%).

En el grupo de intervención con la formulación funcional se cuantificaron variaciones negativas (↓34%) en los valores de colesterol total en comparación con los participantes del Grupo_1. Generalmente, los hombres presentaron concentraciones más altas de colesterol que las mujeres (Laparra et al., 2023, solicitud de patente en curso). Esta observación nos permitiría hipotetizar que es uno de los motivos de la diferencia en la proporción de las distintas especies de *Bacteroides* que se han cuantificado entre la población femenina y masculina (Fig nº 6). Además, *B. uniformis* podría tener una ventaja metabólica derivada de su elevada versatilidad glicolítica (Benitez-Páez et al., 2017). Estas acciones metabólicas mediadas por los *Bacteroides* spp podrían tener un gran impacto en el control de la severidad de patologías como la esteatohepatitis no alcohólica (NASH) donde la lipotoxicidad mediada por la sobrecarga de colesterol libre hepático favorece la necroinflamación y la fibrosis (Horn et al., 2022). Igualmente, el proceso de resolución inmune es importante para generar una respuesta efectora adecuada, la cual, se ha asociado con el metabolismo del colesterol, revelando este como un actor con una función dual; agrava y controla la inflamación y actividad inmunológica (Cardoso y Perucha, 2021). *B. uniformis* se ha identificado como contribuyente positivo mejorando mejorando los mecanismos de defensa inmune, deteriorados en la obesidad (Gauffin et al., 2012). Estos efectos aparecen derivados de su influencia en la actividad de macrófagos, los cuales, desempeñan una función esencial en el control y desarrollo del NASH.

Además, *Bacteroides* spp desempeñan una función importante en la promoción de la salud gastrointestinal ya que los esfingolípidos derivados de estos son fundamentales para mantener la homeostasis y la simbiosis intestinal (Brown et al., 2019). Estas capacidades contribuyen, de modo importante, al mantenimiento y promoción de una microbiota 'más' saludable (Price et al., 2022). Así, el intestino se convierte en una fuente nutrientes y metabolitos que favorecen el estado nutricional, si bien, además señales y activación del sistema inmunológico. Por ejemplo, *B. vulgatus* Bv46 produce hidrolasas de ácidos biliares (i.e., cloilglicina hidrolasa) capaces de eliminar el grupo esteroide de los ácidos biliares (Xu et al., 2023) y minimizando la producción de

oxisteroles. *B. fragilis* presenta propiedades inmunomoduladoras debido a la producción de su polisacárido capsular (Troy et al., 2010) y se ha asociado, si bien, no de modo causal, a una mejor respuesta inmunológica protectora contra el cáncer colorrectal (Roberti et al., 2023). En conjunto, la promoción de estas especies en el Grupo_2 de la intervención avala el efecto positivo de la misma sobre la población de *Bacteroides* spp. Sin embargo, no hay que olvidar que la participación de *B. fragilis* en la salud intestinal todavía presenta aspectos que necesitan aclararse ya que su presencia también se ha asociado a la enfermedad de Chron (Becker et al., 2021) y agravar la obesidad en mujeres peri- y postmenopáusicas (Shen et al., 2022).

6. CONCLUSIONES

La intervención inmunonutricional asociada a la administración de la formulación funcional, si bien, una limitación del estudio es el tamaño muestral, favorece el aumento de la población del filo *Bacteroidota*, de modo específico en las especies de *B. fragilis* y *B. vulgatus* con un efecto género dependiente. Los cambios en la microbiota, relativos a las especies nombradas tiene lugar de modo específico atendiendo al género del huésped. Las variaciones cuantificadas permiten asumir la microbiota tras la intervención funcional como 'más saludable' en comparación con la población que recibe la formulación comercial.

Es importante conocer las alteraciones de la microbiota intestinal características de las patologías metabólicas, para desarrollar estrategias de intervención que orienten a la microbiota hacia estados más favorables de salud. En este sentido la nutrición de precisión es una gran estrategia ya que toma en cuenta las características individuales de cada persona.

7. RECOMENDACIONES

- Realizar un estudio con mayor número de voluntarios para conseguir resultados de mayor relevancia.
- Si bien este estudio estuvo enfocado en especies concretas, también se recomienda estudiar el comportamiento de los demás grupos microbianos apoyándose en técnicas de estudio de nueva generación, para analizar con mayor profundidad los cambios que ocurren en la microbiota a raíz de la intervención inmunonutricional.
- Continuar con la búsqueda de estrategias que tomen en cuenta la interacción existente entre los sistemas endocrino, inmune y de la microbiota; para tratar a los pacientes de manera holística, tomando en cuenta sus características individuales (edad, sexo, estilos de vida,

hábitos dietéticos, ubicación geográfica, aspectos psicológicos, sociales y espirituales), ya que el conjunto de todo esto tiene un impacto en la microbiota, y por tanto en la salud.

8. BIBLIOGRAFIA

- Benítez-Páez, A., Gómez del Pulgar, E. M., & Sanz, Y. (2017). The Glycolytic Versatility of *Bacteroides uniformis* CECT 7771 and Its Genome Response to Oligo and Polysaccharides. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7.
- Brown, E. M., Ke, X., Hitchcock, D., Jeanfavre, S., Avila-Pacheco, J., Nakata, T., Arthur, T. D., Fornelos, N., Heim, C., Franzosa, E. A., Watson, N., Huttenhower, C., Haiser, H. J., Dillow, G., Graham, D. B., Finlay, B. B., Kostic, A. D., Porter, J. A., Vlamakis, H., & Clish, C. B. (2019). *Bacteroides*-Derived Sphingolipids Are Critical for Maintaining Intestinal Homeostasis and Symbiosis. *Cell Host & Microbe*, 25(5), 668-680.e7.
- Cardoso, D., & Perucha, E. (2021). Cholesterol metabolism: a new molecular switch to control inflammation. *Clinical Science*, 135(11), 1389–1408.
- Carvajal, C. C. (2017). Síndrome metabólico: Definiciones, epidemiología, etiología, componentes y tratamiento. *Medicina Legal de Costa Rica*, 34(1).
- Dominianni, C., Sinha, R., Goedert, J. J., Pei, Z., Yang, L., Hayes, R. B., & Ahn, J. (2015). Sex, Body Mass Index, and Dietary Fiber Intake Influence the Human Gut Microbiome. *PLOS ONE*, 10(4), e0124599.
- Enciso-Higueras, J., Cortés-Aguilera, A. J., Rodríguez-Gómez, J. Á., Rey-Luque, Ó., Enciso-Higueras, J., Cortés-Aguilera, A. J., Rodríguez-Gómez, J. Á., & Rey-Luque, Ó. (2022). Prevalencia del síndrome metabólico en el ámbito laboral. *Ene*, 16(2).
- Fernández-Bergés, D., Cabrera de León, A., Sanz, H., Elosua, R., Guembe, M. J., Alzamora, M., Vega-Alonso, T., Félix-Redondo, F. J., Ortiz-Marrón, H., Rigo, F., Lama, C., Gavrila, D., Segura-Fragoso, A., Lozano, L., & Marrugat, J. (2012). Síndrome metabólico en España: Prevalencia y riesgo coronario asociado a la definición armonizada y a la propuesta por la OMS. Estudio DARIOS. *Revista Española de Cardiología*, 65(3), 241–248.
- Gallo, J., Aristizábal, D., Segura, Á., Correa, M., & Zapata, N. (2008). Relación de la resistencia a la insulina con la estructura, la función cardiaca y el metabolismo en adultos jóvenes no obesos. (*Acta Med Colomb*), 33(3), 117–126.
- Gauffin Cano, P., Santacruz, A., Moya, Á., & Sanz, Y. (2012). *Bacteroides uniformis* CECT 7771 Ameliorates Metabolic and Immunological Dysfunction in Mice with High-Fat-Diet Induced Obesity. *PLoS ONE*, 7(7), e41079.

- Guo, X., Xia, X., Tang, R., Zhou, J., Zhao, H., & Wang, K. (2008). Development of a real-time PCR method for Firmicutes and Bacteroidetes in faeces and its application to quantify intestinal population of obese and lean pigs. *Letters in Applied Microbiology*, 47(5), 367–373.
- Haro, C., Rangel-Zúñiga, O. A., Alcalá-Díaz, J. F., Gómez-Delgado, F., Pérez-Martínez, P., Delgado-Lista, J., Quintana-Navarro, G. M., Landa, B. B., Navas-Cortés, J. A., Tena-Sempere, M., Clemente, J. C., López-Miranda, J., Pérez-Jiménez, F., & Camargo, A. (2016). Intestinal Microbiota Is Influenced by Gender and Body Mass Index. *PLOS ONE*, 11(5), e0154090.
- Heike, Jamin, C., Liene Bervoets, Boleij, A., Xu, P., Pierik, M. J., Frank, Paul, Penders, J., & Jonkers, D. (2021). Higher Prevalence of *Bacteroides fragilis* in Crohn's Disease Exacerbations and Strain-Dependent Increase of Epithelial Resistance. *Frontiers in Microbiology*, 12.
- Hemarajata, P., Devaraj, S., & Versalovic, J. (2013). La microbiota intestinal humana y el metabolismo corporal: Implicaciones con la obesidad y la diabetes. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 47(2), 421–434.
- Hernández, J. Á., Fernández-Real, J. M., Aguilar, F. G., Gueimonde, M., Rodríguez, J. M., Pipaon, M. S. de, & Sanz, Y. (2021). Microbiota intestinal y salud. *Gastroenterología Y Hepatología*, 44(7-7), 519–535.
- Horn, C. L., Morales, A., Savard, C. E., Farrell, G. C., & Ioannou, G. N. (2021). Role of Cholesterol-Associated Steatohepatitis in the Development of NASH. *Hepatology Communications*, 6(1), 12–35.
- Jian, C., Luukkonen, P., Yki-Järvinen, H., Salonen, A., & Korpela, K. (2020). Quantitative PCR provides a simple and accessible method for quantitative microbiota profiling. *PLoS ONE*, 15(1).
- Laclaustra Gimeno, M., Bergua Martínez, C., Pascual Calleja, I., & Casasnovas Lenguas, J. A. (2005). Síndrome metabólico: Concepto y fisiopatología. *Revista Española de Cardiología Suplementos*, 5(4), 3D10D.
- Laparra Llopis, J. M., Brown, D., & Saiz, B. (2020). *Chenopodium Quinoa* and *Salvia Hispanica* Provide Immunonutritional Agonists to Ameliorate Hepatocarcinoma Severity under a High-Fat Diet. *Nutrients*, 12(7), 1946.
- Laparra, J. M., Olivares, M., Gallina, O., & Sanz, Y. (2012). *Bifidobacterium longum* CECT 7347 Modulates Immune Responses in a Gliadin-Induced Enteropathy Animal Model. *PLoS ONE*, 7(2), e30744.

- Laparra, J. M. (2017). La chía en estrategias inmunonutricionales. *ICU. Investigación, Ciencia Y Universidad*, 2(2).
- Le Roy, T., Lécuyer, E., Chassaing, B., Rhimi, M., Lhomme, M., Boudebbouze, S., Ichou, F., Haro Barceló, J., Huby, T., Guerin, M., Giral, P., Maguin, E., Kapel, N., Gérard, P., Clément, K., & Lesnik, P. (2019). The intestinal microbiota regulates host cholesterol homeostasis. *BMC Biology*, 17(1).
- Le, H. H., Lee, M.-T., Besler, K. R., Comrie, J. M. C., & Johnson, E. L. (2022). Characterization of interactions of dietary cholesterol with the murine and human gut microbiome. *Nature Microbiology*, 7(9), 1390–1403.
- Lu, Y., Zhou, G., Ewald, J., Pang, Z., Shiri, T., & Xia, J. (2023). *MicrobiomeAnalyst 2.0: comprehensive statistical, functional and integrative analysis of microbiome data*.
- Luoto, R., Kalliomäki, M., Laitinen, K., Delzenne, N. M., Cani, P. D., Salminen, S., & Isolauri, E. (2011). Initial Dietary and Microbiological Environments Deviate in Normal-weight Compared to Overweight Children at 10 Years of Age. *Journal of Pediatric Gastroenterology & Nutrition*, 52(1), 90–95.
- Magne, F., Gotteland, M., Gauthier, L., Zazueta, A., Pessoa, S., Navarrete, P., & Balamurugan, R. (2020). The Firmicutes/Bacteroidetes Ratio: A Relevant Marker of Gut Dysbiosis in Obese Patients? *Nutrients*, 12(5), 1474.
- OCDE. (2021). *Panorama de la Salud 2021 Indicadores de la OCDE*. <https://www.oecd.org/health/Panorama-de-la-Salud-2021-OCDE.pdf>
- Price, C. W., Guillaume Jospin, Brownell, K., Eisen, J. A., Laraia, B. A., & Epel, E. S. (2022). Differences in gut microbiome by insulin sensitivity status in Black and White women of the National Growth and Health Study (NGHS): A pilot study. *PLOS ONE*, 17(1), e0259889–e0259889.
- Roberti, M. P., Yonekura, S., Duong, C. P. M., Picard, M., Ferrere, G., Tidjani Alou, M., Rauber, C., Iebba, V., Lehmann, C. H. K., Amon, L., Dudziak, D., Derosa, L., Routy, B., Flament, C., Richard, C., Daillère, R., Fluckiger, A., Van Seuning, I., Chamillard, M., & Vincent, A. (2020). Chemotherapy-induced ileal crypt apoptosis and the ileal microbiome shape immunosurveillance and prognosis of proximal colon cancer. *Nature Medicine*, 26(6), 919–931.
- Sanz, Y. (2019). *Microbiota y enfermedades metabólicas*. Biocodex Microbiota Institute. <https://www.biocodexmicrobiotainstitute.com/es/pro/microbiota-y-enfermedades-metabolicas>

- Selma-Gracia, R., Haros, C. M., & Llopis, J. M. L. (2020). Inclusion of *Salvia hispanica* L. and *Chenopodium quinoa* into bread formulations improves metabolic imbalances derived from a high-fat intake in hyperglycaemic mice. *Food & Function*, *11*(9), 7994–8002.
- Shen, W.-D., Lin, X., Liu, H.-M., Li, B.-Y., Qiu, X., Lv, W.-Q., Zhu, X.-Z., Greenbaum, J., Liu, R.-K., Shen, J., Xiao, H.-M., & Deng, H.-W. (2022). Gut microbiota accelerates obesity in peri-/post-menopausal women via *Bacteroides fragilis* and acetic acid. *International Journal of Obesity (2005)*, *46*(10), 1918–1924.
- Soriano, J. B., Rojas-Rueda, D., Alonso, J., Antó, J. M., Cardona, P.-J., Fernández, E., Garcia-Basteiro, A. L., Benavides, F. G., Glenn, S. D., Krish, V., Lazarus, J. V., Martínez-Raga, J., Masana, M. F., Nieuwenhuijsen, M. J., Ortiz, A., Sánchez-Niño, M. D., Serrano-Blanco, A., Tortajada-Girbés, M., Tyrovolas, S., & Haro, J. M. (2018). La carga de enfermedad en España: resultados del Estudio de la Carga Global de las Enfermedades 2016. *Medicina Clínica*, *151*(5), 171–190.
- Srdić, M., Ovčina, I., Fotschki, B., Haros, C. M., & Laparra Llopis, J. M. (2020). *C. quinoa* and *S. hispanica* L. Seeds Provide Immunonutritional Agonists to Selectively Polarize Macrophages. *Cells*, *9*(3), 593.
- Statista. (2023). *The statistics portal for market data, market research and market studies*. Statista.com; Statista. <https://www.statista.com/>
- Tong, J., Liu, C., Summanen, P., Xu, H., & Finegold, S. M. (2011). Application of quantitative real-time PCR for rapid identification of *Bacteroides fragilis* group and related organisms in human wound samples. *Anaerobe*, *17*(2), 64–68.
- Troy, E., B. (2010). Beneficial effects of *Bacteroides fragilis* polysaccharides on the immune system. *Frontiers in Bioscience*, *15*(1), 25. <https://doi.org/10.2741/3603>
- Valero, Y., Colina, J., & Herrera, H. (2015). La microbiota intestinal y su rol en la diabetes. *Anales Venezolanos de Nutrición*, *28*(2), 132–144.
- Vanhoutte, T., De Preter, V., De Brandt, E., Verbeke, K., Swings, J., & Huys, G. (2006). Molecular Monitoring of the Fecal Microbiota of Healthy Human Subjects during Administration of Lactulose and *Saccharomyces boulardii*. *Applied and Environmental Microbiology*, *72*(9), 5990–5997.
- World Health Organization. (2022, September 16). *Noncommunicable Diseases*. World Health Organization. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/noncommunicable-diseases>
- Xu, M., Lan, R., Qiao, L., Lin, X., Hu, D., Zhang, S., Yang, J., Zhou, J.-R., Ren, Z., Li, X., Liu, G., Liu, L., & Xu, J. (2023). *Bacteroides vulgatus* Ameliorates Lipid Metabolic Disorders and

- Modulates Gut Microbial Composition in Hyperlipidemic Rats. *Microbiology Spectrum*, 11(1).
- Yoshida, N., Emoto, T., Yamashita, T., Watanabe, H., Hayashi, T., Tabata, T., Hoshi, N., Hatano, N., Ozawa, G., Sasaki, N., Mizoguchi, T., Amin, H. Z., Hirota, Y., Ogawa, W., Yamada, T., & Hirata, K. (2018). *Bacteroides vulgatus* and *Bacteroides dorei* Reduce Gut Microbial Lipopolysaccharide Production and Inhibit Atherosclerosis. *Circulation*, 138(22), 2486–2498.
- Zafar, H., & Saier, M. H. (2021). Gut *Bacteroides* species in health and disease. *Gut Microbes*, 13(1), 1–20.
- Zhang, Y., & Zhang, H. (2013). Microbiota associated with type 2 diabetes and its related complications. *Food Science and Human Wellness*, 2(3-4), 167–172.
- Zmora, N., Zeevi, D., Korem, T., Segal, E., & Elinav, E. (2016). Taking it Personally: Personalized Utilization of the Human Microbiome in Health and Disease. *Cell Host & Microbe*, 19(1), 12–20.